

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

Unidad Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Posgrado en Biología Experimental



“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINAS CLASE I EN CÉLULAS LINFÓIDES Y SU RELACIÓN CON LA GRAVEDAD DE LA LEUCEMIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS”

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTORA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA

Mtra.Biol.Exp. Laura Angelica Estrada Abreo
Matricula: 2133801762
Correo electrónico: estradaangelic15@gmail.com

CODIRECTORES

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Dr. Genaro Patiño López

JURADO

Presidente:

Dr. Julio César Almanza Pérez

Secretario:

Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo

Vocal:

Dr. Benjamín Pérez Aguilar

Vocal:

Dr. José Luis Gómez Olivares

Iztapalapa, Ciudad de México a 19 de Octubre de 2021



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Inmunología y Proteómica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con el apoyo de la Unidad de

Hemato-Oncología

El protocolo fue aprobado por el comité de ética del Hospital Infantil de México y del Hospital Pediátrico Moctezuma.

Declaración de originalidad

El (La) que suscribe esta declaración de originalidad de tesis es, alumna del posgrado de Biología Experimental, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor(a) de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: “Determinación de la expresión de las miosinas de clase I en células linfoides y su relación con la gravedad de la Leucemia en pacientes pediátricos”

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el jurado para lo obtención del grado de Doctora es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de esta, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 19 de Octubre del 2021.

Atentamente

Laura Angelica Estrada Abreo

Nombre y firma del alumno

Este documento debe ser firmado con tinta azul y debe anexarse copia en la tesis o idónea comunicación de resultados (tesina, reporte, etc.), el documento original será conservado por el Coordinador del Posgrado.

**“El Programa de Doctorado en Biología Experimental de la
Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad
(PNPC) del CONACYT, registro, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo,
Clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.**
Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302088

“Para la realización de la tesis de doctorado en Biología Experimental, la alumna Laura Angelica Estrada Abreo contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de la beca otorgada número: 302088”



El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINAS CLASE I EN CÉLULAS LINFOIDES Y SU RELACIÓN CON LA GRAVEDAD DE LA LEUCEMIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS”, que presentó

M. en Biol. Exp. LAURA ANGELICA ESTRADA ABREO

El día 19 de Octubre 2021
Sinodales:

PRESIDENTE

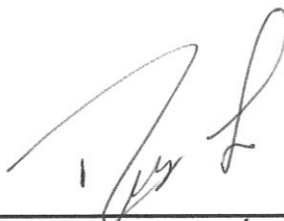
SECRETARIO

VOCAL 1

VOCAL 2

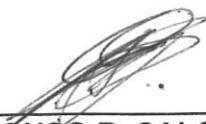
COMITÉ TUTORAL

DIRECTOR



Dr. LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ

ASESOR



Dr. ALFONSO R. SALGADO AGUAYO

INDICE

RESUMEN.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Epidemiología Cáncer Infantil.....	2
1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	3
1.3 Diagnóstico	3
1.4 Inmunofenotipo.....	4
1.5 Citogenética	5
1.6 Estratificación de Riesgo.....	6
1.6.1 Edad	6
1.6.2 Nivel de glóbulos blancos	6
1.6.3 Inmunofenotipo	6
1.6.4 Translocaciones	6
1.7 Tratamiento	7
1.7.1 Inducción a la remisión.....	7
1.7.2 Consolidación.....	7
1.7.3 Mantenimiento.....	7
1.7.4 Terapia Santuario.....	7
1.8 Recaídas.....	8
1.9 Migración Celular.....	8
1.10 Miosinas.....	9
1.11 Miosinas Clase I	9
1.11.1 Funciones de Miosinas Clase I	10
1.12 Migración y Cáncer	10
1.13 Miosinas Clase I y Cáncer.....	12
2. JUSTIFICACIÓN.....	14
3. HIPÓTESIS.....	15
4. OBJETIVO GENERAL	16
5. OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
6. METODOLOGÍA.....	18

6.1 Pacientes.....	19
6.2 Criterios de determinación de pacientes en estudio.....	19
6.2.1 Criterios de inclusión	19
6.2.2 Criterios de exclusión.....	19
6.2.3 Criterios de eliminación	19
6.3 Purificación de células mononucleares de sangre periférica.....	21
6.4 Purificación de Linfocitos B (Columnas magnéticas Miltenyi)	21
6.5 Expresión de Miosinas Clase I en CMN y Linfocitos B por PCR en tiempo real.....	22
6.6 Expresión de miosina 1G por Inmunofluorescencia	22
6.6.1 Tinción de Laminillas.....	22
6.7 Expresión de miosina 1G por Inmunocitoquímica	23
7. RESULTADOS	24
7.1 Evaluación de la Expresión de Miosinas Clase I	25
7.2 Evaluación de la expresión de Miosina 1G en CMN de pacientes	31
7.3 Evaluación de Miosina 1G en CMN por Inmunofluorescencia.....	35
7.4 Evaluación de la expresión de Miosina 1G por Inmunocitoquímica	41
7.5 Casos Clínicos.....	46
7.5.1 Caso 1	46
7.5.2 Caso 2	47
7.5.3 Caso 3	48
7.5.4 Caso 4	49
8. DISCUSIÓN.....	50
9. CONCLUSIONES.....	56
10. PERSPECTIVAS	57
11. BIBLIOGRAFÍA.....	58
12. ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura1. Registro de Incidencia en Cáncer en niños y adolescentes en 2017.....	2
Figura2. Cáncer en menores de 18 años. Registros en el IMSS 2012.....	3
Figura3. Marcadores celulares en los diferentes estadios de maduración de los linfocitos B yT.....	5
Figura4. Expresión relativa de las miosinas de Clase I en la LLA (F.C.).....	25
Figura5. Expresión de la Miosina 1B,1C y 1G en LLA.....	26
Figura6. Expresión de la Miosina 1A en LLA.....	27
Figura7. Expresión de la Miosina 1D en LLA.....	27
Figura8. Expresión de la Miosina 1E en LLA.....	28
Figura9. Expresión de la Miosina 1F en LLA.....	28
Figura10. Fold Change (F.C.).....	29
Figura11. Niveles de expresión de las Miosinas de Clase I en Linfocitos B y CMN de pacientes LLA.....	30
Figura12. Niveles de expresión de Linfocitos B y de CMN de individuos sanos.....	31
Figura 13. Expresión de la Miosina 1G en LLA.....	32
Figura 14. Expresión de la Miosina 1G en CMN de pacientes de Riesgo alto y Habitual.....	33
Figura 15. Niveles de expresión de la miosina 1G en pacientes con translocación (9:22) Cromosoma Filadelfia.....	34
Figura16. Niveles de expresión de la miosina 1G en pacientes con LLA al diagnóstico.....	35
Figura17. Expresión de Miosina 1G.....	66
Figura18. Análisis por Inmunofluorescencia de la proteína miosina 1G en pacientes con LLA-RA.....	36
Figura19. Análisis por Inmunofluorescencia de la proteína miosina 1G en pacientes con LLA-RH.....	36
Figura20. Análisis por Inmunofluorescencia de la miosina 1G en pacientes con recaída.....	37
Figura21. Análisis por Inmunofluorescencia de la miosina 1G en pacientes con diversa estratificación de riesgo.....	38
Figura22. Análisis por Inmunofluorescencia de la miosina 1G en pacientes con Infiltración.....	39
Figura23. Células Mononucleares (Inmunofluorescencia).....	40
Figura24. Análisis por Inmunocitoquímica de la proteína Myo1G en pacientes con LLA-RH.....	41
Figura25. Análisis por Inmunocitoquímica de la miosina 1G en pacientes con mala respuesta al tratamiento.....	42
Figura26. Análisis por Inmunocitoquímica de la proteína miosina 1G en pacientes con infiltración.....	43
Figura27. Análisis por Inmunocitoquímica de la proteína Myo 1G en pacientes con recaída.....	44
Figura28. Imágenes representativas de CMN de dos pacientes con LLA y dos individuos pediátricos sanos.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla1. Criterios de referencia para diagnóstico en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	4
Tabla2. Blastos en Sistema Nervioso Central en Leucemia Linfoblástica Aguda.....	11
Tabla3. Características clínicas de los pacientes y controles.....	20
Tabla4. Fold Change (F.C.) de Miosinas Clase I Linfocitos B (LB)-Células Mononucleares (CMN).....	65
Tabla5 Secuencias de primers para las miosinas de clase I y GAPDH.....	67
Tabla6. Fold Change (F.C.) de Miosina 1G al diagnóstico y en las fases de tratamiento.....	32

ABREVIATURAS

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LLA-B: Leucemia Linfoblástica Aguda linaje B

LLA-T: Leucemia Linfoblástica Aguda linaje T

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda

M.O: Médula Ósea

FAB: Franco Americano Británico

CD: Clúster de Diferenciación

Pre-B: Célula precursora B

CALLA: Antígeno Común de LLA

MLL: Gen de Linaje Leucémico Mixto

AR: Alto Riesgo

RH: Riesgo Habitual

EMR: Enfermedad Mínima Residual

SNC: Sistema Nervioso Central

Myo 1A: Miosina 1A

Myo 1B: Miosina 1B

Myo 1C: Miosina 1C

Myo 1D: Miosina 1D

Myo 1E: Miosina 1E

Myo 1F: Miosina 1F

Myo 1G: Miosina 1G

Myo 1H: Miosina 1H

LCR: Líquido cefalorraquídeo

ATP: Adenosin Trifosfato

TH: Tail Homology (Homología a tallo o a cola)

PH: Homologo a Pleckstrina

CMN: Células Mononucleares

RNA: Ácido Ribonucleico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato

UPL: Universal Probe Library (Biblioteca de Sondas Universales)

IgG: Inmunoglobulina G

PBS: Buffer de fosfato

IOD: Intensidad de Densidad Óptica

mRNA: RNA mensajero

Ct: Ciclo Treshold

Δ Ct: Diferencia del Ciclo treshold

$\Delta\Delta$ Ct: Diferencia de los Δ Ct

F.C.: Fold Change (medida de cambio)

SP: Sangre Periférica

LA: Leucemias Agudas

LLA-AR: Leucemia Linfoblástica Aguda Alto Riesgo

LLA-RH: Leucemia Linfoblástica Aguda Riesgo Habitual

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda es la neoplasia más común en la población pediátrica, representa el 80% del cáncer en niños, es frecuente en niños de 2 a 5 años de edad, causa afectación a dos linajes celulares, los linfocitos B y T. En este padecimiento el pronóstico se ve desfavorecido por una cuenta leucocitaria alta al diagnóstico, edad, aberraciones cromosómicas (citogenética), variación en marcadores de superficie (Inmunofenotipo) de células T, falla a la inducción a la remisión, infiltración al sistema nervioso central y recaída temprana en médula ósea, todos estos factores incrementan la gravedad de los pacientes con este padecimiento.

Actualmente existen reportes de que las miosinas (Myo) no convencionales Clase I juegan un papel importante en diversas funciones celulares como son endocitosis, exocitosis, tensión de la membrana, tráfico intracelular, rigidez de la membrana y migración, esta última función hace que estas proteínas se asocien con diversos tipos de cáncer. Los cambios en la expresión de estas proteínas podrían tener un impacto en la motilidad celular y en la formación de infiltrados y metástasis, por esta razón se decidió estudiarlas en Leucemia, en los pacientes reclutados en este estudio se determinó la expresión de las diferentes miosinas clase I en células mononucleares sanguíneas, sin embargo el principal enfoque fue en miosina 1G por su expresión en las células blanco (linfocitos) de la LLA, esto fue realizado por PCR en tiempo real, Inmufluorescencia e Inmunohistoquímica

Los resultados muestran en las células de los pacientes con LLA un aumento en la expresión de Miosina 1B y una asociación de sobreexpresión de Miosina 1G con diversos criterios de alto riesgo en los niños. La expresión de esta proteína aumenta en los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda en recaída y disminuida en los pacientes con infiltración. Para comprobar la asociación de Myo1G con algunos factores clínicos de alto riesgo de los pacientes, se considera necesario incrementar al grupo de los pacientes con el criterio clínico específico.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia is the most common neoplasm in the pediatric population, it represents 80% of cancer in children, is common in children 2 to 5 years of age. This condition affects two cell lineages, B and T lymphocytes.

The prognosis of this disease is disadvantaged for in children with high leukocyte counts at diagnosis, age, cytogenetics, T-cell immunophenotype, failure to induce to the remission, infiltration of the central nervous system and early relapse to the bone marrow, all these factors increase the severity of Patients.

Class I Myosins play an important role in various cell functions, such as endocytosis, exocytosis, membrane tension, intracellular traffic, membrane stiffness and cell migration. This last function relates class I myosins with various types of Cancer and the changes in the expression of these proteins could have an impact on cell motility and the formation of infiltrates and metastases, for this reason we began to study Myosin 1G in Leukemia. In the patients recruited in this study, the expression of the different class I myosin in blood mononuclear cells was determined by PCR in real time, Immunofluorescence and Immunohistochemistry, however we mainly focus was on myosin 1G due to its expression in the target cells (lymphocytes) of ALL.

We found an increase in the expression of Myosin 1B in the cells of patients with ALL and an association of overexpression of Myosin 1G with criteria of high risk in the patients. The expression of Myosin 1G is increased in patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in relapse and this is decreased in patients with infiltrations to SNC. Myosin 1G show tendency to increase in the cells of patients with clinical specific characteristics (translocations, relapse or infiltrates). We consider to increase the group of patients with the specific clinical criteria that showed the change in the expression (down and up) of the protein in the cells of patients compared to the control group. This increase in the number of the population will demonstrate if Myosin 1G could be a prognostic marker.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad crónica que se caracteriza por alteraciones genéticas y moleculares, que resultan en una proliferación celular descontrolada. Las células anormales crecen de manera invasiva y se propagan a los tejidos, lo que resulta en una falta de control en el funcionamiento normal del organismo¹. Cualquier parte del cuerpo puede verse afectada, razón por la cual se conocen más de 100 tipos de cáncer². En los niños representa la segunda causa de mortalidad en el país según cifras de la Secretaría de Salud.

1.1 Epidemiología Cáncer Infantil

Dentro de las principales causas de muerte en niños y adolescentes a nivel mundial encontramos al cáncer. Existen registros que demuestran que cada año se diagnostican aproximadamente 18 millones de casos nuevos en todo el mundo de los cuales 200, 000 afectan a la población pediátrica. Las estimaciones recientes señalan que en México el cáncer representa la primera causa de muerte en niños de 5 a 14 años ^{3,4}.

Los datos de registro de cáncer en niños y adolescentes determinaron que uno de los grupos más vulnerables ante este padecimiento son los niños de 0-4 años (Figura.1), mientras que la tasa de mortalidad es mayor en los niños con rango de edad de 15-19 años⁵.

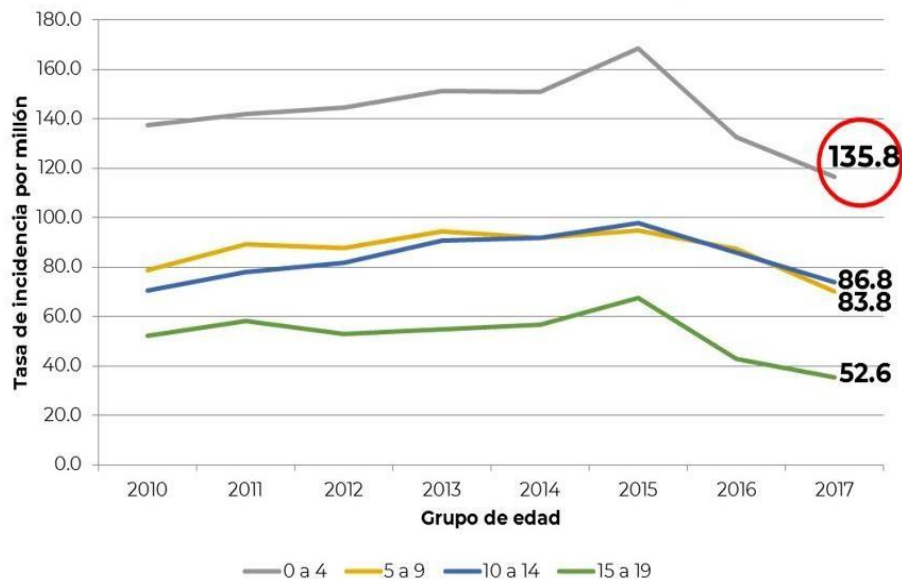


Figura1. Registro de Incidencia en Cáncer en niños y adolescentes en 2017. Gobierno de México. Dirección General de Información en Salud (DGIS).

<https://www.gob.mx/salud%7Ccensia/articulos/cancer-infantil-en-mexico-130956>.

La mayoría de los casos de cáncer en los niños son **Leucemia, Linfomas y Tumores del Sistema Nervioso Central**⁴ (Figura 2).

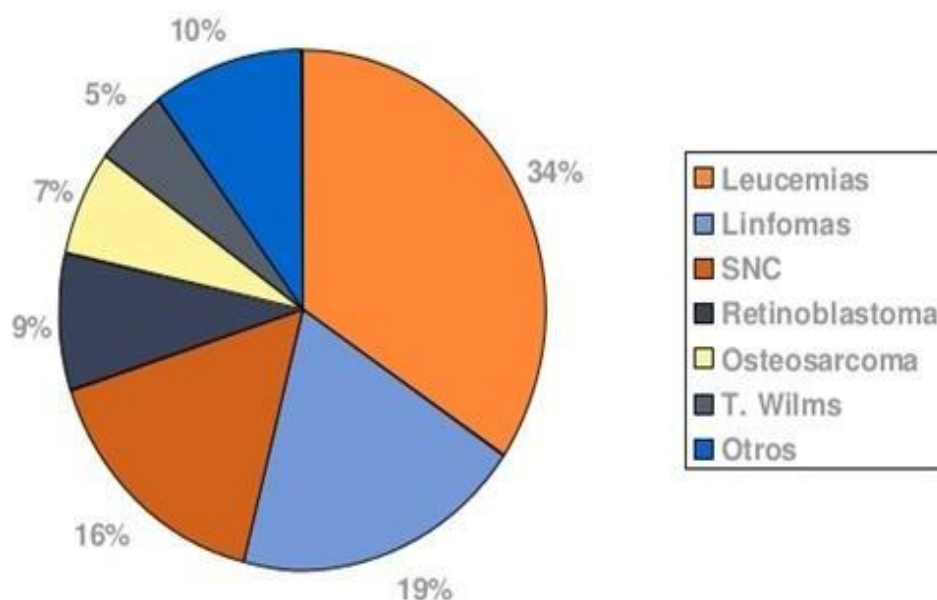


Figura 2. Cáncer en menores de 18 años. Registros en el IMSS,2012.

1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias malignas de rápida evolución caracterizadas por la proliferación de precursores hematopoyéticos dentro de la médula ósea (M.O). Entre estos padecimientos encontramos a la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) que corresponde al 80% de los casos y la Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) que afecta del 15% al 20% de la población infantil^{6,7,8}.

La LLA es un trastorno caracterizado por la proliferación de glóbulos blancos inmaduros en la M.O y en la sangre e infiltración de estos a otros tejidos. Este tipo de cáncer hematopoyético tiene una prevalencia máxima entre las edades de 2 y 5 años⁸.

1.3 Diagnóstico

El diagnóstico de un paciente inicia con la realización de la biometría hemática completa. Se encuentra anemia hasta en el 80% de los casos, conteo menor de 100, 000 plaquetas. Puede haber cuentas bajas o elevadas en los leucocitos y en cuadros clínicos más graves se observa disnea, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatías e infiltración de

mediastino y testículo⁹. La Sociedad Franco-Americana-Británica (FAB) marca como criterio para el diagnóstico de leucemia más del 25% de blastos en M.O.

Los pacientes presentan diversos síntomas que permiten realizar el diagnóstico inicial en conjunto con los resultados de laboratorio. (Tabla 1).

Tabla1.-Criterios de referencia para diagnóstico en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Historia Clínica
Palidez lentamente progresiva
Fiebre intermitente o persistente
Procesos infecciosos persistentes
Dolores articulares persistentes
Petequias y esquemosis
Adenomegalias
Hepatoesplenomegalia
Estudios de Laboratorio
Anemia
Neutropenia
Bicitopenia
Pancitopenia
Leucocitosis
Leucopenia
Blastos en frotis de sangre periférica

1.4 Inmunofenotipo

El análisis de la expresión de antígenos de superficie, citosólicos y nucleares en las células leucémicas permiten determinar en esta enfermedad el linaje hematopoyético que se ve afectado. La LLA de linaje B es la que más incide en los niños, representa del 80 a 85% de los casos y se define por la expresión de **CD19, CD20, CD22, CD10** (antígeno común de la LLA o CALLA). Hay cuatro subtipos de LLA de linaje B: **pre B temprana, pre B, pre B transicional y B madura**, mientras que en la LLA de linaje T se expresan los antígenos

CD2, CD7, CD5 o CD3 y constituye el 15% de los casos en los niños^{8,10}(Figura 3). Existen situaciones en las que se expresan marcadores tanto de células T como B o puede coexistir expresión de marcadores linfoides y mieloides¹⁰. El inmunofenotipo Pre-B es el que se presenta con mayor frecuencia en la población pediátrica.

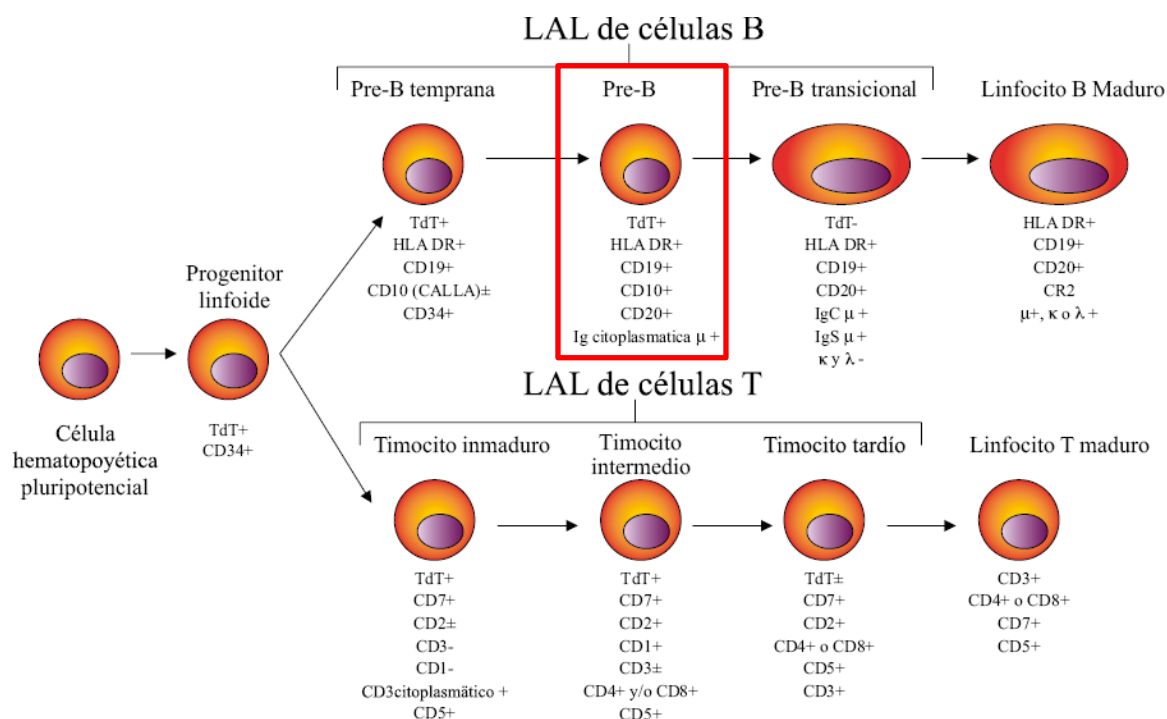


Figura 3. Marcadores celulares en los diferentes estadios de maduración de los linfocitos B y T⁸.

1.5 Citogenética

El estudio citogenético de las células leucémicas ha permitido determinar presencia de aneuploidías (**hiperdiploidía e hipodiploidía**) y translocaciones. Dentro de las translocaciones encontramos a la **t(12:21) (TEL-AML/ETV6-RUNX1)**^{11,12} que es la que presenta más incidencia en la LLA, ocurre en el 20% de los pacientes, la segunda en frecuencia es la **t(1:19) (E2A-PBX1/TCF3-PBX1)**, en tercer lugar se encuentra la **t(9:22) (BCR-ABL)** o cromosoma Filadelfia, presente en el 3 a 5% de los pacientes y la translocación **t(4:11)(MLL)** que se presenta en el 2% de los casos por lo general es encontrada en lactantes y en leucemia mixta^{9,12}.

1.6 Estratificación de Riesgo

La determinación del riesgo es necesario en el momento del diagnóstico con la finalidad de determinar el protocolo terapéutico a seguir. Los niños con LLA se clasifican en dos grupos de riesgo, **Riesgo Alto (RA) y Riesgo Habitual (RH)**². Los criterios clínicos para estratificar riesgo en estos pacientes son: edad, conteo de glóbulos blancos, marcadores de superficie (inmunofenotipo) de las células leucémicas y aberraciones cromosómicas (citogenética), así como la presencia de infiltrados en el momento del diagnóstico.

1.6.1 Edad

Los niños menores a un año y mayores a diez son considerados pacientes de alto riesgo mientras que los niños de 1 a 9 años son pacientes con mejor pronóstico siempre que no presente uno de los siguientes criterios².

1.6.2 Nivel de glóbulos blancos

Los pacientes con un conteo mayor de 50,000 células por mm³ presentan mal pronóstico ante el padecimiento².

1.6.3 Inmunofenotipo

Los pacientes con leucemia de células pre-B presentan mejor respuesta al tratamiento que los niños con leucemia de células T y B maduras, que son considerados pacientes de riesgo alto^{8,10}.

1.6.4 Translocaciones

Los niños con translocación 12:21, tienen mayor probabilidad de curarse que aquellos que presentan translocación en los cromosomas 9 y 22, o bien, entre los cromosomas 1 y 19, estos niños tienen una tasa de cura más baja. La translocación t (9:22) en las células leucémicas se relaciona con pacientes de mal pronóstico, hiperleucocitosis, lenta respuesta inicial a la terapia, recaída y con una baja tasa de curación; se clasifican como pacientes de muy alto riesgo^{11,12}.

Es determinante la asignación del riesgo en el paciente debido a que de esto dependerá la estrategia terapéutica que se utilizará, con la finalidad de obtener mayores beneficios de los tratamientos.

1.7 Tratamiento

El tratamiento consiste en tres fases²:

1.7.1 Inducción a la remisión

En esta fase se restaura la hematopoyesis en médula ósea con un porcentaje de blastos $\leq 5\%$ y máxima reducción de la carga tumoral. Con el tratamiento se pretende eliminar la mayor parte de las células leucémicas. Con la hematopoyesis recuperada, se induce la diferenciación de blastos mieloides y la aparición de progenitores hematopoyéticos CD34+. El grado de remisión actual bajo este régimen es de 70 a 90%. Se determina Enfermedad Mínima Residual (EMR) al alcanzarse la remisión y encontrarse un remanente por debajo del límite del 5%; este evento se relaciona con las recaídas^{2,3}.

1.7.2 Consolidación

Con la recuperación de la hematopoyesis se da inicio a este tratamiento; el objetivo de esta fase es eliminar las células residuales que han sobrevivido en la etapa de inducción^{2,3}.

1.7.3 Mantenimiento

Este tratamiento tiene como objetivo eliminar las células residuales leucémicas que pueden causar recaída². La recaída de la enfermedad se interpreta como mal pronóstico para los pacientes; que se asocia con falla al tratamiento, remisión inicial parcial y aparición de blastos circulantes.

1.7.4 Terapia Santuario

Este tratamiento va dirigido al sistema nervioso central (SNC) y su administración evita que las células leucémicas encuentren un sitio santuario en el SNC, por lo tanto, evita que el cáncer reincida y cause una recaída en el paciente.

La biopsia de la médula ósea se realiza a lo largo de todas las fases del tratamiento para conocer si la leucemia está respondiendo al tratamiento.

El estudio de la enfermedad residual mínima en LLA ¹³provee datos sobre la eficacia clínica del tratamiento para una exacta estratificación del mismo, intensificación de tratamiento en pacientes de alto riesgo de recaída y reducción en pacientes de bajo riesgo, así como la implementación de nuevas estrategias terapéuticas.

Con los nuevos tratamientos la supervivencia de los pacientes con LLA ha incrementado, se estima que del 80 al 85% de los niños se curan¹⁴, sin embargo, el principal fracaso al tratamiento continúa siendo la recaída.

1.8 Recaídas

Este evento se presenta entre el 15 y 20% de los niños y la supervivencia de estos pacientes puede predecirse por el sitio en el cual se da la recaída. Los reportes de estos eventos se dan dentro de los primeros 2 años después de la finalización del tratamiento. Se han detectado casos de recaída en los primeros 18 meses desde el diagnóstico y son llamadas recaídas tempranas, mientras que las recaídas tardías se presentan posterior a los 36 meses desde el momento del diagnóstico. La mayoría de las recaídas ocurren en la M.O., ya sea en forma aislada o en combinación con la participación de otro sitio, entre estos sitios principalmente se encuentra el SNC o los testículos^{15,16,17}.

Las recaídas aisladas a M.O. tienen muy mal pronóstico comparado a las recaídas aisladas de SNC, testículo u algún otro sitio extramedular¹⁶.

La supervivencia de los pacientes que experimentan una recaída temprana en M.O. varía del 0 al 15%. Para los pacientes con recaídas tardías, las tasas de supervivencia varían del 14 al 50%¹⁵.

Las recaídas que involucran sitios extramedulares, tienen mejor pronóstico: las tasas de supervivencia para las recaídas del SNC se acercan al 51% mientras que las testiculares aisladas oscilan entre 53 y 84%^{15,17}.

En general, la terapia actual cura al 10% de los pacientes con recaídas tempranas y al 50% con recaídas tardías.

La capacidad migratoria de los blastos permite que estos invadan sitios donde es poco posible la acción de los quimioterapéuticos, por ello la importancia del estudio de factores que modifiquen la migración de las células tumorales (metástasis e infiltraciones) que es una de las principales complicaciones en el cáncer.

1.9 Migración Celular

Este proceso biológico suele ser cíclico, comenzando con la adquisición de la polaridad celular, esta polarización se debe a la recepción de señales externas, estímulos quimiotácticos, factores de crecimiento o proteínas de la matriz extracelular, las cuales determinan la dirección de la migración. Estas señales activan a receptores de membrana situados en el frente celular, la activación de estos receptores permite la emisión de prolongaciones o extensiones transitorias, conocidas como filopodios y lamelipodios, estos son responsables del movimiento de la célula¹⁸. La polimerización y despolimerización de

la actina refleja la consecuencia de la reorganización del citoesqueleto, es la responsable de la formación de dichas extensiones^{19,20}.

Los microfilamentos y las asociada proteínas producen cambios en el citoesqueleto, lo cual da origen a la propulsión celular^{18,19}. Entre las proteínas que se asocian al citoesqueleto encontramos a la familia de las Miosinas.

1.10 Miosinas

Estas proteínas motoras cumplen varias funciones dentro de la célula; intervienen en la morfología celular, la señalización, el tráfico de orgánulos, los procesos de endocitosis y exocitosis, pero su función principal es generar movimiento^{20,21,22}.

Los eucariotas tienen 38 clases de miosinas, de las cuales se conocen dos grupos, las convencionales y no convencionales, como resultado de la diversificación genética en su estructura. Las miosinas más estudiadas son las miosinas de clase II (miosinas convencionales), que están codificadas por 14 genes en humanos. Las miosinas de clase I, son una subfamilia de miosinas no convencionales, que está compuesta por ocho miembros (Myo1A, Myo1B, Myo1C, Myo1D, Myo1E, Myo1F, Myo1G y Myo1H)^{21,22} codificadas por ocho genes

1.11 Miosinas Clase I

Las miosinas de clase I fueron identificadas en *Acanthamoeba*. Estas proteínas motoras pequeñas, tienen alta capacidad para generar fuerza mecánica y se expresan en la mayoría de los linajes celulares^{22,23,24}. En mamíferos sus funciones han sido poco caracterizadas. Sin embargo, la mayoría de ellas juegan un importante papel en la migración celular.

Estructuralmente esta clase de miosinas están formadas por una sola cadena pesada de 110-140 KDa, dividida en tres regiones: cabeza, cuello y cola. El dominio motor o de cabeza contiene el sitio de unión de actina; esta región es responsable de la hidrólisis de ATP. El cuello se caracteriza por uno o varios motivos IQ, los cuales se componen de aproximadamente 29 residuos de aminoácidos con la secuencia central IQXXRGXXRX (I-isoleucina, Q-glutamina, R-arginina, G-glicina, Y-tirosina, X-cualquier otro aminoácido). Cada motivo proporciona un sitio de unión para calmodulina, una proteína citosólica de unión a calcio, esencial para la conversión eficiente de energía química en trabajo mecánico^{22,24}.

El último dominio corresponde a la cola; este dominio se divide en tres regiones TH (*tail homology*, del inglés), designadas como TH 1, TH 2 y TH 3. Las miosinas de clase I que contienen los tres dominios TH se han denominado de cola larga mientras que las que contienen una región TH única son llamadas miosinas de cola corta. El dominio de cola es

el que interactúa con los fosfolípidos y las proteínas de membrana, lo que facilita la unión directa de estas proteínas a las membranas celulares^{22,23}.

1.11.1 Funciones de Miosinas Clase I

Específicamente la miosina 1A, es abundantemente expresada en el epitelio intestinal y gástrico; mantiene la composición molecular y la organización general de las microvellosidades intestinales, regulando la liberación de vesículas, lo que contribuye a la inmunidad intestinal y está implicada en la tensión celular de los enterocitos^{25,26, 27}. A la miosina 1B se le ha involucrado con la migración celular durante el desarrollo embrionario y se ha relacionado con el control de la propulsión celular a través de los filipodios, el tráfico de membranas y la exocitosis. Participa en el mantenimiento de los filamentos de actina unidos a la membrana^{28,29}. Miosina 1C se expresa abundantemente en las microvellosidades de linfocitos B, tiene un papel importante en la migración en estas células y estabiliza a las prolongaciones celulares (lamellipodios y filipodios)^{30,31,32,33}. Mientras que la miosina 1D es importante para la mielinización normal de los oligodendrocitos³⁴. Por otro lado, miosina 1E está presente en los podocitos y se relaciona con la motilidad celular, ya que permite la interacción membrana-citoesqueleto en las células renales^{35,36,37}. La migración de neutrófilos, la adhesión intercelular y la polarización de los macrófagos se ha relacionado con funciones de miosina 1F³⁸; esta miosina no ha sido la única proteína relacionada con células sanguíneas. Por otro lado existen reportes que muestran que miosina 1G se localiza en la membrana de las células hematopoyéticas³⁹, principalmente su expresión se ha determinado en linfocitos B y T, células blanco de la LLA. Se conoce que los linfocitos B deficientes de esta proteína presentan un movimiento más lento y trayectorias cortas en su migración²⁴, como consecuencia de la reducción de la tensión de membrana ejercida por la deficiencia de esta proteína que probablemente deteriora la polarización de las células B. Sin embargo, en los linfocitos T la ausencia de Myo 1G provoca el aumento de la velocidad, mientras que, disminuye el ángulo de giro de las células T cuando migran o se desplazan alrededor de la célula presentadora de antígeno durante el reconocimiento antigénico⁴⁰.

Myo 1G regula la tensión de membrana, la velocidad intrínseca de migración, la fagocitosis y exocitosis. Las alteraciones que puedan presentarse en los linfocitos como cambios en la morfología, proliferación y movilidad, tienen gran importancia para el estudio de patologías como el cáncer principalmente en la Leucemia Linfoblástica Aguda^{41,42}. Miosina 1H ha sido poco estudiada y solo se ha relacionado con prognatismo mandibular⁴³.

Todas las miosinas tienen funciones específicas, sin embargo, juegan un papel importante como motores moleculares en la movilidad y migración celular

1.12 Migración y Cáncer

Las células cancerosas se pueden diseminar desde estadios muy tempranos, estas células deben ser capaces de romper sus lazos con la estructura cohesiva del tejido y en la circulación van a ser capaces de infiltrar un órgano determinado solamente si poseen las funciones necesarias para atravesar las paredes de los capilares de este órgano⁴⁴.

Las infiltraciones de tejido surgen en cánceres hematopoyéticos y metastásicos (en otras formas de cáncer). La invasión en tejidos se divide en las siguientes etapas: invasión local, migración, intravasación, extravasación y metástasis. En la primera etapa, las células invaden su tejido de origen haciendo cambios en la membrana basal para invadir directamente el estroma, posteriormente migran para ingresar a la luz de un vaso sanguíneo o linfático y la difusión a través de la circulación permite que las células cancerosas se dispersen^{44,45}. Este proceso de intravasación se ve facilitado por los cambios moleculares que aumentan y promueven la capacidad de las células cancerosas para atravesar la barrera endotelial. Una vez que las células cancerosas alcanzan la circulación venosa o arterial, deben sobrevivir a las tensiones del entorno hemodinámico para que puedan asentarse en órganos distantes. Las células tumorales sobreviven en el microambiente de un tejido inusual, que tiene un entorno que no siempre es óptimo para que proliferen y formen la colonia metastásica^{46,47,48}.

Las infiltraciones y la metástasis aumentan la gravedad de los pacientes y la estrategia quimioterapéutica a seguir dependerá si el paciente presenta las infiltraciones al diagnóstico o durante el curso de la enfermedad⁴⁹.

Como se comentó anteriormente, en la LLA los principales sitios santuarios de infiltración son el SNC y el testículo. La clasificación del estado del SNC depende de la cantidad de blastos que migran al líquido cefalorraquídeo (Tabla 2).

Tabla 2.- Blastos en Sistema Nervioso Central en Leucemia Linfoblástica Aguda

Estado del SNC	Blastos en Líquido Cefalorraquídeo (LCR)
SNC grado 1	Células blásticas no detectables
SNC grado 2	< 5 leucocitos / μ L de células blásticas
SNC grado 3	$\geq$ 5 leucocitos / μ L de células blásticas Parálisis de los nervios craneales

Se han relacionado con metástasis a diversas proteínas que participan en la migración, algunas de estas se expresan en tipos celulares específicos y su expresión se modifica en circunstancias patológicas.

1.13 Miosinas Clase I y Cáncer

Las miosinas de clase I han sido implicadas en la migración celular, y hay evidencia de su papel en diferentes tipos de cáncer, ya que se ha relacionado a estas proteínas con metástasis. Por ejemplo la miosina 1B se ha asociado con cáncer de células escamosas de cabeza y cuello^{50,51}. En este tipo de cáncer se ha encontrado frecuentemente invasión tumoral en ganglios linfáticos; la invasividad y la migración a diversos tejidos. Estos procesos; se han relacionado con esta proteína motora, ya que al disminuir su expresión por medio de RNA de interferencia ambos procesos se ven disminuidos. Además, se ha observado un aumento en la migración de las células escamosas por la sobreexpresión de miosina 1B⁵². Estos eventos han propuesto a esta proteína como un marcador potencial para prevenir la metástasis. Del mismo modo, miosina 1C se ha relacionado con el incremento de la migración de las células tumorales en cáncer gástrico. Diversos estudios demostraron que al ser inhibida su expresión por el microRNA miR-137⁵³, la migración de estas células se vio afectada y no se originó metástasis. Los ensayos reportados en ese estudio sugirieron que los pacientes con alta expresión de miR-137 tenían mayor supervivencia que aquellos donde la expresión de este se encontraba disminuida. Otro cáncer que se ha relacionado con esta miosina es el de próstata⁵⁴ donde se encuentra aumentada. Específicamente la isoforma A de esta miosina 1C se encuentra disminuida en cáncer de endometrio. En un estudio fueron analizados diferentes estadios de carcinoma de endometrio y se determinó una disminución en la expresión de Myo 1C en la carcinogénesis de este tejido, por ello se relacionó su baja expresión con la reducción en la velocidad de migración a consecuencia de una capacidad disminuida de las células para adherirse⁵⁵.

Las miosinas 1A y 1E también participan en cáncer. Se ha demostrado que la miosina 1A podría estar contribuyendo en la capacidad invasiva de los tumores colorrectales, debido a que las mutaciones que presenta se han relacionado con la pérdida de polaridad celular y el desarrollo de este tipo de cáncer colorrectal⁵⁶. La ausencia de la miosina 1A impulsa el proceso tumorigénico en el intestino, por lo tanto, la falta de proteínas estructurales o de soporte del citoesqueleto trae como resultado la desdiferenciación y la pérdida de la polarización celular, favoreciéndose la progresión del tumor.

Por otro lado, la alta expresión de miosina 1E se ha asociado con un mal pronóstico en los pacientes diagnosticados con cáncer de mama, conociéndose como un regulador

importante en la tumorigénesis en este tipo de cáncer. Se propone que pueda estar involucrada en la proliferación celular y la pérdida de la diferenciación en las células, debido a que está relacionada con la proteína ZO-1 (proteína que pertenece a la zonula occludens o de uniones ocluyentes), la cual regula la formación y la dinámica de las uniones célula – célula y con diversas vías fisiológicas que se basan en la actividad de PI3K (fosfatidilinositol 3 cinasa), vía que es crucial en el crecimiento y la supervivencia celular, lo que favorece la actividad metastásica^{57,58}.

En resumen, existen diversos estudios que han vinculado a las miosinas Clase I con la proliferación e invasividad de tumores, sin embargo, se conoce poco sobre la asociación que pudieran tener estas proteínas con algún tipo de Leucemia. Solo hay un reporte que relaciona a la miosina 1F con el gen de Linaje Leucémico Mixto (Mixed Lineage Leukemia o MLL) en Leucemia Monocítica Aguda Infantil y este estudio determinó la fusión entre ambos genes. Se conoce que los rearrreglos del gen MLL están asociados con un mal pronóstico y un 80% de los lactantes con leucemia presentan translocaciones en este gen. El gen de la miosina 1F se fusiona con MLL y se ha demostrado en otros trabajos que las proteínas de fusión participan en la leucemogénesis⁵⁹, sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si esta fusión en particular favorece el desarrollo de la Leucemia.

Los estudios que se han realizado con las miosinas Clase I y cáncer han generado la expectativa de que alguna de estas proteínas pueda tener un alto potencial como blanco terapéutico o como posible biomarcador diagnóstico o pronóstico en este tipo de padecimientos. Por ello el presente trabajo se centró en el estudio de las ocho miosinas clase I en Leucemia Linfoblástica Aguda, padecimiento con alta incidencia en la población infantil.

2. JUSTIFICACIÓN

Las leucemias agudas (LA) son cánceres del sistema hematopoyético que causan una transformación maligna de las células progenitoras linfoides y mieloides. Es el cáncer más frecuente en la etapa pediátrica. A pesar de que la sobrevida de los pacientes con este padecimiento ha aumentado considerablemente en las últimas décadas, aún se desconocen con exactitud los factores que lo originan, por lo tanto, sigue representando el 30% de las muertes por cáncer en niños.

Actualmente se sabe que las miosinas de clase I participan en una gran variedad de respuestas fisiológicas; recientemente se determinó que tienen un papel muy importante en la migración de los linfocitos, células afectadas en la LLA. Por ello se considera que alguna de estas proteínas pueda estar influyendo en la formación de infiltrados tisulares en pacientes con este diagnóstico, por lo tanto, se pretende determinar que miosinas de esta familia se expresan en linfocitos B humanos, cómo se altera su expresión en las leucemias agudas y cómo estos cambios de expresión se correlacionan con la gravedad de la enfermedad en pacientes con leucemia. El estudio tiene la finalidad de identificar si la miosina 1G o alguna otra miosina de clase I pueda ser un factor pronóstico que nos permita clasificar de manera más adecuada a los pacientes y obtener los mejores beneficios de las opciones terapéuticas para un mejoramiento de la calidad de vida de la población oncológica pediátrica mexicana.

3. HIPÓTESIS

Los cambios en la expresión de las miosinas de clase I se relacionan con el incremento de la gravedad de los pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios de expresión y contenido proteico de las miosinas de clase I en las células leucémicas y su relación con la gravedad de la enfermedad en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda

5. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar los niveles de expresión de miosinas clase I en linfocitos B normales de humano.
- Evaluar la expresión de las miosinas de clase I en células leucémicas de pacientes pediátricos y en células de individuos sanos.
- Evaluar la asociación existente entre la expresión de alguna miosina clase I con los criterios clínicos para estratificación de riesgo alto en pacientes con Leucemia.

6. METODOLOGÍA

6.1 Pacientes

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 133 pacientes pediátricos en un intervalo de edad de 0-18 años, masculinos y femeninos con diagnóstico de Leucemia, remitidos por el servicio de Hemato-Oncología, las muestras fueron proporcionadas por el laboratorio clínico del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y Hospital Pediátrico de Moctezuma (Tabla 3). Las muestras se obtuvieron al diagnóstico, al término de la primera fase de tratamiento (Inducción a la remisión), en esta fase el esquema terapéutico se basa en una ventana esteroidea con prednisona. Posteriormente agregan vincristina, daunorrubicina, L-asparaginasa y metotrexate sin suspender la prednisona hasta el día 28 y durante la fase de consolidación (un mes posterior a haberse obtenido la remisión completa), en esta fase la estrategia de tratamiento es con altas dosis de metotrexato intercalando con ciclofosfamida, citarabina, mercaptopurina y vincristina.

Los pacientes reunieron los criterios de inclusión y aceptaron su participación en el estudio mediante la firma de consentimiento informado (Carta de Consentimiento Informado en Anexos).

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética y Seguridad del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y del Hospital Pediátrico Moctezuma.

6.2 Criterios de determinación de pacientes en estudio

6.2.1 Criterios de inclusión:

- Pacientes pediátricos de 0 a 18 años del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” con diagnóstico documentado de leucemia linfoblástica aguda.
- Que sus cuidadores primarios acepten la participación en el estudio a través de la firma de carta de consentimiento informado.

6.2.2 Criterios de exclusión:

- Con tratamiento previo al diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.
- Con transfusiones previas al diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

6.2.3 Criterios de eliminación:

- Cambio de unidad hospitalaria.

- Cambio de domicilio fuera del área de influencia de la institución (HIMFG).
- Que el paciente o cuidador primario decidan retirarse del estudio voluntariamente.

Para el grupo control se obtuvieron muestras sanguíneas de individuos pediátricos de otros servicios (Ortopedia del Hospital Pediátrico Moctezuma y Otorrinolaringología Hospital Infantil de México) en un rango de edad de 1-14 años. Se corroboró que no presentaran alteraciones hematológicas mediante biometría hemática. Su participación en el estudio fue autorizada mediante consentimiento informado.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes y controles.

Pacientes LLA	n=133
Edad	Rango (7 meses a 16 años)
Genero (%)	39F/61M
Estratificación de riesgo	AR 93/RH39
Inmunofenotipo LLA	Pro - B 15 Pre - B 87 T 9 B 17
Fallecidos (%)	16.54
Infiltración (%)	16.54
Translocación t9:22 (%)	3.75
Recaída (%)	10.52
Mala Respuesta a la Remisión (%)	19.54
Controles	n=61
Edad	Rango (1-14 años)

LLA, Leucemia Linfoblástica Aguda; F, Femenino; M, Masculino; AR, Alto riesgo; RH, Riesgo Habitual; Pro-B/Pre-B, precursores tempranos de células B en Leucemia Linfoblástica Aguda; B, precursores de células B en Leucemia Linfoblástica Aguda; T, precursores de células T en Leucemia Linfoblástica Aguda.

6.3 Purificación de células mononucleares de sangre periférica

Las muestras de sangre periférica de pacientes con LLA se diluyeron con solución salina (NaCl 0.9%) con una relación 1:1 (v/v).

La purificación de células mononucleares (CMN) de sangre periférica se realizó mediante la técnica de separación por gradiente y centrifugación; empleando LymphoPrep (Axis Shield). Se procedió a hacer una mezcla de Lymphoprep con la muestra de sangre problema ya previamente diluida con NaCl y se guardó una relación v/v de 1:2 respecto al lymphoprep; posteriormente se centrifugó a 2,000 rpm por 30 minutos a 20 °C. Después se llevó a cabo la separación de la capa de CMN y se realizaron 3 lavados con NaCl 0.9%, y se centrifugó nuevamente por 10 minutos a 1, 200 rpm a 20 °C. En el último lavado se cambió el número de revoluciones a 1,000 rpm.

Después de la purificación de células, se llevó a cabo el conteo por la técnica de exclusión con azul de tripano utilizando una cámara de Neubauer.

6.4 Purificación de Linfocitos B (Columnas magnéticas Miltenyi)

Para la purificación de linfocitos B se utilizó el kit (Cell Isolation Kit II human) y columnas MACS de Miltenyi. Se realizó la separación por selección negativa.

Se preparó una solución de PBS pH7.2, 0.5% de BSA y EDTA 2 Mm y se mantuvo esta solución en hielo (2-8 °C), para realizar los lavados celulares.

Se utilizaron 10^7 CMN. Esta suspensión celular se centrifugo a 300xg durante 10 min y el sedimento celular se resuspendió con 40µl de la solución de PBS ya antes mencionada y, se mantuvieron las células en hielo (2-8 °C).

Posteriormente se adicionaron 10 µL de la mezcla de anticuerpos (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a), se resuspendió e incubo por 5 minutos. Después de este tiempo se adicionaron 30µL de la solución de PBS y se resuspendió nuevamente. Para finalizar el periodo de preparación de la suspensión celular, se colocaron 20 µL de micropelotas y se hizo una incubación durante 10 min. La suspensión celular se mantuvo en hielo desde el inicio (2-8 °C).

Después de obtener la suspensión celular, se procedió a la separación magnética utilizando columnas LS de Miltenyi, previamente esta columna fue preparada con 3 ml de solución buffer (misma solución utilizada en los lavados celulares). Posteriormente se fue colocando la suspensión celular poco a poco en la columna evitando la formación de burbujas.

6.5 Expresión de miosinas Clase I en CMN y Linfocitos B por PCR en tiempo real

A partir de las células purificadas de los pacientes (CMN y Linfocitos B), se extrajo el RNA total en un baño de solución monofásica de fenol e isotiocinato de guanidina-cloroformo usando el reactivo de Trizol (Life Technologies, Inc.)²⁸ y con columnas RNeasy de Qiagen, se procedió a realizar la extracción siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido fue almacenado en congelación (-80 °C) y posteriormente procesado para la obtención de cDNA el cual se utilizó para RT-PCR en tiempo real. El RNA total (250 ng) fue retro-transcrito a cDNA por 15min a 42 °C con el Kit Quantiscript Reverse Transcriptase (QIAGEN). La Integridad del RNA se comprobó utilizando el Bionalyzer 2100 (Agilent Technologies).

Para las reacciones se utilizaron las sondas UPL (Roche). #1, #3, #11, #29, #62, #63, #80, #89 con los oligos correspondientes para miosina 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G y 1H (Se muestran las secuencias en anexos). Como controles internos para normalizar cada reacción se usaron oligos para el gen constitutivo gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)²⁹(Secuencias de primers mostradas en anexos) y la sonda UPL (Roche) #60.

La amplificación de cada secuencia de DNA se realizó con la mezcla Light Cycler 480 probes master (Roche) en un termociclador Agilent, bajo las siguientes condiciones: 95 °C /10s, 56 °C /30s, 72 °C /11s durante 45 ciclos.

6.6 Expresión de miosina 1G por Inmunofluorescencia

Una alícuota de las CMN que se obtuvieron se ajustó a 10,000 células/10 microlitros. Se colocaron dos puntos en cada laminilla y se dejaron secar a temperatura ambiente, posteriormente se fijaron las células con formaldehído al 4 % a una temperatura de 4 °C por 20 minutos. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X, cada uno 15 minutos en agitación para eliminar células no adheridas.

6.6.1 Tinción de Laminillas

Las células se lavaron en PBS al 0,1% / Tween 20 durante 40 min. Las muestras se bloquearon con 2% de suero de cerdo en una cámara húmeda durante 1 hora 40 min. y posteriormente con 05% de Triton X-100 por 20 min. Luego se lavaron dos veces durante 5 minutos. Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario para la miosina 1G a temperatura ambiente durante la noche a una dilución 1: 100 (a partir de un stock 800 µg / mL). Después de cinco lavados con PBS/Tween 20, las muestras se incubaron durante 1 h. a temperatura ambiente con IgG de cabra anti-conejo Alexa 647 (Jackson Immuno Research) a dilución 1: 200; finalmente, las células se lavaron ocho veces en PBS / Tween

20. Para el montaje se utilizó una gota de vectashield (medio de montaje) con DAPI (Vector Labs), se colocó sobre las preparaciones un cubreobjetos y se selló finalmente con esmalte.

Para obtener imágenes de las células teñidas, se usó un microscopio confocal (Olympus FV1000). Capturamos no menos de 5 micrográficas del plano medio de las células a 60X usando configuraciones idénticas para cada captura. Nos aseguramos que no se detectaran píxeles saturados. Cuantificamos la intensidad media de fluorescencia de 50 a 100 células por paciente en el momento del diagnóstico y en las diferentes fases del tratamiento (remisión y consolidación). Las imágenes se analizaron utilizando el software Fiji Image J (NIH); específicamente se midió la intensidad de fluorescencia media (MFI) de la periferia en cada célula. Los resultados se expresaron como el promedio de MFI para cada paciente usando unidades arbitrarias para la cuantificación.

6.7 Expresión de miosina 1G por Inmunocitoquímica

Para evaluar la expresión de la miosina 1G se utilizaron anticuerpos específicos como anti-Myo 1G de humano hecho en conejo (dilución 1:750) y anti-IgG de conejo biotinilado (Normal Rabbit Santa Cruz, Biotechnology).

Se hidrataron las células con un lavado en PBS 1X durante 5 minutos y se realizó la recuperación antigénica con citrato de sodio (0.01M, pH 6.0) por 15 minutos a 90 °C en baño maría con agitación. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena se hicieron 2 lavados de 15 minutos con metanol y peróxido de hidrógeno al 3%. Se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos a las células, incubando las laminillas con leche durante 1 hora 30 min. a temperatura ambiente en cámara húmeda. Las laminillas se sometieron a una segunda incubación toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo primario (anti-Myo1g) en cámara húmeda. Después de lavar con PBS 1X, las células se incubaron con el reactivo ImmPRESS HRP (Vector) durante 30 minutos a temperatura ambiente, luego se lavaron con PBS y se incubaron con estreptavidina durante 10 minutos. Por último, se reveló mediante la adición del substrato cromógeno Diamino-Bencidina (Dako). Las muestras fueron teñidas al mismo tiempo (1 min) en un mismo día; la reacción se detuvo con agua y se contratiñó con hematoxilina, durante 1s. Las muestras se deshidrataron bajo las siguientes condiciones: agua destilada, etanol al 70 %, etanol al 90 %, etanol al 100 % y xileno; finalmente, las laminillas se cubrieron con resina.

Las células se visualizaron usando un microscopio Olympus, BX-40; se midió la intensidad de tinción de 50 a 100 células por paciente en el momento del diagnóstico y en las diferentes fases del tratamiento para obtener el IOD (intensidad de densidad óptica) utilizando el software Image - Pro Plus V 6.0, Media Cybernetics. Se cuantificó la tinción de color marrón de la periferia celular y se promediaron todos los valores de un paciente por fase de tratamiento. Los resultados se expresaron como el promedio de los píxeles cuantificados (IOD) en cada célula.

7. RESULTADOS

7.1 Evaluación de la Expresión de Miosinas Clase I

Para la evaluación de la expresión de las de Clase I por PCR en tiempo real, se obtuvo el cDNA de 10 pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda y 10 individuos pediátricos sanos. En las células de los pacientes las miosinas tuvieron una variación en su expresión. Al realizarse la comparación se observó un aumento en la expresión de la miosina 1B, 1C, 1G y 1H en los pacientes, así como una disminución en la expresión de miosina 1A, 1D, 1E y 1F. Sin embargo, al realizar el análisis estadístico no se mostraron diferencias significativas, sólo se detecta una tendencia del cambio de expresión (**Figura 4**).

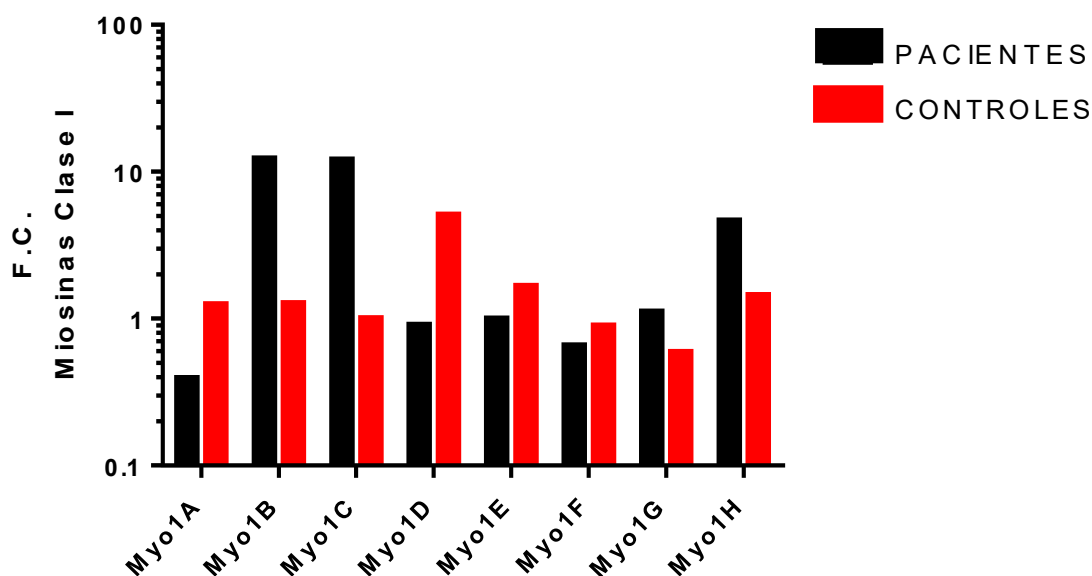


Figura 4. Expresión relativa de las miosinas de Clase I en LLA (F.C.). F.C.= representa las veces de cambio de un grupo con respecto al otro. Se comparó la expresión de las miosinas de Clase I en CMN de pacientes e individuos pediátricos sanos. Los valores de F.C. muestran una alta expresión de Myo 1B y 1C en los pacientes respecto a la expresión del grupo control. El F.C. se obtuvo a partir del siguiente algoritmo de cálculo.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{paciente}) - \Delta Ct (\text{Control})$$

$$F.C. = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

De las ocho miosinas encontradas en las CMN de los pacientes, la expresión más aumentada fue la de Miosina 1B, 1C y 1G. (**Figura 5**) mientras que la expresión más disminuida se encontró en la miosina 1A, 1D, 1E y 1F en LLA (**Figuras 6, 7, 8, 9**).

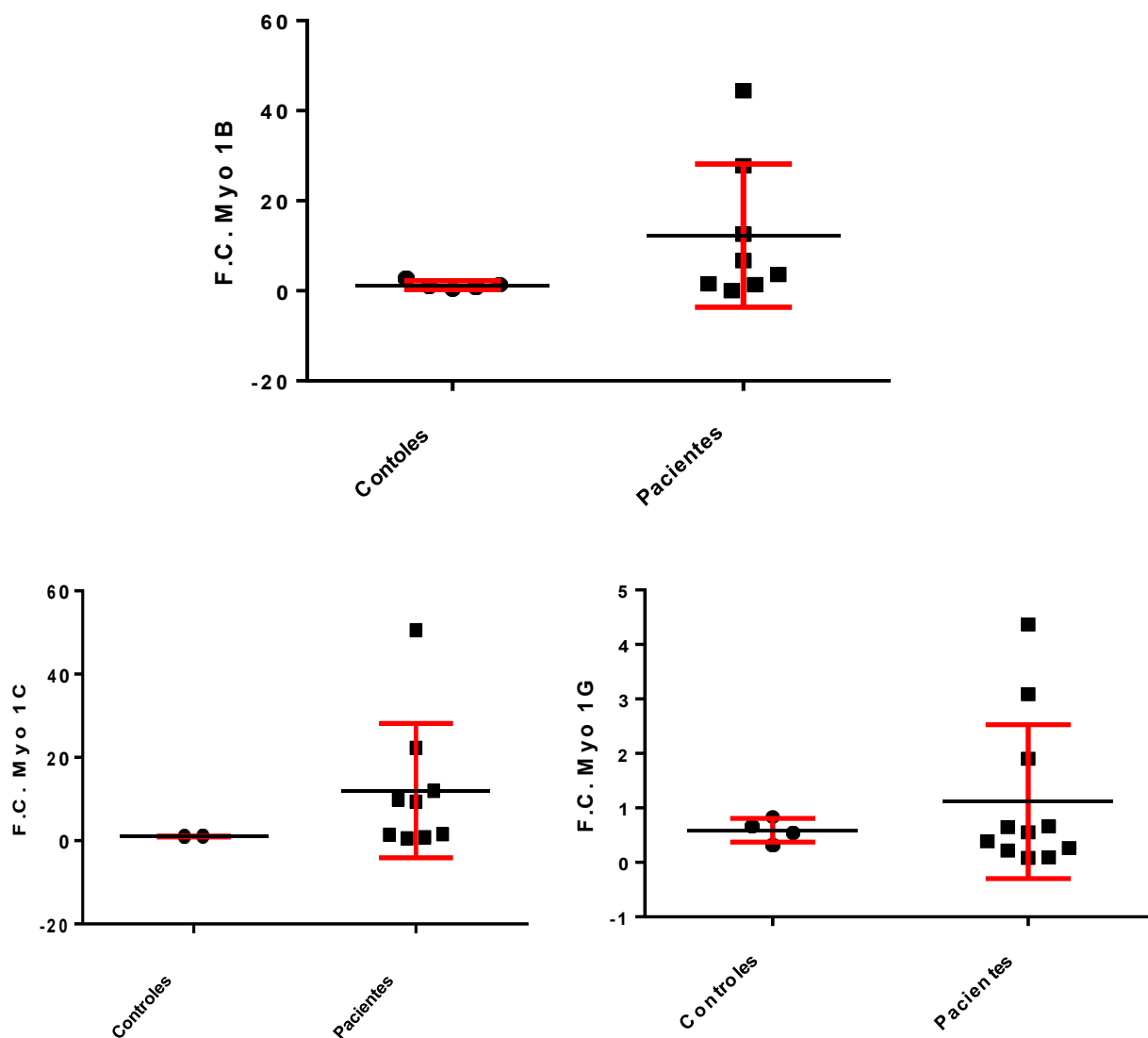


Figura 5. Expresión de la miosina 1B, 1C y 1G en LLA. Se comparó la expresión de Miosina 1B, 1C y 1G en CMN de pacientes e individuos pediátricos sanos. Los valores de F.C. muestran una alta expresión en LLA. Control n= 5, n=2, n=4, Pacientes n=8, n=9, n=11. Se aplicaron las pruebas estadísticas, t-student y U-Mann Whitney para obtener el valor de p, sin encontrar diferencia significativa en ninguno de los casos. (p=0.1562), (p=0.2545), (p=0.7744).

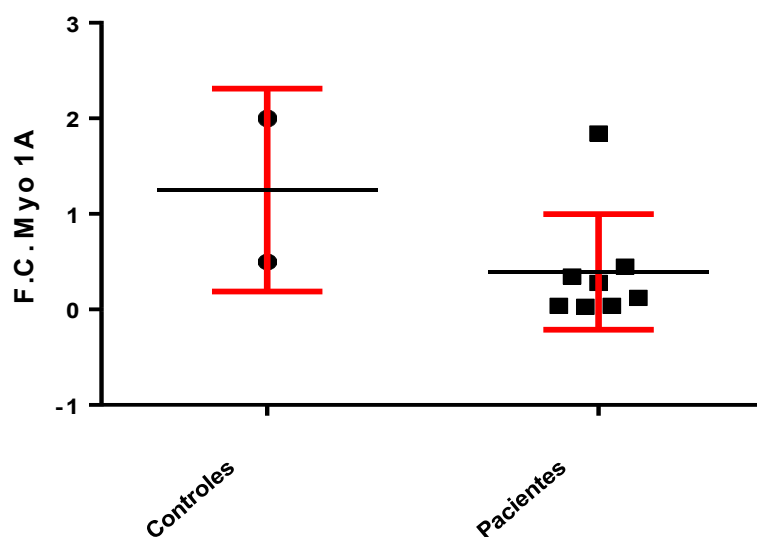


Figura.6.- Expresión de la miosina 1A en LLA. Expresión relativa de la miosina 1A en CMN de niños con LLA. Se observa una tendencia a la baja en la expresión del mRNA en los pacientes. Se aplicó la prueba de U-Mann Whitney para obtener el valor de p. ($p=0.0889$). Control $n=2$, Pacientes $n=8$.

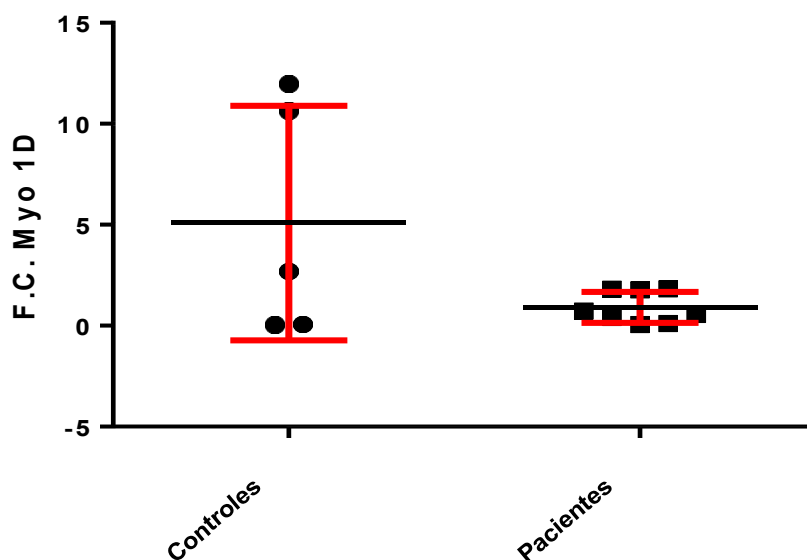


Figura 7. Expresión de la miosina 1D en LLA. Expresión relativa de Miosina 1D en CMN de niños con LLA, se observa una tendencia a la baja del mRNA en los pacientes. Se aplicó la prueba estadística t-student, para obtener el valor de p, ($p=0.0635$). Control $n=5$, Pacientes=8.

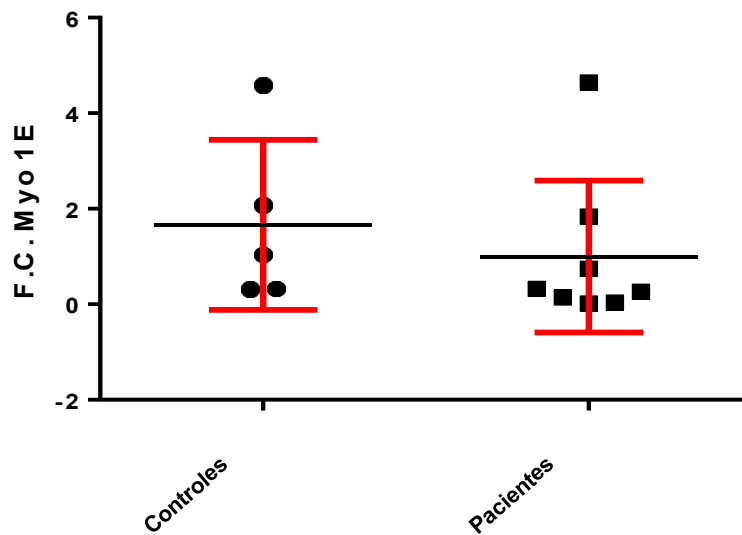


Figura 8. Expresión de la miosina 1E en LLA. La expresión del mRNA se observa disminuida en los pacientes con LLA. Los valores F.C. tienen una tendencia a ser más bajos realizando la comparación con el grupo control. Se aplicó la prueba estadística de U-Mann Whitney para obtener el valor de p, ($p = 0.2222$). Control $n=5$, Pacientes $n=8$.

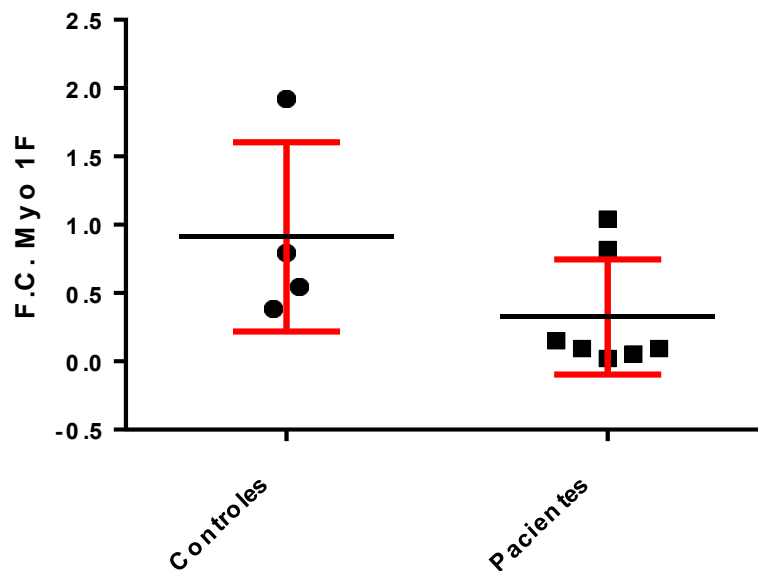


Figura 9. Expresión de la miosina 1F en LLA. La expresión de miosina 1F se observó disminuida en los pacientes con LLA. Los valores F.C. tienen una tendencia a la baja en

comparación con los pediátricos sanos Se aplicó la prueba de U-Mann Whitney para obtener el valor de p. ($p=0.1485$). Control $n=4$, Pacientes $n=7$.

Se obtuvo el F.C. (Fold Change) de las cuatro miosinas más desreguladas en los pacientes con LLA, encontrándose cuatro veces más expresada la miosina 1B en pacientes que en individuos sanos y seis veces más la miosina 1C en LLA que en el grupo control (**Figura 10**).

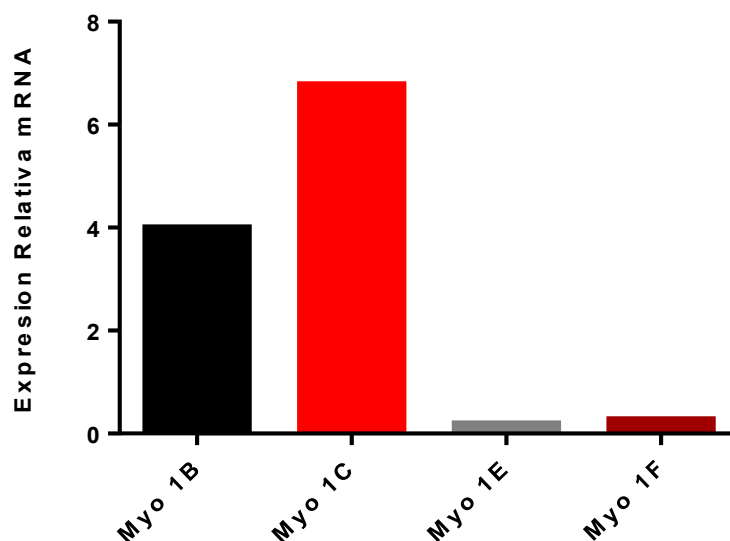


Figura 10. Fold Change (F.C). Se observa sobreexpresión de la miosina 1B (Myo 1B) y la miosina 1C (Myo1C) y una expresión disminuida de Miosina 1E (Myo 1E) y Miosina 1F (Myo 1F) en los pacientes con LLA comparado con el grupo control. Pacientes $n=5$, Control $n=5$.

Como mencionamos anteriormente los linfocitos B son las células más comúnmente afectadas en la LLA, por esta razón en este estudio se determinó la expresión de las miosinas de Clase I en este linaje en específico en células humanas, conociendo que existen reportes de la expresión de estas proteínas en células B en un modelo murino. Los resultados demuestran la expresión únicamente de siete miosinas de clase I en linfocitos B y se comparó esta expresión con la de CMN de pacientes con LLA y de individuos sanos. Se encontró alta expresión de Miosina 1C y 1D en los linfocitos B de individuos sanos comparada con la expresión de células mononucleares de pacientes e individuos sanos (**Figuras 11, 12**). Obteniendo el fold change, se observó que Miosina 1C es la proteína con mayor expresión en células B humanas (**Figura 12**) (**Tabla 4 Anexos**).

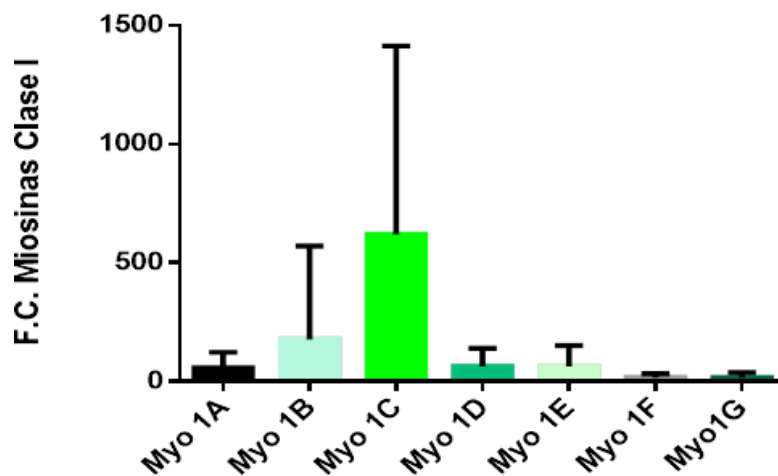


Figura 11. Niveles de expresión de las miosinas de clase I en linfocitos B y CMN de pacientes LLA. Se encontraron siete miosinas de clase I expresadas en Linfocitos B. La miosina 1C es una de las que más se expresa en los Linfocitos B en comparación con las CMN de pacientes. Se aplicó la prueba de ANOVA de una vía y se encontró diferencia significativa entre los grupos p (0.0296*).

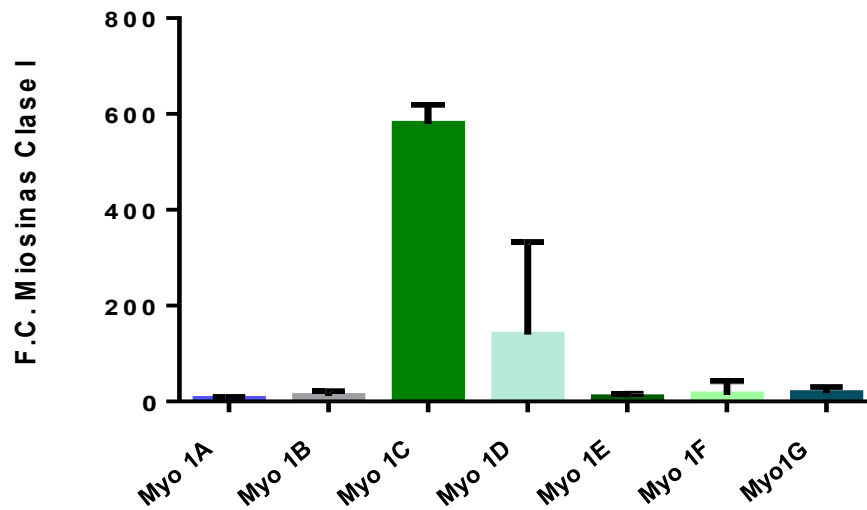


Figura.12.-Niveles de expresión de Linfocitos B y de CMN de individuos sanos. Se realizó la comparación de la expresión de las siete miosinas entre Linfocitos B y CMN. Se observó alta expresión de la miosina 1C y 1D en los Linfocitos B de individuos sanos. Se aplicó prueba de ANOVA y se encontró diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.0001^{****}$).

De las ocho miosinas identificadas en las CMN no existían reportes en este tipo de cáncer pediátrico, sin embargo, el presente estudio se centró en estas proteínas debido a que se han identificado como marcadores en otros tipos de cáncer. En la literatura se sabía que miosina 1G estaba expresada en todas las células sanguíneas y principalmente los linfocitos B y T, células blanco de este tipo de Leucemia, por lo tanto, se evaluó la expresión de miosina 1G en los pacientes pediátricos, y se extendió el análisis para evaluar las ocho miosinas de clase I determinando que estas proteínas pueden jugar un papel importante en este padecimiento.

7.2 Evaluación de la expresión de Miosina 1G en CMN de pacientes

Se evaluó la expresión de la miosina 1G en los pacientes al conocerse que su expresión era alta en las células sanguíneas y que podría asociar con las manifestaciones clínicas de esta enfermedad. La expresión de la miosina 1G fue determinada en una población de 100 pacientes y 18 individuos pediátricos sanos. Esta proteína se evaluó al diagnóstico de los pacientes y en las diferentes fases de tratamiento (remisión y consolidación) (**Tabla 6**). Se encontró a nivel de mRNA, mayor expresión de Myo 1G al diagnóstico y en remisión, esto respecto al grupo control, mientras que la fase de consolidación presentó una expresión similar con estos controles. (**Figura 13**). Por lo que, fue importante analizar la expresión de la miosina 1G en los pacientes considerando su estratificación de riesgo al momento del diagnóstico. En las CMN de los pacientes se encontró mayor expresión de la miosina 1G en el grupo de pacientes de riesgo alto al diagnóstico realizando al compararla con el grupo control (**Figura 14**).

Pacientes/Controles	F.C.
Diagnóstico /Control	3.35
Remisión/Control	2.94
Consolidación/Control	1.84
Diagnóstico /Remisión	1.13
Diagnostico/Consolidación	1.81
Remisión/Consolidación	1.59

Tabla 6.- Fold Change (F.C.) de Miosina 1G al diagnóstico y en las fases de tratamiento. (Fig.17 Anexos)

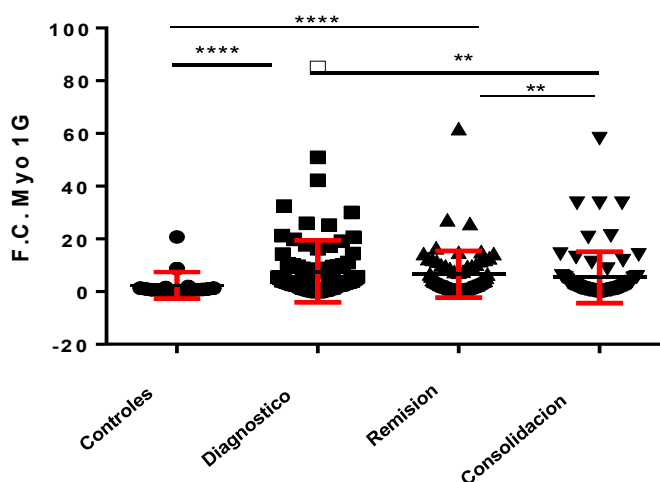


Figura.13.- Expresión de la miosina 1G en LLA. Se observó que la mayoría de los pacientes presentaron una mayor expresión de la miosina 1G al diagnóstico, también se encontraron valores similares entre el diagnóstico y la remisión. No se determinó cambio de expresión entre la consolidación y el grupo control. Se aplicó prueba no paramétrica U-Mann Whitney entre grupos, $p (<0.0001^{****})$, $p (<0.0001^{****})$, $p (0.0028^{**})$, $p (0.0097^{**})$. Diagnóstico $n=101$, Remisión $n=70$, Consolidación $n=73$, Control $n=18$.

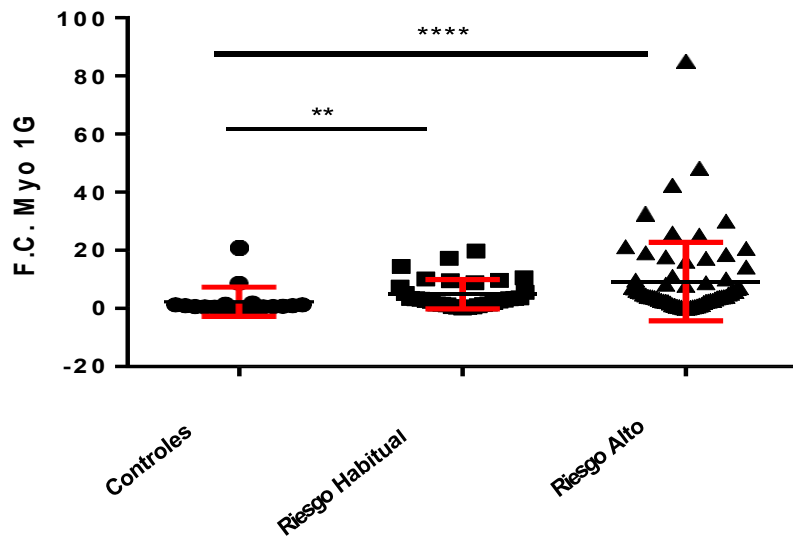


Figura 14. Expresión de la miosina 1G en CMN de pacientes de Riesgo Alto y Habitual. Se observó que la expresión de la miosina 1G al diagnóstico es mayor en los pacientes de riesgo alto en comparación con el grupo control. Se aplicó la prueba no paramétrica U-Mann Whitney para obtener el valor de significancia. $p < 0.0014^{**}$, $p < 0.0001^{****}$. Riesgo Habitual $n=33$, Riesgo Alto $n=70$, Control $n=18$.

Al conocer que el grupo de pacientes de riesgo alto tenían mayor expresión de la miosina 1G al diagnóstico, comenzamos a estudiar la expresión en pacientes con diferentes criterios clínicos de alto riesgo. Analizar los niveles de expresión en los pacientes con translocación (9:22), observamos que en las células mononucleares de estos niños hay un aumento de la expresión de la miosina 1G en fase de remisión y consolidación respecto al grupo Control. (Figura 15).

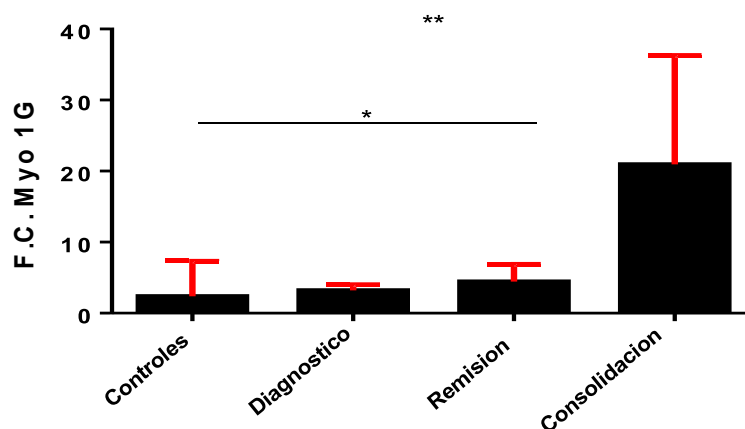


Figura 15. Niveles de expresión de la miosina 1G en pacientes con translocación (9:22) Cromosoma Filadelfia. Se evaluó la expresión de la miosina 1G en los pacientes con translocación, obteniéndose el F.C. Se observó cambio en la expresión entre la fase de Consolidación y el grupo control. La expresión es mayor en Remisión y Consolidación. El valor de p fue calculado con la prueba no paramétrica U-Mann Whitney, (p 0.0194*), (p 0.0086**). Diagnostico n=5, Remisión n=4, Consolidación n=4, Control n=18.

Se analizó en 10 pacientes la expresión de la miosina 1G en sangre periférica y en M.O. para determinar si los blastos de M.O. tienen diferencia con los que migraron y se encuentran en sangre periférica. No se encontró una diferencia de expresión de la miosina 1G entre células de sangre periférica y médula ósea (**Figura 16**). El diagnóstico de los pacientes se realiza por aspirado de M.O. y en esta investigación se utilizaron muestras de sangre periférica, por esta razón fue importante evaluar la expresión de Myo 1G en CMN de ambas células y se pudo demostrar que al diagnóstico no hubo cambio.

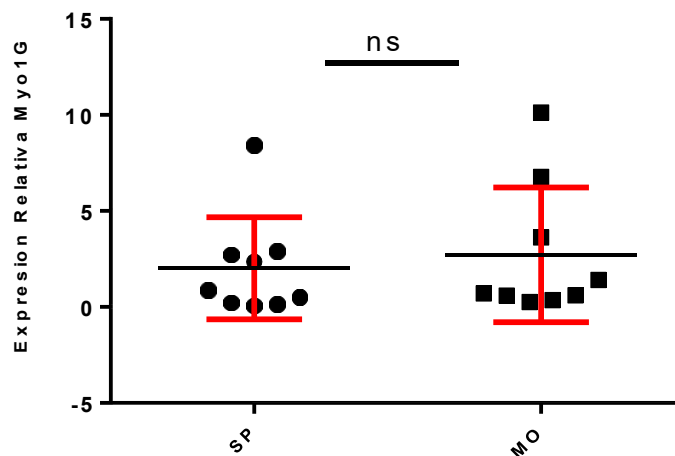


Figura 16. Niveles de expresión de la miosina 1G en pacientes con LLA al diagnóstico. Se mostró que la expresión de la miosina 1G es similar en las células de los pacientes en sangre periférica (SP) y medula ósea (M.O). El valor de P fue calculado con la prueba no paramétrica U-Mann Whitney (p 0.28), n=10.

Con los resultados obtenidos pudimos observar un aumento de Miosina 1G en los pacientes con LLA a nivel del mensajero, sin embargo, para el grupo de trabajo era importante determinar el contenido de la proteína en las células de estos pacientes. Para ello se continuo con el análisis de esta proteína por Inmunofluorescencia.

7.3 Evaluación de Miosina 1G en CMN por Inmunofluorescencia

Se determinó el contenido de Myo 1G por inmunofluorescencia. Se midió la intensidad de fluorescencia de 50 a 100 células por paciente y por fase de tratamiento. Se inició el análisis dividiendo la cohorte en dos poblaciones considerando la estratificación de riesgo criterio determinado por el área clínica, pacientes de Riesgo Alto (RA) y Riesgo Habitual (RH). En el grupo de Riesgo Alto encontramos una disminución de la proteína al diagnóstico mientras que los niveles en las fases de tratamiento se comportan igual al grupo control (**Figura 18**). En el grupo de Riesgo Habitual no se observan cambios en el contenido de la miosina 1G en ninguno de los grupos. (**Figura 19**).

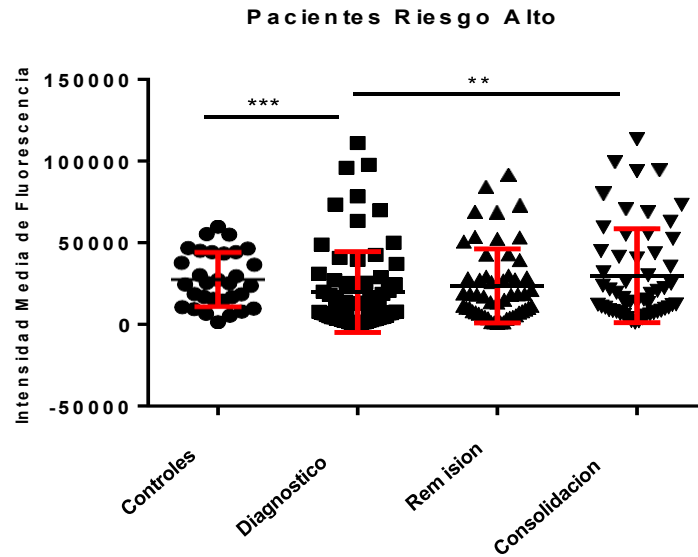


Figura 18. Análisis por Inmunofluorescencia de la proteína miosina 1G en pacientes con LLA-RA. En los pacientes con estratificación de Riesgo Alto encontramos diferencia en el contenido de la miosina 1G entre el diagnóstico y la fase de Consolidación. Esta última tiende a mostrar una expresión similar al control. El valor de p fue calculado por la prueba U-Mann Whitney $p < 0.0005^{***}$, $p < 0.0061^{**}$. Diagnostico $n=77$, Remisión $n=53$, Consolidación $n=55$, Control $n=31$.

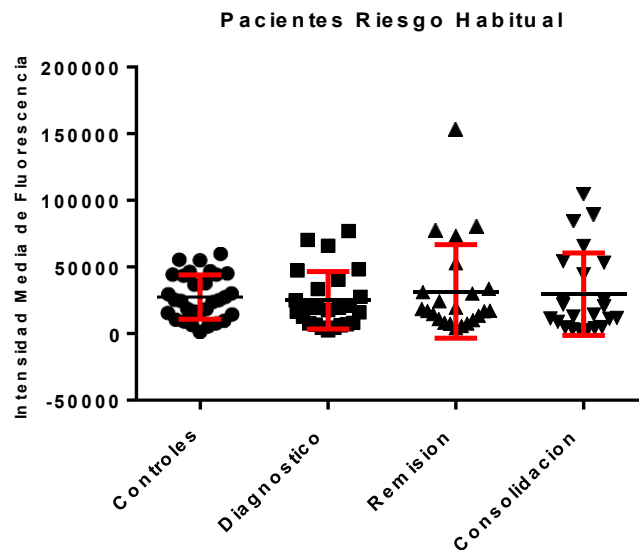


Figura.19.- Análisis por Inmunofluorescencia de la proteína miosina 1G en pacientes con LLA-RH. Se determinó el contenido de la miosina 1G en pacientes al diagnóstico y en las fases de tratamiento y se comparó con las CMN de los niños sanos. No se observó

diferencia en ninguno de los grupos al aplicar la prueba de ANOVA. p (0.8367). Diagnóstico $n=25$, Remisión $n=23$, Consolidación $n=23$, Control $n=31$.

Al observarse modificaciones en la expresión de la miosina 1G en el grupo de Riesgo Alto, se analizó el comportamiento de esta proteína en pacientes que presentaron datos clínicos de riesgo alto. Encontramos en los pacientes con recaída un nivel alto de la miosina 1G al diagnóstico y disminuida en las fases de tratamiento; sin embargo los datos no mostraron diferencias significativas (**Figura 20**). Se conservó el alto contenido de la miosina 1G en los pacientes con recaída al realizar una comparación con los pacientes de riesgo habitual y riesgo alto (**Figura 21**).

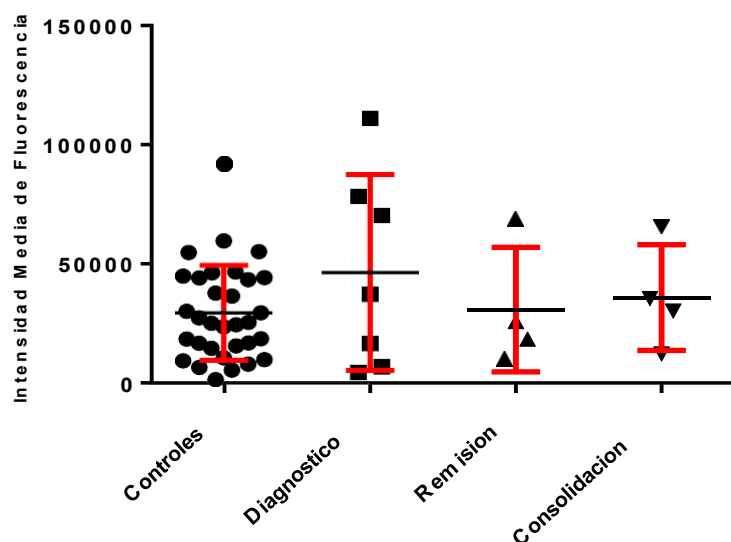


Figura 20. Análisis por Inmunofluorescencia de la miosina 1G en pacientes con recaída. En las CMN de los pacientes con recaída, la miosina 1G presenta una tendencia al aumento respecto a las fases de tratamiento y grupo control, sin embargo, no hubo significancia estadística analizado por ANOVA ($p=0.4272$). Diagnóstico $n=11$, Remisión $n=9$, Consolidación $n=9$, Control $n=31$.

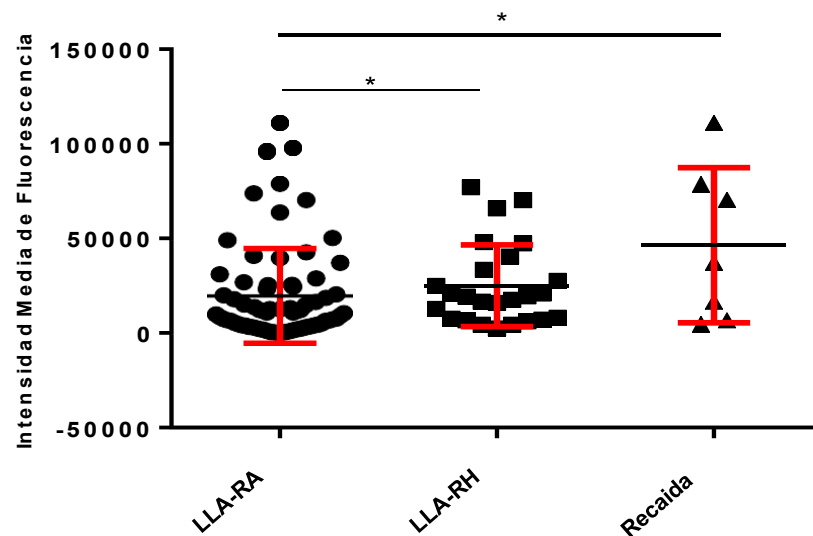


Figura 21. Análisis por Inmunofluorescencia de la miosina 1G en pacientes con diversa estratificación de riesgo. Se evaluó el contenido de la proteína en los pacientes de Riesgo alto, habitual y recaída. Encontramos un alto contenido de la miosina 1G en los pacientes con recaída en el momento del diagnóstico. RA= Riesgo Alto, RH=Riesgo habitual. Se aplicó la prueba de U-Mann Whitney y t-student. Se encontró diferencia con un valor de p (0.0481*), p (0.0128*). RA n=77, RH n=25, Recaída n=7.

Otro de los criterios clínicos en donde evaluamos la expresión de la miosina 1G fue en pacientes con infiltración al SNC. En ellos se observó una disminución de Myo 1G en CMN de sangre periférica al diagnóstico. El contenido de la proteína va incrementando en las fases de tratamiento. La expresión en las fases de tratamiento es similar a la que presenta el grupo control (**Figura 22**).

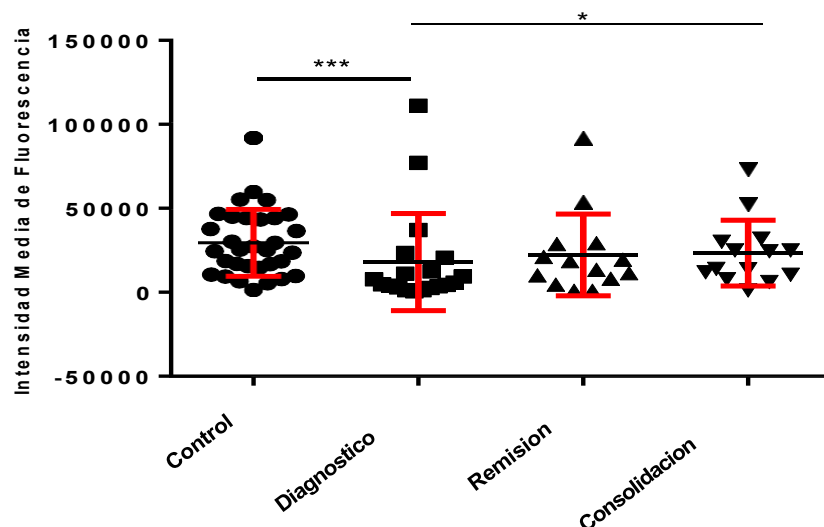


Figura 22. Análisis por Inmunofluorescencia de la miosina 1G en pacientes con Infiltración. En los pacientes con LLA que presentaron infiltrado se observa disminución en el contenido de la proteína miosina 1G y un aumento en las fases de tratamiento similar a los valores basales del grupo control. Solo se observa diferencia significativa entre diagnóstico y control, diagnóstico y fase de consolidación. Los valores de p se obtuvieron aplicando la prueba de U Mann-Whitney p (0.001***), p (0.045*). Diagnóstico $n=19$, Remisión $n=13$, Consolidación $n=13$, Control $n=31$.

Con los resultados obtenidos se demostró que los pacientes con recaída tienen una tendencia a aumentar el contenido de la miosina 1G comparado con los controles. También en algunos pacientes encontramos bajo contenido comparado con el grupo control. En la figura 23 se muestran imágenes de Inmunofluorescencia representativas en las que se observa alta fluorescencia en un paciente en recaída comparada con la expresión en el paciente sin recaída y el individuo sano, se debe recordar que mayor fluorescencia indica mayor contenido de la miosina 1G. **(Fig.23)**

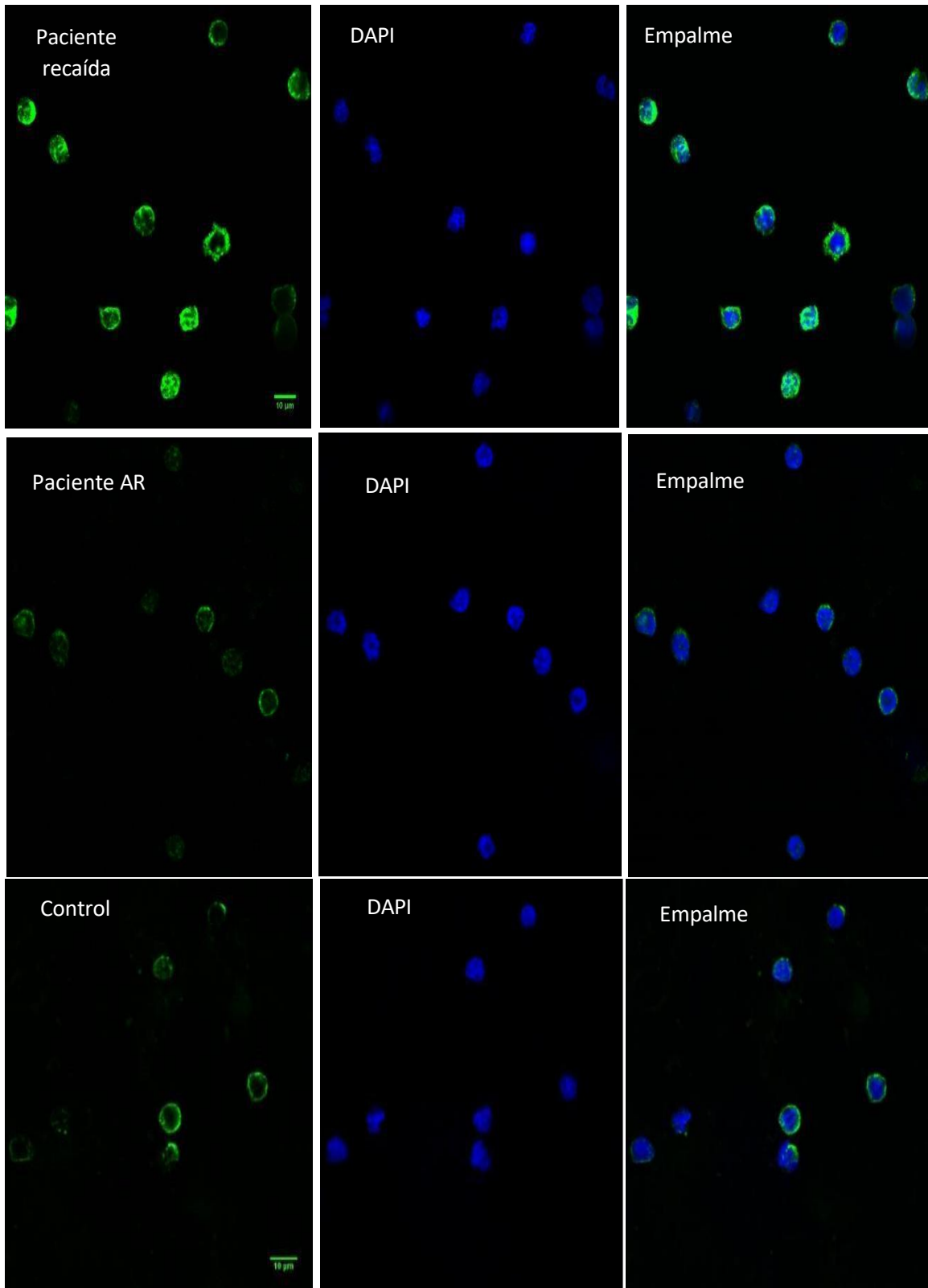


Figura.23.- Células Mononucleares (Inmunofluorescencia). Se muestran imágenes de un paciente con recaída, paciente con LLA de riesgo alto y un individuo sano. Las imágenes fueron obtenidas del Microscopio Olympus (60X).

7.4 Evaluación de la expresión de miosina 1G por Inmunocitoquímica

Se analizó a la proteína miosina 1G por Inmunocitoquímica ya que es una de las técnicas más utilizadas para diagnóstico en enfermedades hematológicas. Se midió el IOD (Intensidad de Densidad Óptica) de 100 células por paciente al diagnóstico y en cada fase de tratamiento, así como en cada uno de los individuos pediátricos sanos que se incluyeron al protocolo. El valor de IOD se relaciona con la intensidad de tinción celular (color marrón) que a su vez se asocia con el contenido de la miosina 1G. Como fue comentado anteriormente, la cohorte fue dividida en dos grupos considerando la estratificación de riesgo de los pacientes. En el grupo de riesgo habitual el contenido de la proteína no presentó ningún cambio al diagnóstico comparado con las fases de tratamiento ni con el grupo control. Existe una tendencia al aumento de la proteína al diagnóstico, dicho contenido tiene un comportamiento similar en la fase de consolidación. Esta tendencia al incremento se observa respecto al grupo control y fase de remisión (**Figura 24**).

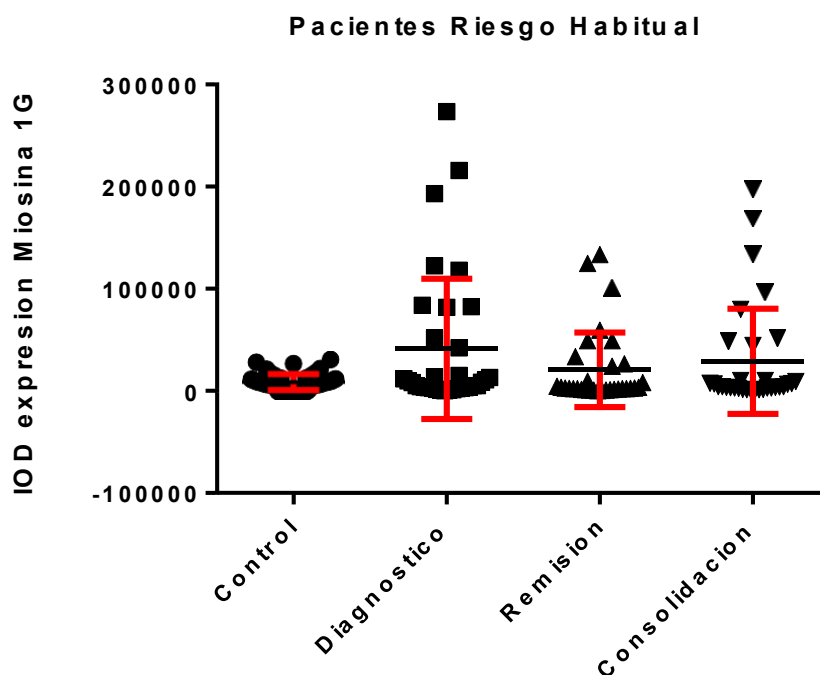


Figura 24. Análisis por Inmunocitoquímica de la proteína Myo1G en pacientes con LLA-RH. No se observa un cambio significativo en el contenido de la proteína entre las CMN de los pacientes al diagnóstico ni durante el tratamiento. Ninguna de las fases mostró un cambio respecto al grupo control. El valor de p se obtuvo aplicando la prueba de Kruskal-Wallis (0.3226). Diagnóstico n=34, Remisión n=32, Consolidación n=32, Control n=61.

Al igual que en la Inmunofluorescencia se analizó el contenido de la miosina 1G en las CMN de los pacientes que presentaron criterios clínicos de riesgo alto, entre los criterios analizados fueron translocaciones, respuesta a la ventana esteroidea, mala respuesta a la remisión, infiltración y recaídas.

En las CMN de los pacientes que tuvieron mala respuesta a la remisión encontramos un aumento de la miosina 1G al diagnóstico respecto al grupo control, sin embargo, en la fase de remisión se observa un contenido similar que el diagnóstico. (Figura 25)

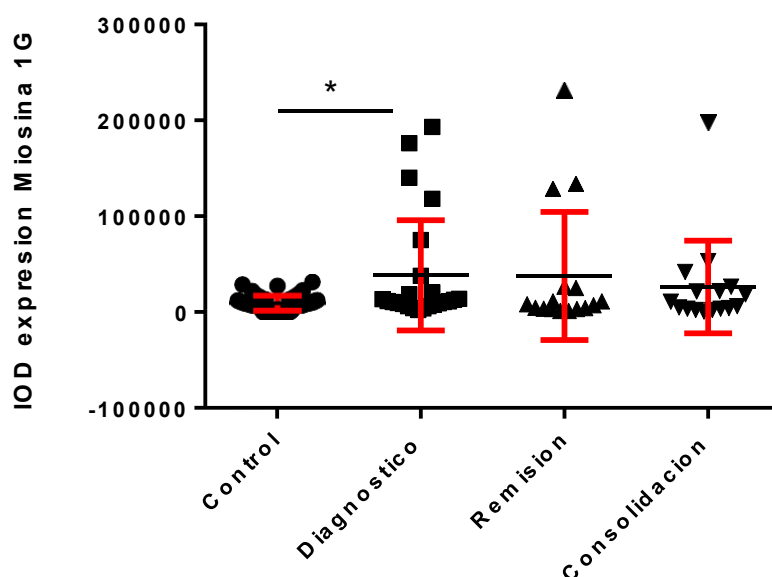


Figura 25. Análisis por Inmunocitoquímica de la miosina 1G en pacientes con mala respuesta al tratamiento. Se observó un alto contenido de la proteína en los pacientes al diagnóstico respecto al grupo control. No existió cambio significativo entre las fases de tratamiento y la fase diagnostica, ese cambio tampoco se observa entre las fases y el grupo control. El valor de p se obtuvo al aplicar la prueba U-Mann Whitney y fue significativo al comparar la fase diagnóstica con el grupo control. $p < 0.0141^*$. Diagnostico $n=24$, Remisión $n=16$, Consolidación $n=16$, Control $n=61$.

En los pacientes con infiltrados a SNC se evaluó a la miosina 1G, y no se encontraron cambios entre las fases de tratamiento ni en el grupo control, sin embargo, hay una tendencia a aumentar en la fase diagnostica realizando una comparación con el grupo control y una tendencia a disminuir en la fase de consolidación comparando con la fase diagnostica y remisión. (Figura 26)

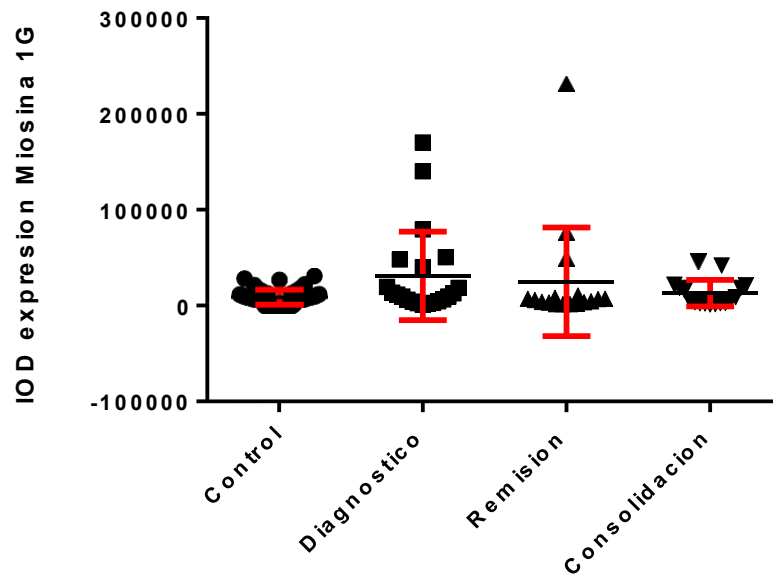


Figura 26. Análisis por Inmunocitoquímica de la proteína miosina 1G en pacientes con infiltración. Se determinó el contenido de esta proteína en pacientes con algún tipo de infiltración. No se observaron cambios significativos; se muestran tendencias al aumento en el diagnóstico y disminución en la fase de consolidación. El valor de p se obtuvo al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis. p (0.2616). Diagnóstico $n=21$, Remisión $n=17$, Consolidación $n=17$, Control=61.

Para confirmar los resultados obtenidos de los ensayos de inmunofluorescencia de los pacientes que recayeron, se analizó por Inmunocitoquímica a la proteína miosina 1G, en este grupo. Los datos indican una tendencia al aumento en el diagnóstico que se mantiene sin cambio en la fase de consolidación esto respecto al grupo control. No se obtuvo una diferencia significativa al aplicar la prueba estadística de Kruskal-Wallis. (**Figura 27**).

Es importante comentar que la Inmunocitoquímica es una técnica muy utilizada en el ámbito clínico principalmente en padecimientos como el cáncer, para la determinación de moléculas específicas en las células tumorales como posibles biomarcadores. Por ello solo se confirmaron algunos de los datos que se obtuvieron por inmunofluorescencia por esta técnica.

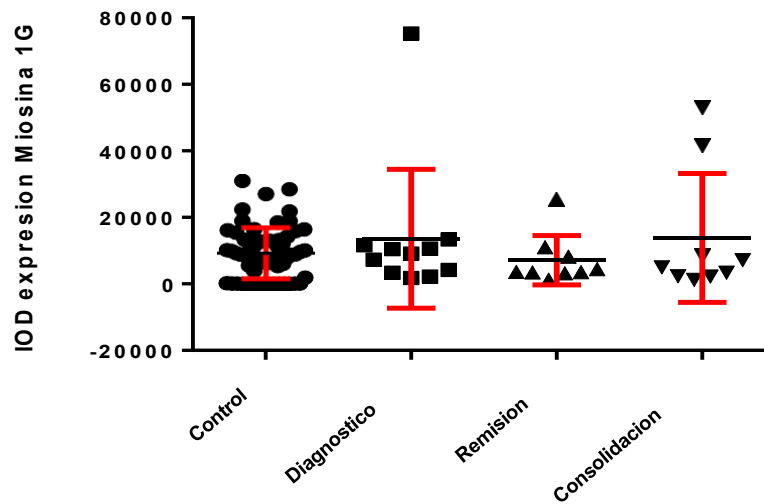


Figura 27. Análisis por Inmunocitoquímica de la proteína Myo 1G en pacientes con recaída. Se determinó el contenido de la miosina 1G en el grupo de pacientes que tuvieron recaída; no se observan cambios significativos, nuevamente en este grupo. Se observa un incremento en el diagnostico al grupo control y fase de remisión. Los niveles en el contenido proteico mostrados en la fase de consolidación son similares a los que se muestra al diagnóstico. El valor de p se obtuvo al aplicar la prueba Kruskal-Wallis. p (0.7817). Diagnóstico $n=11$, Remisión $n=9$ Consolidación $n=9$, Control $n=61$.

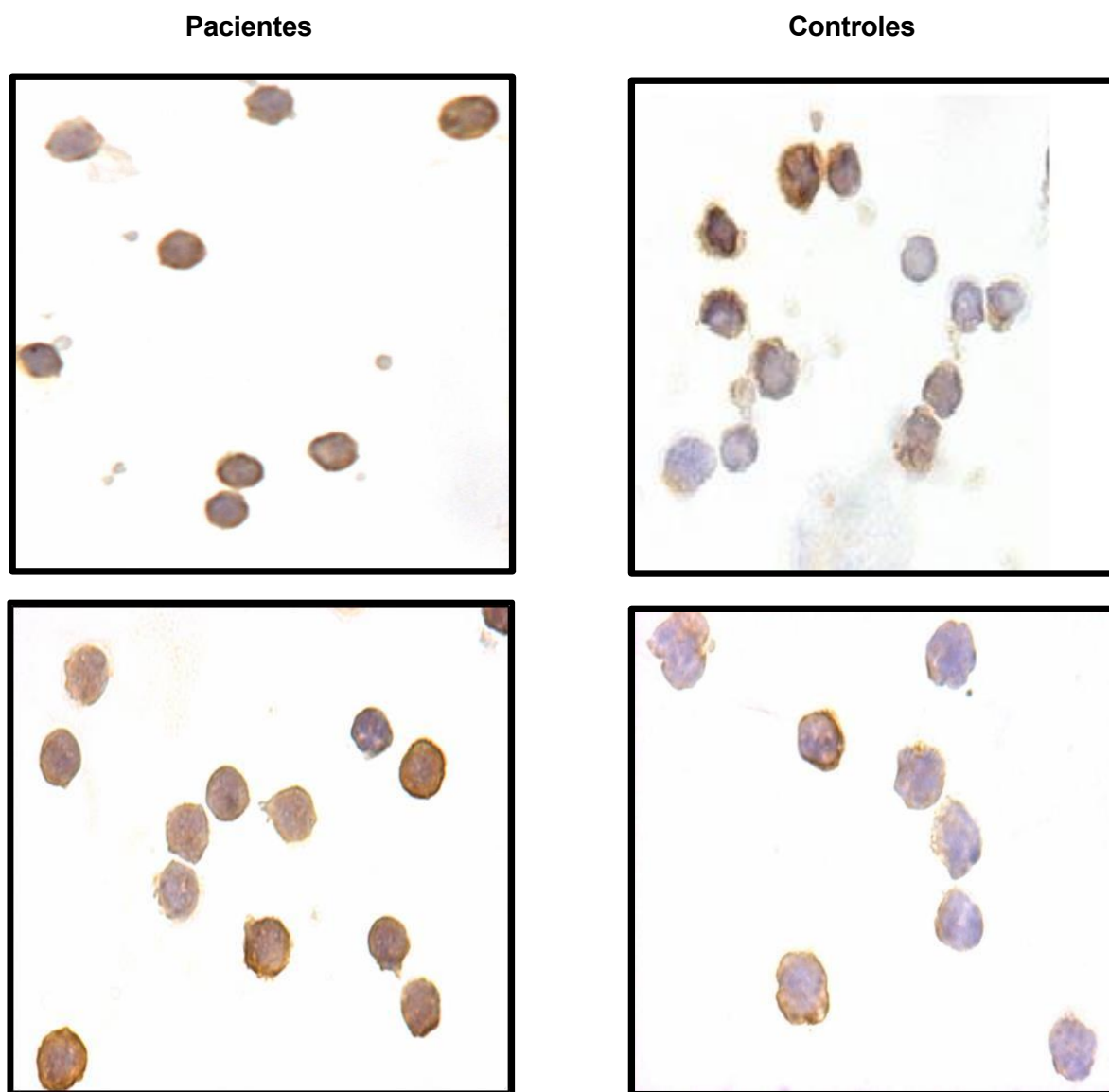


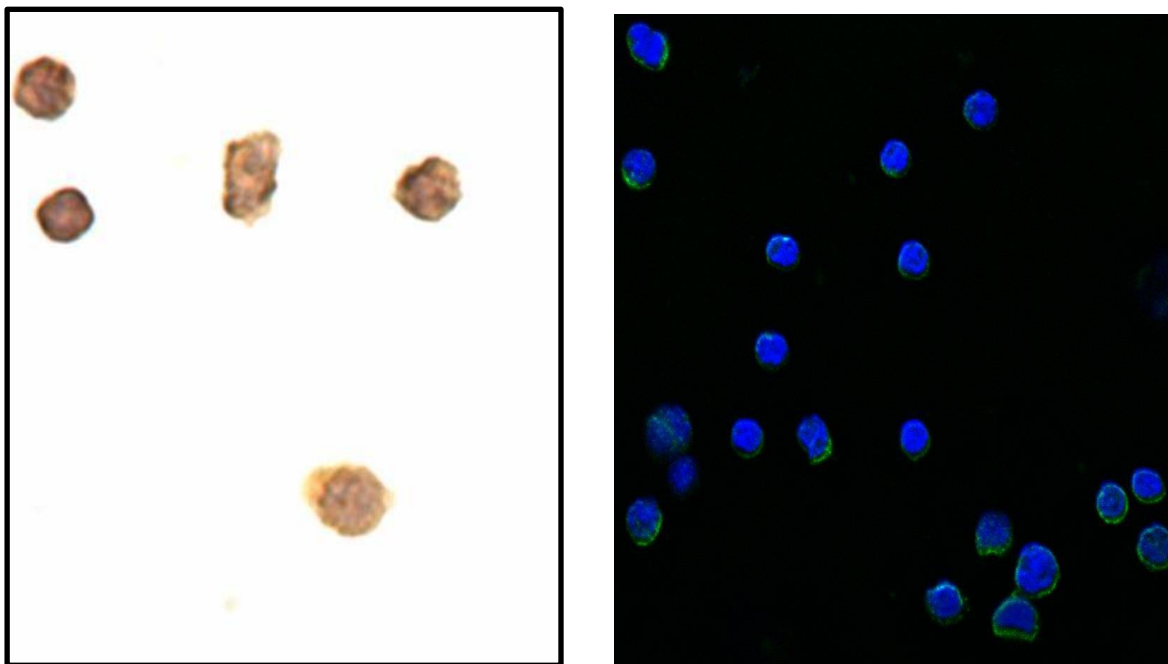
Figura 28. Imágenes representativas de CMN de dos pacientes con LLA y dos individuos pediátricos sanos. Las imágenes se adquirieron en un Microscopio Olympus (Aumento 100X).

Con los datos obtenidos resultó importante realizar las asociaciones de los niveles proteicos de la miosina 1G con las manifestaciones clínicas de cada uno de los pacientes, así como la respuesta que ellos fueron presentando durante el tratamiento.

Se llevó a cabo la revisión de expedientes clínicos y se obtuvieron diversos casos reportados como graves con recaída temprana y un aumento de la expresión de Miosina 1G (Caso 1 y 2) y pacientes de Riesgo Habitual con baja expresión de nuestra proteína (Caso 3 y 4).

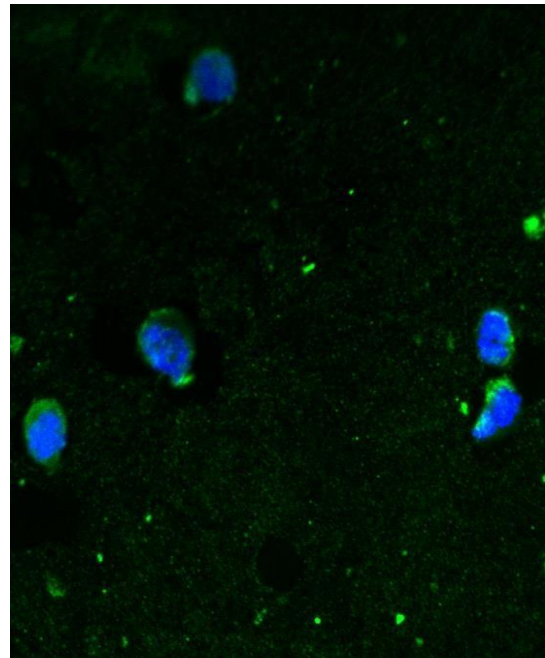
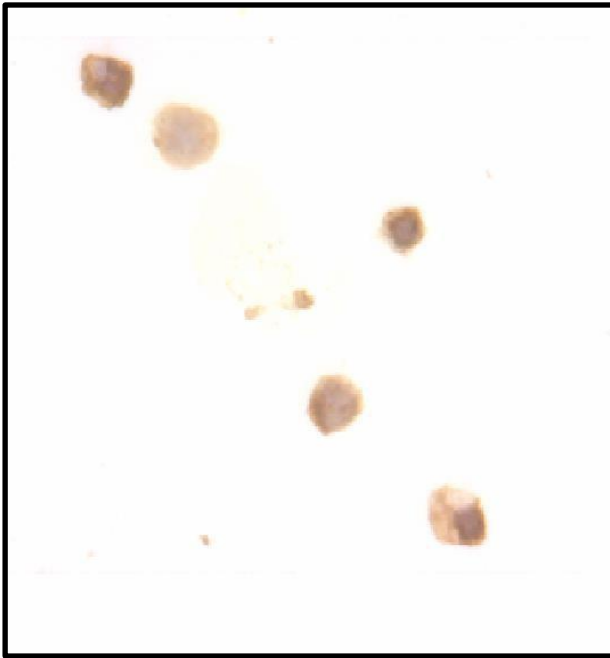
Se muestran imágenes representativas de CMN de sangre periférica de pacientes con LLA al diagnóstico con diferente estratificación de riesgo. Se muestran las imágenes teñidas por medio de Inmunocitoquímica (panel izquierdo) y por inmunofluorescencia (panel derecho).

7.5 Casos Clínicos



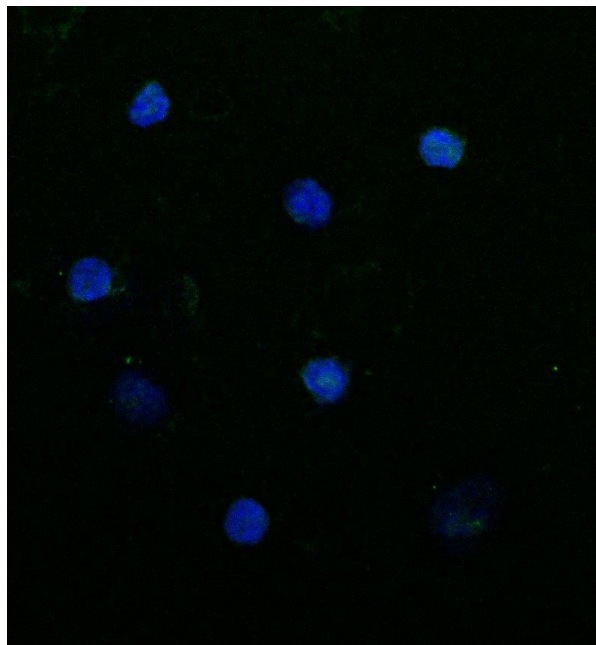
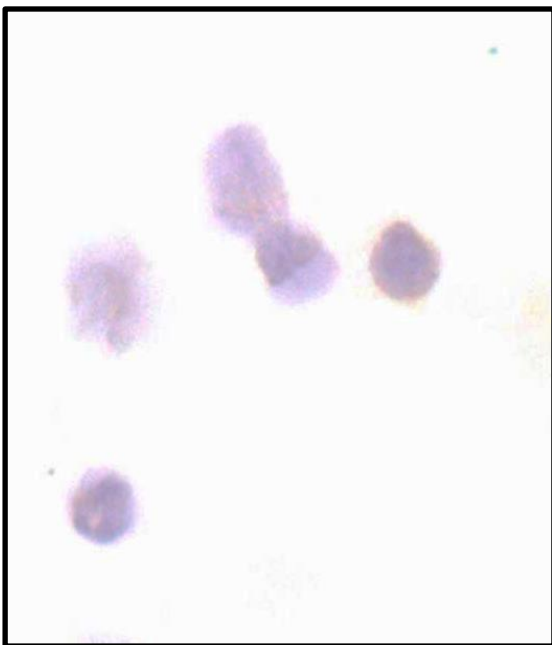
7.5.1 Caso 1

Paciente Masculino de 6 años con hiperleucocitosis al diagnóstico (leucocitos 540,400); Inmunofenotipo T; mala respuesta a la ventana de esteroide; mala respuesta al tratamiento (Remisión); presento recaída y falleció.



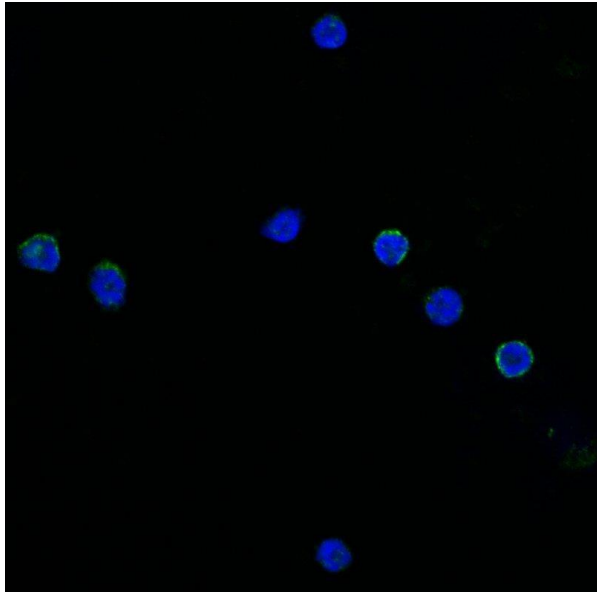
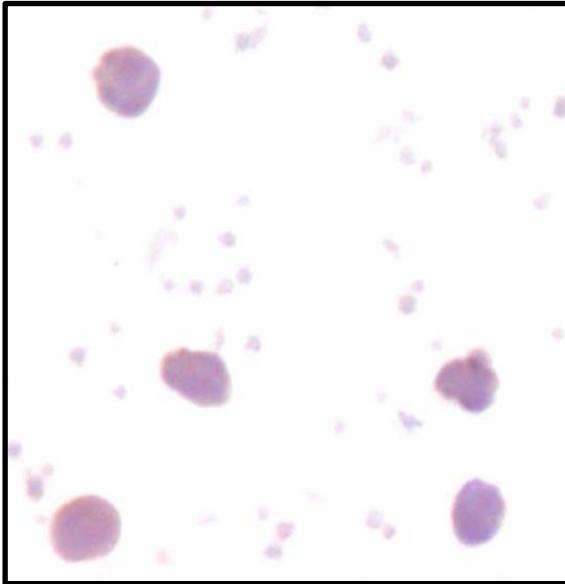
7.5.2 Caso 2

Paciente Femenino de 5 años con Leucocitos de 20,400 al diagnóstico, inmunofenotipo Pre-B. Mala respuesta a la ventana de esteroide, mala respuesta al tratamiento (Remisión), presento recaída y falleció.



7.5.3 Caso 3

Paciente Femenino de 3 años con Leucocitos de 8,000 a su diagnóstico; presentó translocación (12:21); inmunofenotipo Pre-B con buena respuesta a la ventana de esteroide, buena respuesta a tratamiento, sin infiltración, sin recaída y vivo.



7.5.4 Caso 4

Paciente de ocho años con leucocitos de 15,400 a su diagnóstico; inmunofenotipo Pre-B. Con buena respuesta a la ventana de esteroide, buena respuesta al tratamiento (Remisión), sin infiltración ni recaída y vivo

8. DISCUSIÓN

La leucemia es el cáncer con mayor incidencia en niños a nivel mundial y la Leucemia Linfoblástica Aguda es el subtipo más común en la población infantil, representando el 80% de los casos. México tiene mayores incidencias en este cáncer pediátrico y tasas de mortalidad significativamente más altas en comparación con países desarrollados. En estos últimos años se han logrado grandes avances en el tratamiento de la LLA alcanzándose una tasa de curación del 90%⁶⁰. Este éxito sin duda se debe al desarrollo tecnológico y científico de los tratamientos, el diseño de esquemas terapéuticos, así como la detección oportuna de clonas malignas para la identificación de pacientes con alto riesgo de recaída. Actualmente la elección del tratamiento se administra con base en el riesgo de recaída que presentan los pacientes, el cual se determina por diversos criterios clínicos. Se han establecido protocolos terapéuticos más agresivos para alcanzar en estos pacientes una tasa de curación mayor a pesar de ello la tasa de recaída sigue siendo alta, aproximadamente el 20% de los niños recaen¹⁵. Este evento origina el estudio detallado de moléculas que puedan ser identificadas como posibles blancos terapéuticos con la finalidad de mejorar las terapias.

Hay estudios que proponen a las miosinas como biomarcadores potenciales en diferentes tipos de cáncer. Estas proteínas dentro de este padecimiento se han relacionado con metástasis^{52,53,54,57}. No hay algún reporte que haya asociado a esta familia de proteínas no convencionales con la leucemia, a pesar de que se conoce que algunas de ellas se expresan en las células blanco de este tipo de cáncer.

El presente trabajo de investigación se enfocó en el estudio de las Miosinas Clase I no convencionales en LLA. Se evaluó la expresión en células mononucleares de sangre periférica de pacientes e individuos sanos y se identificaron a los 8 miembros de esta familia de miosina. La expresión fue variable en las células de los pacientes (**Figura 4**); en ellos se detectó mayor expresión de Miosina 1B, 1C y 1G (**Figura 5**) respecto a la expresión determinada en los pediátricos sanos. Estas mismas células presentaron una expresión disminuida de Miosina 1E y 1F (**Figuras 8, 9**).

Al realizar una evaluación clínica de los expedientes de los niños se encontró que los pacientes con mayor expresión de la miosina 1B fallecieron durante el curso de la enfermedad; tres de ellos presentaron mala respuesta a la ventana de esteroide y a la remisión; dos presentaron infiltración. Se ha reportado que esta miosina juega un papel importante en la migración de células neoplásicas escamosas de cabeza y cuello, también en la progresión del tumor en cáncer cervical por incremento en la migración de las células cervicales.

La miosina 1B se ha asociado con mal pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello^{50,51}, su participación en la migración dentro de esta enfermedad y los resultados que se obtuvieron nos hace crear expectativas a futuro de una posible asociación de la Myo 1B con la Leucemia Linfoblástica Aguda o específicamente con un factor o criterio clínico que predisponga al paciente al aumento de riesgo.

Miosina 1C, también se ha asociado a diversas neoplasias y es considerada como un oncogén en cáncer gástrico⁵³ porque al igual que la miosina 1B incrementa la migración de las células tumorales al estar sobreexpresada. Esta sobreexpresión se ha observado en cáncer de próstata y con los datos obtenidos en este estudio también en CMN de pacientes con LLA; sin embargo, haciendo la revisión clínica de ellos no hay por el momento asociación con algún criterio clínico que predisponga al paciente a un aumento de la gravedad. El estudio de ambas proteínas en células neoplásicas leucémicas podría contribuir con aportaciones que mejoren la terapia de los pacientes con LLA. Por otro lado a pesar de que se observó un aumento en la expresión de Myo 1G en los pacientes, no existen actualmente reportes que asocien a esta miosina específicamente con algún tipo de cáncer, pero su expresión ha sido estudiada en linfocitos, linaje celular afectado en la LLA^{23,24}.

La disminución en la expresión de la miosina 1F era esperada (**Figura 9**), ya que los reportes existentes la asocian con migración en neutrófilos³⁸ y en este padecimiento estas células se encuentran disminuidas por las alteraciones hematopoyéticas presentes en la médula ósea. Los pacientes con LLA cursan con neutropenia durante la evolución de la enfermedad como consecuencia de los tratamientos, por ello se cree que no es una molécula que pueda proporcionar datos de la evolución del padecimiento ni estar asociada a LLA, aunque el hecho de estar disminuida al diagnóstico, denota un hallazgo de la disminución de un linaje celular (neutrófilos) por una anomalía en la médula ósea.

Uno de los principales objetivos de esta investigación, ha sido el inicio de la búsqueda de posibles marcadores celulares para LLA, por ello se analizó la expresión de estas miosinas de clase I en Linfocitos B humanos como principales células blanco de este padecimiento, ya que al conocer que miosinas se expresaban de manera basal en este linaje celular se podía determinar las variaciones en las CMN de pacientes con LLA, considerando que el porcentaje mayor de células estudiadas en estos pacientes son linfocitos B y linfocitos B inmaduros al tratarse de una LLA de linaje B, que es la que más incide en los niños.

Al analizar a los Linfocitos B encontramos que expresan mayormente a miosina 1C (**Figuras 11 y 12**). Con los resultados obtenidos de esta proteína y los reportes de su participación en cáncer^{53,54,55}, se podría proponer un estudio más detallado en las células de estos pacientes para determinar específicamente su participación en este padecimiento.

Las miosinas que se expresaron en las células B humanas fueron, 1A,1B,1C,1D,1E,1F Y 1G, no se identificó a la miosina 1H. Existe un reporte que menciona la expresión y la participación de estas miosinas en linfocitos B de murinos. El conocer la expresión de estas proteínas en Linfocitos B, permitió comparar la expresión de las siete miosinas entre las CMN de pacientes y de individuos sanos respecto a la de los Linfocitos B. Se encontró que la miosina 1A, 1D 1E y 1F están menos expresadas en las CMN de los pacientes que en las CMN de los individuos sanos respecto a la expresión determinada en los Linfocitos B. Por otro lado, la miosina 1G se encuentra más expresada en CMN de pacientes que en CMN de controles (**Figuras 5 y 13**).

Las miosinas de clase I más estudiadas en linfocitos B, son Miosina 1C y 1G, y se sabe que ambas proteínas están involucradas en la migración de esta estirpe celular.

El papel de Miosina 1C se ha relacionado con la estabilización de lamelipodios y filopodios, específicamente involucrada en la dinámica del citoesqueleto^{31,32,33}. Mientras que el papel de miosina 1G está relacionado con migración; su deficiencia disminuye la rigidez y adhesión celular, así como la tensión de membrana, la cual afecta la polarización originándose un movimiento celular más lento. Lo contrario se observa en linfocitos T pues al eliminar la expresión de Miosina 1G aumenta la velocidad y disminuye el ángulo de giro al migrar o explorar la superficie de la CPA^{39,40,41}. Todos los estudios realizados por el grupo de trabajo y otros grupos respecto a esta proteína y su expresión en células hematopoyéticas (principalmente linfocitos) fueron los principales antecedentes para estudiarla en Leucemia Linfoblástica Aguda.

Se identificó una sobreexpresión de la miosina 1G en pacientes con LLA al diagnóstico a nivel de mRNA (**Figura 13**). Por otro lado, al igual que en la primera fase de tratamiento (remisión), la fase de consolidación y el grupo control presentaron una expresión baja respecto al diagnóstico.

Al encontrarse sobreexpresada miosina 1G al diagnóstico del paciente, se esperaba que la expresión disminuyera en los pacientes que recibieran tratamiento es decir en la remisión y en la consolidación, siempre y cuando tuvieran buena respuesta al tratamiento y evolución favorable de la enfermedad. La disminución de la proteína se encontró hasta la segunda fase de tratamiento (consolidación); se consideró que este cambio en la expresión fue una consecuencia del tratamiento quimioterapéutico. Se sabe que la vincristina principal quimioterapéutico afecta la formación de microtúbulos, por esto se cree que también podría estar afectando la formación de microfilamentos de actina, que son el soporte para la miosina. Al disminuir la actina podría disminuir la miosina 1G.

Es importante comentar que parte de la terapia en la fase de consolidación es el suministro de metotrexato, que interviene en la síntesis de ADN y ARN, lo que influye en la formación de proteínas. Dicho mecanismo del fármaco podría estar repercutiendo en la síntesis de la miosina 1G, lo cual daría como resultado una baja expresión de la proteína en esta fase de tratamiento.

Otra observación importante de este estudio fue la sobreexpresión de la miosina 1G en las células de los pacientes de riesgo alto comparada con la expresión del grupo control (**Figura 14**), esto condujo a realizar un análisis detallado de la expresión de la proteína en los pacientes que presentaron criterios clínicos de riesgo alto desde su diagnóstico tales como edad, hiperleucocitosis, translocaciones e infiltrados. También el seguimiento clínico que se realizó en estos pacientes nos permitió estudiar la expresión en pacientes con mala respuesta al tratamiento y recaída.

En los pacientes con translocación (9:22) se observó un aumento de la expresión de la miosina 1G en fase de Consolidación (**Figura 15**), esto lo asociamos a una mala respuesta al tratamiento que podría estar repercutiendo en la recurrencia de la enfermedad. Se debe considerar que los niños con t (9:22) confieren un mal pronóstico especialmente cuando la translocación está asociada a un recuento leucocitario alto y a una respuesta inicial lenta a la terapia. En nuestra población pediátrica detectamos 3 casos de 5 que presentaron hiperleucocitosis (Mayor a 100, 000 leucocitos) al diagnóstico y 2 casos con mala respuesta al tratamiento desde inicio.

Los pacientes con la t(9:22), son tratados con medicamentos inhibidores de proteínas con actividad tirosin cinasa, específicamente en esta translocación se inhibe la función de la proteína BCR-ABL que se genera por la alteración de los cromosomas 9 y 22. Esta proteína aumenta el ciclo celular y produce un incremento en la proliferación, es por ello que se infiere que al no presentarse una respuesta adecuada al tratamiento por parte del paciente, continua el aumento proliferativo de blastos, los cuales creemos presentan la mayor expresión de la miosina 1G y por esta razón se da el incremento en la expresión de esta proteína en la fase de consolidación en estos niños.

Fue importante determinar la expresión entre CMN de sangre periférica y CMN de médula ósea, con la finalidad de demostrar que los blastos encontrados en sangre periférica tenían una expresión similar a los que se estudiaron en médula ósea. Al realizar la comparación no se observó diferencia en la expresión entre ambos grupos (**Figura 16**).

Se determinó el contenido de la proteína mediante inmunofluorescencia e Inmunocitoquímica para relacionar los resultados con los que se obtuvieron a nivel RNA mensajero.

Se inició con el análisis de la miosina 1G en los pacientes de riesgo alto y riesgo habitual, con la finalidad de conocer si esta proteína pudiera estar participando en la estratificación de riesgo.

Específicamente por la función que presenta la miosina 1G en las células, se consideró que estaría más expresada en pacientes de riesgo alto, principalmente en aquellos que presentaban infiltración, ya que la formación de infiltrados se podría ver favorecida por la sobreexpresión de esta proteína motora; Los resultados mostraron un bajo contenido de la Myo 1G en los pacientes de riesgo alto al diagnóstico al compararse con el grupo control y las fases de tratamiento. El contenido de la proteína durante el tratamiento se comportó de manera similar al control (**Figura 18**). Mientras que en el grupo de pacientes de riesgo habitual, la miosina 1G se mantuvo sin cambio.

La clínica se basa en diversos criterios para estratificar el riesgo en los pacientes, uno de esos criterios, es la presencia de infiltrados al diagnóstico, presente en un 3 a 5% de los niños con LLA. Al evaluar la expresión de estos pacientes, se encontró una tendencia a la baja de la proteína al diagnóstico, aunque dicho cambio no fue significativo (**Figura 22**); Se conoce que al producirse un infiltrado, las células experimentan cambios en la expresión de las proteínas involucradas en el proceso de movilidad celular; estas proteínas y el microambiente de la célula permite que surjan dichas infiltraciones^{61,62}.

En los niños con LLA se conocen dos sitios santuarios o extramedulares principales que protegen a las células tumorales de los agentes quimioterapéuticos (SNC y testículo)¹⁵, por lo tanto, se considera que las células que migraron hacia estos sitios de infiltración, son las que pudieran tener más alta expresión de la miosina 1G; esto no pudo determinarse porque solo estudiamos la expresión en células de sangre periférica, las cuales se cree que tienen una velocidad de movimiento más disminuida que aquellas que fueron influidas por agentes quimiotácticos a sitios determinados. Posteriormente, sería importante evaluar la expresión de esta proteína en líquido cefalorraquídeo de pacientes con infiltración, para confirmar nuestra teoría. La expresión disminuida de la miosina 1G en los pacientes de riesgo alto podría deberse a la formación de infiltrados que únicamente están presentes en este grupo de pacientes.

Como fue mencionado anteriormente, era importante relacionar todos los criterios clínicos que predisponen al paciente a incrementar la gravedad de la enfermedad con la expresión de la miosina 1G. Entre los criterios evaluados tenemos; la respuesta al tratamiento, el inmunofenotipo, la translocación (9:22), la infiltración y la recaída.

En los pacientes que recayeron, se observó una tendencia al aumento de la proteína respecto a la expresión de las células del grupo control; este cambio no alcanzo significancia estadística (**Figura 20**), la propuesta seria incrementar a este grupo de pacientes para realizar un estudio específico que permita identificar de manera temprana la predisposición a una recaída, ya que suelen ser los pacientes que experimentan fracaso al tratamiento y muerte.

La expresión de la miosina 1G en la fase de consolidación del grupo de pacientes en recaída es similar a la que se determinó en las células en los mismos a su diagnóstico, una posibilidad es que el fracaso al tratamiento no permitió observar un cambio en la expresión entre el diagnóstico y la fase de consolidación, observándose la misma tendencia. La miosina 1G está sobreexpresada en los pacientes con recaída, esto comparándose con los pacientes de RA y RH al diagnóstico (**Figura 21**). Esta expresión nos hacen pensar que es consecuencia de que sus células progresan a varios sitios y la actividad migratoria de las mismas debe estar incrementada.

El uso de la tinción por Inmunocitoquímica en este estudio nos permitió corroborar los datos obtenidos por inmunofluorescencia, considerando que es una técnica muy utilizada para la identificación de moléculas blanco, en padecimientos como el cáncer y enfermedades hematológicas. La desventaja radica en que es una técnica menos sensible y a pesar de que la cuantificación se realiza con softwares específicos tiene cierto grado de variabilidad.

Los resultados de esta técnica mostraron un análisis no variable en el grupo de riesgo habitual, entre el diagnóstico, las fases de tratamiento y el grupo control; así como se demostró en la inmunofluorescencia (**Figura 24**). Lo mismo se observa al evaluar el contenido de la Myo 1G en pacientes con Infiltración (**Figura 26**).

Se observó nuevamente la tendencia al incremento de la miosina 1G en los pacientes con recaída al diagnóstico, conservándose dicha expresión en la segunda fase de tratamiento (consolidación), considerando que no se observa cambio entre estas fases por mala respuesta al tratamiento (**Figura 27**).

El contenido de la miosina 1G también se analizó en pacientes que presentaron mala respuesta al primer ciclo de tratamiento (remisión) y se pudo determinar su contenido al diagnóstico fue alto en estos pacientes respecto al grupo control. En la fase de remisión el contenido proteico mantuvo igual a lo observado al diagnóstico y en la fase de consolidación se encuentra una tendencia a la baja.

Al no existir cambios en el contenido de la proteína del diagnóstico a la remisión en pacientes con fracaso a este primer tratamiento, se podría generar expectativas de la relación de la miosina 1G con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico; esta idea prevalece al observar una tendencia a la baja en la siguiente fase de tratamiento (consolidación), debido a que los pacientes con mala respuesta vuelven a reinducirse, con cambios en las dosis de tratamiento que podrían ya estar repercutiendo en la expresión de la miosina 1G en la fase de consolidación (**Figura 25**).

Un objetivo primordial en este estudio fue asociar los criterios clínicos determinados por el área médica con la expresión de la miosina 1G. De los cuatro casos clínicos presentados se observan dos con alta tinción celular (color marrón) que cualitativamente se asocian con alto contenido de la miosina 1G; estos pacientes presentaron mal pronóstico por sus características clínicas expuestas desde su diagnóstico. Los otros dos casos muestran características clínicas de bajo riesgo, la tinción celular se encuentra disminuida (color marrón) al igual que la expresión de la proteína.

La fluorescencia de las células de los cuatro casos que no presentaron ningún factor de riesgo alto es menor comparada con los casos que experimentaron recaída, que cualitativamente se encuentra más incrementada.

La inmunofluorescencia es una técnica altamente sensible que permite la detección de moléculas celulares con el uso de anticuerpos específicos; La diferencia de los resultados obtenidos por esta técnica y RT-PCR, posiblemente se deba a que en estos últimos ensayos se realiza la cuantificación de todos los linajes celulares que constituyen a las CMN.

Se debe tomar en consideración que al obtenerse las CMN purificadas se pueden adherir a esta población otras células o plaquetas, que pueden estar influyendo en la cuantificación; esto se descarta con la técnica de Inmunofluorescencia, al realizarse el conteo del contenido de la proteína célula por célula. Aun teniendo la presencia de plaquetas o restos eritrocitarios, estos son excluidos de la cuantificación por el tamaño celular que presentan.

Los cambios distintos observados en la fase de consolidación en ambas técnicas, posiblemente sea consecuencia de las altas dosis de metotrexato¹⁵ que se les administra a los pacientes en esta fase de tratamiento; Este fármaco impide la formación del tetrahidrolato necesario para la síntesis de ácidos nucleicos, este afecta principalmente a las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular al catalizar la forma activa del folato endógeno que es un donador de grupos metilo para la formación de metionina en la síntesis de proteínas; Al realizar la cuantificación total de la expresión del gen de la miosina 1G en las CMN que se encuentran disminuidas por uso del fármaco, se reduce el contenido de la proteína, hecho que no ocurre en la inmunofluorescencia por que la cuantificación de la proteína no es dependiente del número de células.

Otro de los aspectos que podrían estar influyendo en las diferencias de los resultados de RT-PCR e Inmunofluorescencia es la presencia de corte y empalme (*Splicing*) alternativo, el cual es un proceso que experimentan más del 90 % de los genes humanos. Mediante este mecanismo se producen diferentes proteínas a partir de un gen, ocasionando variantes proteicas que pueden presentar propiedades y funciones biológicas diferentes^{63,64}.

9. CONCLUSIONES

- El análisis de la expresión de las miosinas de clase I en células mononucleares de pacientes con Leucemia linfoblástica aguda mostró la expresión de las ocho proteínas, demostrándose una sobreexpresión de Miosina 1B, 1C y 1G.
- La miosina 1B posiblemente podría estar influyendo en la gravedad de la LLA debido a que en nuestra población de estudio se detectaron casos reportados clínicamente como graves con altos niveles de expresión de esta proteína.
- Pacientes con LLA y t (9:22) sobreexpresan a la miosina 1G durante el tratamiento de consolidación.
- En la población pediátrica de estudio se detectaron niños en recaída con alta expresión de la miosina 1G.
- La miosina 1G podría ser un posible marcador pronóstico en la Leucemia Linfoblástica Aguda.

10. PERSPECTIVAS

- Se pretende aumentar el número de pacientes con LLA que han sufrido recaída para determinar la expresión de Myo 1G en este grupo.
- Incluir un mayor número de pacientes con t (9:22) con la finalidad de realizar el análisis de expresión de Myo 1G.
- Aumentaran el numero de pacientes con diagnóstico de LLA y los meses de seguimiento clínico de los pacientes para la determinación de Myo1G, se sugiere monitoreo clínico hasta fase de mantenimiento.
- Se iniciará el estudio piloto con Myo 1B, determinando su expresión en pacientes pediátricos con LLA.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. avbCooper GM. The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. 2000;935-955.
2. Secretaria de Salud Publica. Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes en México. ISBN 978-607-460-243-2. 2011.
3. Ortega-Sanchez MA ,Osnaya-Ortega ML ,Rosas-Barrientos JV.Leucemia Linfoblástica Aguda. 2007; 23: 26-33.
4. Rendón-Macías ME, Reyes-Zepeda NC, Villasís-Keever MÁ, Serrano MJ, Escamilla NA. Tendencia mundial de la supervivencia en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. Revisión de las últimas cuatro décadas, Bol Med Hosp Infant Mex. 2012; 69(3): 153-163.
5. Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: Descriptive epidemiology. BMC Cancer. 2011;11.
6. Mejía-Arangur JM. Ortega-Álvarez MC, et al. Epidemiología de las Leucemias Agudas en México. Rev. Med IMSS. 2005; 43(4); 323-333.
7. Mejía-Arangur JM. Molecular epidemiology of acute leukemia in children: Causal model, interaction of three factors-susceptibility, environmental exposure and vulnerability period. Bol Med Hosp Infant Mex. 2016; 73(1): 55–63.
8. Lassaletta A. Leucemia Linfoblástica Aguda, Servicio Hemato-Oncología Hospital Pediátrico de Madrid. Rev Ped Int. 2012;16 (6): 453-462.
9. Jiménez-Morales S, Hidalgo-Miranda A, Ramírez -Bello J. Leucemia Linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. Bol Med Hosp Infant Mex. 2017; (74): 13-26.
10. Lepe-Zuñiga JL, Jerónimo-López FJ, Hernández-Orantes JG. Cythopathologic features of childhood acute leukemia at the Hospital de Especialidades Pediátricas, Chiapas, México. Bol Med Hosp Infant Mex. 2017; 74(2):122-133.
11. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, et al. Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study-Report from the Mexican Interinstitutional Group for the

Identification of the causes of Childhood Leukemia. *Bio Med Research International*. 2014; 10: 8.

12. Chargoy-Vivaldo E, Martínez-Hernández C, et al. Translocaciones en Leucemia Linfoblástica Aguda y supervivencia a cinco años en niños. *Rev Hematol Mex*. 2018; 19(4): 165-173.

13. Sramkova L, Muzikova K, et al. Detectable minimal residual disease before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts extremely poor prognosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*. 2017; 48(1): 93-100.

14. Pui CH, Robison LL et al. Acute Lymphoblastic Leukaemia. 2008; 371 (9671); 1030-43.

15. Locatelli F, Schrappe M, et al. How I treat relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012; 120(14): 2807-2816.

16. Krishnan S, Wade R, et al. Temporal changes in the incidence and pattern of central nervous system relapses in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on four consecutive Medical Research Council trials 1985-2001. *Leukemia*. 2010; 24: 450-459.

17. Zhang X, Wu H, Fan H, Su B, Zhang G, Dong L. Clinical characteristics and prognosis of pediatric patients with B cell acute lymphoblastic leukemia relapse. *Oncol Lett*. 2018; 16(3): 2929–2934.

18. Friedl P, Bröcker E. The biology of cell locomotion within three-dimensional extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000; 57(1):41–64.

19. Chambers AF, Groom, AC. et al. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2(8): 563–572.

20. McConnell RE, Tyska MJ. Leveraging the membrane - cytoskeleton interface with myosin-1. *Trends Cell Biol*. 2010; 20(7): 418–26.

21. Liu K.C, Cheney R E. Myosins in cell junctions. *BioArchitecture*. 2012; 2(5): 158–170.

22. Maravillas-Montero J.L, Santos-Argumedo L. The myosin family: unconventional roles of actin-dependent molecular motors in immune cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2012; 91(1): 35–46.

23. Patino-López G, Aravind L. et al. Myosin 1G is an abundant class I myosin in lymphocytes whose localization at the plasma membrane depends on its ancient divergent pleckstrin homology (PH) domain (Myo1PH). *J Biol Chem*. 2010; 285(12): 8675–8686.

24. Santos-Argumedo L, Maravillas-Montero JL, López-Ortega O. Class I myosins in B cell physiology: Functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic. *Immunol Rev.* 2013; 256(1): 190–202.
25. Tyska MJ, Nambiar R, Myosin 1a: A motor for microvillar membrane movement and mechanics. *Commun Integr Biol.* 2010; 3(1): 64-66.
26. Mazerik JN, Tyska MJ. Myosin1A targets to microvilli using multiple membrane binding motifs in the tail homology (TH1) domain. *J Biol Chem.* 2012; 287(16): 13104-13115.
27. Tyska MJ, Mackey AT, et al. Myosin-1a is critical for normal brush border structure and composition. *Mol Biol Cell.* 2005; 16(5): 2443-2457.
28. Komaba S, Coluccio LM. Localization of myosin 1b to actin protrusions requires phosphoinositide binding. *J Biol Chem.* 2010; 285(36): 27686–27693.
29. Komaba S, Coluccio LM. Myosin 1b regulates amino acid transport by associating transporters with the apical plasma membrane of kidney cells. *PLoS ONE.* 2015; 10(9): 0138012.
30. Brandstaetter H, Kishi-Itakura C, et al. Loss of functional MYO1C/myosin 1c, a motor protein involved in lipid raft trafficking, disrupts autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy.* 2014; 10(12): 2310–2323.
31. Greenberg MJ, Lin T, Goldman Y. et al. Myosin IC generates power over a range of loads via a new tension-sensing mechanism. *Proc Nat Acad Sci.* 2012; 109(37): E2433–E2440.
32. Maravillas-Montero JL, Gillespie PG, et al. Myosin 1c Participates in B Cell Cytoskeleton Rearrangements, Is Recruited to the Immunologic Synapse, and Contributes to Antigen Presentation. *J Immunol.* 2011; 187(6): 3053–3063
33. Pyrpassopoulos S, Feeser EA. et al. Membrane-bound Myo1c powers asymmetric motility of actin filaments. *Curr Biol.* 2012; 22(18): 1688–1692.
34. Yamazaki R, Ishibashi T, et al. Knockdown of Unconventional Myosin ID Expression Induced Morphological Change in Oligodendrocytes. *ASN Neuro.* 8 (5): 1177/1759091416669609.
35. Cheng J, Grassart A., Drubin D G. Myosin 1E coordinates actin assembly and cargo trafficking during clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell.* 2012; 23(15): 2891–2904.

36. Gupta P, Gauthier NC, et al. Myosin 1E localizes to actin polymerization sites in lamellipodia, affecting actin dynamics and adhesion formation. *Biology Open*. 2013; 2(12): 1288–1299.
37. Krendel M, Osterweil EK., et al. Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS Letters*. 2007; 581(4): 644–650.
38. Salvermoser M, Pick R, Weckbach LT, et al. Myosin 1f is specifically required for neutrophil migration in 3D environments during acute inflammation. *Blood*. 2018; 131(17): 1887–1898.
39. Olety B, Wälte M, Honnert U, Schillers H, Bähler M. Myosin 1G (Myo1G) is a haematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. *FEBS Lett*. 2010; 584(3): 493–9.
40. Gerard A, Patino-López G, Beemiller P, Nambiar R, Ben-Aissa K, Liu Y, et al. Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1g. *Cell*. 2014; 158(3): 492–505.
41. Maravillas-Montero JL, López-Ortega O, Patiño-López G, Santos-Argumedo L. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and Myosin 1G in acute lymphoblastic leukemia endocytosis in B lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2014; 44(3): 877–886.
42. Santos-Argumedo L, Maravillas-Montero JL, López-Ortega O. Class I myosins in B cell physiology: Functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic. *Immunol Rev*. 2013; 256(1): 190–202.
43. Arun RM, Lakkakula BV, Chitharanjan AB. Role of myosin 1H gene polymorphisms in mandibular retrognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2016; 149(5): 699–704.
44. Valastyan S., Weinberg RA. Review Tumor Metastasis : Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell*. 2011; 147(2): 275–292.
45. Peckham M. How myosin organization of the actin cytoskeleton contributes to the cancer phenotype. *Biochem Soc Trans*. 2016; 44(4): 1026–1034.
46. Li Y-R, Yang W-X. Myosins as fundamental components during tumorigenesis: diverse and indispensable. *Oncotarget*. 2016; 7(29): 46785–46812.
47. Ouderkirk JL, Krendel M. Non-muscle myosins in tumor progression, cancer cell invasion, and metastasis. *Cytoskeleton*. 2014; 71(8): 447–463.
48. Wyckoff JB, Jones, JG, Condeelis JS, Segall JE. A critical step in metastasis: In vivo analysis of intravasation at the primary tumor. *Cancer Res*, 2000; 60(9):2504–2511.
49. Palomo-Colli MA, Zapata Tarres MM. Inmunofenotipo en el líquido cefalorraquídeo de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda. *Gaceta Mexicana Oncología*. 2015; 14(1): 13–20.

50. Ohmura G, Tsujikawa T, Yaguchi T, et al. Aberrant Myosin 1b Expression Promotes Cell Migration and Lymph Node Metastasis of HNSCC. *Mol Cancer Res*. 2015; 13(4): 721–731.
51. Chapman BV, Wald AI, Akhtar P, et al. MicroRNA-363 targets myosin 1B to reduce cellular migration in head and neck cancer. *BMC Cancer*. 2015; 15:861.
52. Zhang HR, Lai SY, Huang LJ, et al. Myosin 1b promotes cell proliferation, migration, and invasion in cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 2018; 149(1): 188–197.
53. Du Y, Chen Y, Wang, F, Gu L. miR-137 plays tumor suppressor roles in gastric cancer cell lines by targeting KLF12 and MYO1C. *Tumor Biology*. 2016; 37(1): 13557-13569.
54. Ihnatovych I, Sielski N L., Hofmann W.A. Selective expression of myosin IC isoform A in mouse and human cell lines and mouse prostate cancer tissues. *PLoS ONE*. 2014; 9(9): e108609.
55. Saidova AA, Potashnikova DM, Tvorogova AV, Maly IV, Hofmann WA, Vorobjev IA. Specific and reliable detection of Myosin 1C isoform A by RTqPCR in prostate cancer cells. *PeerJ*. 2018; 6: e5970.
56. Kim JH, Kang GH. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(15): 4230–4243.
57. Ouderkirk-Pecone JL, Goreczny GJ, Chase SE, Tatum AH, Turner CE, Krendel M. Myosin 1e promotes breast cancer malignancy by enhancing tumor cell proliferation and stimulating tumor cell de-differentiation. *Oncotarget*. 2016; 7(29): 46419–46432.
58. Heim JB, Squirewell EJ, Neu A, et al. Myosin-1E interacts with FAK proline-rich region 1 to induce fibronectin-type matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017; 114(15): 3933–3938.
59. Duhoux F.P, Ameye G, Libouton JM, Bahloula K.. et al. The t(11;19)(q23;p13) fusing MLL with MYO1F is recurrent in infant acute myeloid leukemias. *Leuk Res*, 2015; 35(9): e171–e172.
60. Miranda-Lora L, Klunder-Klunder M. et al. Estructura Hospitalaria y su relación con la sobrevivencia de pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda. *Bol Med Hosp Infant Mex*. 2012; 69(3): 205-211.
61. Chunsong H, Yuling H, Li W. et al. CXCL13 and CXCL19 Cooperatively Render Resistance to Apoptosis in B Cell Lineage Acute and Chronic Lymphocytic Leukemia CD23+CD5+ B Cells. *J Immunol*. 2006; 177(10): 6713–6722
62. Passaro D, Irigoyen M, Catherinet C, et al. CXCR4 Is Required for Leukemia-Initiating Cell Activity in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015; 27(6): 769–779.

63. Montes-Resano M. Mecanismo molecular del acoplamiento de la transcripción y el splicing alternativo de los pre-mRNAs (tesis de posgrado). 2012. Universidad de Granada, España.
64. López-Perolio I. Estudio de Splicing alternativo y variantes sin clasificar en genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario: implicaciones clínicas (tesis de posgrado).2018. Universidad Complutense de Madrid, España.

12. ANEXOS

Miosinas LB/CMN	F.C. Pacientes	F.C. Control
Myo 1A	23.50	4.30
Myo 1B	2.20	8.86
Myo 1C	85.28	578.69
Myo 1D	37.74	18.19
Myo 1E	27.60	5.51
Myo 1F	7.65	2.09
Myo 1G	8.90	11.49

Tabla 4.- Fold Change (F.C.) de Miosinas Clase I Linfocitos B (LB)-Células Mononucleares (CMN).

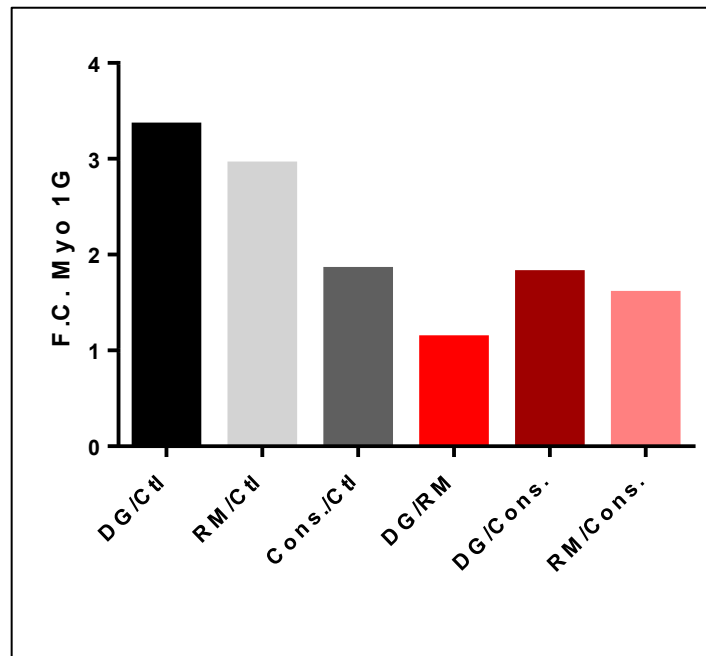


Figura.17.- Expresión de Miosina 1G. Se observa que al diagnóstico en las CMN hay un aumento en la expresión de la proteína respecto a las fases de tratamiento y al grupo control. DG=Diagnóstico, RM= Remisión, Cons. =Consolidación, Ctl =Control.

PRIMERS	Tm	%GC	SECUENCIA
F-GAPDH	62.3	57.9	AGCCACATCGCTCAGACAC
R-GAPDH	60.2	52,6	GCCCAATACGACCAAATCC
F-Miosina 1G	59	63	CTCCCCCTCTCCTTCACTG
R-Miosina 1G	59	53	TGGAAACACCTTGCCTCAC
F-Miosina 1A	60	50	AAGCAGGCATCTCTCAAACG
R-Miosina 1A	60	50	GCTCATTGGGCTTTATGCAC
F-Miosina 1B	60	55	GGGCTTACTGGCTTGGATCT
R-Miosina 1B	60	50	ACAGCAACTGCATGCTTACG
F-Miosina 1C	60	55	ACAGGAAGATCATCGCCAAG
R-Miosina 1C	59	50	GACGAGCCAGGTAAAAGTGC
F-Miosina 1D	60	55	GAGAGACCGCCTCACCTTTT
R-Miosina 1D	59	50	TCGCCTCTTCATAGCCTTGT
F-Miosina 1E	60	58	GCAGGGAGAGGAGAAGCAA
R-Miosina 1E	60	58	GTCGCTGTCCATGTTGACC
F-Miosina 1F	59	55	GAGGAACTAAAGCCGGGAGT
R-Miosina 1F	60	61	GGTTCAGGGGGATCTTGG
F-Miosina 1H	59	57	CCTGGTCCTGCTACAGACTTG
R-Miosina 1H	60	50	GCATGTTTGCCCACTTTCTC

Tabla 5.- Secuencias de primers para las miosinas de clase I y GAPDH. Los primers se obtuvieron mediante el programa de ROCHE.

Página Roche

<http://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1&storeId=15006#tab-3>

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Se invita a su hijo(a) _____ para que participe en el proyecto de investigación titulado “Correlación de la expresión de miosinas clase I con la severidad de la enfermedad en pacientes con Leucemia Linfoblástica Infantil”, cuyo objetivo principal es determinar en su paciente el estado de unas moléculas que pertenecen al sistema inmune y se encuentran alteradas en niños con leucemia. El procedimiento consiste en permitir que utilicemos en el laboratorio de investigación el remanente (residuo) de la muestra sanguínea que se tome en el Hospital para uso diagnóstico o seguimiento clínico en el servicio correspondiente. Los beneficios de este estudio no serán directamente para mi niño(a), ni para mí, serán para ayudar a ampliar el conocimiento sobre si los niños con Leucemia tienen alteraciones en su sistema inmunológico y esto pudiera tener alguna repercusión en el desenlace de su enfermedad.

Los riesgos de este estudio para mi niño(a) consisten en un posible malestar en el momento de sacar la muestra de sangre en el hospital, aunque esto se hará con equipo especial para minimizar el posible malestar.

La participación en este estudio es voluntaria. Es de mi conocimiento que seré libre de retirar a mi hijo(a) de esta investigación en el momento que lo desee, sin que esto afecte o le sea negada la atención necesaria para su tratamiento en esta Institución y que se me entregará una copia de esta hoja de consentimiento.

Yo _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma de la madre/padre o tutor:

Nombre del niño(a):

Número de expediente: _____

Diagnóstico:

Dirección:

Teléfono:

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante)

He explicado al Sr(a)._____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación en seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión, de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del Investigador:

Dr. Genaro Patiño López

B.E. Laura Angelica Estrada Abreo

Dirección: Hospital Infantil de México “Federico Gómez” Laboratorio de Inmunología y Proteómica

Teléfono: 52289917 Ext.4507

Fecha: _____

High expression of Myosin 1g in pediatric acute lymphoblastic leukemia

Laura A. Estrada-Abreo^{1,2}, Leonor Rodríguez-Cruz², Yanelly Garfias-Gómez¹, Janeth E. Araujo-Cardenas¹, Gabriela Antonio-Andrés³, Alfonso R. Salgado-Aguayo⁴, Darío Orozco-Ruiz⁵, José Refugio Torres-Nava⁵, Juan D. Díaz-Valencia¹, Sara Huerta-Yépez³ and Genaro Patiño-López¹

¹Immunology and Proteomics Laboratory, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México

²Cell Biology and Flow Cytometry Laboratory, Department of Health Sciences, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México

³Oncologic Diseases Research Unit, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México

⁴Laboratory of Research on Rheumatic Diseases, National Institute of Respiratory Diseases, Ismael Cosío Villegas, México City, México

⁵Oncology Service, Hospital Infantil Moctezuma, México City, México

Correspondence to: Genaro Patiño-López, email: gpatino@himfg.edu.mx

Keywords: Myosin 1g; acute lymphoblastic leukemia; high risk; biomarker; pediatric

Received: March 13, 2021

Accepted: August 13, 2021

Published:

Copyright: © 2021 Estrada-Abreo et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#) (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most frequent cancer in pediatric population. Although the treatment has improved and almost 85% of the children are cured about 20% suffer relapse, therefore finding molecules that participate in the pathogenesis of the disease for the identification of relapse and patients at risk is an urgent unmet need. Class I myosins are molecular motors involved in membrane tension, endocytosis, phagocytosis and cell migration and recently they have been shown important for development and aggressiveness of diverse cancer types, however Myo1g an hematopoietic specific myosin has not been studied in cancer so far. We evaluated the expression of Myo1g by qRT-PCR, Immunocytochemistry and Immunofluorescence in a cohort of 133 ALL patients and correlated the expression at diagnosis and after treatment with clinical features and treatment outcomes. We found high expression levels of Myo1g in Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMCs) from patients with ALL at diagnosis and those levels decreased after complete remission; furthermore, we found an increase in Myo1g expression on patients with 9:22 translocation and those who relapse. This study show that Myo1g is over expressed in ALL and that may participate in the pathogenesis of the disease specially in high-risk patients.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00132

Matrícula: 2133801762

**DETERMINACIÓN DE LA
EXPRESIÓN DE MIOSINAS
CLASE I EN CÉLULAS
LINFOIDES Y SU RELACIÓN
CON LA GRAVEDAD DE LA
LEUCEMIA EN PACIENTES
PEDIÁTRICOS**

Con base en la Legislación de la Universidad Autónoma Metropolitana, en la Ciudad de México se presentaron a las 9:00 horas del día 19 del mes de octubre del año 2021 POR VÍA REMOTA ELECTRÓNICA, los suscritos miembros del jurado designado por la Comisión del Posgrado:

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES
DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR
DR. ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO



LAURA ANGELICA ESTRADA ABREO
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: LAURA ANGELICA ESTRADA ABREO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. JULIO CESAR ALMANZA PEREZ

VOCAL

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

DR. BENJAMIN PEREZ AGUILAR

SECRETARIO

DR. ALFONSO RAFAEL SALGADO AGUAYO