

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



**EFFECTO DE LA SOBREENPRESIÓN DE MIOSINA 1G SOBRE LA MIGRACIÓN
DE LINFOCITOS B Y SU CORRELACIÓN CON LA GRAVEDAD DE LA
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA

LIC.BIOL.EXP.LAURA ANGELICA ESTRADA ABREO

COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES

**DR.GENARO PATIÑO LÓPEZ
DRA. LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ**

ASESOR

DR.ALFONSO R. SALGADO AGUAYO

(09/2015)

**“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la
Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de
Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel
Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo,
Clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.**

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 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:

“EFECTO DE LA SOBREEXPRESIÓN DE MIOSINA 1G SOBRE LA MIGRACIÓN DE LINFOCITOS B Y SU CORRELACIÓN CON LA GRAVEDAD DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA “, que presentó

LIC.BIOL.EXP.LAURA ANGELICA ESTRADA ABREO

El día 1 de Septiembre del año 2015
Sinodales:



Dr. Rodolfo Velasco Lezama

PRESIDENTE



Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo
SECRETARIO



Dr. David Cruz Robles
VOCAL 1



M. en C. Felipe Mendoza Pérez
VOCAL 2



COMITÉ TUTORAL

CODIRECTORES



Dr. GENARO PATIÑO LÓPEZ



Dra. LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ

ASESOR



Dr. Alfonso Rafael Salgado Aguayo

DEDICATORIAS

A MI PADRE

Por ser siempre una figura de fortaleza y generosidad para mí, por ser una guía en mi vida, por brindarme tu apoyo de manera incondicional y por creer en mí.

Gracias

En tí he encontrado al mejor padre y al mejor amigo, gracias por compartir este logro conmigo.

A MI MADRE

Por ser una parte fundamental en mi vida, por todo el inmenso cariño que me diste y por las bendiciones que me mandas desde donde estas.

Gracias

A MIS HERMANOS

Por brindarme toda su ayuda, por ser un ejemplo de perseverancia y tenacidad para mí, por alentarme a seguir adelante cuando me encontraba en situaciones complicadas y por compartir conmigo momentos de felicidad.

Gracias

Mi Ale querida gracias especialmente a tí, por compartir conmigo tantos desvelos, momentos de angustia y de mucha alegría.

A MIS ASESORES

A ustedes les agradezco mucho por contribuir en mi formación académica, por compartir conmigo su conocimiento, por su entrega en mi aprendizaje y por confiar en mi trabajo y en lo que puedo lograr a nivel profesional.

A MI UNIVERSIDAD

Por ser la institución que permitió mi formación académica, por que viví experiencias inolvidables en cada una de sus aulas y porque continúas brindándome la oportunidad de seguir creciendo académicamente.

Gracias

Este trabajo que he realizado con mucho esfuerzo y cariño principalmente lo dedico a los niños y a sus padres que colaboraron conmigo en este proyecto, por confiar en que podemos brindarles una alternativa para mejorar su calidad de vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
ESTRUCTURA DE LAS MIOSINAS.....	4
FUNCIONAMIENTO DE LAS MIOSINAS	6
CLASES DE MIOSINAS	7
MIOSINAS CLASE I.....	7
MIOSINA 1G	8
ORIGEN Y FUNCIONALIDAD DE LOS LINFOCITOS B.....	9
LEUCEMIA	10
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	11
MANIFESTACIONES CLÍNICAS	12
CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA.....	13
ESTIMACIÓN DEL RIESGO.....	17
TRATAMIENTO	18
EPIDEMIOLOGÍA	19
ANTECEDENTES	21
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25

OBJETIVO GENERAL.....	26
OBJETIVOS PARTICULARES	26
MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
ANÁLISIS DE DATOS	28
EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G EN CÉLULAS MONONUCLEARES POR PCR EN TIEMPO REAL	29
EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G POR INMUNOCÍTOQUÍMICA.....	30
ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR.....	31
PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO	33
TRANSFECCIÓN LÍNEA CELULAR.....	33
RESULTADOS.....	34
ANÁLISIS CLÍNICO	34
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G POR INMUNOCITOQUÍMICA	35
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G POR PCR EN TIEMPO REAL	37
INTEGRIDAD DE RNA.....	37
EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G.....	39
DISCUSIÓN.....	48
CONCLUSIONES	55
PERSPECTIVAS.....	55
ANEXOS.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	65

FIGURAS

Figura 1. Estructura de la Miosinas.....	5
Figura 2. Mecanismo de acción de las Miosinas.....	6
Figura 3. Complejo Proteínico Acto-miosina.....	7
Figura 4. Incidencia de Cáncer en pacientes pediátricos.....	11
Figura 5. Modelo de diferenciación Linfocitaria.....	15
Figura 6. Datos bioinformáticos del Microarreglo (Base de datos Oncomine).....	21
Figura 7. Tinción Inmunocitoquímica para Miosina 1G.....	22
Figura 8. Expresión de Miosina 1G en pacientes (Tinción Inmunocitoquímica)...	36
Figura 9. Análisis Cuantitativo del ensayo de Inmunocitoquímica.....	37
Figura 10. Electroferogramas Bioanalyzer.....	38
Figura 11. Gráfico de Amplificación de PCR.....	40
Figura 12. Gráfico Δ Ct Pacientes LLA vs Individuos sanos.....	41
Figura 13. Gráfico Δ Ct Pacientes LLA-RA vs Individuos sanos.....	42
Figura 14. Gráfico Δ Ct Pacientes LMA vs Individuos sanos.....	43
Figura 15. Gráfico Δ Ct Pacientes LLA vs LMA.....	44
Figura 16. Cambio en la expresión del gen de Miosina 1G (F.C).....	46
Figura 17. Células RS4, 11 transfectadas por el Plásmido pDest732Myo1G.....	47
	ix

TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la Leucemia Linfoblástica Aguda basada en la morfología celular.....	13
Tabla 2. Translocaciones cromosómicas en la Leucemia Linfoblástica Aguda.....	16
Tabla 3. Características de los vectores para transfección de la línea celular.....	32
Tabla 4. Características generales de los pacientes en estudio.....	34
Tabla 5. Factores de riesgo presentes en la población pediátrica en estudio.....	35
Tabla 6. Valores RIN (Número de Integridad del RNA).....	38
Tabla 7. Valores de los ΔC_t obtenidos de las amplificaciones de los pacientes pediátricos.....	39
Tabla 8. Valores P obtenidos de las comparaciones entre grupos de pacientes y controles.....	44
Tabla 9. $\Delta\Delta C_t$ y Fold Change (F.C.) obtenido de los datos de las amplificaciones del gen de Miosina 1G.....	45
Tabla 10. Resultados de las amplificaciones del gen de Miosina 1G en líneas celulares leucémicas.....	57
Tabla 11. Cts obtenidos de las amplificaciones de Miosina 1G por PCR en tiempo real.....	58

GLOSARIO

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMA: Leucemia Mieloblástica Aguda

ATP: Adenosin Trifosfato

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

ADP: Adenosin Difosfato

Pi: Pirofosfato

PH: Homologo a Pleckstrina

Myo 1G: Miosina 1G

CTH: Células Troncales Hematopoyéticas

IL-7: Interleucina-7

FAB: Grupo Franco Americano Británico

LLA-B: Leucemia Linfoblástica Aguda linaje B

LLA-T: Leucemia Linfoblástica Aguda linaje T

TdT: Desoxinucleotidil-transferasa terminal

HLA-DR: Antígeno Leucocitario Humano

SNC: Sistema Nervioso Central

CMN: Células Mononucleares

RNA: Ácido ribonucleico

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

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

pEntr: Plásmido de Entrada

pDest: Plásmido destino

GFP: Proteína Verde Fluorescente

SFB: Suero Fetal Bovino

ICAM-1: Molécula de Adhesión Intercelular 1

RA: Riesgo Alto

RH: Riesgo Habitual

LLA-RA: Leucemia Linfoblástica Aguda Riesgo Alto

LLA-RH: Leucemia Linfoblástica Aguda Riesgo Bajo

RIN: Número de Integridad del RNA

Ct: Ciclo Treshold

Δ Ct: Diferencia del Ciclo treshold

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

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

RESUMEN

La Leucemia es el cáncer más común en la etapa pediátrica, se distingue por infiltraciones en la médula ósea y otros tejidos; la presencia de infiltrados incrementa el riesgo del paciente. De los diferentes tipos de leucemia que se pueden presentar, la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia más común en menores de 15 años, constituye la cuarta parte de las neoplasias diagnosticadas en este grupo de edad y afecta a las estirpes celulares tipo B y T.

Actualmente existen reportes de que Miosina 1G, una proteína motora expresada en la periferia de las células hematopoyéticas, (principalmente en linfocitos) tiene un papel relevante en la migración de estas células. Un estudio previo mediante el análisis de un microarreglo, demostró que miosina 1G está sobreexpresada en leucemias, por lo que el objetivo del presente estudio fue evaluar la expresión de esta proteína en células de niños con LLA. Se incluyeron 13 pacientes riesgo alto, 13 pacientes riesgo habitual, 2 pacientes con LLA sin clasificación de riesgo, 5 pacientes con Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) y 10 individuos pediátricos sanos. Los resultados obtenidos muestran que la expresión de Miosina 1G se incrementa en niños de riesgo alto y el aumento en la expresión de la proteína podría estar asociado con la formación de infiltrados, sin embargo se considera necesario aumentar nuestra población pediátrica con dicho diagnóstico para obtener resultados más contundentes.

ABSTRACT

Leukemia is the most common cancer in children. It is characterized by infiltration of the bone marrow and other tissues; the presence of infiltrations is of bad prognosis and correlates with increased severity in patients. Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most frequent in children under 15 years, constitutes 25% of all the cancers diagnosed in this age group and affects B and T cell lineages.

Myosin 1G is a motor protein expressed below the membrane of hematopoietic cells, mainly in lymphocytes; in these cells this protein has an important role in migration. Results from an analysis of a microarray database, showed that myosin 1G is overexpressed in leukemias.

The main goal of this study was to analyze if Myo 1G was overexpressed in children with leukemia and determine if Myo 1G could function as a biomarker for this disease. To begin to address this we included 13 high-risk patients, 13 normal risk patients, 2 patients with acute lymphoblastic leukemia without risk classification, 5 patients with acute myeloblastic leukemia and 10 pediatric healthy individuals.

Our results show that the expression of myosin 1G increases in high risk children and we propose that the increased myosin 1G expression could be associated with the promotion of infiltrates, our hypothesis is that the cell moves with higher speed from one place to another, but we consider that is necessary to increase our pediatric population with that diagnosis so we obtain more robust results.

INTRODUCCIÓN

La migración celular ocurre en procesos biológicos fundamentales, tales como el desarrollo embrionario, la regeneración de tejidos, la respuesta inmunitaria, entre otros. Estos procesos implican cambios en la forma celular, regidos por modificaciones en el citoesqueleto que conducen al movimiento individual o en grupo de distintos tipos celulares, como ejemplo del movimiento individual tenemos a los linfocitos, células del sistema inmunológico que se dirigen a sitios en donde se detecta la presencia de agentes extraños. Independientemente del tipo celular que esté sujeto a un proceso de migración, se han podido identificar mecanismos generales que coordinan el movimiento celular y que pueden servir como modelo para entender este proceso; sin embargo, algunos componentes moleculares se expresan en linajes celulares específicos y en ocasiones únicamente en circunstancias patológicas¹. Entender a nivel molecular el movimiento celular es fundamental para la función de una célula viva y es determinante para identificar a los elementos que se ven alterados en situaciones patológicas^{1, 2}.

El citoesqueleto tiene una relevante participación en los movimientos celulares, debido a que es una estructura dinámica constituida por distintos tipos de filamentos polarizados a los cuales se unen proteínas como las miosinas, esta asociación que surge mediante regiones específicas que caracterizan a estas proteínas y que tienen la capacidad de hidrolizar adenosin trifosfato (ATP) para la obtención de energía. Las interacciones entre los filamentos y las proteínas crean un ciclo mecánico-químico para originar el movimiento de la célula³. A pesar de que no son los únicos componentes moleculares que intervienen en este proceso biológico. Una de las familias de proteínas que está implicada en la migración celular es la de las miosinas², que son de gran interés para nuestro grupo de investigación.

Las miosinas son una familia de motores moleculares que se unen con los filamentos de actina, para generar movimiento⁴, el cual es dependiente de la hidrólisis de adenosin trifosfato ATP⁵.

Se encuentran en la mayoría de las células eucariontes y tienen como función principal la movilidad de la célula, pero también una relevante participación en la regulación de la forma celular, de la señalización, del tráfico de vesículas y de organelos⁶.

Las miosinas sufrieron diversificación genética, la que ha repercutido en su estructura. Se conocen dos tipos, las miosinas convencionales y las no convencionales⁶.

La miosina convencional clase II se localiza en el músculo y ha sido muy estudiada; posterior a su descubrimiento se encontraron proteínas estructuralmente muy parecidas a la miosina muscular en otros tejidos; como consecuencia de ello, recibieron el nombre de miosinas no convencionales²; ambos tipos de miosinas comparten propiedades estructurales, cinéticas y de regulación.

ESTRUCTURA DE LAS MIOSINAS

Las miosinas son proteínas heteroméricas, formadas por una o dos cadenas pesadas y un número variable de cadenas ligeras. Las cadenas pesadas presentan tres dominios, la cabeza, el cuello y la cola o región caudal⁷(**figura 1**); el dominio N-terminal de las cadenas de esta proteína constituye la cabeza globular o motor, que se une a los filamentos de actina, hidroliza ATP y genera fuerza mecánica⁵(**figura 2**).

Entre los dominios de la cabeza y la cola se encuentra el dominio cuello, formado por uno o más motivos IQ, caracterizados por 14 aminoácidos con la repetición IQXXXRGXXXRXY (I-isoleucina, Q-glutamina, R-arginina, G-glicina, Y-tirosina, X-cualquier otro aminoácido)²(**figura 1**), cada uno de estos motivos proporciona un

sitio de unión a calmodulina, proteína citosólica capaz de unirse a calcio por medio del dominio estructural formado de dos hélices alfa denominado EF o dominio hand, esta proteína parece ser esencial, para la conversión eficiente de energía química en trabajo mecánico⁸.

La última región de la proteína motora es la cola, que posee la mayor diversidad entre todas las clases de miosinas⁷, en esta región se localiza una secuencia que forma un motivo de unión a fosfolípidos⁵.

El dominio de cola se divide en tres regiones TH (tail homology, del inglés), denominadas como TH1, TH 2, TH 3y se asocian a proteínas o fosfoinositoles de membrana^{7,9}. **(figura2)**

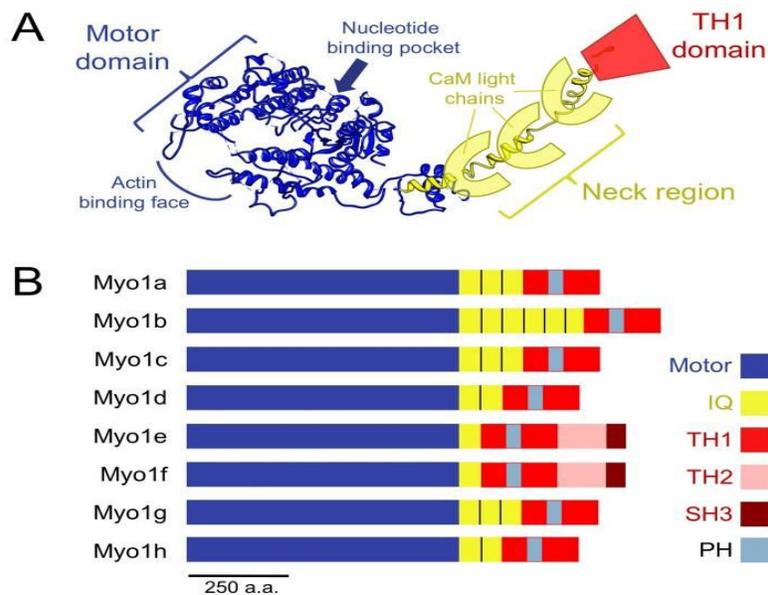


Figura1.-Estructura de las miosinas. Todas las miosinas clase1 comparten una disposición estructural común, presentan en el extremo N-terminal el dominio motor (azul) que está conectado a una cola de unión a la membrana (rojo) por una región de cuello α -helicoidal (amarillo)¹⁰.

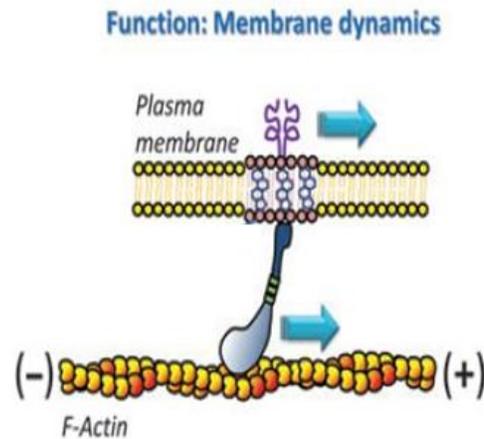


Figura 2.-Mecanismos de acción de las miosinas. El extremo N-terminal (cabeza o motor) de Miosina es la región encargada de la hidrólisis de ATP al interactuar con el filamento de actina, esta interacción crea un ciclo químico-mecánico que da origen al movimiento, mientras que la región caudal se une a fosfoinositoles de membrana¹⁰.

FUNCIONAMIENTO DE LAS MIOSINAS

La miosina es una ATPasa capaz de transducir la energía química del ATP durante el movimiento, mediante cambios conformacionales de su estructura. Esta proteína se une con gran afinidad a la actina, esta unión permanece así hasta que la miosina se encuentra con el ATP, al unirse a esta molécula energética se disocia de la actina y se inicia la hidrólisis².

La actina induce la liberación de los productos de la hidrólisis (ADP + Pi), en el momento en que el Pi es expulsado, la miosina experimenta un cambio conformacional capaz de generar el “power stroke”(movimiento brusco o jalón)². Es éste el responsable del deslizamiento del filamento de actina sobre el de miosina, después de la salida del Pi, el ADP se despega, quedando el sitio catalítico de miosina libre para volverse a unir a actina y recomenzar el ciclo.**figura3**

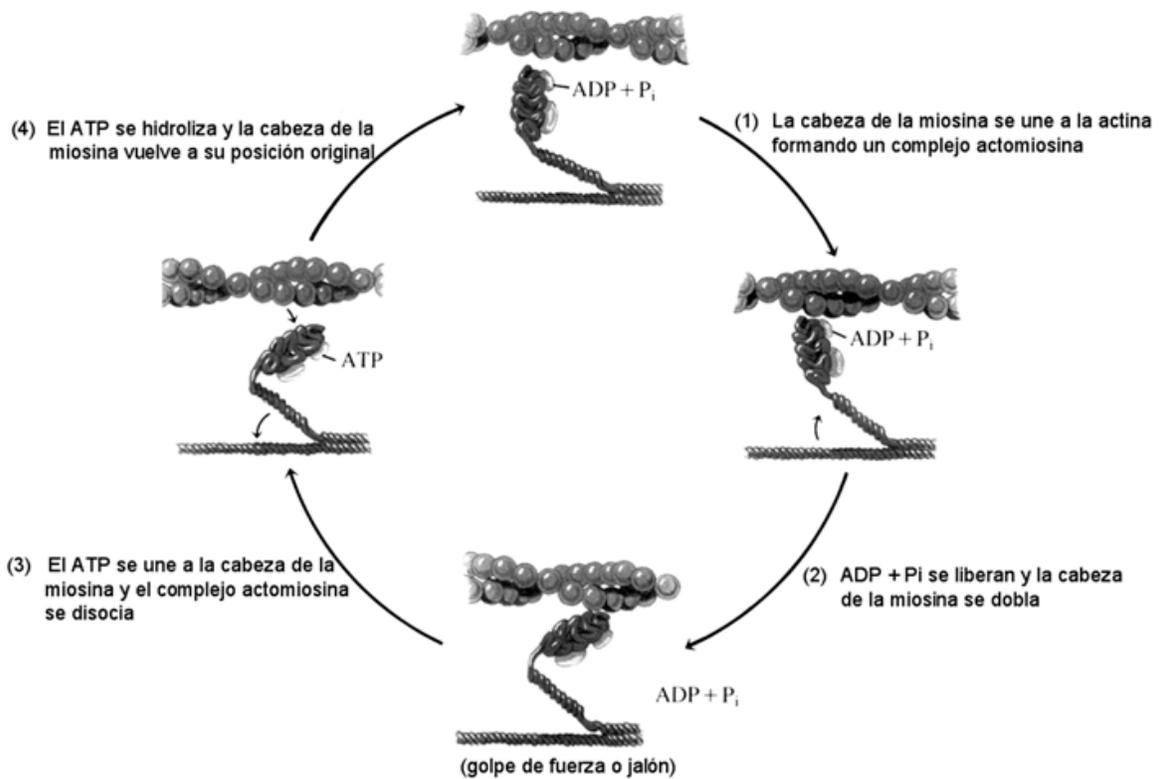


Figura3.-Esquema del ciclo de formación del complejo acto-miosina y la hidrólisis de ATP².

CLASES DE MIOSINAS

Existen 36 clases de miosinas en eucariontes, específicamente en los seres humanos se han encontrado ocho genes que codifican para miosinas clase I y catorce genes que codifican para miosina clase II¹¹.

En este trabajo se hará énfasis en la participación de una miosina que forma parte de la familia de las miosinas no convencionales clase I y es expresada en células hematopoyéticas, enfocándonos en el papel que juega dentro del proceso de movilidad o migración celular.

MIOSINAS CLASE I

La miosina clase I fue la primera en ser llamada no convencional y se identificó en *Acanthamoeba*¹². Son proteínas pequeñas y motoras, con gran capacidad de generar fuerza mecánica y están presentes en muchos tipos celulares².

Están bien posicionadas para llevar a cabo funciones biológicas en la interfase de la membrana y el citoesqueleto; se expresan en la mayoría de los linajes celulares, aunque algunas se encuentran abundantemente en tejidos específicos, como es el caso de la miosina 1G, expresada en células hematopoyéticas¹².

En este grupo se identificaron estructuralmente miosinas de cola corta con una región TH1 única y las de cola larga, que contienen las tres regiones TH⁷. Son capaces de interactuar con fosfolípidos, por ello puede unirse directamente a las membranas celulares; la interacción está mediada por la zona TH1, que forma parte del dominio de unión a membrana llamado PH; sin embargo, se encontró que este dominio solo no es suficiente para que la miosina se asocie con la membrana y que se requieren otras regiones de la cola para la interacción con la membrana¹².

Dentro de las miosinas clase I, se ha demostrado que miosina 1G participa en la migración de los linfocitos⁷ tanto B como T de ratón Knock-out (Myo1G -/-) y se ve alterada la migración^{9, 13}.

MIOSINA 1G

Es una miosina de cola corta, que se expresa en células del sistema inmunológico, como los linfocitos T y B; éstos se localizan en muchos tejidos y están expuestos a fuerzas mecánicas⁹, se ha demostrado que la elasticidad celular está controlada por miosinas¹⁴.

Específicamente la miosina 1G parece desempeñar un papel muy importante en los linfocitos B, ya que su deficiencia origina irregularidades en los procesos de fagocitosis, movilidad y exocitosis¹⁴.

Se ha reportado que los Linfocitos B deficientes de esta proteína presentan un movimiento más lento y las trayectorias que realizan para su migración son más cortas, esto se debe a una reducción de la tensión de la membrana ejercida por la deficiencia de la miosina de clase I que probablemente deteriora la polarización de

las células B, lo que hace más lento su movimiento⁹, es importante aclarar que aunque se conoce la participación de miosina en células B, aún no se conocen los mecanismos moleculares a través de los cuales ejerce estas funciones. Se ha reportado que Miosina 1G aumenta la velocidad y el ángulo de giro que se forma cuando los linfocitos T migran o se desplazan alrededor de la célula presentadora de antígeno durante el reconocimiento antigénico¹³.

Esta proteína juega un papel importante en la tensión de membrana, en la regulación de la velocidad intrínseca y la propensión de giro de la célula¹³, esto nos hace pensar que una sobreexpresión del gen que codifica para esta miosina podría traer como consecuencia un aumento de la proteína y a su vez un incremento en la velocidad de migración de los linfocitos B.

Las alteraciones que puedan presentarse en los linfocitos B como son cambios en la morfología, proliferación y movilidad, tienen gran importancia en este estudio, por ello es necesario conocer el origen y la funcionalidad de estas células.

ORIGEN Y FUNCIONALIDAD DE LOS LINFOCITOS B

Las células troncales de la médula ósea y del hígado fetal (Células troncales hematopoyéticas CTH) dan lugar a todos los linajes de células de la sangre, estas células maduran para convertirse en los progenitores linfocíticos que originan a los linfocitos B, linfocitos T, células NK y algunas células dendríticas.

El compromiso de las CTH hacia el linaje B o T depende de las instrucciones de la superficie celular y de reguladores específicos de la transcripción, sin embargo el desarrollo de los linfocitos B y T se deriva de la proliferación de los progenitores que son estimulados principalmente por la interleucina-7 (IL-7), lo que origina un aumento en el número de estos linfocitos¹⁵.

Los Linfocitos B son células que cumplen con muchas funciones en el mantenimiento de la inmunidad, son productoras de anticuerpos, se originan y maduran en la médula ósea para posteriormente migrar hacia los órganos linfoides

secundarios o periféricos, donde llevan a cabo las etapas de reconocimiento antigénico y activación¹⁶, participan principalmente en la inmunidad específica o adquirida, al ser activadas por el antígeno se transforman en células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas.

Se estima que el desarrollo de un linfocito B maduro a partir de un progenitor linfocítico tarda de 2 a 3 días, pero en ellos pueden presentarse alteraciones que originan el desarrollo de patologías como la leucemia linfoblástica aguda (LLA)¹⁵.

LEUCEMIA

La etimología literal es “sangre blanca”, la palabra está formada por dos elementos griegos: leuc una variante de leuco= blanco y emia=sangre. El investigador Virchow en 1845 fue uno de los investigadores que en Alemania llamó a esta enfermedad sangre blanca, por la excesiva proliferación de los glóbulos blancos presente en los pacientes con este diagnóstico¹⁷.

En 1913 las leucemias se clasificaron en agudas y crónicas, refiriéndose a la rapidez de desarrollo y progreso, con respecto al tipo de población leucocitaria que afecta son nombradas linfoides o mieloides¹⁸.

En 1917 se reconoció el aumento de su prevalencia en niños entre 1 y 5 años de edad y se reportaron en México 1926 casos nuevos con tasa de 4 casos cada 10000 habitantes. Una de las entidades federativas con mayor morbilidad fue el Distrito Federal¹⁸.

La Leucemia es una neoplasia maligna caracterizada por la proliferación clonal de precursores hematopoyéticos dentro de la médula ósea, se considera el cáncer pediátrico más común al representar el 31% del cáncer que ocurre antes de los 15 años de edad¹⁹(**figura4**); dentro de estos padecimientos, la LLA corresponde al 80% de los casos.

Tasas de incidencia ajustadas por edad y específicas para la edad para pacientes de cáncer de 0-19 años

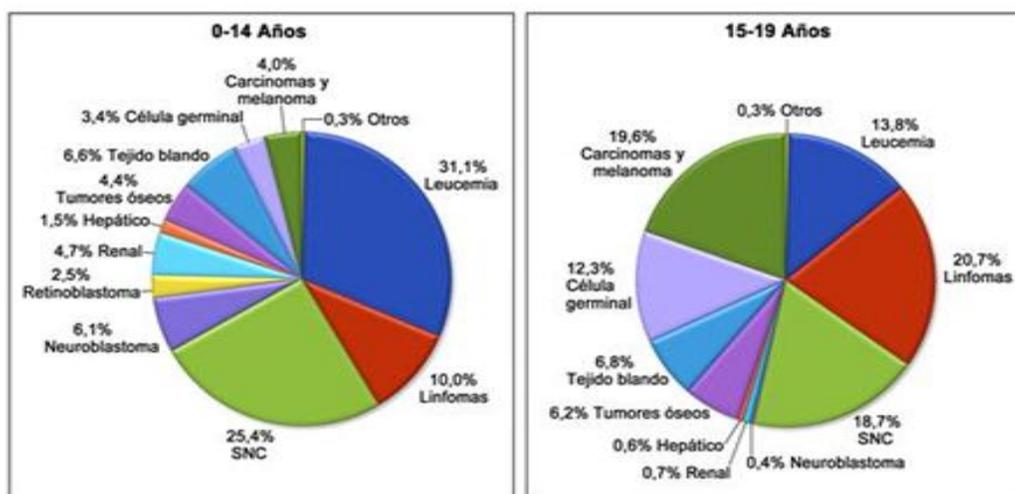


Figura 4.- Incidencia de cáncer en pacientes pediátricos. Porcentajes de incidencia ajustados por edad para pacientes con cáncer de 0-19 años (Secretaría de Salud Pública 2011)¹⁹.

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Es una patología que afecta principalmente a los precursores de los linfocitos B, ocasionando anormalidad e incremento en su proliferación. La LLA de precursores B incide en un 85% en la población pediátrica a diferencia de la LLA de linaje T presente en un 12% en los niños.

En diferentes tipos de cáncer la adhesión entre células disminuye, esto trae como consecuencia que las células cancerosas puedan establecer colonias celulares en lugares diferentes de donde inicialmente se originaron, es decir invaden otros tejidos y producen metástasis²⁰. Específicamente en la LLA los linfocitos B neoplásicos se caracterizan por producir infiltraciones en la médula ósea y en sitios como el sistema nervioso central¹¹; posiblemente las infiltraciones sean consecuencia de cambios estructurales que a su vez producen alteraciones en la movilidad de la célula.

La presencia de infiltrados incrementa la gravedad del paciente debido a que las células neoplásicas comienzan a invadir sitios donde originalmente no se encuentran. Por ello la migración es un proceso clave en el desarrollo del cáncer; debido a que las células pueden moverse de su sitio de origen y producir colonias a distancia, para que las células neoplásicas puedan expandirse por el organismo debe pasar por una serie de fases y la última de ellas corresponde a la migración²⁰.

La leucemia no es un cáncer sólido, sin embargo las células leucémicas que se desplazan por el torrente sanguíneo tienen la capacidad de invadir otros tejidos y órganos produciendo infiltrados¹¹, esto probablemente ocurre cuando disminuye el flujo sanguíneo y las células anormales establecen contacto directo con el sustrato o el tejido.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Normalmente en la médula ósea los leucocitos constituyen el 5% o menos del total de células, sin embargo, en la LLA hay aumento de los estadios inmaduros constituyendo entre el 30 y el 100 % de la celularidad de la médula ósea, esto origina que se inhiba la producción de células hematopoyéticas normales como eritrocitos, plaquetas, etc.¹¹

Los síntomas y signos que se presentan en esta enfermedad se correlacionan con la carga de células leucémicas. Entre los síntomas más comunes se encuentran, fiebre, fatiga, dolor óseo y articular, hemorragias, lesiones en la piel, adenopatías en la cabeza y el cuello o lesiones aisladas del hueso²¹. Las anomalías hematológicas más comunes en la LLA incluyen anemia, trombocitopenia, neutropenia, hiperleucocitosis presentes en aproximadamente el 15% de los pacientes pediátricos, niveles elevados de ácido úrico en suero y de lactato deshidrogenasa, que se correlaciona con la carga tumoral.

Los síntomas ya antes mencionados se deben principalmente a la falta de linfocitos funcionalmente adecuados²¹.

CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

El estudio de diversas características detectables en las células leucémicas ha permitido la clasificación de estas neoplasias desde los puntos de vista morfológico, inmunológico y citogenético.

Clasificación morfológica

Esta clasificación se fundamenta principalmente en las características morfológicas que presentan las células, el grupo Franco-Americano-Británico (FAB) clasifica a las células leucémicas en tres grupos designados como L1, L2 y L3²²(Tabla1).

GRUPOS DE LLA			
Características Histológicas	L1	L2	L3
Tamaño celular	Predominio de células pequeñas	Muchas células grandes. Heterogéneas.	Muchas células grandes. Homogéneas.
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable, con frecuencia más o menos abundante.	Moderadamente abundante
Nucléolos	Visibles, o no llamativos	Uno o más, grandes	Uno o más prominente
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable, heterogénea en cada caso.	Finamente punteada, homogénea
Forma nuclear	Regular	Irregular	Regular, ovalados y redondos
Basofilia citoplasmática	Variable	Variable	Intensa
Vacuolas citoplasmáticas	Variable	Variable	Prominente

Tabla1.- Clasificación morfológica de la leucemia linfoblástica aguda propuesta por el FAB²².

Clasificación Inmunofenotípica

La inmunofenotipificación es esencial para el diagnóstico de la LLA, se divide en precursores de células B (LLA-B) y en precursores de células T (LLA-T)²³.

La LLA-B se caracteriza por la expresión de antígenos específicos de células B, como CD19, CD20, CD22 (marcadores de superficie y de citoplasma), CD24 y CD79 (citoplasmática). Una gran proporción de linfocitos B también expresan CD10 (antígeno común de leucemia linfoblástica aguda), el cual es un antígeno que constantemente es expresado en las células B progenitoras, otros antígenos expresados por los blastosleucémicos²³, son marcadores progenitores de las primeras etapas de células B precursoras, incluyendo CD34 y desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT).

Actualmente se conocen cuatro subtipos de LLA de linaje B: pre B temprana, pre B, pre B transicional y B madura²⁴ (**figura 5**). Por otro lado, la LLA-T, se caracteriza por la expresión de antígenos asociados al linaje T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 y CD8), así como CD1a, CD10, CD34, CD99, HLA-DR y TdT. Frecuentemente se pueden expresar antígenos mieloides como elCD11b, CD13, CD15, CD33 y en raras ocasiones CD117³. A menudo este inmunofenotipo se correlaciona con una mala respuesta al tratamiento en la LLA.

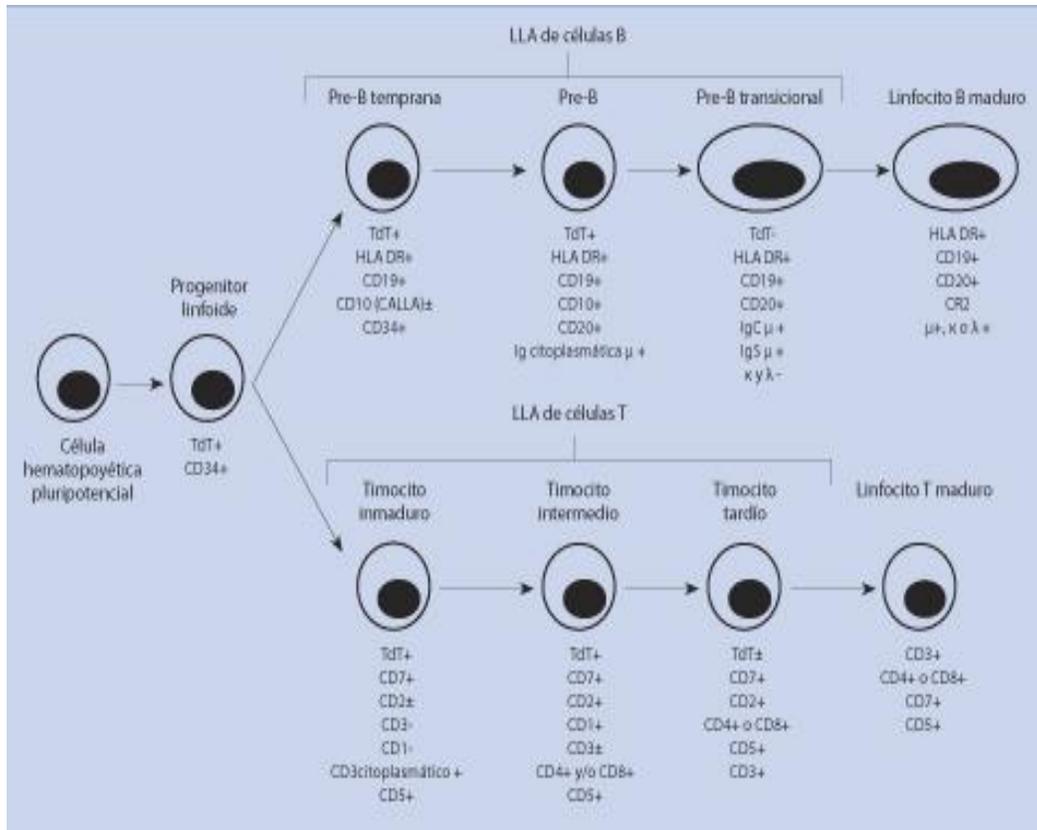


Figura.5.- Modelo de diferenciación linfocitaria basado en los estados de maduración y desarrollo²⁴.

Clasificación citogenética

El análisis citogenético consiste en el estudio de las alteraciones cromosómicas en la metafase de las células neoplásicas. Este estudio permite detectar la morfología de los cromosoma, alteraciones numéricas (monosomías, trisomías etc.) o estructurales (translocaciones, inversiones, deleciones etc. (**Tabla 2**)) presente en todo el genoma¹⁷.

Este análisis es imprescindible en el manejo de todo paciente con LLA, porque el cariotipo de las células leucémicas tiene una implicación importante en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico²³. Las translocaciones cromosómicas son las alteraciones genéticas clínicamente más importantes relacionadas con las células precursoras B. Las principales alteraciones se muestran en la **Tabla 2**.

Translocación	Frecuencia	Genes Afectados	Características
t(1:19)(q23;p13)	5-6%	E2A-PBX1	Fenotipo pre-B con Hiperleucocitosis Mal pronóstico, necesario tratamiento intensivo.
t(9:22)(q34;p11)	3-5%	BCR-ABL	Cromosoma Philadelphia. Hiperleucocitosis Mal pronóstico.
t(4:11)(q21;p23)	2%	MLL-AF4	Estirpe B, asociado a LLA lactante. Hiperleucocitosis Mal pronóstico.
t(12:21)(p13;q22)	25% de LLA pre-B	TEL-AML	Fenotipo B. Buen pronóstico.

Tabla 2.-Translocaciones más frecuentes en la Leucemia Linfoblástica Aguda²³.

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico correcto es esencial para la clasificación del tipo de Leucemia, además juega un papel central para la clasificación del paciente y el tratamiento quimioterapéutico.

La evaluación inicial se obtiene a partir de un recuento de leucocitos totales y cuenta diferencial en un frotis de sangre periférica, para determinar la presencia y morfología de los linfoblastos¹⁷. El número de los blastos al momento del diagnóstico, continúa siendo el indicador más importante en el pronóstico del paciente.

El diagnóstico definitivo de una leucemia, se debe realizar mediante el análisis morfológico, molecular y citogenético del aspirado de la médula ósea. La presencia de al menos el 25% de blastos en la médula confirmará el diagnóstico²⁵. El subtipo de LLA se definirá con los estudios morfológicos, la anemia está

presente hasta el 80% de los casos y las cifras de plaquetas se encuentran por debajo de 100 000 en el 75% de los casos, se recomienda realizar un examen de líquido cefalorraquídeo para descartar infiltrado en SNC²⁵.

ESTIMACIÓN DEL RIESGO

Los niños se clasifican en dos grupos de riesgo: Bajo riesgo (o habitual) y Alto riesgo²⁶. Para poder hacer la asignación del riesgo se toman en cuenta características clínicas como son: edad, sexo y cuenta leucocitaria, presencia o ausencia de infiltraciones, las características de los blastos y respuesta a la terapia.

Factores de riesgo en la LLA

Edad

Los niños menores de un año y los niños mayores de 10 años se consideran pacientes de alto riesgo, para ellos se emplea un tratamiento más agresivo con el fin de mejorar los resultados, mientras que los niños de 1 a 9 años tienen un pronóstico más favorable²⁶.

Género

Las niñas tienen mayores probabilidades de curarse que los niños; esto se debe a que en los niños se presentan recaídas testiculares y suelen tener mayor riesgo de recaídas en la medula ósea debido a factores que no se comprenden hasta el momento²⁶.

Nivel de leucocitos

Los pacientes con conteo alto, se clasifican como de alto riesgo y generalmente necesitan tratamiento más intensivo. Generalmente se utiliza un conteo de 50,000 células por mm^3 (mayor a esta cifra alto riesgo)^{17,26}. Las cifras encontradas en los pacientes nos permite hacer la diferencia entre un mejor o peor pronóstico, el

conteo de glóbulos blancos elevado está relacionado a otros factores pronósticos de alto riesgo como alteraciones cromosómicas.

Es determinante la asignación del riesgo en el paciente ya que de esto dependerá la estrategia terapéutica que se utilizará, por esta razón es necesario seguir en la búsqueda de posibles marcadores presentes en células neoplásicas que puedan proporcionar una mejor clasificación del paciente con la finalidad de obtener mayores beneficios de los tratamientos.

TRATAMIENTO

El tratamiento quimioterapéutico consiste en tres fases:

Inducción a la remisión

La remisión se define como la restauración de la hematopoyesis, con un porcentaje de blastos $\leq 5\%$ en médula ósea.

En esta fase se pretende eliminar la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal, el grado de remisión actual bajo este régimen es de 70a 90%. En esta fase se puede administrar dexametasona o metilprednisolona y se logra inducir la diferenciación de blastos mieloides y la aparición de progenitores hematopoyéticos CD34¹⁷.

Es importante comentar que cuando se ha alcanzado la remisión y existe un remanente por debajo del límite del 5% es denominada enfermedad residual mínima, la cual se relaciona con las recaídas²⁷.

Tratamiento de consolidación o post-remisión

Con la recuperación de la hematopoyesis se inicia el tratamiento de consolidación, que debe iniciarse inmediatamente después de la fase de remisión¹⁸. El objetivo de esta fase es eliminar las células residuales que han sobrevivido en la etapa previa; se administran dosis altas de medicamentos o combinaciones de ellos.

Tratamiento de mantenimiento

Conocido como mantenimiento o continuación de la remisión, tiene como objetivo eliminar las células residuales leucémicas que pueden causar recaída. La recaída de la enfermedad se interpreta como mal pronóstico para los pacientes, otros factores que indican mal pronóstico son falla al tratamiento, remisión inicial parcial, aparición de blastos circulantes y leucocitosis¹⁸.

Terapia Santuario

Este tratamiento para el sistema nervioso central (SNC) se administra durante cada fase de la terapia, debido a que la quimioterapia administrada por vía oral o intravenosa pueda no llegar al cerebro o espina dorsal, encontrando las células leucémicas un santuario en el SNC. Esta terapia se administra para evitar que el cáncer vuelva¹⁷ 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 tiene el potencial de proveer datos sobre la eficacia clínica de las estrategias de tratamiento estándares y de nuevas estrategias terapéuticas.

El monitoreo de la enfermedad residual es utilizado para una exacta estratificación de la terapia. La estratificación incluye intensificación del tratamiento en pacientes con alto riesgo de recaída y reducción en pacientes de bajo riesgo²⁷.

EPIDEMIOLOGÍA

La LLA es el cáncer pediátrico más común, afecta a niños y adolescentes (0-18 años); sin embargo ocurre con más frecuencia entre los dos y cuatro años de edad²¹.

Esta patología representa el 30% de las muertes por cáncer en pacientes pediátricos; este dato genera la necesidad de identificar nuevos factores pronósticos en la LLA.

Actualmente hay datos disponibles que muestran que la miosina 1G se encuentra en los linfocitos B^{7, 12}, pero hasta este momento no hay reportes de investigaciones que muestren que la sobreexpresión de la miosina 1G modifique la capacidad de migración de los linfocitos B en enfermedades como la LLA y que a su vez esta modificación en la migración pudiese estar relacionada con la gravedad de esta patología.

ANTECEDENTES

Un estudio previo, en el cual se realizó el análisis de una base de datos de microarreglos, demostró que miosina 1G está sobreexpresada en leucemia (**figura 6**) (Datos no publicados). Por lo que resultó importante confirmar la sobreexpresión de miosina 1G en células de pacientes con LLA.

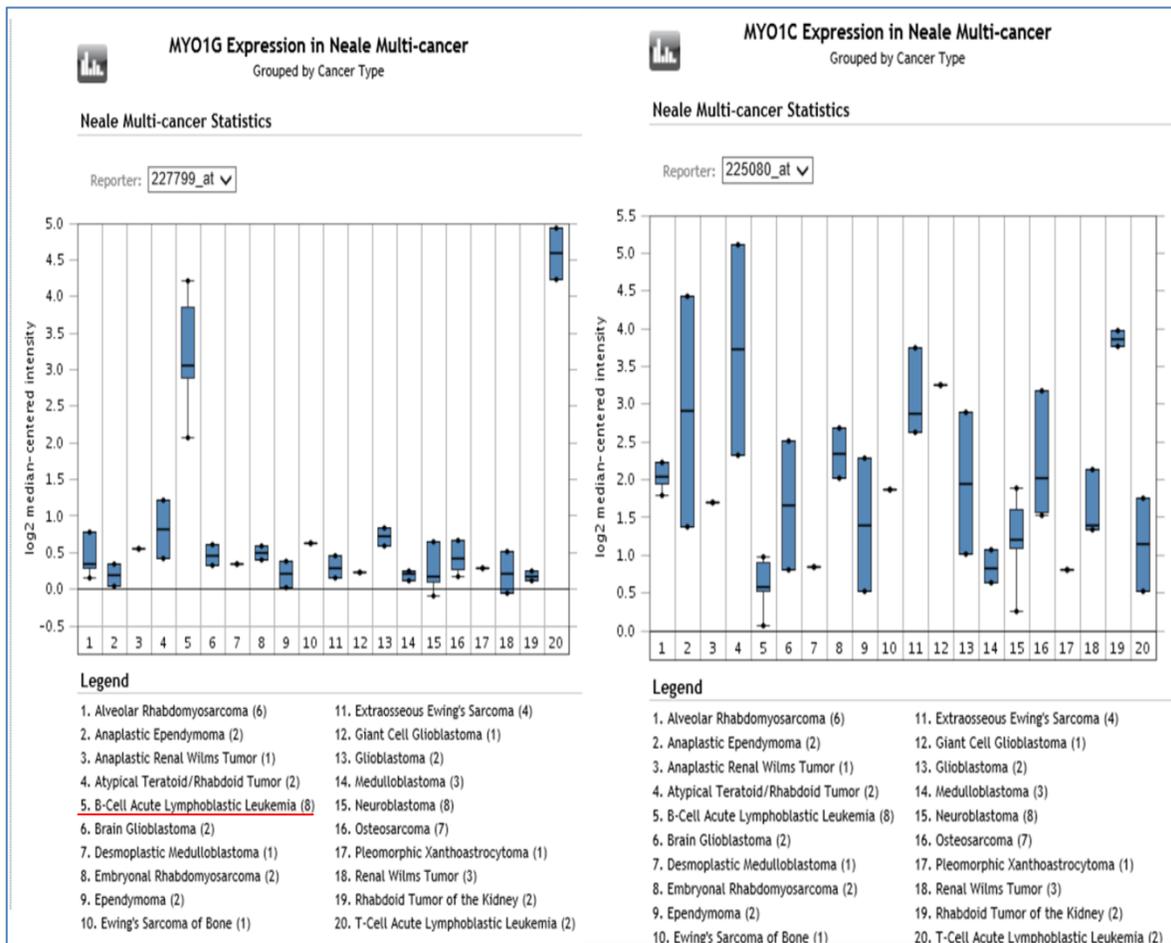


Figura6.-Resultados del análisis bioinformática de la base de datos de Microarreglos Oncomine.

Se muestra en la gráfica de la izquierda que la miosina 1G se encuentra sobreexpresada en LLA (línea 5 y 20); otro aspecto importante de la figura es que miosina 1C (Panel derecho) presenta un comportamiento diferente en relación con las mismas leucemias, pareciendo incluso ser desregulada.

Los resultados obtenidos de la base de datos de microarreglos condujeron a la evaluación de miosina 1G por Inmunocitoquímica en un estudio piloto, en donde se observó que pacientes con LLA expresaban niveles más elevados de miosina 1G comparados con muestras de individuos sanos. (figura7).

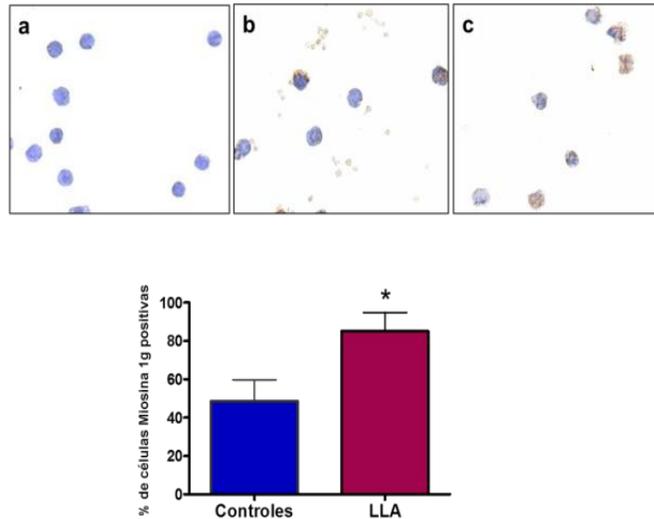


Figura7.-Micrografías de la tinción de Inmunocitoquímica para la miosina 1G (b-c) y el control de isotipo (a) en células de pacientes con LLA (c) y sujetos controles (b).La gráfica representa la media del porcentaje de células positivas y se observa un incremento significativo de casi un 40% en los pacientes con LLA vs controles sanos. *p = 0.0074 t Student (Patiño-López, et al datos no publicados).

Los resultados obtenidos de los ensayos anteriores ayudaron a plantear una idea más firme que nos permitió continuar con este estudio, el cual se realizó con el propósito de evaluar si existe correlación entre dicha sobreexpresión y el grado de gravedad de la enfermedad, además de que se pretendía evaluar si existen cambios en la migración celular de linfocitos B que sobreexpresen miosina 1G. Y si esto correlaciona nuevamente con la gravedad de la enfermedad. La gravedad de la enfermedad se determinó por diferentes manifestaciones clínicas, como número de leucocitos en sangre periférica, disminución en el número de plaquetas, respuesta al esteroide e infiltración primaria a sistema nervioso central, infiltración testicular²¹.

Los linfocitos B juegan un papel relevante dentro de esta investigación por ser principalmente las células blanco de la LLA y aunque se conocen diferentes componentes moleculares que intervienen en el control de su migración, como es el caso de las quimiocinas, la ausencia de proteínas motoras puede producir alteraciones en la migración, ocasionando que las células no puedan seguir una señal quimiotáctica al carecer de movilidad. Recientemente utilizando células B del ratón deficiente en miosina 1G, se encontró que estas células B tienen defectos en la migración celular, tanto en un modelo in vitro como in vivo⁴.

JUSTIFICACIÓN

La LLA es la neoplasia maligna más frecuente en la infancia en todo el mundo; en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) se atienden cada año alrededor de 100 casos nuevos de LLA, esta cifra representa el 34.4% de todos los casos de cáncer tratados en la institución. En la LLA se encuentran afectados principalmente los precursores de los linfocitos B y a pesar de los avances que se han conseguido en investigación clínica, aún se desconocen con exactitud los factores que la originan. Este padecimiento de rápida evolución trae como consecuencia infiltrados de linfocitos B en diversos tejidos, evento relacionado con la gravedad de la enfermedad.

Actualmente se conoce que la miosina 1G es una proteína motora expresada en los linfocitos B, pero hasta el momento no se han realizado estudios que muestren evidencias de que la sobreexpresión de esta proteína influya en la velocidad de migración de los linfocitos B, propiciando la formación de infiltrados tisulares en enfermedades como la leucemia.

Los infiltrados tisulares se relacionan con leucemias graves, por lo tanto existe la posibilidad de que las células leucémicas que más expresen miosina1G se relacionen con leucemias más agresivas. Por esta razón, es importante seguir realizando investigaciones que nos permitan comprender los mecanismos básicos que se originan en la migración celular, con la finalidad de encontrar un biomarcador pronóstico o de riesgo con el cual podamos estratificar de mejor manera a los pacientes y así contribuir al mejoramiento de la calidad de vida de la población pediátrica con LLA.

HIPÓTESIS

* La sobreexpresión de Miosina 1G incrementa la velocidad de migración de los linfocitos B y la gravedad de la leucemia linfoblástica aguda en los pacientes.

OBJETIVO GENERAL

*Determinar si existe una correlación entre el nivel de expresión de Miosina 1G, la velocidad de migración de linfocitos B y la gravedad de la LLA.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar la expresión de la miosina 1G en los linfocitos B de pacientes con LLA e individuos sanos.

Evaluar si la sobreexpresión de miosina 1G está asociada a los pacientes de riesgo alto o habitual de LLA.

Analizar si existen cambios en la migración de linfocitos B por la sobreexpresión de miosina 1G.

MATERIALES Y MÉTODOS

DESCRIPCIÓN DE PACIENTES

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 33 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".

Los pacientes han reunido los criterios de inclusión y han aceptado su participación en el estudio mediante la firma de consentimiento y/o asentimiento informado.

Para la clasificación como pacientes de alto riesgo y riesgo habitual se han tomado en cuenta la edad, número total de leucocitos en sangre periférica, infiltración primaria a sistema nervioso central, infiltración testicular, respuesta al esteroide, respuesta a la inducción a la remisión.

El estudio fue aprobado por el Comité de Bioética y Seguridad del Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

Criterios de determinación de pacientes en estudio

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.

-Que los pacientes mayores de 8 años acepten participar en el estudio a través de la firma de una carta de asentimiento informado.

Criterios de exclusión:

- Con tratamiento previo al diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.
- Con transfusiones previas al diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.
- Pacientes que provengan de otra institución con tratamiento o con recaída.

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.

ANÁLISIS DE DATOS

Para conocer si los datos obtenidos de los ensayos presentaban normalidad se realizaron histogramas, al observarse que eran normales se utilizó la prueba estadística paramétrica t-Student y la de análisis de varianzas (ANOVA), con el objeto de determinar si existieron diferencias significativas entre los grupos de estudio.

Antes de aplicar el estadístico t-Student a los datos obtenidos por PCR en tiempo real, se realizó la prueba F para conocer la homocedasticidad (es decir con esta prueba identificamos si los datos presentaban varianzas iguales o desiguales). Se aplicó esta prueba a los datos con un $\alpha=0.05$. Para conocer la significancia estadística de los ensayos de Inmunocitoquímica se llevó a cabo el análisis de varianzas (ANOVA). Las pruebas estadísticas se realizaron con Análisis de datos (EXCEL) y NCSS (Statistical Software).

PURIFICACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA

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

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 hacer una mezcla de Lymphoprep con la muestra de sangre problema guardando una relación v/v de 1:2; posteriormente se centrifugó a 2000 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 1200 rpm a 20°C, en el último lavado cambia el número de revoluciones a 1000rpm.

Después de la purificación de células, se llevó a cabo su conteo para lo cual fueron teñidas con azul de tripano y contadas en cámara de Neubauer.

EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G EN CÉLULAS MONONUCLEARES POR PCR EN TIEMPO REAL

A partir de las células purificadas de los pacientes, 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. Un microgramo de RNA total fue retro-transcrito a cDNA por 15min a 42°C con Quantiscript Reverse Transcriptasa (QIAGEN). La Integridad del RNA se comprobó utilizando el Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies.

Para las reacciones se utilizó la sonda UPL (Roche) #11 con los oligos para miosina 1G (Se muestran las secuencias en anexos). Como controles internos para normalizar cada reacción se usarán 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 ha realizado con la mezcla Light Cycler 480 probes master (Roche) en un termociclador Agilent, bajo las siguientes condiciones: 95°C /10s, 57°C /30s,72°C /11s durante 45ciclos.

EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G POR INMUNOCITOQUÍMICA

Una alícuota de las CMN que se obtuvieron se ajustó a 10,000 células/10microlitros. 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 y en agitación, para eliminar células no adheridas.

TINCIÓN DE LAMINILLAS

Para evaluar la expresión de Miosina 1G se utilizaron anticuerpos específicos como son, anticuerpo anti-Myo 1G de humano hecho en conejo (dilución 1:750) y el anticuerpo anti-IgG de conejo biotinilado (Normal Rabbit Santa Cruz, Biotechnology (# Cat.Sc2027)) (dilución 1:375).

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 suero normal de cerdo al 2% durante 1 hora 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 laminillas se incubaron con el anticuerpo

secundario acoplado a biotina por 30 minutos a temperatura ambiente, se procedió a realizar lavados con PBS y en seguida se adiciono estreptavidina por 30 minutos. Por último se reveló mediante la adición del substrato cromógeno diamino-Bencidina (Dako), las muestras fueron teñidas al mismo tiempo (55 segundos) en un mismo día; la reacción se detuvo con agua y se contratiñó con hematoxilina, durante 1segundo. 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 laminillas fueron analizadas con el microscopio (Olympus, BX-40) y la intensidad de expresión de Miosina 1G en las células positivas mediante el analizador de imágenes, Image-Pro Plus, Media Cybernetics (Silver Spring, MD, USA), para conocer el porcentaje de células positivas a la inmunotinción se contaron 100 células.

ANÁLISIS DE LA MIGRACIÓN CELULAR

Para proceder con este análisis se realizó la construcción del vector como se menciona posteriormente.

CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR

Se utilizó el vector de entrada pEntr D-TOPO el cual tiene incorporado el gen de nuestro interés que es el de miosina1g flanqueado por sitios attL. Teniendo listo el vector de entrada, el gen de miosina1g se insertó en el vector de destino pDest732³⁰ a través de una reacción de recombinación. Este plásmido presenta un gen de resistencia a la ampicilina (gen que sirvió como un marcador de selección de las células que incorporaron el vector de expresión al ser cultivadas en un medio con ampicilina), un gen para eGFP (gen reportero), con la cual se generó una proteína de fusión que nos indicó la presencia de miosina1G en las células y un gen letal CcdB que se incorporó en el vector de entrada en el momento que se originó la reacción de recombinación entre sitios específicos de los vectores. Este último gen eliminó a las células que no incorporaron el DNA clonado, es decir se produjo muerte celular por inserción de este gen, es importante comentar que el

gen CcdB provocó una disminución en la expresión del vector en donde se encontraba, también presento dos sitios attR necesarios para insertar el gen de miosina1G. Los sitios attL del vector de entrada se recombinaron con los sitios attR del vector destino, esta reacción de recombinación fue catalizada por la mezcla de enzimas LR clonasa, al finalizar la reacción se obtuvo al vector de expresión pDest 732 Myo1G.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICA
pEntr D-Topo	Vector de entrada (Invitrogen)
pDest 732	Vector Gateway Destino

Tabla 3.- Características de los vectores que fueron utilizados para el ensayo de migración celular

TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS DH5- ALFA

Se utilizaron 40µl de bacterias a las cuales se le incorporó 1µl de plásmido, se incubó durante 30 min en baño de hielo, posteriormente se dio el choque térmico colocando a las bacterias durante 40 segundos a 42°C, después de este tiempo se colocaron en hielo por 2 min. Para la recuperación de las bacterias se agregaron 150µl de SOC (250 mM de KCl, 100 mM de MgCl₂, 2g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 20 mM de glucosa para un litro) y se incubó a 37°C en agitación a 200rpm durante 1 hora.

Se prepararon placas con agar y ampicilina, considerando 25µl, 50µl y 100µl del cultivo bacteriano, se incubaron a 37°C. Las colonias transformadas se observaron entre las 12 y 16 hrs.

Las colonias resistentes al antibiótico ampicilina se sembraron en placas, posteriormente se seleccionaron y se dejaron crecer en caldo durante 18 horas a 37°C en agitación, posteriormente se purificó el DNA plásmidico.

PURIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO

Se utilizó el kit Gene Jet Plasmid Maxiprep de Thermo Scientific, realizando el siguiente procedimiento.

A las células bacterianas se les adicionaron 250µl de la solución de resuspensión, posteriormente se le agregó la misma cantidad de solución de lisis y se mezcló invirtiendo el tubo. Se adicionaron 350µl de la solución de neutralización, se agitó por inversión del tubo y centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min, se transfirió el sobrenadante a la columna y se centrifugó por 1 min. Se añadió a la columna 500µl de solución de lavado (procedimiento repetido 2 veces), se centrifugó durante 30 segundos, se transfirió la columna a un tubo de 1.5ml y se adicionaron 50µl de buffer de elución, se incubó durante 2 min y se centrifugó durante 2 min. El ADN plásmidico se guardó a -20°C.

TRANSFECCIÓN LÍNEA CELULAR

Para realizar los experimentos de migración se utilizó la línea celular de linfocitos B, RS4, 11, la cual fue transfectada con un plásmido que codifica para miosina 1G¹³, pDest 732Myo1G.

La línea celular de linfocitos B que se utilizó para este experimento, creció en cultivo en suspensión con medio RPMI suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, posteriormente las células fueron transfectadas por electroporación (en un aparato o electroporador ECM 2001BTX). Se utilizaron 1, 500,000 células las cuales fueron colocadas en una celda BTX de 0.4cm, con 20µg de plásmido, la electroporación se realizó a 310V, 1 pulso. Se detectó la expresión de miosina 1G por la expresión de GFP (Green Fluorescent Protein) ³¹ que se incluye en este plásmido. Como control negativo la misma línea celular se transfectó con un plásmido que contenía únicamente el gen reportero GFP, es decir no presenta el gen que codifica para miosina 1G.

RESULTADOS

ANÁLISIS CLÍNICO

Se obtuvieron muestras sanguíneas de 33 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 central del Hospital Infantil de México "Federico Gómez". (Tabla 4). También se obtuvieron muestras de sangre de 10 individuos sanos pediátricos como controles del estudio para realizar únicamente el ensayo de Inmunocitoquímica, este grupo se encuentra en un intervalo de edad de 10-14 años. La tabla 5 muestra los factores de riesgo presentes en la población de estudio.

Los pacientes han reunido los criterios de inclusión, aceptación y firma de la cartade consentimiento y asentimiento de informado.

	Pacientes	Edad	Subtipo			Riesgo		
n=	33		L1	L2	L3	Alto	Habitual	Intermedio
Femenino	14	1-13 años	4	3	0	5	6	2
Masculino	19	2 meses 16 años	6	8	0	8	7	1

*Los pacientes de riesgo intermedio presentan diagnóstico de LMA subtipo M3.

Tabla 4.- Características generales de los pacientes con LLA que participaron en el protocolo de estudio.*Se consideraron dentro del protocolo de estudio 28 pacientes con LLA y cinco casos con diagnóstico de LMA, con la finalidad de tener un grupo más para posteriormente realizar una comparación de la expresión de Miosina 1G. Considerando la clasificación de pacientes de riesgo alto y habitual, es importante comentar que aun en expediente clínico no se cuenta con el dato de los últimos pacientes 3 masculinos y 1 femenino, con respecto al subtipo de leucemia no hay reporte de 9 pacientes.

Paciente	Hiperleucocitosis	Infiltrados SNC/Testicular	Edad (años)	Recaída	Translocación	Vivo	Deceso
Femenino	2	1	3	2	2	12	2
Masculino	4	2	4	2	0	17	2

Tabla5.-Factores de riesgo presentes en nuestra población pediátrica que se relacionan con la gravedad de la leucemia.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G POR INMUNOCITOQUÍMICA

Los resultados obtenidos del ensayo de inmunocitoquímica para determinar la expresión de miosina 1G se muestran en la **figura 8**. Mediante análisis cualitativo, se observa que la expresión de miosina 1G es mayor en el paciente con leucemia de riesgo alto comparado con los pacientes de riesgo habitual y controles.

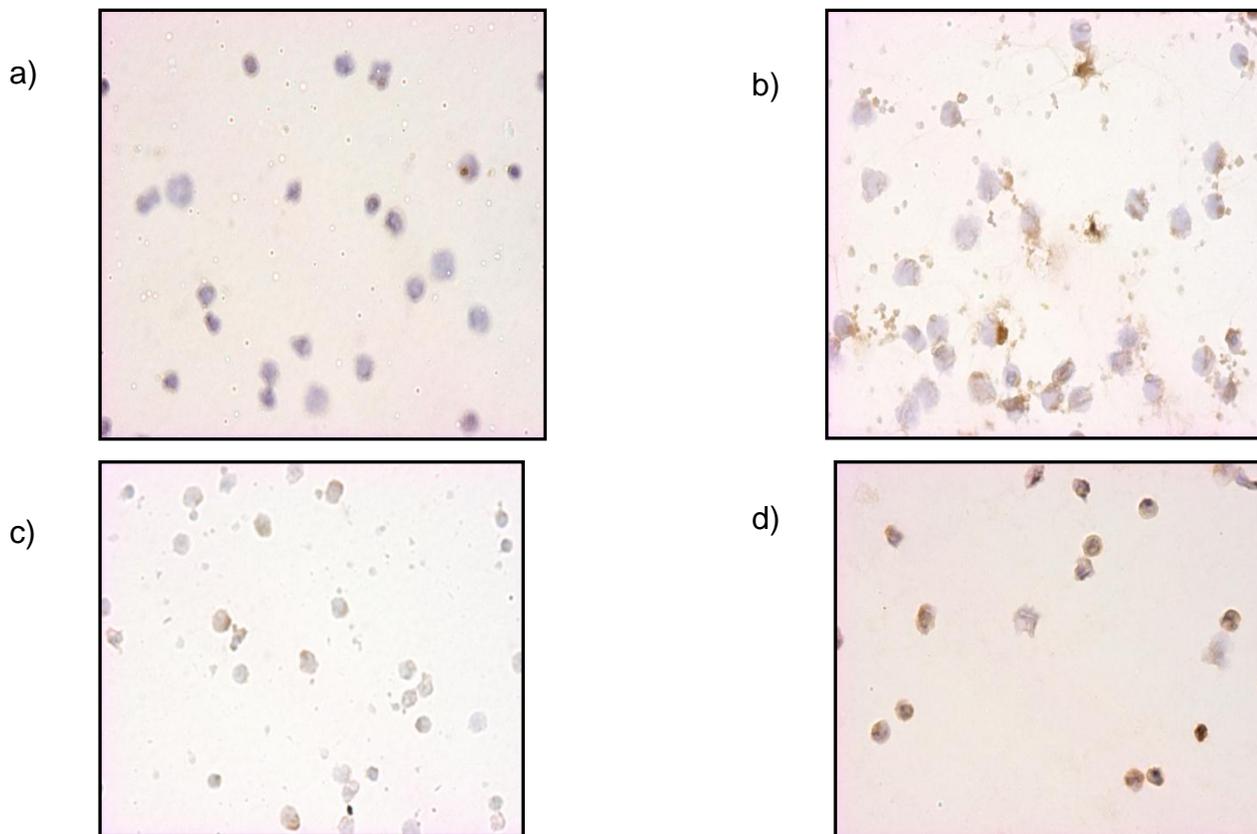


Figura.8.-Imágenes representativas de la expresión de Miosina 1G en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con LLA. Se observa mayor intensidad de expresión de Miosina 1G en células positivas (color café) en la imagen del paciente con leucemia riesgo alto (d) a diferencia del paciente de riesgo habitual (c) y pediátrico sano (b).Control de Isotipo(a). Aumento 40X Microscopio Olympus.

El análisis cuantitativo de la expresión de Miosina 1G se realizó con el programa Image Pro-Plus,(Media Cybernetics).Los valores de los pacientes con LLA de riesgo habitual muestran un ligero incremento en la expresión de Miosina 1G en comparación con los pacientes de riesgo alto (figura 9).Para realizar el análisis cuantitativo se contaron cien células en cada laminilla y con ello obtuvimos el porcentaje de células positivas y la intensidad de expresión de Miosina 1G en cada una de ellas.

El analizador de imágenes Image Pro-Plus (Media Cybernetics), midió la densidad óptica (IOD), la cual se relaciona con la intensidad de expresión presente en cada célula.

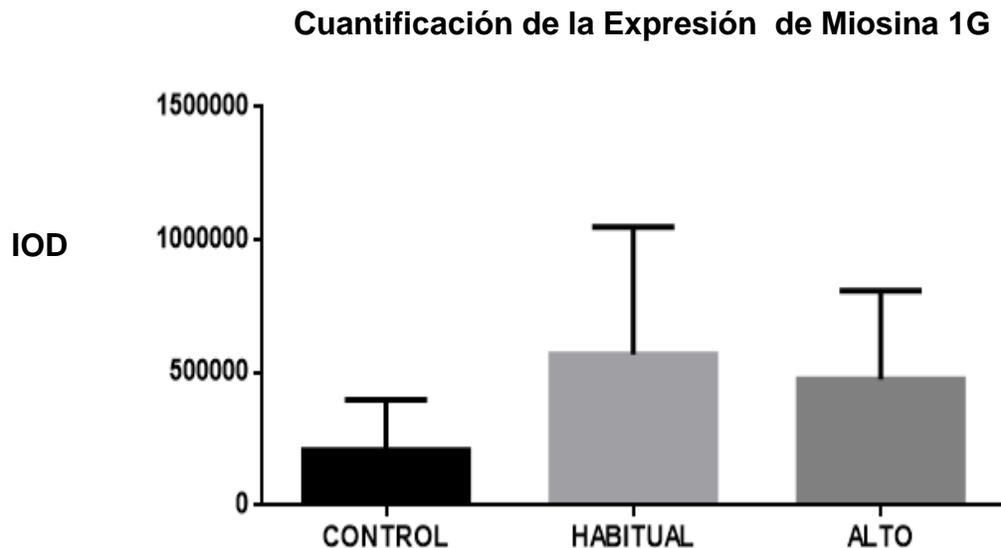


Figura.9.-Análisis Cuantitativo del ensayo de inmunocitoquímica. Se comparó la intensidad de expresión de Miosina 1G entre pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda de riesgo habitual y riesgo alto, así como de Individuos sanos. Se utilizó la prueba estadística ANOVA ente grupos y no se observa una diferencia significativa($p=0.05$). IOD= Integrity Optical Density.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G POR PCR EN TIEMPO REAL INTEGRIDAD DE RNA

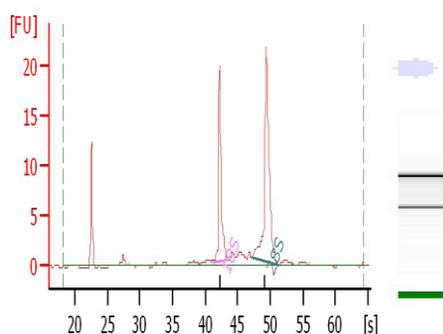
Antes de realizar la PCR en tiempo real de las muestras de cada uno de los pacientes, se corroboró la integridad del RNA utilizando el equipo Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies Inc.). Este equipo arroja un valor denominado RIN (RNA Integrity Number), obtenido con un algoritmo patentado por la compañía que nos indica la integridad del RNA. Esta calidad se determina mediante un valor, el cual se encuentra en un intervalo de 1 a 10, considerándose que el número 10 corresponde a un RNA completamente intacto y a medida que se aleja de dicho número la integridad va disminuyendo. El valor mínimo aceptado para realizar ensayos de PCR en tiempo real es de 7.0, este valor es el que proponen las

directrices MIQE (conjunto de normas que describen la información mínima para evaluar los experimentos de qPCR en el momento de la publicación) para obtener resultados confiables de la técnica³².

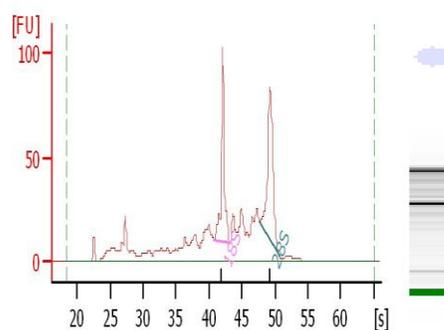
El promedio general del RIN obtenido de las muestras de RNA, el cual fue extraído de células mononucleares de pacientes fue de 9.13, considerando que el valor RIN mínimo obtenido fue de 7.20 y el valor máximo de 9.80.

RIN Máximo	RIN Mínimo	Promedio General
9.80	7.20	9.13

Tabla 6.-Integridad del RNA.Se muestra el valor máximo y mínimo de los valores RIN (Número de Integridad del RNA) obtenidos del Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies, se incluye el promedio del RIN de todas las muestras analizadas.



RNA Integrity Number (RIN): 9.8



RNA Integrity Number (RIN): 7.20

Figura 10.- Electroferogramas representativos del análisis de la Integridad del RNA extraído de células mononucleares de los pacientes, en la gráfica de la izquierda se observa un RIN mayor a 9 y en la gráfica de la derecha de 7.20. Imágenes obtenidas del Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies.

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MIOSINA 1G

Para la evaluación de la expresión de miosina 1G por PCR en tiempo real, se obtuvo el cDNA de 34 individuos, 18 con diagnóstico de LLA, 5 pacientes con LMA y 11 individuos sanos en un rango de edad de 23-32 años, esto debido a que en este momento no se pudo obtener muestras pediátricas por cuestiones éticas. Se muestran datos de cada uno de los pacientes en la (tabla 7).

ΔCt /LLA-RA	ΔCt / LLA-RH	ΔCt / LMA	ΔCt / Control
6.89	5.9	8.23	4.55
9.13	6.95	6.04	4.64
4.90	4.82	7.58	5.6
5.49		9.00	6.38
6.08		7.54	6.71
6.69			7.33
5.21			8.14
6.08			8.48
7.10			8.50
7.25			8.57
5.15			10.02
4.59			
4.81			
6.81			
6.34			
6.16± 1.18	5.89±1.06	7.67±1.09	7.17±1.76

Tabla 7.- Datos de las amplificaciones del gen de Miosina 1G. Los ΔCt obtenidos para el gen de Miosina 1G se clasifican en grupos conforme al diagnóstico del paciente. El ΔCt se obtuvo de la siguiente fórmula $\Delta Ct = Ct (Myo1G) - Ct (GAPDH)$. Se obtuvo la media y la desviación estándar D.E. de los valores ΔCt de cada uno de los grupos. LLA: leucemia linfoblástica aguda, LMA: leucemia mieloblástica aguda, RA= riesgo alto, RH=riesgo habitual

Se puede observar que el grupo de pacientes con LLA-RA muestra un valor promedio de ΔCt menor, comparado con el grupo de LMA y Controles sanos, el grupo que presentó un promedio mayor fue el de LMA a pesar de que el número de pacientes de este grupo fue menor que el grupo de LLA y Control.

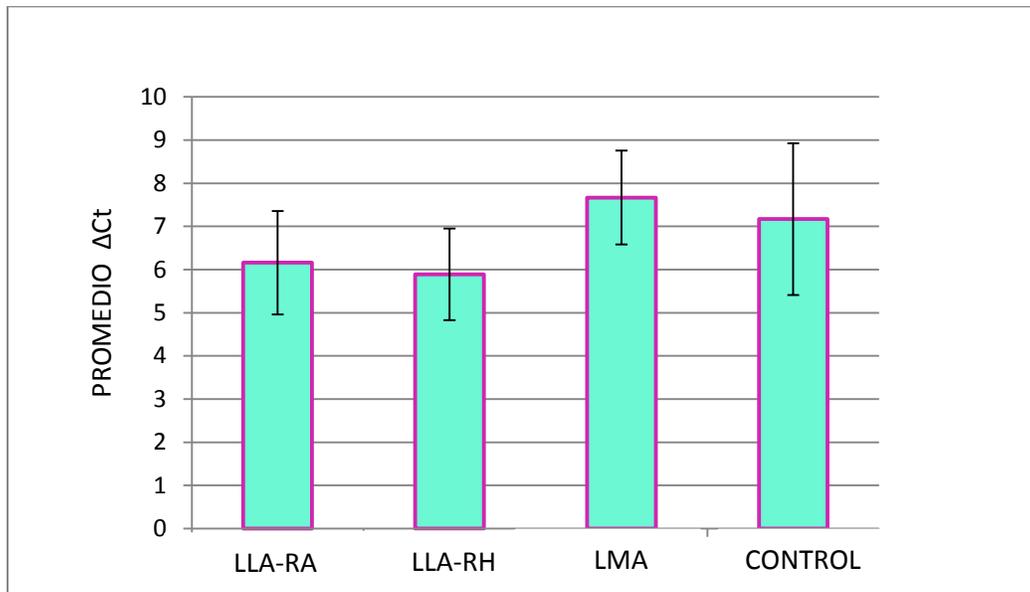


Figura.11.-Promedio de los ΔCt de cada uno de los grupos de estudio a comparar. LLA: leucemia linfoblástica aguda, LMA: leucemia mieloblástica aguda, RA: Riesgo alto, RH: Riesgo habitual. Se observa que la media más alta corresponde al grupo de pacientes con LMA. La barra de error representa la Desviación Estándar. Se observa que los promedios más bajos corresponden a los grupos de Leucemia Linfoblástica Aguda. Utilizando la prueba estadística t-student se observa una diferencia significativa en la expresión de Miosina 1G entre los grupos LLA-Controles, LLA-RA-Controles y LLA-LMA. $p=0.05$.

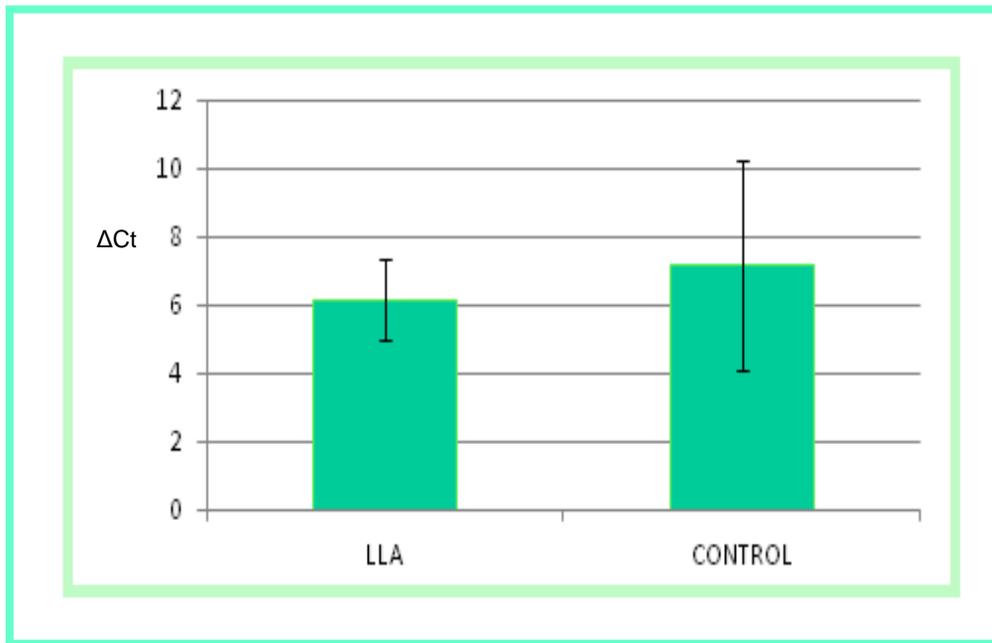


Figura.12.- Valores de ΔCt obtenidos con PCR en tiempo real de muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (Se incluyen pacientes RA y RH) e Individuos sanos. Se comparó la expresión de Miosina 1G entre estos grupos, sin tomar en cuenta la clasificación del riesgo que se realiza clínicamente, para conocer si hay diferencia entre pacientes y controles. Las barras de error representan la Desviación Estándar, si se observa diferencia estadística significativa entre estos grupos aplicando prueba t-student. $p=0.05$. RA=Riesgo Alto, RH=Riesgo Habitual.

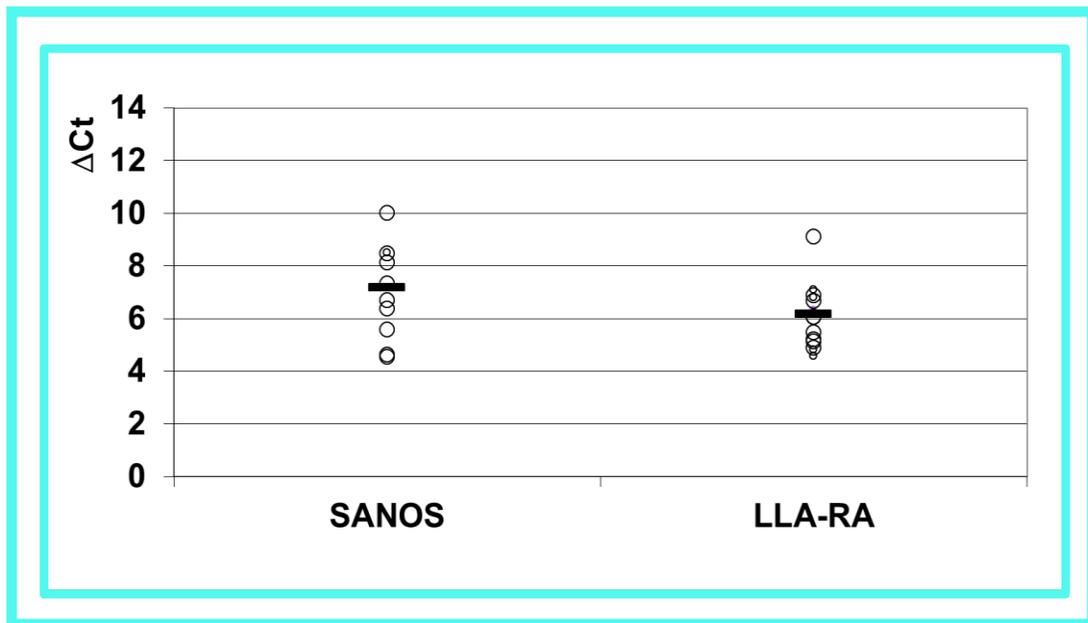


Figura.13.- Valores de ΔCt obtenidos por PCR en tiempo real de muestras de sangre periférica de pacientes de LLA riesgo alto (LLA-RA) e Individuos controles. Se muestra un gráfico de puntos que representa el ΔCt obtenido de cada uno de nuestros pacientes tomando en cuenta que los Ct más bajos corresponden a los pacientes que tuvieron mayor expresión del RNAm del gen de Miosina1G. Entre estos grupos existe una diferencia en la expresión de Miosina 1G estadísticamente significativa con la prueba t-student. $p=0.05$.

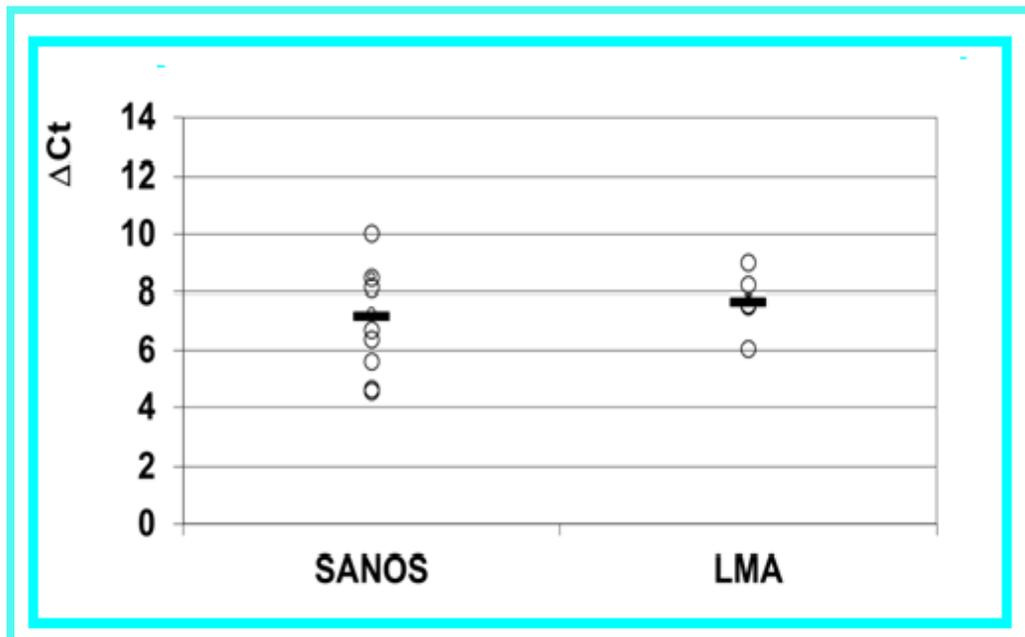


Figura.14.-Valores de ΔCt obtenidos con PCR en tiempo real de muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) e Individuos sanos. Se compara la expresión de Miosina 1G y se observa que ambos grupos expresan de manera similar al gen de Miosina 1G.Se aplicó la prueba t-student y no existe diferencia estadística significativa entre estos grupos. $p=0.05$.

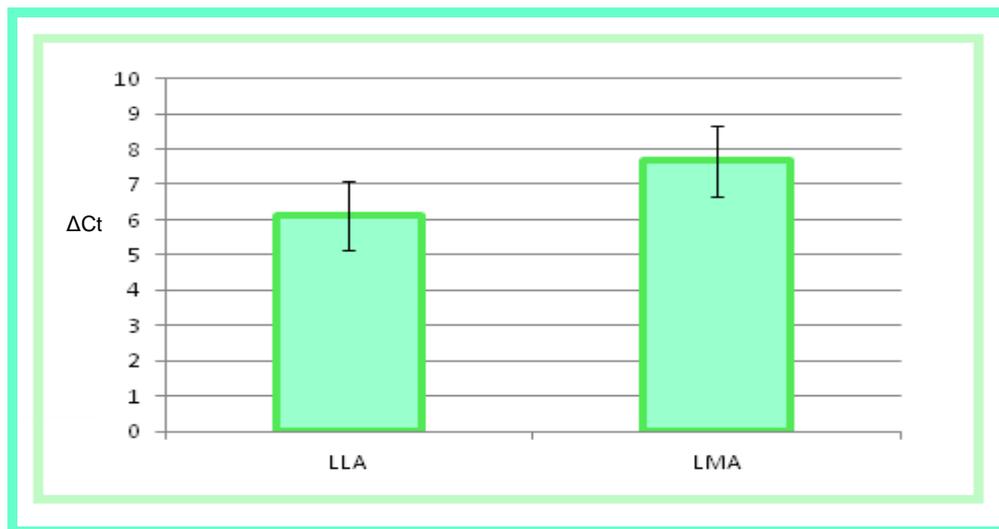


Figura.15.-Valores de ΔCt obtenidos con PCR en tiempo real de muestras de sangre periférica de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA). Se compara la expresión de Miosina 1G entre estos grupos, observándose que hay una diferencia entre ellos estadísticamente significativa al aplicar la prueba t-student. $p=0.05$

Grupos de pacientes	Significancia Estadística (valor $p = 0.05$)
LLA-RA /SANOS (CONTROL)	0.048
LLA/SANOS (CONTROL)	0.031
LMA/SANOS (CONTROL)	0.284
LLA/LMA	0.006

Tabla 8.- Significancia estadística de las comparaciones entre grupos de pacientes y controles sanos. Se muestran la significancia estadística de cada uno de los grupos que se compararon en el estudio, estos resultados fueron obtenidos de la prueba estadística t-student, observándose que existe diferencia estadística significativa en tres de los grupos que se comparación, sin embargo la comparación entre los grupos LMA-Control no presentó diferencia estadísticamente significativa.

Se utilizó el algoritmo de cálculo del $\Delta\Delta Ct$ para obtener el F.C. (**Fold Change**)³³ y conocer la diferencia de expresión entre pacientes con diagnóstico de LLA y LMA

e Individuos sanos. El F.C. es una medida para comparar el nivel de expresión de ARNm de un gen entre dos condiciones distintas.

Es importante comentar que de los 33 pacientes que se obtuvieron sólo la muestra de 23 pacientes fue adecuada para realizar el ensayo de PCR en tiempo real.

Algoritmo de Cálculo

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

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

Las comparaciones que se realizaron para conocer la diferencia en la expresión de Miosina 1G fueron entre pacientes LLA-RA e Individuos sanos, LLA e Individuos sanos, LLA con pacientes de LMA y LMA e Individuos sanos.

Grupos a comparar	ΔCt RA	ΔCt Control	$\Delta\Delta Ct$	F.C.
LLA-RA/Individuos Sanos	6.16	7.17	-1.01	2.01
LLA/Individuos Sanos	6.12	7.17	-1.05	2.07
LLA/LMA	6.12	7.67	-1.55	2.90
LMA/Individuos Sanos	7.67	7.17	0.5	0.70

Tabla 9.-Se realizó la comparación entre pacientes e individuos sanos y pacientes LLA-LMA, utilizando como algoritmo de cálculo el $\Delta\Delta Ct$ para obtener el F.C. y conocer la expresión de Miosina 1G en los dos grupos.

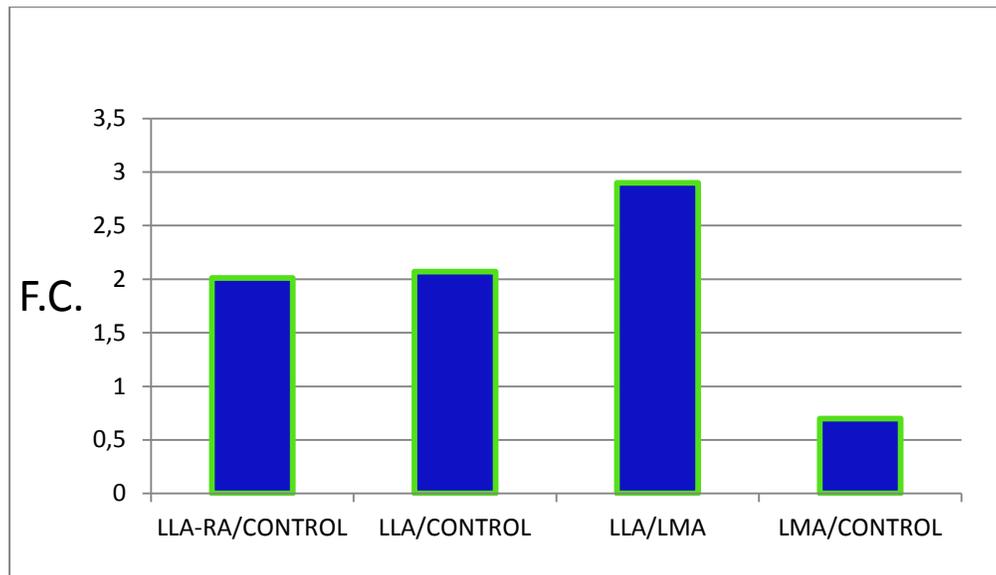


Figura.16.- Gráfica del **Fold Change** entre los diferentes grupos. F.C.= representa las veces de cambio de un grupo con respecto al otro. Se observa que los grupos de pacientes con LLA y LMA expresan lo doble del gen de Miosina 1G comparado con el grupo control.

TRANSFECCIÓN LÍNEA CELULAR RS4, 11

Para la evaluación de la migración celular, la línea leucémica RS4; 11, fue transfectada con el plásmido pDest732Myo1g. Hasta la fecha no se ha procedido a la realización de estos ensayos ya que actualmente se está generando una línea celular estable con la cual se pueda identificar posteriormente posibles cambios en la velocidad y direccionalidad durante la migración^{13, 34}.

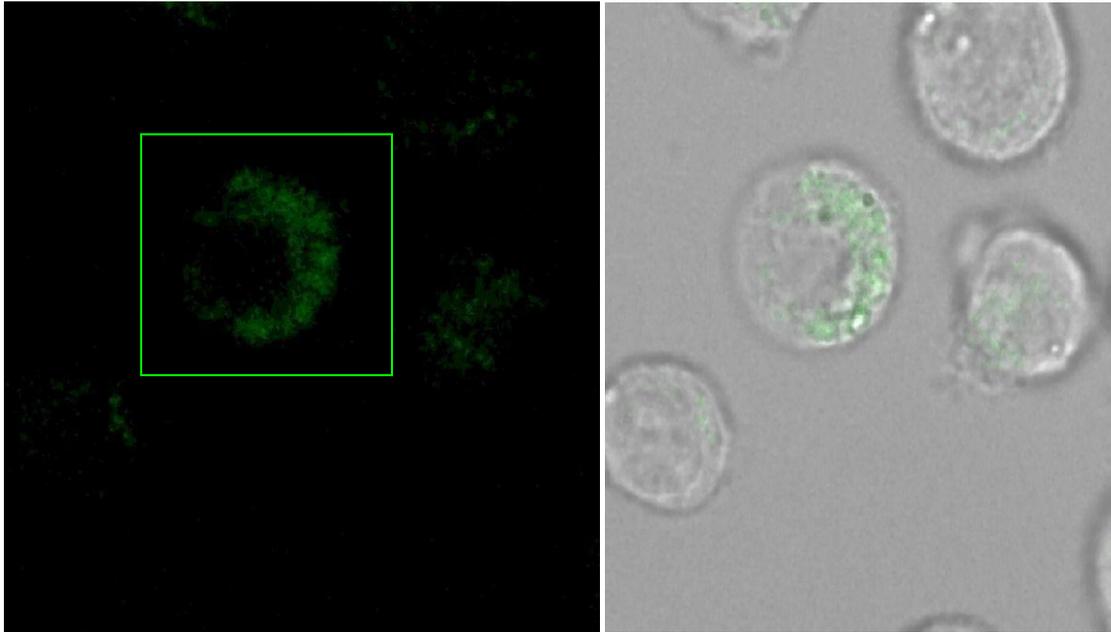


Figura.17.-En estas imágenes se muestra la fluorescencia de las células que han integrado el plásmido. El plásmido pDest732Myo1G presenta el gen reportero GFP, que permite distinguir la presencia de Miosina1G en las células. La fluorescencia verde que se observa en la membrana de las células en ambas imágenes indica la presencia de Miosina 1G en la célula, debido a que se formó una proteína de fusión entre GFP-Myo1G. En la imagen de la derecha se observan las células con expresión de Myo1G en contraste de fases. Imágenes obtenidas del Microscopio confocal (Leica TCS-SP8x).

DISCUSIÓN

Evaluación de la expresión de Miosina 1G

Se evaluó la expresión de Miosina 1G en células mononucleares de 20 pacientes con LLA y de individuos sanos mediante Inmunocitoquímica. Se observó una correlación entre la intensidad de expresión de Miosina 1G y la gravedad de la enfermedad presente en cada uno de los pacientes. Los resultados obtenidos muestran mayor intensidad en la expresión de Miosina 1G en células de pacientes de riesgo alto comparado con el grupo de pacientes con LLA de riesgo habitual y grupo control (figura 8 y Anexos). En estos dos últimos grupos se observa una disminución en cuanto a las células que expresan Miosina 1G, esto probablemente se deba a que en estos pacientes y controles sanos no son abundantes las células que sobreexpresan al gen de miosina 1G, a diferencia de los pacientes de riesgo alto en donde posiblemente se encuentran en mayor porcentaje células con alto grado de anormalidad que sobreexpresan al gen de miosina. Al realizar el análisis cuantitativo con el programa Image Pro-Plus (figura 9) los datos obtenidos no muestran una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, realizando la prueba ANOVA. Sin embargo a pesar de que no hay una diferencia significativa, en los resultados se observa que los pacientes de Leucemia presentan una tendencia hacia un aumento en la expresión de Miosina 1G comparado con el control (figura 9), esto se relaciona con el análisis cualitativo que se realizó con el Microscopio.

Se esperaba que el grupo con mayor IOD fuera el de LLA-RA y no el grupo de LLA-RH, esto es porque consideramos que la expresión de Miosina 1G se encuentra incrementada en pacientes graves principalmente en aquellos que presentan infiltrados extramedulares, los cuales están originándose de manera rápida como consecuencia de un aumento en la velocidad de migración de las células B, el estudio realizado por Maravillas Montero y Colaboradores demuestra que en linfocitos B deficientes de Myo1G se ve disminuida la migración⁹ por ello es

que nosotros esperamos que a mayor expresión de miosina se aumente la migración en células B y con ello la formación de infiltrados.

Realizando el estudio del expediente clínico de cada uno de los pacientes que participaron en la investigación, detectamos que en el grupo de Riesgo habitual dos de los niños presentaron recaída y uno de ellos deceso, datos que difícilmente surgen en pacientes con este diagnóstico, también identificamos a un niño de este grupo con 52,000 leucocitos en su diagnóstico. Estos tres casos posiblemente estén mal clasificados con respecto al riesgo y probablemente dicha situación esté alterando los datos de nuestro ensayo, pero sobretodo este hecho nos incita a seguir con nuestra investigación, ya que Miosina 1G podría ser un factor más que pudiese determinar con mayor precisión el riesgo del paciente.

El estudio de los expedientes clínicos nos permitió correlacionar la intensidad de la tinción celular, la expresión de Miosina 1G y la gravedad que presenta el paciente.

Las células mononucleares que se observan en el inciso (d) figura 8 corresponden a un paciente femenino de 13 años de edad con diagnóstico de LLA subtipo L2, se diagnóstica de alto riesgo por edad, actualmente viva en fase de consolidación, a diferencia del inciso (c) figura 8 que corresponden a las células de un paciente masculino de 6 años de edad con diagnóstico de LLA subtipo L2 riesgo habitual con buena respuesta al tratamiento actualmente vivo y en fase de consolidación. (No todas las laminillas de los pacientes pudieron ser analizadas debido al exceso de celularidad en las muestra, únicamente en este ensayo se incluyeron individuos sanos pediátricos).

Evaluación de la Integridad del RNA

La Integridad del RNA es un factor determinante en los ensayos de PCR en tiempo real, un RNA integro o intacto muestra dos bandas correspondientes a las subunidades (28s y 18s), ambas bandas se muestran en los electroferogramas en

forma de pico, el primer pico que aparece en el gráfico corresponde a la subunidad 18s y el segundo a la subunidad 28s.

Para tener certeza de los resultados obtenidos en PCR tiempo real corroboramos la integridad del RNA de cada una de las muestras, el valor RIN menor que obtuvimos fue de 7.20 y el mayor de 9.8 (figura 10) en cada una de ellas.

Los RIN que se obtuvieron se encuentran aceptados por los estándares MIQE (conjunto de directrices que describen la información necesaria mínima para evaluar los experimentos de qPCR en el momento de la publicación)³², esto nos permitió seguir con los ensayos de PCR en tiempo real.

Análisis de la expresión del gen de Miosina 1G en Pacientes con LLA, LMA e Individuos Sanos.

En la tabla 7 se observa que el promedio del ΔCt más bajo corresponde a los pacientes con LLA, esto indica que la expresión de Myo 1G es mayor en este grupo de pacientes comparado con el grupo de pacientes con diagnóstico de LMA y grupo Control. En esta tabla también se muestra la D.E (Desviación estándar) de cada uno de los grupos, la cual es menor que las medias obtenidas este valor nos indicó el grado de dispersión de los datos, en este caso la mayoría de ellos se encuentran cercanos a la media.

Las muestras de los individuos adultos que se utilizaron en este ensayo fueron tratadas bajo las mismas condiciones que las muestras de los pacientes pediátricos. Es importante comentar que el número leucocitario de un adulto suele ser más bajo que en un niño³⁵ y posiblemente esa diferencia nos podría estar alterando los resultados, sin embargo para evitar esto el ensayo parte de la misma cantidad de RNA, cDNA y se normalizó con el gen endógeno GAPDH el cuál no presento variaciones entre adultos y niños

Los resultados del análisis de expresión de Miosina 1G a partir del ensayo por PCR en tiempo real se obtuvieron por el método del ΔCt . El ΔCt de cada uno de

los pacientes se obtuvo por la diferencia entre el Ct obtenido de la amplificación de Miosina1G y el gen normalizador GAPDH. Para determinar la expresión de un gen entre diferentes muestras es necesario normalizar el ensayo con un gen constitutivo o endógeno cuya expresión no muestre variación en las condiciones del experimento. Con la normalización del ensayo evitamos que los cambios en la expresión del gen se originen por la cantidad o concentración de RNA total empleada en la síntesis de cDNA. Para este ensayo se utilizó el GAPDH como gen endógeno, esta decisión fue tomada en base a la teoría y a investigaciones donde se incluyen pacientes con diagnóstico de LLA y LMA^{29, 36}.

Se realizaron comparaciones entre los diferentes grupos (figura11) y observamos en los gráficos un aumento de Miosina 1G en las CMN de los pacientes con Leucemia comparando con individuos sanos (figura 12, figura 13), esta diferencia es estadísticamente significativa, aplicando la prueba t-student, además para obtener mayor poder estadístico se pretende obtener muestras de pacientes pediátricos sin alteraciones hematológicas como grupo control para un estudio posterior, con respecto a la comparación que se realizó entre el grupo de pacientes de LLA y LMA, también se observó una diferencia significativa mediante la prueba t-student en la expresión de Miosina 1G, sin embargo debido a la incidencia que presenta la LMA la cantidad de muestras obtenidas fue menor por lo tanto estos resultados solo nos da una idea de la expresión del gen y consideramos necesario incrementar el número de muestras de pacientes con este diagnóstico para llegar a conclusiones definitivas.

Otro grupo a comparar fue el de los pacientes con LMA con el grupo control y aplicando la prueba estadística t-student, observamos que no hay diferencia significativa, la expresión de Miosina 1G es similar entre estos grupos, tomando en cuenta que el grupo de pacientes con LMA presenta una tendencia de una menor expresión de Miosina 1G, hasta el momento no existen investigaciones que muestren evidencia que en la leucemia mieloblástica aguda se presente desregulación en proteínas motoras, se tiene que tomar en cuenta que estos pacientes (LMA) son niños de riesgo intermedio y hasta el momento no

conocemos como se está expresando Miosina 1G en pacientes pediátricos de LMA-RA, sería interesante continuar con el estudio de este grupo de pacientes debido a que se sabe que los infiltrados extramedulares son más frecuentes en pacientes con LMA que en pacientes con LLA³⁷.

Como sabemos el ensayo de PCR en tiempo real nos permite obtener los Ct, este valor es inversamente proporcional a la cantidad de mensajero presente, por tal motivo podemos observar que los Cts que se obtienen en ciclos más tempranos se relacionan con un aumento en la expresión del gen y los ciclos más tardíos con una disminución en la expresión del gen, por esta razón es importante comentar que analizando el expediente clínico encontramos que dos de los Cts más bajos (tabla en anexos) corresponden a niños con infiltrados a nivel testicular y SNC, uno de ellos de 2 meses de edad fallecido y el otro de 11 años de edad vivo. Ambos casos clínicos son de gran relevancia para este estudio ya que nos permite correlacionar la expresión de Miosina 1G con la gravedad de la enfermedad.

Considerando los casos anteriores podemos asociar el aumento en la expresión de Myo 1G con niños que se han clasificado de riesgo alto por edad (0-9 años), hiperleucocitosis e infiltraciones. El incremento en el número de pacientes con LLA será determinante en el seguimiento de este estudio, para poder confirmar los resultados que hemos obtenido hasta este momento.

Actualmente no se encuentran reportes en donde se demuestre que proteínas motoras influyan en la migración de células leucémicas, sin embargo se ha reportado que las células cancerosas migran a través de las matrices extracelulares modificadas respondiendo fundamentalmente a estímulos quimiotácticos, factores autocrinos inductores de la migración, así como moléculas de adhesión³⁸, factores dispersantes, factores de crecimiento y factores derivados de las glicoproteínas de la matriz de los órganos diana (fibronectina, laminina)³⁹

El F.C. nos muestra las veces de cambio de un grupo respecto a otro, con este dato podemos saber que tanta expresión de Miosina 1G se presenta en un grupo

respecto a otro. En los grupos de LLA-Control sano, podemos decir que Miosina 1G se está expresando dos veces más en pacientes con LLA respecto a los individuos sanos, lo mismo sucede en el grupo LLA-LMA en donde la expresión de Miosina 1G también es dos veces más en pacientes con LLA respecto al grupo de pacientes con LMA(figura16).En la comparación que se realizó entre el grupo de LMA-Control sano el F.C. muestra los pacientes expresan 0.7 veces la cantidad del gen de Miosina 1G con respecto a los sanos.

Los valores F.C. obtenidos muestran un incremento en la expresión de Myo 1G en LLA datos que se relacionan con los resultados del análisis bioinformático de la base de datos de Microarreglos Oncomine, en donde el gen de Miosina 1G se encuentra sobreexpresado en pacientes con LLA.

La significancia estadística de este ensayo se obtuvo aplicando el estadístico t-student de una cola, porque los resultado previos a este estudio (Análisis de base de datos de microarreglo y estudio piloto para conocer la expresión de Miosina 1G) influyeron para que propusiéramos que la proteína Miosina 1G se sobreexpresa en pacientes con LLA.

Ensayo de Migración

Como último punto a mencionar, la Línea celular de Leucemia Linfoblástica Aguda linaje B, RS4; 11, fue transfectada con el plásmido pDest 732 Myo1G y pDest 732 (control) para poder hacer una comparación en la migración celular, el plásmido tiene el gen reportero eGFP, la presencia de esta proteína fluorescente nos permite identificar la expresión de Miosina 1G en la membrana de la célula B (figura 17).

Con esta línea celular pretendemos conocer cómo influye miosina1Gen la velocidad y direccionalidad durante la migración celular y determinar si existe la correlación del aumento en la migración al aumentar la expresión de la proteína, para tratar de entender otros aspectos de lo que está ocurriendo en el organismo del paciente leucémico al alterarse la expresión de esta proteína motora.

Esta proteína podría ser el factor que desencadena una migración celular acelerada que origine la rápida formación de infiltrados en los pacientes con LLA.

CONCLUSIONES

*El análisis realizado de la expresión de Miosina 1G en las células mononucleares de pacientes con Leucemia linfoblástica aguda mostró que esta proteína aumenta su expresión en pacientes con dicho diagnóstico y esta sobreexpresión posiblemente se encuentre influyendo en la gravedad de la enfermedad debido a que en nuestra población de estudio se detectaron casos reportados clínicamente como graves con altos niveles de expresión de Miosina 1G.

*La expresión de Miosina 1G pudiera ser un posible biomarcador celular de células leucémicas, contribuyendo así en la clasificación de riesgo en el momento del diagnóstico con la finalidad de que el paciente oncológico reciba una terapia más específica y adecuada con respecto a su padecimiento.

*Miosina 1G pudiera estar desregulada en pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloblástica Aguda y para poder determinarlo consideramos importante incluir a este grupo de pacientes en un estudio posterior.

*La hipótesis de esta investigación no se ha cumplido en su totalidad, sin embargo los resultados obtenidos nos sugieren continuar con la investigación incrementando el número de pacientes en el estudio y explorando mecanismos básicos que nos ayuden a entender cómo cambian las propiedades migratorias de los linfocitos B al sobreexpresar está (Miosina1G) u otras proteínas motoras relacionadas.

PERSPECTIVAS

Uno de los ensayos que tenemos planeados es el de migración, con el cual se podrá determinar la velocidad y direccionalidad celular, esperando que las células que tienen al pDest 732Myo 1G tengan una velocidad incrementada comparada con las células transfectadas con pDest 732, ya que se ha reportado que en Linfocitos B que no expresan Myo1G hay deficiencias en la migración⁹, así que al aumentar esta proteína esperamos obtener lo opuesto en las células.

Con los resultados obtenidos consideramos necesario incrementar el número de pacientes con la finalidad de que nuestros resultados presenten mayor confiabilidad, esto se logrará aumentando las colaboraciones con otros hospitales pediátricos, una de nuestras prioridades es obtener muestras sanguíneas de pacientes pediátricos sin alteraciones hematológicas como grupo control (por ejemplo pacientes de ortopedia). En la segunda fase de nuestro estudio se incluirá a los pacientes con LMA, con la finalidad de conocer si en pacientes hay cambios en la expresión de Miosina 1G, esto resulta de gran interés por que estos pacientes son más susceptibles a infiltraciones extramedulares³⁷ y la frecuencia de curación para ellos a diferencia de los pacientes con LLA solo ha mejorado en forma parcial⁴⁰.

Con respecto al ensayo de inmunocitoquímica pretendemos corroborar los datos obtenidos con esta técnica realizando inmunofluorescencia y de aquí determinar cómo es la expresión de Miosina 1G en los diferentes grupos de pacientes.

También dentro de nuestras actividades planeadas está el determinar si alguna otra miosina clase I expresada en Linfocitos B se encuentra alterada en pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia.

Tenemos la firme convicción de que en la segunda fase de esta investigación obtendremos resultados con mayor certeza, debido a que con esta primera fase conocimos las limitaciones del estudio y esto nos permitirá aumentar nuestras perspectivas respecto a objetivos que plantearemos para un estudio posterior.

ANEXOS

Las secuencias de Primers para Miosina 1G y GAPDH se obtuvieron mediante el programa de ROCHE.

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

Página Roche

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

PCR en tiempo real

Para la estandarización de esta técnica se utilizó como control positivo a la línea celular de linfocitos B, RS4, 11 y Jurkat de linfocitos T (ambas líneas de leucemia linfoblástica aguda), los Ct de Myo 1G y Δ Ct normalizando con GAPDH obtenidos fueron los siguientes.

Línea Celular	Ct	Δ Ct
RS4,11	27.24	9.45
Jurkat	26.35	9.44

Tabla 10.- Resultados obtenidos de las amplificaciones del gen de Miosina 1G en líneas celulares leucémicas ambas líneas fueron utilizadas como controles positivos.

Se muestran los Cts obtenidos del ensayo de PCR en tiempo real al utilizar las muestras de los pacientes diagnosticados con Leucemia, con estos datos se puede apreciar la diferencia entre los ciclos en los diferentes grupos de pacientes.

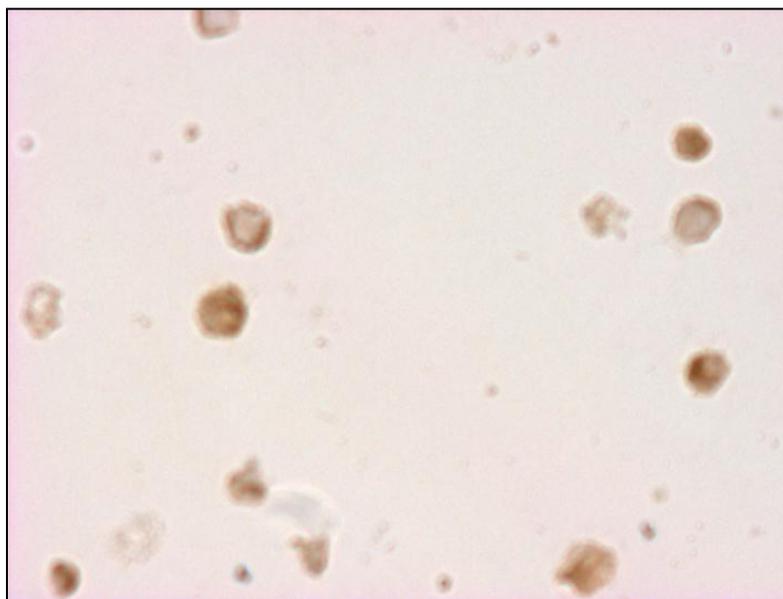
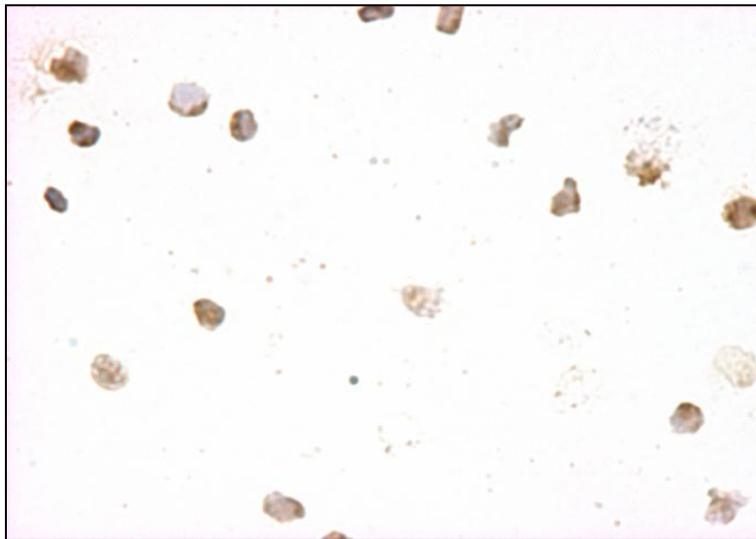
Ct / LLA-RA	Ct / LLA-RH	Ct / LMA	Ct/Control
25.59	27.73	29.0	27.66
25.79	28.41	29.52	28.00
26.3	32.66	30.6	28.16
26.44		31.0	28.91
26.62		27.83	29.37
28.02			29.5
28.44			29.95
30.0			30.47
30.7			30.75
31.18			31.48
31.43			33.97
32.05			
32.71			
32.81			
35.31			

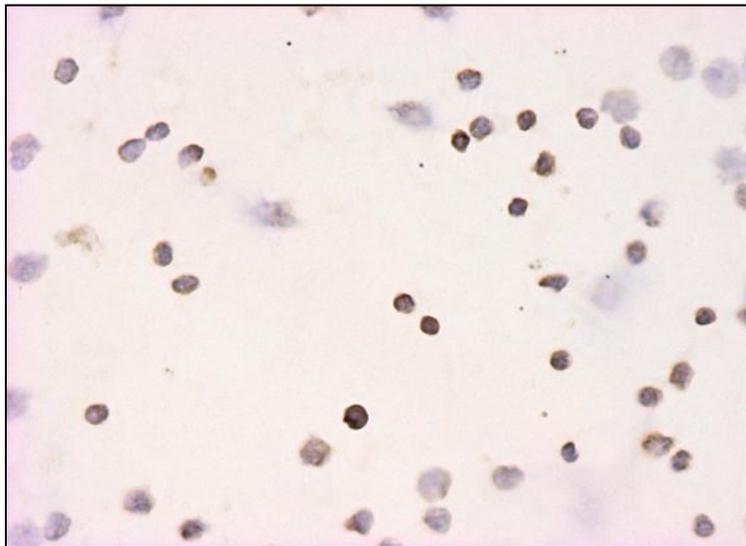
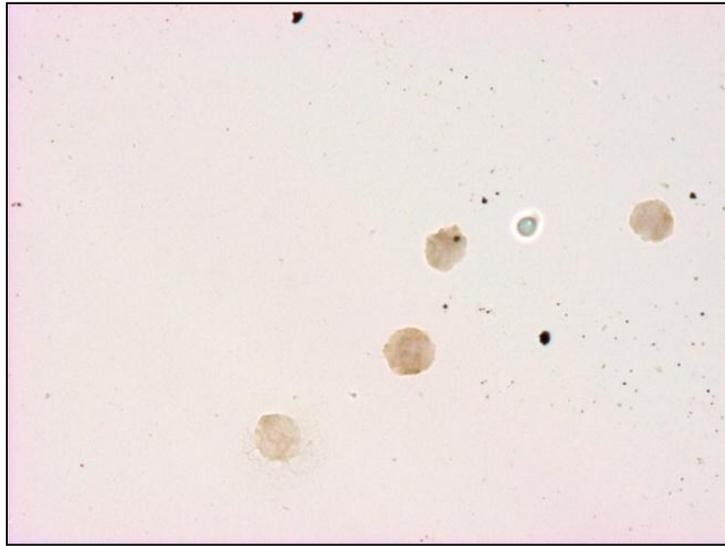
Tabla 11.- Datos de las amplificaciones del gen de Miosina 1G. Los Ct obtenidos para el gen de Miosina 1G se relacionan con el diagnóstico del paciente.

Se muestran algunas imágenes de Células Mononucleares de pacientes con el diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda e Individuos pediátricos sanos. En todas las imágenes de este apartado se muestran diferencias entre pacientes con respecto a la celularidad y positividad de las células para Miosina1G.

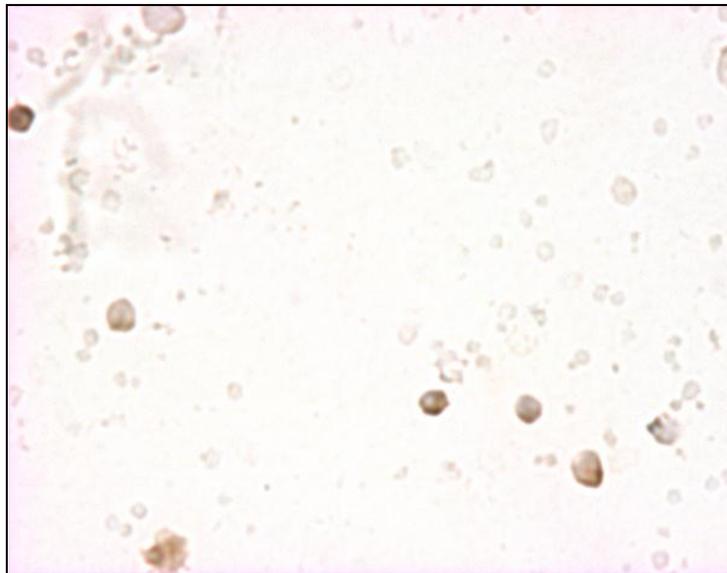
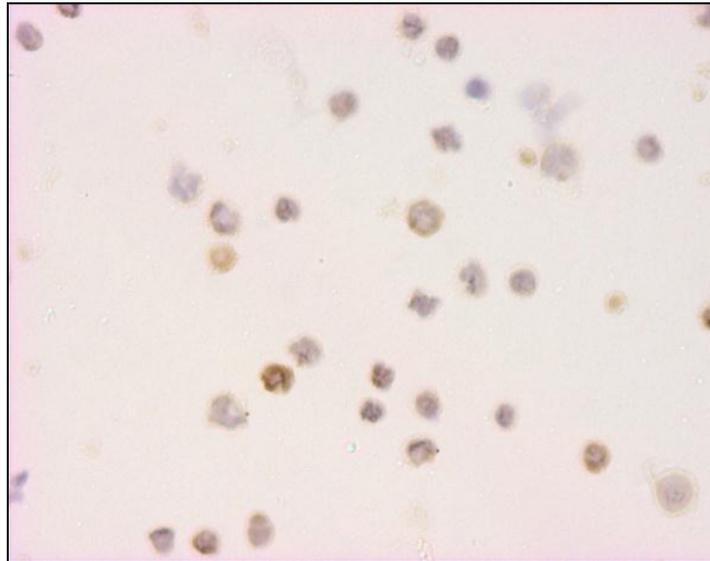
Las imágenes se obtuvieron con un aumento 40X, el cromógeno utilizado para teñir fue DAB y se contratiñeron con hematoxilina.

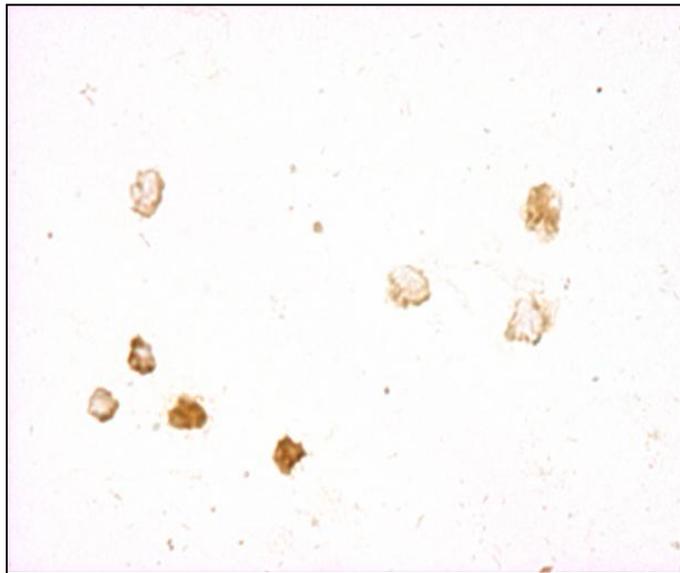
Imágenes de las Células Mononucleares de Pacientes con LLA-RA



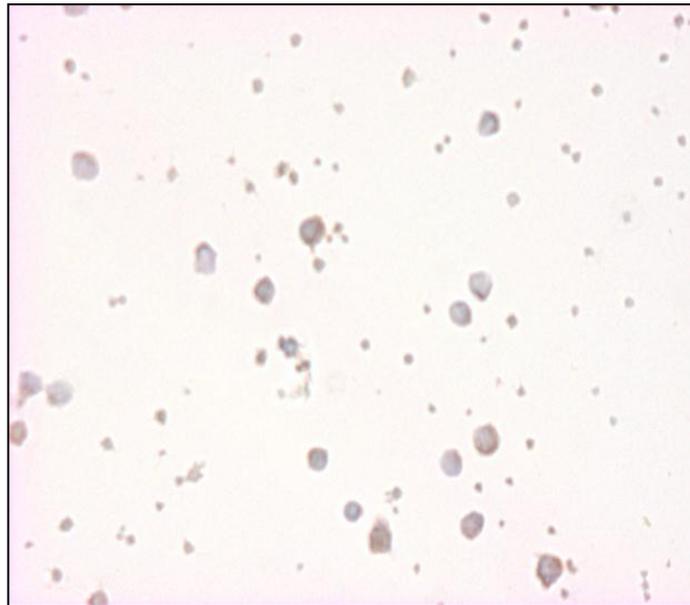
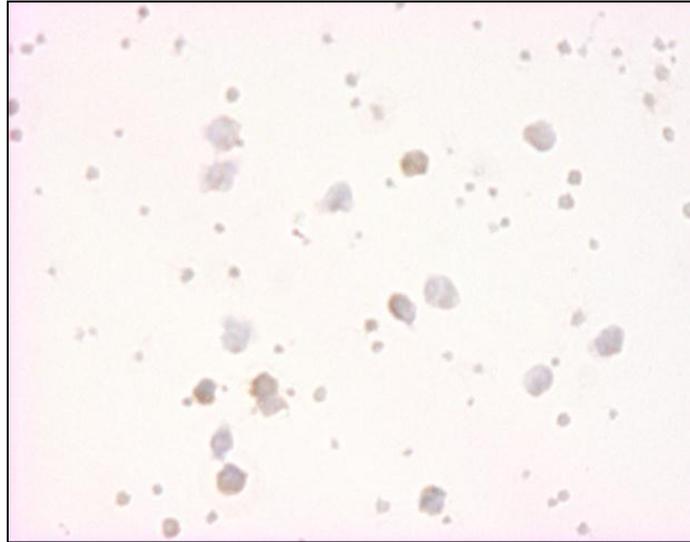


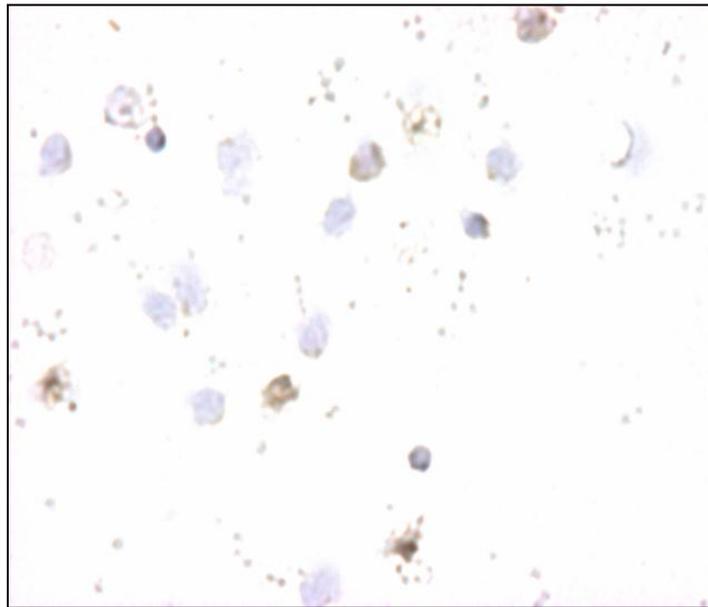
Imágenes de las Células Mononucleares de Pacientes con LLA-RH





Imágenes de las Células Mononucleares de Individuos Sanos





BIBLIOGRAFÍA

- 1) Vázquez-Prado, J. Guzmán-Hernández, M. L., Carretero-Ortega, J., Sánchez-Barbosa, S., Hernández-García, R., & Reyes-Cruz, G. 'Mecanismos Moleculares de la Migración de Células Endoteliales y Angiogénesis', (Universidad Nacional Autónoma de México), Mensaje Bioquímico (2006) 30(5)77-104.
- 2) Cameron-Luiz, 'La Miosina En El Movimiento Celular, Estructuras Y Propiedades Cinéticas', Laboratorio de Bioquímica de proteínas, Universidad Río de Janeiro, (2003), 22: 7-18.
- 3) Cooper, (2002) La Célula. 2ª ed. Marban. Vol. 1. ISBN 978-84-7101-488-7.
- 4) Mc Connell-RE & Tyska, M. J. Leveraging the membrane–cytoskeleton interface with myosin1- Trends in cell biology, (2010), 20(7), 418-426.
- 5) Bond-Lisa, M., Brandstaetter, H., Kendrick-Jones, J., & Buss, F. Functional roles for myosin 1c in cellular signaling pathways. Cellular signalling, 2013, 25(1), 229-235.
- 6) Liu-KC, 'Myosins in Cells Junctions', Bioarchitecture (2012), 2(5):158-170.
- 7) 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.
- 8) Gillespie-P; 'Calmodulin Binding to Recombinant Myosin 1c and Myosin1c IQ Peptides', BMC Biochemistry (2002), 20 (9):3-31.
- 9) Maravillas-Montero, J. L., López-Ortega, O., Patiño-López, G., & Santos-Argumedo, L. Myosin 1g regulates cytoskeleton plasticity, cell migration, exocytosis, and endocytosis in B lymphocytes. European journal of immunology, 2014, 44(3), 877-886.
- 10) Santos –Argumedo, L, Maravillas Montero, J. L., & López, Ortega, O. Class I myosins in B-cell physiology: functions in spreading, immune synapses, motility, and vesicular traffic, Immunological Reviews, 2013, Vol. 256: 190–202.
- 11) Satake, N; 'Leucemia Linfoblástica Aguda', Clinical Fellow, Department of Pediatric Hematology-Oncology, Mattel Children's Hospital at University of California at the Angeles, (2006), 36(1-2):5-8.
- 12) Patino-Lopez, G; Aravind, L, Dong, X., Kruhlak, M. J., Ostap, E. M., & Shaw, S. '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)', *Journal of Biological Chemistry*, (2010), 285(12):8675-86.

13) Gérard, A., Patino-López, G., Beemiller, P., Nambiar, R., Benaissa, K., Liu, Y., & Krummel, M.F. (2014). Detection of rare antigen-presenting cells through T cell-intrinsic meandering motility, mediated by Myo1G. *Cell*, 158(3), 492-505.

14) Olety, B., Wälte, M., Honnert, U., Schillers, H., & Bähler, M. (2010). Myosin 1G (Myo1G) is a hematopoietic specific myosin that localises to the plasma membrane and regulates cell elasticity. *FEBS letters*, 584(3), 493-499.

15) Vega Robledo, G. B. (2009). Linfocitos. *Revista de la Facultad de Medicina*, 52(006).

16) Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. (2008) 6º Ed. "Inmunología celular y molecular". Saunders-Elsevier..

17) García Dolores, Fernando. 2012. Identificación de un Marcador Molecular de Cáncer en Leucemia. Tesis Doctoral.

18) Sánchez, Manuel Alfredo Ortega, María Luisa Osnaya Ortega, and José Vicente Rosas Barrientos. (2007). "Leucemia linfoblástica aguda." *Medicina Interna de México* 23.1.

19) Secretaria de Salud Publica, 2011, Perfil epidemiológico del cáncer en niños y adolescentes en México. ISBN 978-607-460-243-2.

20) Hunter KW, 'Mechanisms of Metastasis', *Breast Cancer* (2008) 10 1:52.

21) Mejía, J; Fajardo, A; 'Epidemiología De Leucemias Agudas En Niños', *Médica IMSS* (2005), 43 (4): 323-333.

22) Mandal A, Clasificación aguda de la Leucemia Linfoblástica, *News Medical*. 2013

23) Antonio-Andrés, G; 2012 Evaluación de la regulación transcripcional del gen Multirresistencia a fármacos (MDR1) por el factor de transcripción Yin-Yang 1 (YY1) en la leucemia Linfoblástica Aguda (Tesis Maestría). IPN, México D.F.

24) Lassaletta A. Leucemia Linfoblástica Aguda, Servicio Hemato-Oncología Hospital Pediátrico de Madrid, *Pediatría Integral* 2012, XVI (6):453-462.

25) Campbell, M; Ferreiro, C., Tordecilla, C., Joannon, S., Rizzardini, L., & Rodríguez, Z. Leucemia Linfoblástica Aguda, características al diagnóstico en 100 niños, *Revista Pediatría Chilena*, 2000, Vol.70, Núm.4. 288-293.

26) El Consejo, DSG, Institutos, L., y Salud, PSE Protocolo de la atención leucemia linfoblástica Para. Guía Clínica y Esquema de Tratamiento.

27) Lugo A, Análisis de perfiles de expresión génica en Leucemia Linfoblástica Aguda, 2008, Facultad de Medicina UANL, Tesis Doctoral.

28) Rio DC, Ares M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). Cold Spring Harbor Protocols, 2010(6).

29) Olarte-Carrillo, I; Expresión del gen de resistencia a multidrogas (MDR1) en pacientes con leucemia aguda mieloblastica, Revista HGM, 2010 vol.73, Num 04), 209-267.

30) Aldona- A, Truncation of Histone H2A's C-terminal Tail as is typical for Ni(II) Assisted specific peptide bond hydrolysis has Gene expression altering effects, Annals of Clinical & Laboratory Science 2009, 39(3):251-262.

31) Spector, DL; Goldman RD; 'Transfection of Mammalian Cells with Fluorescent Protein Fusions', (Nueva York EEUU: Cold Spring Harbor Protocols, (2010), 1;(2)11, pdb-prot5517.

32) Johnson, G., Nour, A. A., Nolan, T., Huggett, J., & Bustin, S. (2014). Minimum information necessary for quantitative real-time PCR experiments. In Quantitative Real-Time PCR (pp. 5-17). Springer New York.

33) Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. Nature protocols, 3(6), 1101-1108.

34) Patino Lopez, G., Ostap, E. M., & Shaw, S. (2009). Myosin 1G is a hematopoietic-restricted protein highly enriched in lymphocyte plasma membrane/microvilli whose deficiency impairs lymphocyte activation. The Journal of Immunology, 182(Meeting Abstracts 1), 35-40.

35) Miale J, (1995) Hematología Medicina de Laboratorio, ed. Reverte, ISBN 978842915550.

36) Arrevillaga Domínguez S, (2005). Caracterización del gen MDR1 en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda. Tesis Doctoral.

37) García Bernal M, Serra Badell I, (2012). Leucemia en la Infancia signo de alertas, Asociación Española Pediátrica, 10(1):1-7.

38) Arvelo F, France-Puppon M, (2001). Aspectos Moleculares y Celulares de la Metástasis Cancerosa, Facultad de Ciencias, Acta Científica Venezolana, Caracas Venezuela, 52(4):304-312.

39) Román Curto C, (1999), On the metastatic process. I: the local invasion of extracellular matrix, *Salamanca*, 90:143-155.

40) Dorantes Acosta E, Medina Sanson A, (2007), Protocolo de tratamiento con el esquema NOPHO-AML93 modificado en pacientes pediátricos del HIMFG con leucemia mieloide aguda, *Boletín Informativo Hospital Infantil de México "Federico Gómez"*.