



**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD IZTAPALAPA  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRIA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EXPRESIÓN DE RUNX1 EN CÉLULAS DE PACIENTES  
PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA**

**T E S I S**

para obtener el grado de Maestra en Biología Experimental

Presenta:

**Q.C. ORETH MONTERO RUIZ**

**Comité Tutorial**

**Dr. José Miguel Betancourt Rule (Co-Director)**

**Dra. Patricia Pérez Vera (Co- Directora)**

**Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza (Asesor)**

*México, D.F.*

*25 de julio de 2008*

## **COMITÉ TUTORAL**

### **CO-DIRECTORES**

- Dr. José Miguel Betancourt Rule.

Laboratorio de Biología Celular. Departamento de Ciencias de la Salud.  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud. UAM-Iztapalapa.  
bet@xanum.uam.mx

- Dra. Patricia Pérez Vera

Laboratorio de Cultivo de Tejidos, Departamento de Inv. en Genética  
Humana. Instituto Nacional de Pediatría. pperezvera@yahoo.com

### **ASESOR**

- Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza

Laboratorio de Biología Molecular. Departamento de Inv. en Genética  
Humana. Instituto Nacional de Pediatría. malcantaraortigoza@yahoo.com.mx

## **MIEMBROS DEL JURADO**

- Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Laboratorio de Endocrinología Molecular (S-229). Departamento de Biología  
de la Reproducción, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, UAM-  
Iztapalapa, pgdm@xanum.uam.mx y pdmatsumura@yahoo.com.mx

- Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza

- M. en C. Bertha Molina Alvarez

Laboratorio de Citogenética, Departamento de Inv. En Genética Humana.  
Instituto Nacional de Pediatría. [bertha\\_molina@yahoo.com.mx](mailto:bertha_molina@yahoo.com.mx)

- Dr. Isabel Enrique Miranda Peralta

Laboratorio de Biología Molecular del servicio de Hematología . Hospital  
General de México. pmiranda@servidor.unam.mx

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por lo apoyos obtenidos al posgrado (Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, con el número de registro 309-0, y actualmente se encuentra dentro del padrón de programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

A CONACYT por el apoyo proporcionado a través de una beca con número de registro 198503.

Este proyecto se realizó parcialmente con el “Apoyo complementario a investigadores en proceso de consolidación” num. 52536,

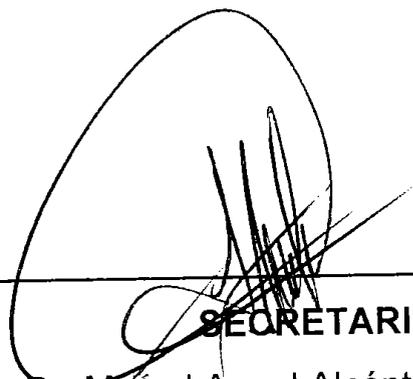
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada (Expresión de *RUNX1* en células de pacientes pediátricos con leucemia aguda linfoblástica) con fecha 25 de julio de 2008.



---

**PRESIDENTE**

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura



---

**SECRETARIO**

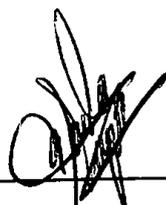
Dr. Miguel Angel Alcántara Ortigoza



---

**VOCAL**

M. en C. Bertha Molina Alvarez



---

**VOCAL**

Dr. Isabel Enrique Miranda Peralta

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Cultivo de Tejidos y laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud.

## **AGRADECIMIENTOS**

A CONACYT por lo apoyos obtenidos al posgrado (Maestría en Biología Experimental, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, con el número de registro 309-0, y actualmente se encuentra dentro del patrón de programas del PIFOP-CONACyT clave C/PFPN-2002-35-32.

A CONACYT por el apoyo proporcionado a través de una beca con número de registro 198503.

Este proyecto se realizó parcialmente con el "Apoyo complementario a investigadores en proceso de consolidación" num. 52536,

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis co-directores de tesis, el Dr. Miguel Betancourt y la Dra. Patricia Pérez Vera por su apoyo, sus enseñanzas, su experiencia y su amistad.

A mi asesor, el Dr. Miguel Angel Alcántara por la dedicación y la paciencia para enseñarme y a la Dra. Ariadna González Del Angel Jefa del laboratorio de Biología Molecular por permitir realizar parte del proyecto con su grupo de trabajo.

Al Dr. Pablo D. Matzumura, por apoyarme en toda la maestría

A Silvia y Vicente (mis padres), por todo el apoyo que siempre me han demostrado, especialmente en estos últimos 10 años.

A Carlos por compartir su vida conmigo. Gracias porque hemos estado juntos también en nuestra vida profesional, me has dado un apoyo incondicional y me has dado la fuerza para continuar en este camino.

A Edson mi hermano, Samadhi mi cuñada y mis sobrinos Bruno y Diego, por su cariño.

A mis amigos del laboratorio de cultivo de tejidos Alex, Chelo, Chio, JC, Paty, Robertito y Vero, gracias por hacerme sonreír en el laboratorio.

A mis compañeros de maestría (Luis, Nadia, Karla, Martha, Gerardo, Gloria y Mario), por todos esos momentos de felicidad, porque somos una generación muy unida.

A las familias Todd y Quiñones por estar siempre pendiente de nuestras metas y nuestros logros.

A todos mis amigos, por su amistad, por darme ánimos en aquellos momentos que fueron difíciles. *A MRGyV, GRACIAS*

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	1
ABREVIATURAS.....	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
1.- INTRODUCCIÓN.....	10
1.1.- Epidemiología.....	10
1.2.- Diagnóstico por inmunofenotipo. ....	11
1.3.- Alteraciones genéticas en leucemia. ....	12
1.4.- El gen <i>RUNX1</i> . ....	14
1.5.- Isoformas de la proteína RUNX1. ....	18
1.6.- Papel de la dosis génica del gen <i>RUNX1</i> en Leucemia aguda linfoblástica (LAL).....	21
1.7.- Estudios de <i>RUNX1</i> en LAL. ....	22
2.- JUSTIFICACIÓN.. ....	25
3.- OBJETIVO GENERAL.. ....	26
4.- OBJETIVOS PARTICULARES. ....	26
5.- HIPÓTESIS. ....	26
6.- DISEÑO DEL ESTUDIO	
6.1.- Estrategia general. ....	27
6.2.- Población de estudio. ....	28
6.3.- Criterios de inclusión. ....	28
6.4.- Criterios de exclusión. ....	28

6.5.- Grupo comparativo.....	29
6.6.- Consideraciones éticas. ....	29
6.7.- Obtención y procesamiento de las muestras de médula ósea.....	30
6.8.- Análisis citogenético con bandas GTW.....	30
6.9.- Estudio del gen <i>RUNX1</i> por FISH.....	31
6.10.- Caracterización de las isoformas de <i>RUNX1</i> por RT-PCR.....	31
6.11.- Caracterización de las variantes de las isoformas de <i>RUNX1</i> por secuenciación.....	33
6.12.- Grupo comparativo.....	34
6.13.- Análisis de resultados.....	35
<b>7.- RESULTADOS</b>	
7.1.- Población de estudio. ....	36
7.2.- Determinación de alteraciones por citogenética convencional y alteraciones del gen <i>RUNX1</i> por FISH.....	37
7.3.- Análisis de expresión de las isoformas de <i>RUNX1</i> .....	38
7.4.- Caracterización de las variantes de las isoformas de <i>RUNX1</i> por secuenciación.....	42
7.5.- Análisis de expresión de las isoformas de <i>RUNX1</i> en linfocitos del grupo comparativo.....	45
7.6.- Perfil de expresión de las isoformas de <i>RUNX1</i> en pacientes con LAL....	48
7.7.- Análisis estadístico.....	49
<b>8.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>50</b>
<b>9.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>59</b>

10.- PERSPECTIVAS.....	60
11.- ANEXOS	
ANEXO 1.- Hoja de captación de datos.....	61
ANEXO 2.- Carta de consentimiento informado.....	62
ANEXO 3.- Método criopreservación de muestras de médula ósea.....	63
ANEXO 4.- Estudio citogenético convencional con bandas GTW.....	65
ANEXO 5.- Estudio del gen <i>RUNX1</i> por FISH.....	69
ANEXO 6.- Estudio de expresión de isoformas <i>RUNX1</i> por RT-PCR.....	73
ANEXO 7.- Separación de linfocitos de sangre periférica.....	78
ANEXO 8.- Características clínicas de los 30 pacientes con LAL.....	79
ANEXO 9.- Marcadores de inmunofenotipo al diagnóstico de los pacientes con LAL.....	80
ANEXO 10.- Resultados de cariotipo y FISH.....	81
12.- REFERENCIAS.....	83

## ABREVIATURAS

<i>AML1</i>	En cursiva representa al gen <i>AML1</i> , (del inglés “acute myeloid leukemia”)
AML1a	Isoforma A del gen <i>AML1</i>
AML1b	Isoforma B del gen <i>AML1</i>
AML1c	Isoforma C del gen <i>AML1</i>
BLK	Tirosina-cinasa de células B
CBF	Del inglés “Core binding factor”
CD	Del inglés “Cluster designation”
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ETV6	Del inglés “ETS variant gene 6”
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GTW	Giemsa Tripsina Wrigth
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ISCN	Del inglés “International System for Human Cytogenetic Nomenclature”
LAL	Leucemia aguda linfoblástica
LAM	Leucemia aguda mieloblástica
MPO	Mieloperoxidasa
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
RAR $\alpha$	Receptor de ácido retinoico $\alpha$
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Acido Ribonucleico mensajero
RT-PCR	Transcripción reversa- Reacción de la polimerasa en cadena.
<i>RUNX1</i>	En cursivas representa al gen <i>RUNX1</i> (del inglés “Runt-

	related protein 1”) también llamado <i>AML1</i> .
RUNX1	Representa a la proteína RUNX1
t	Translocación
TBE	Tris base-ácido Bórico-EDTA
TCR	Receptor de células T

## RESUMEN

**Introducción:** La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es el padecimiento maligno más frecuente en pediatría. *RUNX1* (también llamado *AML1*) es uno de los genes que se alteran con mayor frecuencia en esta enfermedad. Se localiza en 21q22.12 y codifica para un factor de transcripción que regula genes que participan en la hematopoyesis. Se han descrito cuatro isoformas de la proteína *RUNX1*: *AML1a* (250 aa.), *AML1b* (453 aa.), *AML1c* (480 aa.) y *AML1-ΔN* (348 aa). Las isoformas de *RUNX1* son factores de transcripción clave en la hematopoyesis normal y anormal, ya que promueven diferencialmente la transcripción de sus genes subordinados involucrados en este proceso. El análisis de expresión de dichas isoformas en blastos de pacientes pediátricos con LAL, ha revelado datos controvertidos. Un primer estudio mostró alta expresión de las isoformas *AML1b* y *c*, en contraste, un estudio independiente determinó que la isoforma *AML1a* se expresa de forma preponderante en esta enfermedad. Hasta el momento, no se ha encontrado expresada una isoforma en particular que se relacione con la LAL.

**Objetivo:** Determinar la expresión diferencial de los RNAm de las isoformas *AML1a*, *AML1b* y *AML1c*, y su correlación con las alteraciones del gen *RUNX1* en células de médula ósea de pacientes pediátricos con LAL.

**Metodología:** Se analizaron muestras de médula ósea de 30 pacientes pediátricos con LAL por medio de citogenética convencional con bandas GTW. Los resultados se complementaron con el método de FISH con las sondas de DNA para los genes *ETV6*(12p13) y *RUNX1* (21q22.3). A partir de las mismas muestras criopreservadas, se analizó la expresión del RNAm de las isoformas *AML1a*, *b* y *c* por RT-PCR, se utilizó el gen *RARα* (Receptor de ácido retinóico α) como control de la reacción. Como grupo comparativo se analizaron linfocitos de sangre periférica de 10 personas sanas.

**Resultados y discusión:** El cariotipo se obtuvo en 26 de los 30 pacientes analizados, ya que en 4 hubo falla en la obtención de cromosomas. Cuatro pacientes presentaron cariotipo normal y en 22 se observaron alteraciones como hiperdiploidías, translocaciones asociadas con LAL como la t(1;19)(q23;p13) y la t(4;11)(q21;q23), alteraciones del cromosoma 21 y rearrreglos no recurrentes. El estudio de FISH mostró alteraciones en *RUNX1* en 14/30 pacientes: 10 pacientes presentaron incremento en el número de copias (3 a 5 copias extra, producidas por duplicaciones o hiperdiploidías); 4 con la t(12;21)(p13;q22). El estudio de expresión de las isoformas *AML1a*, *b* y *c* se realizó en las 30 muestras criopreservadas. Se analizaron los productos de la RT-PCR de las isoformas esperadas (*AML1a*=A1, *AML1b*=B y *AML1c*=C2) y adicionalmente se detectaron 2 variantes de la isoforma *AML1a* (A2 y A3) y 3 de *AML1c* (C1, C3 y C4). En los 30 pacientes se encontró la variante C4, 26 casos presentaron las variantes de C1 y C2, y 25 pacientes mostraron la variante C3. La variante A1 se presentó en 19 pacientes y las variantes A2 y A3 se observaron en 18 pacientes. La isoforma *AML1b* se presentó en 9

pacientes. Con respecto a los linfocitos del grupo comparativo, todos presentaron la isoforma AML1c y sus variantes. Se caracterizaron por secuenciación automática las isoformas A, B y C, y los productos de las variantes A2, A3 y C4. Se determinó que la variante A2 carece de un fragmento de 65 pb (51pb de la región 3' del exón 6 y 14pb del extremo 5' del exón 7A); La variante A3 no posee el exón 6 completo; Estas dos isoformas presentan cambio en el marco de lectura. Se determinó que la variante C4 carece de un fragmento de 208pb dentro del exón 1. No fue posible secuenciar las variantes C1 y C3 debido a su bajo nivel de expresión. Todos los pacientes mostraron combinaciones en la expresión de las diversas isoformas y la B fue la única que se expresó de forma exclusiva en los pacientes.

**Conclusiones:** En el presente trabajo se demuestra que: a) No hay asociación entre la expresión de una o varias isoformas con la presencia de alteraciones cromosómicas específicas. b) En los blastos de pacientes con LAL no se presenta una isoforma en particular, ya que co-existen diferentes transcritos. c) La variante C4 de la isoforma AML1c, se presentó en todos los pacientes y en todos los controles. d) Se detectaron variantes no esperadas, de las cuales A3 y C4 ya han sido descritas, sin embargo, la variante A2 no se encuentra referida en la literatura.

**Perspectivas:** Se caracterizará la presencia de las isoformas proteicas de RUNX1 para corroborar la traducción de los RNAm analizados y se estudiará la expresión de un gen subordinado de RUNX1 en los pacientes con LAL.

## ABSTRACT

**Introduction:** The acute lymphoblastic leukaemia (ALL) is the most common haematological malignancy in childhood. The *RUNX1* gene (also named *AML1*), is frequently altered in different leukaemias, is located in 21q22.12 and encodes a haematopoiesis transcription factor. This gene produces four protein isoforms: AML1a (250 aa.), AML1b (453 aa.), AML1c (480 aa.) y AML1-ΔN (348 aa). The RUNX1 isoforms are important transcription factors in normal and abnormal haematopoiesis, promoting differential transcription of their subordinate genes, which are involved in these processes. The results obtained by the expression analyses of AML1 isoforms in cells of children with ALL, are controversial. One study showed a higher expression of the AML1b and AML1c isoforms. Other study showed that AML1a is the prevailing isoform in this disease. To date, it has not been found a specific isoform expression in ALL.

**Objective:** The aim of this study was to establish the differential expression of AML1a, b and c mRNA isoforms, and its relationship with the chromosome abnormalities of the ALL patients.

**Methods:** Bone marrow samples were obtained from 30 pediatric patients diagnosed with ALL. FISH analysis using dual colour DNA probes to detect genes *ETV6* (12p13)/*RUNX1* (21q22.3) were performed. This analysis was complemented with conventional cytogenetic analysis with GTW banding. Cryopreserved samples were analysed for the mRNA expression of AML1a, b and c isoforms by RT-PCR, with the *RARα* gene as control. Ten healthy donors were included as comparative group.

**Results and discussion:** The karyotype was obtained in 26/30 patients. The results revealed four patients with normal karyotypes, and 22 patients presented abnormalities as hyperdiploidy, recurrent translocations as t(1;19)(q23;p13) and t(4;11)(q21;q23), abnormalities involving chromosome 21 and other non recurrent abnormalities. The FISH analysis showed the RUNX1 gene altered in 14/30 patients: 10 with increased copy number (3 to 5 extra copies, product of duplications or hyperdiploidy), and 4 with the t(12;21)(p13;q22). The expression analysis of AML1a, b and c isoforms were performed in the 30 cryopreserved samples. RT-PCR products revealed the presence of the follow isoforms: AML1a=A1, AML1b= B and AML1c=C2; additionally 2 variants of the AML1a (A2 and A3) and 3 of AML1c (C1, C3 and C4) isoforms were detected. The C4 variant was found in the 30 patients, 25 cases showed C1 and C2, and 25 patients showed the C3. The A1 variant was presented in 19 patients and the A2 and A3 were observed in 18 patients. The B isoform was found in 9 patients. All the lymphocyte samples from the comparative group presented the AML1c isoform and its variants. The PCR products of isoforms A, B, C, A2, A3 and C4 were characterized by automatic sequencing. The variant A2 showed a loss of 65 bp (51 bp in the position 3' of the exon 6 and 14 bp in the 5' of the exon 7A); The A3 variant lost all the exon 6. These two isoforms showed a frameshift. The C4 variant presented a 208 bp

deletion inside exon 1. The C1 and C3 variants sequentation was not possible due to low expression. All patients showed different combinations of the diverse isoforms expression. The B isoform was only present in the patients.

**Conclusion:** In this work: a) Not association between isoforms expression and specific chromosomal rearrangements was found, b) the leukemic cells did not present a particular isoform, instead of they express a combination of different transcripts and, c) The C4 variant is present in all the patients and controls, d) Variants A3 and C4 were observed by first time in ALL, and a non reported isoform (A2) was identified.

**Perspectives:** Further studies should be conducted to characterize the isoforms of RUNX1 at the protein level. Additionally, the expression analysis of a gene regulated by RUNX1 in the ALL patients will be performed. To know if the isoforms are capable to enhance the expression of their subordinated genes, an appropriate expression analysis must be performed.

## **1.- INTRODUCCIÓN**

Las leucemias son un grupo heterogéneo de padecimientos que se caracterizan por la proliferación desordenada de células hematopoyéticas inmaduras, las cuales se acumulan en la médula ósea y en la sangre, lo que desplaza a los elementos celulares normales. La falla de los mecanismos de un control negativo del crecimiento clonal casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a una sobreproducción de células incapaces de madurar y funcionar normalmente (Head y Pui, 1999; Ruíz-Argüelles y McArthur, 2003).

### **1.1.- Epidemiología.**

La leucemia es el padecimiento maligno más frecuente en edad pediátrica a nivel mundial, conforma el 25% de todas las neoplasias malignas diagnosticadas entre los 0 y 18 años de edad. En México, su incidencia varía de tres a cinco casos por cada 100,000, es más común en el género masculino; el rango de edad de máxima frecuencia se encuentra entre los 2 y los 5 años de edad (Rivera-Luna, 2006).

Las leucemias agudas se presentan principalmente en niños, el subtipo más común es la leucemia aguda linfoblástica (LAL), también llamada linfocítica o linfoide que se presenta del 75% al 80% de todos los casos de infantes con

leucemia. Por otro lado, la leucemia aguda mieloblástica (LAM), también llamada mielocítica, mielógena o no linfoblástica, comprende aproximadamente el 20% y, por último, la leucemia mieloide crónica se presenta en el 2% de los casos. (Head y Pui, 1999).

Los pacientes que sufren leucemias agudas presentan palidez, taquicardia, debilidad y fatiga, debido a la anemia; petequias u otras manifestaciones hemorrágicas que se le atribuye a trombocitopenia; complicaciones infecciosas debido a la neutropenia. Los signos clínicos directamente relacionados con la infiltración de blastos leucémicos en órganos son: linfadenopatías, esplenomegalia y hepatomegalia. (Hoelzer y Gökbuget, 2005).

### **1.2.- Diagnóstico por inmunofenotipo.**

El tipo de células hematopoyéticas así como su estado de maduración, se determinan por el análisis de patrones de expresión de antígenos específicos y por el uso de otras técnicas, como la citometría de flujo. Este último tiene la ventaja de medir cuantitativamente la expresión de estos antígenos y realiza análisis rápidos de decenas de miles de células. En la Tabla 1 se presentan los principales antígenos utilizados como marcadores o CD (del inglés “cluster designation”) útiles en la clasificación de las LAL, en los subtipos precursores de células B y de células T.

Tabla 1.- Marcadores específicos de subtipos de la LAL.

TIPO CELULAR	EXPRESIÓN DE ANTIGENO
CELULAS B	CD79a <sup>+</sup> ó CD22 <sup>+</sup> citoplásmico
Pre-B temprana	CD19 <sup>+</sup> , CD22 <sup>+</sup> , cIG $\mu$ <sup>-</sup> , sIG <sup>-</sup>
Pre-B	cIG $\mu$ <sup>+</sup>
Pre-B transicional	cIG $\mu$ <sup>+</sup> , sIG <sup>+</sup> , sIG $\kappa$ <sup>-</sup> , sIG $\lambda$ <sup>-</sup> .
Célula B	sIG <sup>+</sup> , sIG $\kappa$ <sup>+</sup> ó sIG $\lambda$ <sup>+</sup> .
CELULAS T	CD3 <sup>+</sup> citoplásmico
Pro-T	CD7 <sup>+</sup>
Pre-T	CD7 <sup>+</sup> , CD2 <sup>+</sup> y/o CD5 <sup>+</sup>
T-cortical	CD1a <sup>+</sup>
T-madura	CD3 <sup>+</sup>

cIG.- inmunoglobulina citoplásmica; sIG.- inmunoglobulina de superficie,  $\mu$ .- proteína de cadena pesada mu;  $\kappa$ .- proteína de cadena ligera kappa;  $\lambda$ .- proteína de cadena ligera lambda; a.- expresión de antígeno de superficie, (Head y Pui, 1999).

### 1.3.- Alteraciones genéticas en leucemia.

El análisis citogenético ha permitido conocer las alteraciones del número y estructura cromosómicas presentes en las leucemias, como por ejemplo las translocaciones, a partir de las cuales se han identificado genes involucrados directamente con esta enfermedad. Los genes alterados actúan en una red funcional, donde los productos génicos son: factores de crecimiento, factores de transcripción, enzimas con actividad tirosina-quinasas que participan en vías

de transducción de señales y moléculas que remodelan la estructura de la cromatina, regulando el proceso de transcripción (Pérez-Vera y Montero-Ruiz, 2006).

Un gen que se altera con frecuencia en diferentes tipos de leucemia es *RUNX1* (del inglés “Runt-related protein 1”), también llamado *AML1* (del inglés “acute myeloid leukemia 1”), *CBF $\alpha$*  (del inglés “core-binding factor  $\alpha$ ”), o *PEBP2 $\alpha\beta$*  (del inglés “polyoma virus enhancer-binding protein 2 $\alpha\beta$ ”). Este gen se involucra en translocaciones cromosómicas que originan fusiones génicas, las cuales a su vez producen proteínas quiméricas. Algunas de estas fusiones son *RUNX1/ETO* de la t(8;21), *RUNX1/EVI1*, *RUNX1/MDS1* y *RUNX1/EAP* producidas en la t(3;21) y *ETV6/RUNX1* originada a través de la t(12;21) (Penther *et al*, 2002).

*RUNX1* también presenta amplificaciones génicas, lo que genera un incremento en el número de copias; puede presentar mutaciones puntuales que originan productos no funcionales en diversas leucemias. En particular, el incremento en el número de copias de *RUNX1* se ha identificado en LAL, y con menor frecuencia en LAM. El incremento de las copias de *RUNX1* se puede generar a través de diversos eventos como las duplicaciones en tandem, el isocromosoma 21q, los anillos del cromosoma 21, las translocaciones desbalanceadas en las que participa la banda 21q22.12 y que generan trisomías parciales o por alteraciones numéricas como las polisomías del cromosoma 21, que son frecuentes en la LAL. En el 25% de los pacientes con

LAL se han presentado hiperdiploidías, donde el cromosoma 21 es el más involucrado en esta alteración. En cuanto a las mutaciones puntuales en el gen, éstas se han observado en LAM, pero no en LAL. (Raimondi *et al*, 1991; Berger, 1997; Rowley, 1999; Roumier *et al*, 2003).

#### **1.4.- El Gen *RUNX1***

El gen *RUNX1*, se localiza en la banda cromosómica 21q22.12 y codifica para un factor de transcripción específico que regula la expresión de una gran cantidad de genes que participan en la hematopoyesis (Tabla 2), como el factor estimulante de colonias de granulocitos (GM-CSF), la mieloperoxidasa (MPO), la interleucina 3 (IL3) y la integrina CD11a/CD18, entre otros (Roumier *et al*, 2003).

El gen *RUNX1* presenta 10 exones (1-6, 7A, 7B, 7C y 8) y dos promotores localizados en los exones 1 y 3, a partir de los cuales se pueden producir varias isoformas (Levanon *et al*, 2001). *RUNX1* codifica una proteína (Fig. 1) que consta de: a) un dominio de regulación negativa de la unión del dominio Runt con el DNA (NRDBn) y una región de regulación negativa de la heterodimerización del dominio de Runt (NRHn), ambas regiones reguladoras se ubican en el extremo N-terminal (residuos 1-49 aa.); b) un dominio de unión al DNA denominado Runt (residuos 50-177 aa.); c) un dominio de regulación negativa de la unión al DNA en la región C-terminal (NRDBc), (residuos 184-

291 aa.) y d) un dominio de activación de la transcripción (residuos 291-453 aa.) (Ito, 1999).

<b>Gen</b>	<b>Expresado en:</b>
Línea germinal IgA1	Linfocitos B
Tirosina-cinasa de células B (BLK)	Linfocitos B
Receptor de células T (TCR)	Linfocitos T
IL-3	Linfocitos T
Granenzima B	Linfocitos T
CD8	Linfocitos T
GM-CSF	Linfocitos T

Tabla 2. Genes blanco de la proteína RUNX1 en tejido linfoide.

(Otto *et al*, 2003)

RUNX1 forma parte de un complejo transcripcional heterodimérico conocido como factor de unión al promotor (“core binding factor” CBF), que consiste de las subunidades RUNX1 (o CBF $\alpha$ ) que confiere la unión al DNA, y la subunidad que no se une al DNA directamente, el CBF $\beta$ .

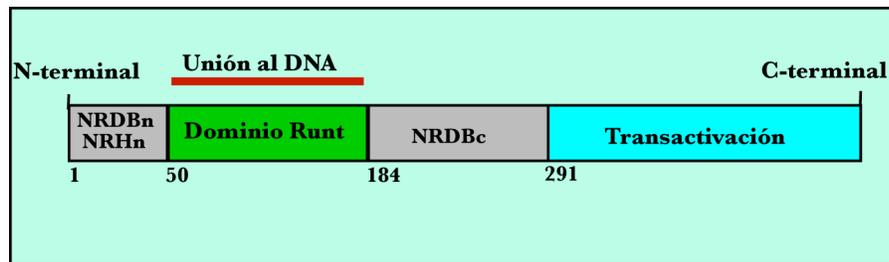


Fig. 1.- Dominios funcionales de la proteína RUNX1.

El dominio de Runt, presente en la subunidad RUNX1, recibe este nombre por la homología que tiene con el dominio Runt de la *Drosophila melanogaster* que está involucrado en la segmentación, la determinación de sexo y el desarrollo neuronal. En humanos, este dominio consta de 128 aminoácidos codificados por los exones 3 al 5 y es importante para la regulación de la transcripción ya que es el sitio a través del cual se une con la proteína CBF- $\beta$  que, a su vez, provoca un cambio conformacional del dominio Runt que le permite reconocer la secuencia consenso TGT/cGGT y unirse al surco mayor del DNA con gran afinidad (Fig. 2). (Warren *et al*, 2000).

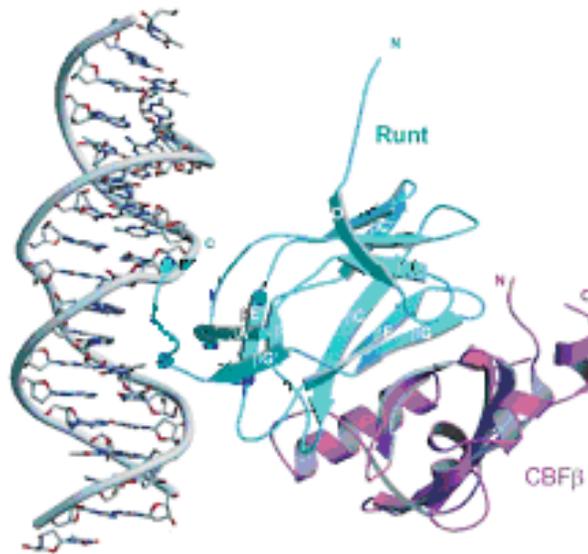


Fig.2. Dominio Runt de la subunidad Runx1 formando un heterodímero con CBF $\beta$ , y la unión con el DNA (Warren *et al.* 2000).

El dímero formado por CBF $\beta$  y RUNX1 actúa como un activador de la transcripción (Fig. 3A), para lo cual se une a varios cofactores como p300 y CBP (del inglés “core binding protein”) que facilitan, por acetilación de histonas, el desenrollamiento de la cromatina y, en consecuencia, el acceso libre al elemento promotor de los genes blanco. El complejo también puede actuar como represor transcripcional (Fig. 3B), cuando se une a co-represores como mSin3A, Ear-2, (es un receptor nuclear huérfano), TLE (del inglés “transducin-like enhancer of split”), o a desacetilasas de histonas (HDACs) (Kurokawa y Hirai, 2003).

### **1.5.- Isoformas de la proteína RUNX1.**

A la fecha se han descrito cuatro isoformas de la proteína RUNX1 denominada AML1a (250 aa.), AML1b (453 aa.), AML1c (480 aa.) y AML1- $\Delta$ N (348 aa) (Fig. 4), las 3 primeras presentan el dominio Runt (Miyoshi et al, 1995), mientras que la cuarta es una forma truncada. La proporción de los transcritos AML1b y AML1c es más alta en el timo y el bazo que en otros tejidos. La isoforma AML1b funciona como un activador de la transcripción, al igual que la isoforma AML1c, la cual varía con respecto a la AML1b sólo en 32 aminoácidos del dominio de activación de la transcripción en el extremo N-terminal, por lo que no tiene una característica funcional diferente.

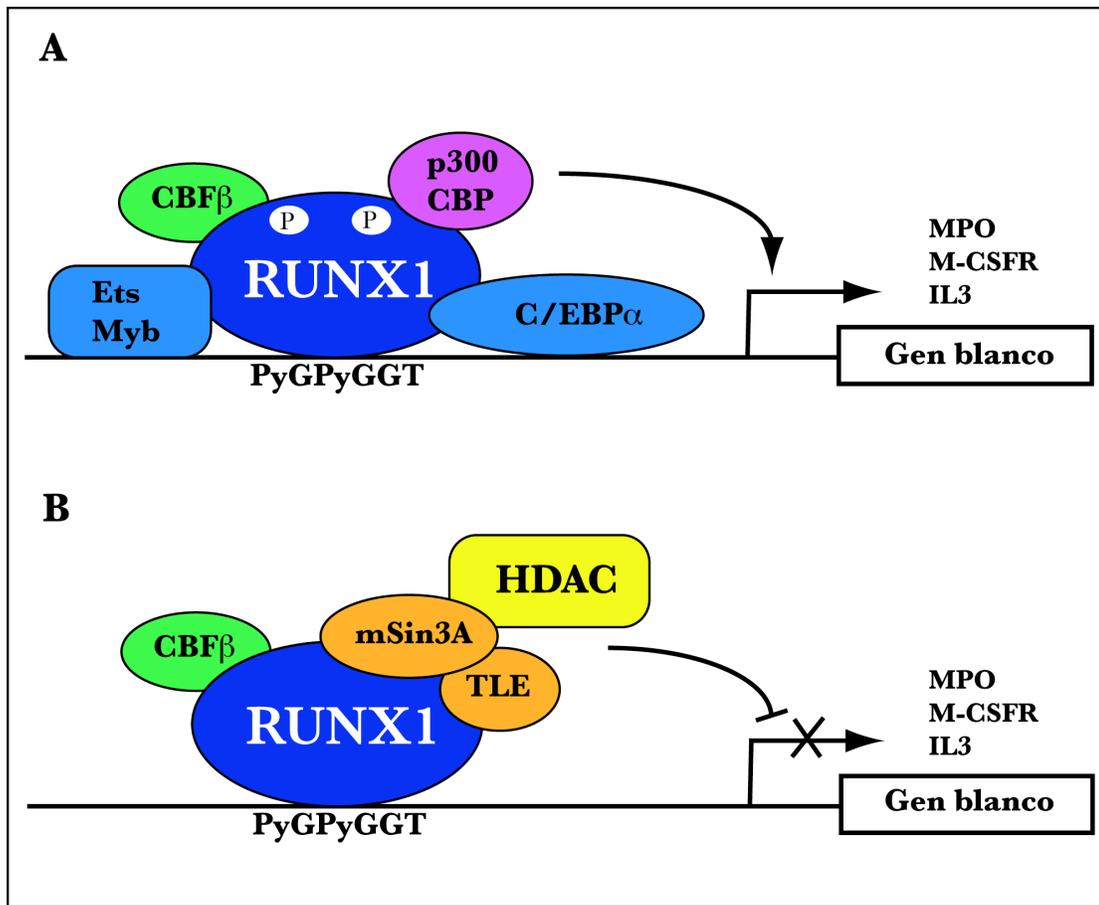


Fig. 3. El CBF $\beta$  forma el heterodímero con RUNX1 y permite su unión con el DNA (secuencia consenso PyGPyGGT; donde Py= pirimidina), a nivel del promotor de los genes blanco. A) Función de activación de la transcripción, por la unión de proteínas coactivadoras (Ets, Myb, p300, CBP o C/EBP $\alpha$ ), B) Función de represión de la transcripción, por la unión de las proteínas corepresoras mSin3A, HDAC o TLE (Kurokawa y Hirai, 2003).

La isoforma AML1a tiene actividad transcripcional limitada debido a que no presenta el dominio de activación de la transcripción, sin embargo, tiene gran afinidad por el DNA debido a que presenta el dominio de Runt, por lo que tiene la capacidad de suprimir la transcripción inducida por AML1b al competir con

éste por la unión al DNA (Bae *et al*, 1994; Tanaka *et al*, 1995). Se ha reportado que entre las isoformas existe antagonismo funcional, por ejemplo, AML1b puede liberar a las células mieloides del bloqueo de diferenciación mediado por AML1a (Tanaka *et al*, 1995).

La última isoforma identificada es la AML1-ΔN, la cual pierde una parte del dominio de Runt y, por lo tanto, no se une al DNA ni forma el heterodímero con CBF-β. Esta fue descubierta en 1997 en una línea celular de origen mieloides de ratón y se ha demostrado que bloquea la diferenciación granulocítica (Zhang *et al*, 1997).

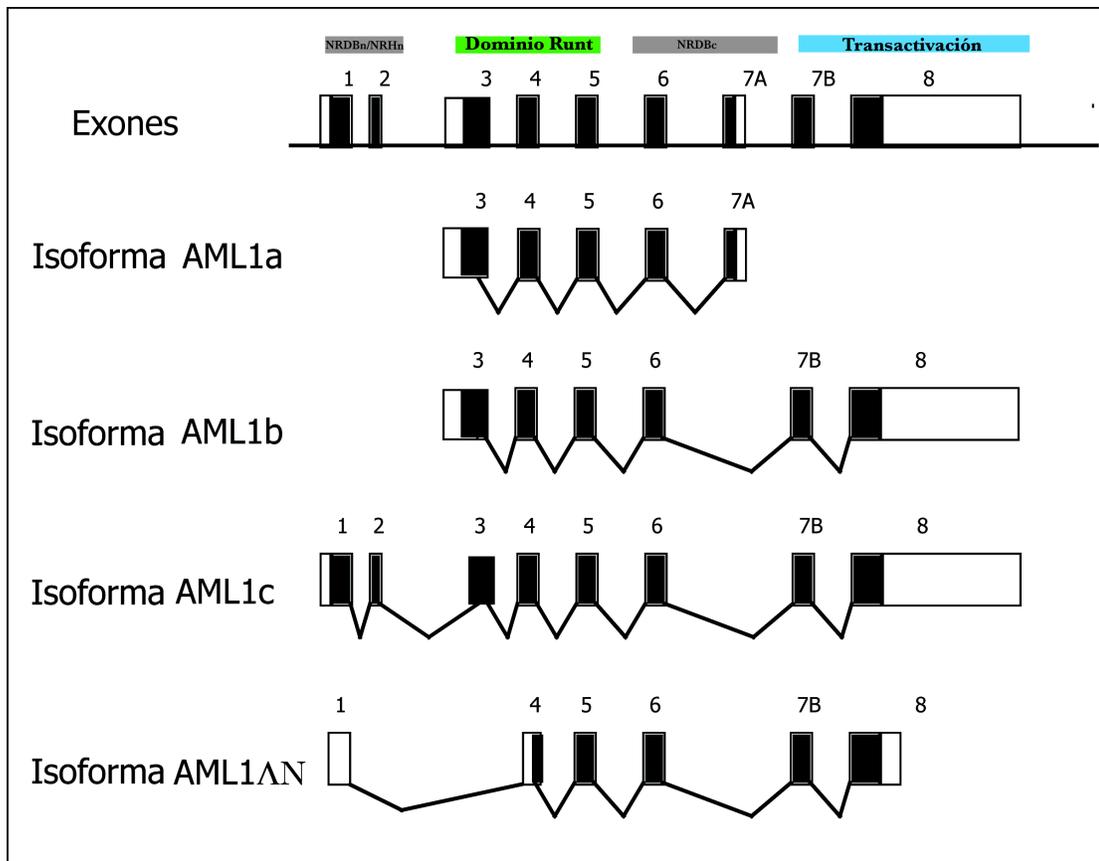


Fig. 4. Isoformas de *RUNX1*. (Zhang *et al*, 1997).

Se ha determinado que las isoformas inducen selectivamente la expresión de moléculas que participan en la progresión tumoral. En un estudio se observó que las células de mieloma múltiple expresan preferentemente la isoforma AML1a, mientras que su contraparte normal expresa la isoforma AML1b. La isoforma AML1a es un inductor específico del gen que codifica para la proteína MIP1a (macrophage inflammatory protein 1a), que es una citocina promotora de la proliferación celular y confiere pronóstico adverso a los pacientes con esta enfermedad (Choi *et al*, 2003).

#### **1.6.- Papel de la dosis génica del gen *RUNX1* en LAL.**

Existen reportes que sugieren que los niveles de expresión de *RUNX1* son críticos para la diferenciación hematopoyética y que la sobre-expresión o la haploinsuficiencia pueden afectar su fenotipo celular, así como contribuir en la etiología de las leucemias humanas.

Se ha propuesto que una copia extra de *RUNX1* en el cromosoma 21 es la responsable de que los pacientes con síndrome de Down presenten un riesgo incrementado para desarrollar leucemia, ya que la banda 21q22 es la región crítica que causa este síndrome y contiene el locus *RUNX1*. El 10% de los niños con síndrome de Down desarrollan un estado transitorio de mielopoyesis anormal y subsecuentemente leucemia megacarioblástica aguda (Dufresne-Zacharia *et al*, 1994; Antonarakis, 1998; Reeves *et al*, 2001; Gurbuxani *et al*,

2004). En el caso de la LAL, se presenta en el 1.7 al 2.1% de los niños con síndrome de Down, lo cual corresponde a una probabilidad de 14 veces mayor que la población general (Hunter, 2005).

Por otro lado, la haploinsuficiencia de *RUNX1* provoca la enfermedad de plaquetas familiar, que se ha asociado con una predisposición a desarrollar LAM (Song *et al*, 1999), lo que implica que la función de *RUNX1* es sensible a la dosis del gen.

Estos hallazgos sugieren la hipótesis de que el incremento en la dosis génica de *RUNX1* juega un papel en el desarrollo de la leucemia, tanto en linaje mielóide como linfóide (Yabagida *et al*, 2005).

### **1.7.- Estudios de *RUNX1* en LAL.**

En 71 pacientes pediátricos con LAL diagnosticados en el Instituto Nacional de Pediatría (México), se llevó a cabo el estudio de citogenética convencional e hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), usando las sondas específicas para los genes *ETV6* (12p13) y *RUNX1* (21q22). Con estas sondas es posible detectar la t(12;21)(p13;q22), que se considera como la alteración estructural más frecuente en la LAL. Cuando esta translocación ocurre se fusionan los genes *ETV6* y *RUNX1* produciendo una proteína quimérica que aunque *RUNX1* conserva la capacidad de unión al DNA, no permite la unión a factores de transcripción y en consecuencia no se transcriben los genes subordinados que se requieren para la linfopoyesis normal. En el estudio se detectó la

presencia de alteraciones como la fusión génica *ETV6/RUNX1* en un 8.5%; también se observó incremento en el número de copias del gen *RUNX1* en el 29.5% de los pacientes, en el 19.7% de los casos correspondieron a polisomias 21 no constitutivas y en el 9.8% se asociaron a la presencia de duplicaciones en tandem de *RUNX1* (Pérez-Vera *et al*, 2005). Estos resultados indican que hasta en el 38% de los pacientes se presentan alteraciones en el cromosoma 21 y que algunas de éstas pueden amplificar al gen *RUNX1*, tanto en alteraciones estructurales como en ganancia del número de copias.

Por otra parte, con base en la hipótesis de la dosis génica, Mikhail y colaboradores (2002) estudiaron la expresión de *RUNX1* en un grupo de 41 pacientes pediátricos egipcios con LAL, por medio de la técnica de PCR en tiempo real. Utilizaron una sonda que abarcó la zona del dominio de activación de la transcripción y evaluaron la expresión de las isoformas AML1b y AML1c en el mismo ensayo. Los resultados que obtuvieron mostraron que 18 de 41 niños (43.9%), la expresión de *RUNX1* fue significativamente mayor con respecto al grupo control. En la mayoría de los casos (90%) este resultado se relacionó con pacientes que presentaron polisomías del cromosoma 21 no constitutivas o duplicaciones en tandem de la banda 21q22 asociadas a la amplificación del gen *RUNX1*, que fueron identificadas por los estudios realizados con citogenética convencional con bandas GTW (bandas cromosómicas obtenidas por degradación con Tripsina y con tinción de Giemsa y Wright) y FISH; sin embargo, dos pacientes con sobre-expresión de *RUNX1* (10% de los casos) no presentaron alteraciones cromosómicas (Mikhail *et al*,

2002). Esta situación puede tener diversos orígenes, como son la presencia de alteraciones en el promotor del gen *RUNX1*, el efecto de genes moduladores sobre la expresión de *RUNX1* o debido a cambios epigenéticos.

En otro estudio realizado en población mexicana, se analizó la expresión de la isoforma AML1a (exones 5 y 7A) y el RNAm AML1 total en 16 pacientes con LAL, mediante la técnica de RT-PCR semi-cuantitativo. Se observó incremento en la expresión de la isoforma AML1a asociado con la presencia de alteraciones estructurales. Los autores sugieren que la presencia de la isoforma AML1a debe contribuir al establecimiento del fenotipo leucémico, sin embargo, su hallazgo contrasta con los resultados observados por Mikhail (Gutiérrez-Angulo *et al*, 2005).

En ambos estudios se emplearon métodos y diseños experimentales diferentes y, de igual forma, revelaron resultados contradictorios. Los trabajos descritos muestran que aún queda sin resolver, si el incremento en la dosis génica de *RUNX1* podría estar asociado con la expresión de alguna de sus isoformas o si éstas contribuyen a la regulación de la expresión de genes que promueven el desarrollo de la LAL.

## 2.- JUSTIFICACION

El incremento en el número de copias del gen *RUNX1* es un hallazgo frecuente en LAL, tan sólo en la población mexicana se han detectado alteraciones del gen en el 29.5% de los pacientes. Actualmente no existen estudios que analice la expresión de las diversas isoformas de *RUNX1* en pacientes con LAL y tampoco se conoce cómo puede influir esta alteración en el desarrollo de la enfermedad. Por lo anterior, en este estudio se determinó la expresión diferencial de las isoformas AML1a, AML1b y AML1c de *RUNX1*, lo cual contribuirá a conocer si su patrón de expresión es un factor que influye en la regulación de la expresión de genes que promueven el desarrollo de la LAL.

### **3.- OBJETIVO GENERAL**

Determinar la expresión diferencial de los RNAm de las isoformas AML1a, AML1b y AML1c, y correlacionarlas con las alteraciones del gen *RUNX1* en células de médula ósea de pacientes pediátricos con LAL.

### **4.- OBJETIVOS PARTICULARES.**

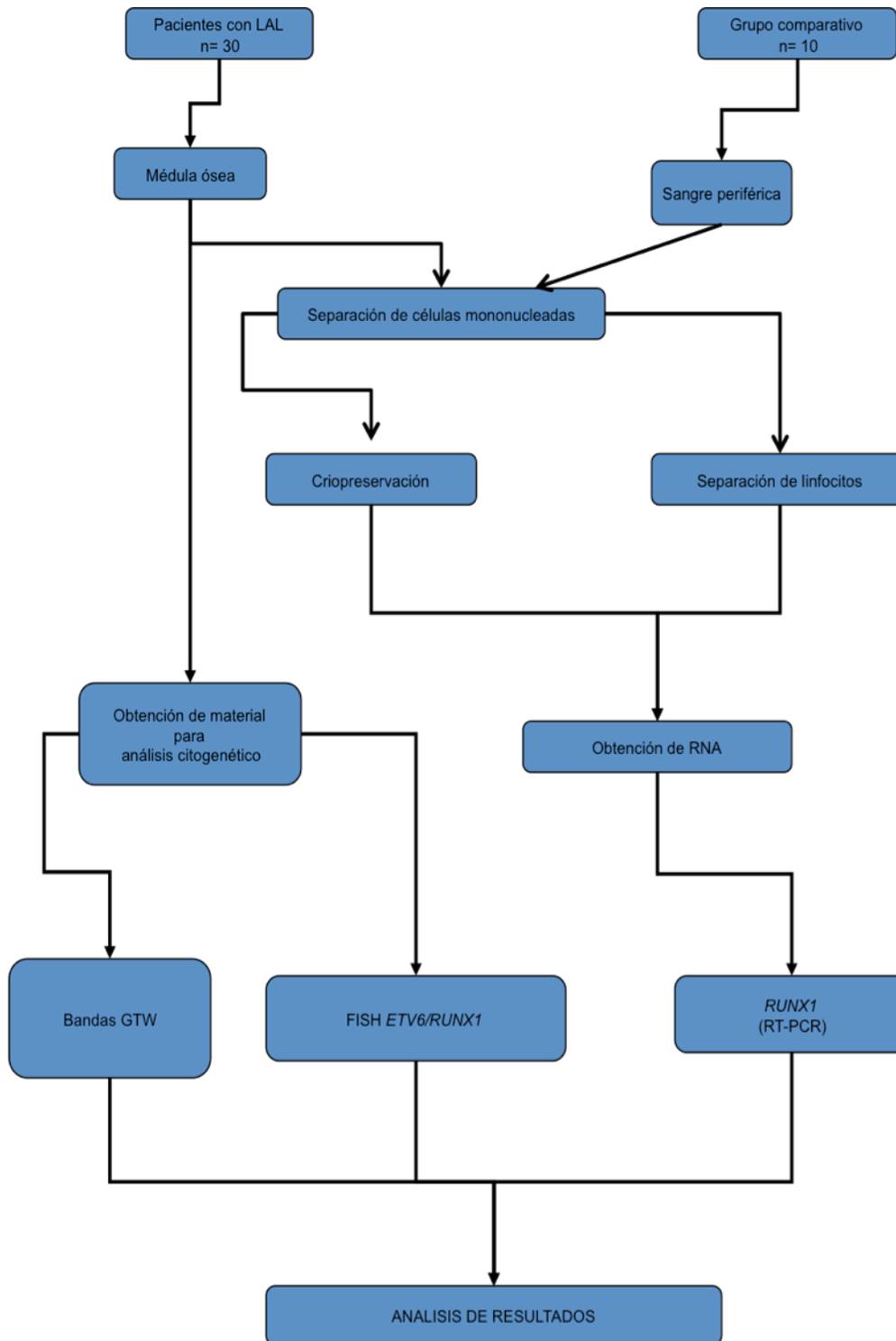
1. Determinar las alteraciones del gen *RUNX1* en células de médula ósea de pacientes pediátricos con LAL.
2. Analizar la expresión diferencial de los RNAm que codifican a las isoformas AML1a, AML1b y AML1c del gen *RUNX1* y determinar su frecuencia de expresión.
3. Correlacionar las alteraciones del gen *RUNX1* con la expresión de sus isoformas.

### **5.- HIPÓTESIS.**

En la LAL, el gen *RUNX1* presenta alteraciones, lo cual puede estar asociado a la expresión diferencial de sus isoformas e influir en el desarrollo de la enfermedad.

## 6.- DISEÑO DEL ESTUDIO.

### 6.1.- Estrategia general.



## **6.2.- Población de estudio:**

Se colectaron 30 muestras de médula ósea de pacientes pediátricos en el período de enero a diciembre del 2006, en el servicio de Oncología del Instituto Nacional de Pediatría, que cumplieron con los siguientes criterios:

## **6.3.- Criterios de inclusión:**

- Pacientes pediátricos (0 a 16 años).
- Diagnóstico de LAL basado en criterios clínicos, citomorfológicos y de inmunofenotipo.
- Sin tratamiento previo.

## **6.4.- Criterios de exclusión:**

- Se excluyeron pacientes en los que posteriormente se diagnosticó una enfermedad diferente a la LAL.
- Pacientes que no reunieron el material biológico suficiente para realizar el estudio.

Se solicitó a los médicos oncólogos que llenaran una hoja de captación de datos (Anexo 1) con la información de los resultados de laboratorio, así como las características clínicas que presentaron los pacientes al momento del diagnóstico.

### **6.5.- Grupo comparativo.**

Se utilizaron linfocitos obtenidos de muestras de sangre periférica de 10 individuos sanos.

### **6.6.- Consideraciones éticas.**

Las muestras de médula ósea de los pacientes se obtuvieron de los aspirados que les realizan para estudios diagnósticos de LAL. Bajo ninguna circunstancia se solicitó muestra extra para cubrir los criterios de este protocolo. Cada participante firmó una carta de consentimiento informado (Anexo 2) o si se contaba con las muestras, se codificaron para garantizar la confidencialidad de los pacientes.

### **6.7.- Obtención y procesamiento de las muestras de médula ósea.**

Cada muestra de médula ósea se separó en 2 fracciones y se procesó como se indica a continuación:

1.- Una parte se utilizó para obtener el material necesario para realizar el estudio citogenético con bandas GTW y el análisis por medio de la técnica de FISH.

2.- A partir de la segunda fracción de la muestra se separaron las células mononucleares por centrifugación en gradiente de densidad y se cuantificaron, esto incrementó el porcentaje de células leucémicas ya que la mayoría de los pacientes presentaron el 80% de blastos. Se hicieron alícuotas con  $4 \times 10^6$  y  $10 \times 10^6$  células que se congelaron en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  en las soluciones adecuadas para preservar ácidos nucleicos y proteínas (Anexo 3). Estas muestras se usaron para realizar la extracción de RNA para los estudios de expresión génica e identificación de las isoformas de RUNX1 por RT-PCR.

### **6.8.- Análisis citogenético con bandas GTW.**

El estudio citogenético se realizó a partir de las muestras fijadas en metanol y ácido acético en proporción 3:1. Se hicieron preparaciones por goteo y se realizaron bandas GTW (Anexo 4). Se analizaron las células en metafase mediante bandas GTW para determinar alteraciones cromosómicas en las células leucémicas de los pacientes. El análisis citogenético se realizó tomando

en cuenta los criterios establecidos en el ISCN 2005 (International System for Human Cytogenetic Nomenclature) (Shaffer y Tommerup, 2005).

### **6.9.- Estudio del gen *RUNX1* por FISH**

Este estudio se realizó utilizando núcleos en interfase fijados con metanol/ácido acético en proporción 3:1 (Anexo 5). Para detectar alteraciones relacionadas con el gen *RUNX1*, se emplearon sondas de secuencias específicas para el gen *ETV6* (12p13, marcada con fluorocromo verde) y el gen *RUNX1* (21q22.3, marcada con fluorocromo naranja) (Vysis, Downers Grove, IL, USA). En los casos en los que se detectó incremento en el número de copias de *RUNX1* y el estudio citogenético no mostró polisomías 21, se realizó el estudio de FISH con la sonda centromérica alfa-satélite 13/21 (marcada con digoxigenina y detectada con rojo Texas) (Oncor) para determinar si las alteraciones correspondían a polisomías 21 o a la presencia de copias en tandem asociadas con duplicaciones de la banda 21q22.

### **6.10.- Caracterización de las isoformas de *RUNX1* por RT-PCR**

Se realizó la extracción de RNA por el sistema de columna de sílica (Qiagen®, Hilden, Germany), (Anexo 6) para lo cual se utilizaron las células de médula ósea congeladas y en alícuotas de  $4 \times 10^6$  células. A partir del RNA obtenido se

sintetizó el cDNA por transcripción inversa y se realizó la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando de 200 a 400 ng de RNA, y 10 pmol de cada uno de los oligonucleótidos específicos para cada isoforma y se utilizó el estuche comercial “SuperScript One step” (Invitrogene, CA, USA). Se usó como gen de expresión constitutiva al receptor de ácido retinóico  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ). Las secuencias de los oligonucleótidos para amplificar cada isoforma se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos específicos para cada isoforma de *RUNX1*

ISOFORMA	SECUENCIA	Exón	TAMAÑO (REFERENCIA)
AML1a	(F) 5'-CTGGTCACTGTGATGGCTGG-3',	4	465pb (Choi, 2003);
	(R) 5'-CTGCCTTAACATCTCCAGGG-3',	7A	
AML1b	(F) 5'-CACCGACAGCCCCAACTTCC-3',	3	293pb (Choi, 2003);
	(R) 5'-AGGTGGCGACTTGCGGTGGG-3',	5	
AML1c	(F) 5' CACAGAACCACAAGTTGGGTAGCC-3'	1	404pb (Miyoshi, 1995).
	(R) 5'-GACTCAAATATGCTGTCTGAAGCC-3'	1	
RAR $\alpha$ :	(F) 5'-CCAGTACTGCCGACTGCA-3'	3	503pb *
	(R) 5'-TGGCGAAGGCAAAGACCA-3'	7	

\*Diseño realizado mediante el programa en la red “Gene Fisher- Software support for the detection of postulated genes” R. Giegerich *et al*, 2007.

Las condiciones de temperatura de la transcripción reversa fueron de 50°C durante 30 min, mientras que las condiciones de PCR fueron: 95°C por 12 min para la desnaturalización inicial, seguido de 45 ciclos a 95°C por 20 seg, 60°C

por 40 seg, 72°C por 1 min y una extensión final a 72°C por 10 min. Se emplearon las mismas condiciones para todas las isoformas. Los productos de PCR obtenidos se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 3% teñidos con bromuro de etidio, se visualizaron y fotografiaron con un transiluminador de UV. El estudio de expresión se obtuvo con un análisis cualitativo, por la determinación de la presencia o ausencia de los productos de RT-PCR.

#### **6.11.- Caracterización de las variantes de las isoformas de *RUNX1* por secuenciación.**

Se purificaron los productos obtenidos por RT-PCR que corresponden a las isoformas AML1a, AML1b, AML1c y sus variantes, para su caracterización por secuenciación; para ello se empleó el kit de purificación de DNA en gel (QiAquick® gel extraction kit, Qiagen®, Hillden, Germany) (Anexo 6). Los productos se enviaron al Laboratorio de Biología Molecular: Secuenciación, del Instituto de Biología, UNAM. El método de secuenciación que emplearon es el big dye version 3.1 de Applied Biosystems (Foster City, CA), el purificado con columnas Centrisep con Sephadex y se procesaron en un secuenciador de Applied Biosystems 3100 de 16 capilares. El análisis de las secuencias se realizó en el software FinchTV versión 1.4.0 de Geospiza Inc.

## 6.12.- Grupo comparativo

Se obtuvo una muestra de 10 ml de sangre periférica heparinizada de 10 individuos sanos, se separaron las células mononucleadas (linfocitos y monocitos) por gradiente de densidad (Anexo 7). Se colocaron en un frasco de cultivo durante 3 horas para permitir la adhesión de los monocitos a la superficie del frasco, se colectó el sobrenadante con los linfocitos en suspensión y por medio del análisis citomorfológico con tinción de Wright se corroboró que más del 90% de las células fueran linfocitos. Los linfocitos en suspensión se congelaron en las mismas condiciones que las muestras de médula ósea, para realizar posteriormente el estudio de expresión de las isoformas por RT-PCR.

Se incluyeron en el estudio las líneas celulares RS4 y REH obtenidas a partir de pacientes con LAL con alteraciones cromosómicas. La línea celular RS4 presenta la  $t(4;11)(q21;q23)$ , se incluyó como un control ya que no presenta alteraciones del cromosoma 21 ni del gen *RUNX1*. La línea celular REH presenta la  $t(12;21)(p13;q22)$ , ésta se incluyó debido a que presenta alteración en el gen *RUNX1*, forma una fusión génica con el gen *ETV6*, por lo tanto no se encuentra el gen completo, está alterado.

### 6.13.- ANALISIS DE RESULTADOS.

El análisis estadístico se realizó con una prueba exacta de Fisher, con una tabla de contingencia de 2x2, en el programa InStat versión 3.0 para Macintosh. Las variables utilizadas fueron: a) Pacientes con >50 cromosomas; b) alteraciones del cromosoma 21; c) más de 2 copias del gen *RUNX1* y d) los marcadores de inmunofenotipo HLA, TdT, CD10, CD19, CD20, CD22, CD79a. Estas variables se compararon con la presencia o ausencia de las diversas isoformas de *RUNX1*.

## 7.- RESULTADOS

Se obtuvo una población de 30 pacientes con diagnóstico de LAL, y se elaboró una base de datos con la siguiente información: edad, sexo, cuenta de leucocitos al diagnóstico, porcentaje de blastos, inmunofenotipo (Anexos 8, 9), cariotipo y análisis del gen *RUNX1* por FISH (Anexo 10).

### 7.1.- Población de estudio.

La población captada presentó edades entre 8 meses y 16 años; 15 pacientes fueron del sexo femenino y 15 del masculino; 28 pacientes mostraron inmunofenotipo precursor de células B y 2 de células T (Fig. 5).

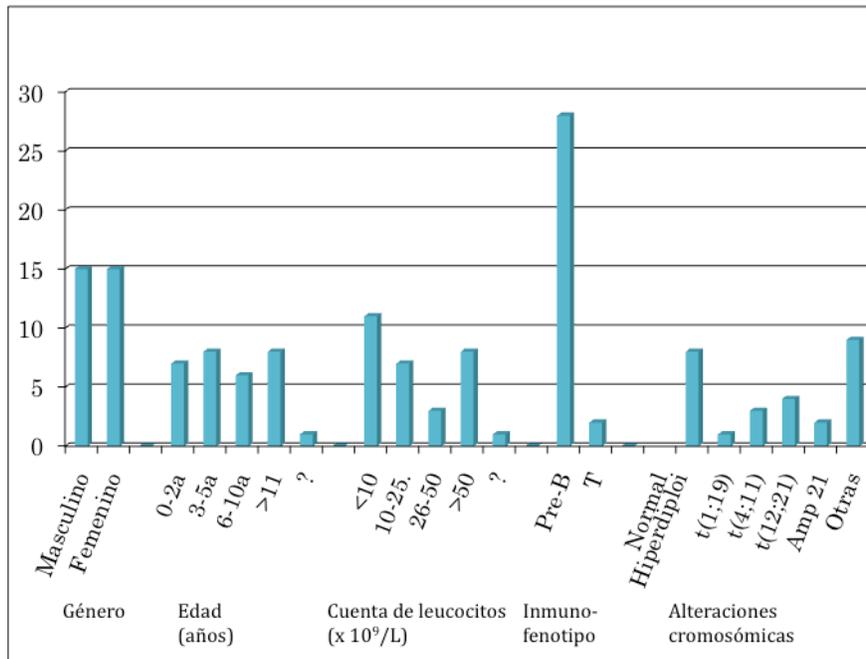


Fig. 5 Características clínicas de los 30 pacientes con LAL.

## **7.2.- Determinación de alteraciones por citogenética convencional y alteraciones del gen *RUNX1* por FISH.**

El cariotipo se realizó en 26/30 pacientes, ya que en 4 hubo falla en la obtención de cromosomas. Cuatro pacientes presentaron cariotipo normal y en 22 se observaron alteraciones como hiperdiploidías, translocaciones recurrentes como la  $t(1;19)(q23;p13)$  y la  $t(4;11)(q21;q23)$ , alteraciones del cromosoma 21, más otras consideradas como no recurrentes (Anexo 10 ). Se realizó FISH para los genes *ETV6* y *RUNX1* en los 30 pacientes. Se analizaron al menos 200 células en interfase y adicionalmente se observaron de 2 a 5 metafases para corroborar los resultados obtenidos. En 16/30 pacientes se presentó el patrón normal de los genes *ETV6* y *RUNX1* (Fig. 6A); en los 14 pacientes restantes se detectaron diversas alteraciones: a) en 10 pacientes se encontró incremento en el número de copias del gen *RUNX1* (3 a 5 copias extra) (Fig. 6B); b) 4 casos mostraron la translocación  $t(12;21)(p13;q22)$  (Fig. 6C), uno de estos pacientes también presentó ganancia de copias del gen *RUNX1*. De los 10 pacientes con incremento en las copias de *RUNX1*: a) en 2 se observó una adición  $add(21)(q22)$  que fue producida por eventos de duplicación que incluyeron la banda 21q22 en la cual se ubica *RUNX1*; b) 5 presentaron hiperdiploidías con ganancia del cromosoma 21 ya también detectadas por citogenética convencional; c) en los 3 casos restantes no se obtuvo el estudio citogenético, para conocer si se debía a una polisomía 21 se analizaron por FISH con la sonda alfa-satélite 13/21, que detecta la región

centromérica de los cromosomas 13 y 21. Con este análisis se determinó que el incremento en el número de copias se produjo por la presencia de polisomías del cromosoma 21, ya que se encontraron de 5 a 6 regiones centroméricas por célula. Los 4 pacientes con la t(12;21) también presentaron delección del gen *ETV6*, que es una alteración secundaria que frecuentemente acompaña a esta translocación. Un paciente de este grupo presentó adicionalmente ganancia de un cromosoma derivativo 21 der(21) de la t(12;21).

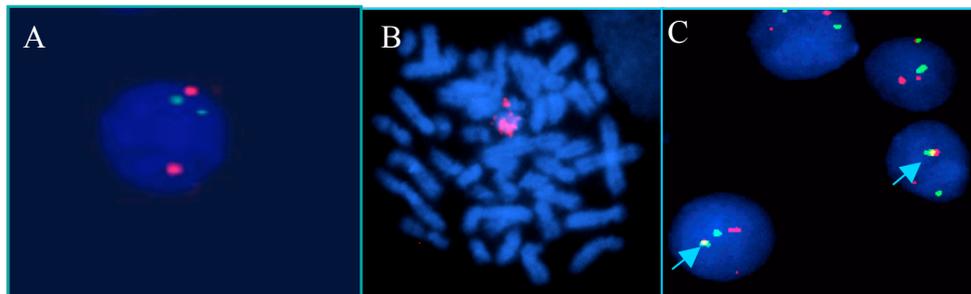


Fig. 6.- Análisis de FISH A) patrón normal de los genes *ETV6* (señal verde) y *RUNX1* (señal roja); B) incremento en el número de copias del gen *RUNX1* (3 a 5 copias extra); C) translocación t(12;21)(p13;q22), la señal amarilla representa la fusión génica *ETV6/RUNX1* (flecha) y se observa una señal roja pequeña residual.

### 7.3.- Análisis de expresión de las isoformas de *RUNX1*.

El estudio de expresión de las isoformas AML1a, AML1b y AML1c se realizó con el método de RT-PCR, con el RNAm preservado de las 30 muestras. Se utilizó el gen *RAR $\alpha$*  como control de la reacción de la RT-PCR. De forma cualitativa se analizaron los productos de la RT-PCR esperados (AML1a=465pb; AML1b=293pb y AML1c=404pb) y además se detectaron variantes de las isoformas AML1a y AML1c (Fig. 7). La isoforma AML1a

presentó 2 variantes adicionales, de 400pb y 263pb. La isoforma AML1c también mostró 3 variantes, de ~450pb, ~350pb y 196pb. A continuación se referirán las isoformas y sus variantes con el código que se indica en la Tabla 4.

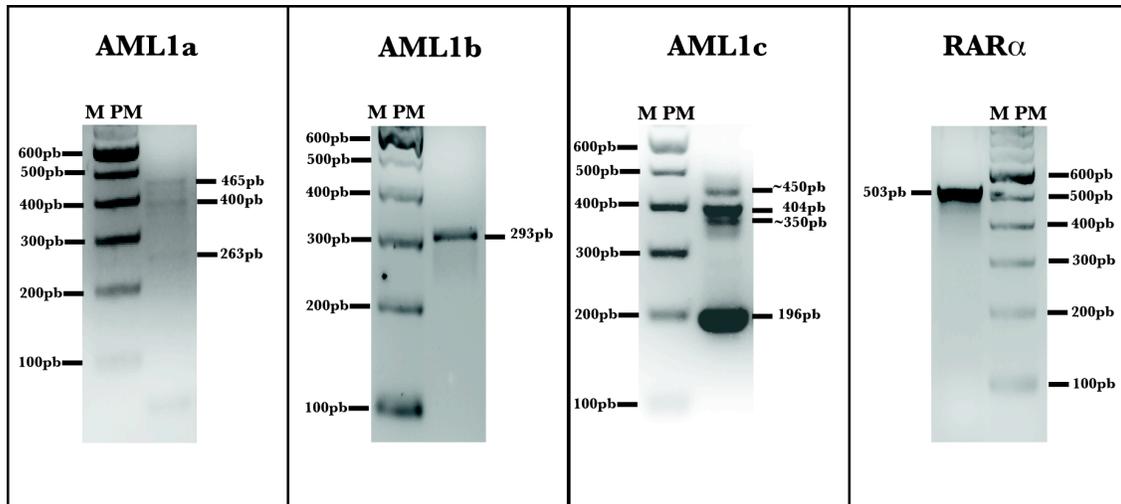


Fig. 7.- Productos RT-PCR de las isoformas de RUNX1: AML1a= 465pb; AML1b=293pb y AML1c=404pb. Las variantes de AML1a 400pb y ~263pb. Las variantes de la isoforma AML1c presentaron de ~450pb, ~350pb y 196pb. Como control de la RT-PCR en una reacción separada se amplificó el receptor de ácido retinoico  $\alpha$  (RAR $\alpha$ ) de 503pb.

Tabla 4.- Codificación de las isoformas de RUNX1

AML1a (465pb)*	A1
AML1a (400pb)	A2
AML1a (273pb)	A3
AML1b (293pb)*	B
AML1c (~450pb)	C1
AML1c (404pb)*	C2
AML1c (~350pb)	C3
AML1c (196pb)	C4

\*isoformas esperadas con el diseño de oligonucleótidos para RT-PCR

En los 30 pacientes se encontró la variante C4 de la isoforma AML1c, en 26 de estos también se observaron las variantes de C1 y C2. Veinticinco pacientes mostraron la variante C3 de esta isoforma. Con respecto a la isoforma AML1a, la variante A1 se presentó en 19 pacientes y las variantes A2 y A3 se observaron en 18 pacientes. La isoforma AML1b (B1) se presentó en 9 pacientes (Fig. 8).

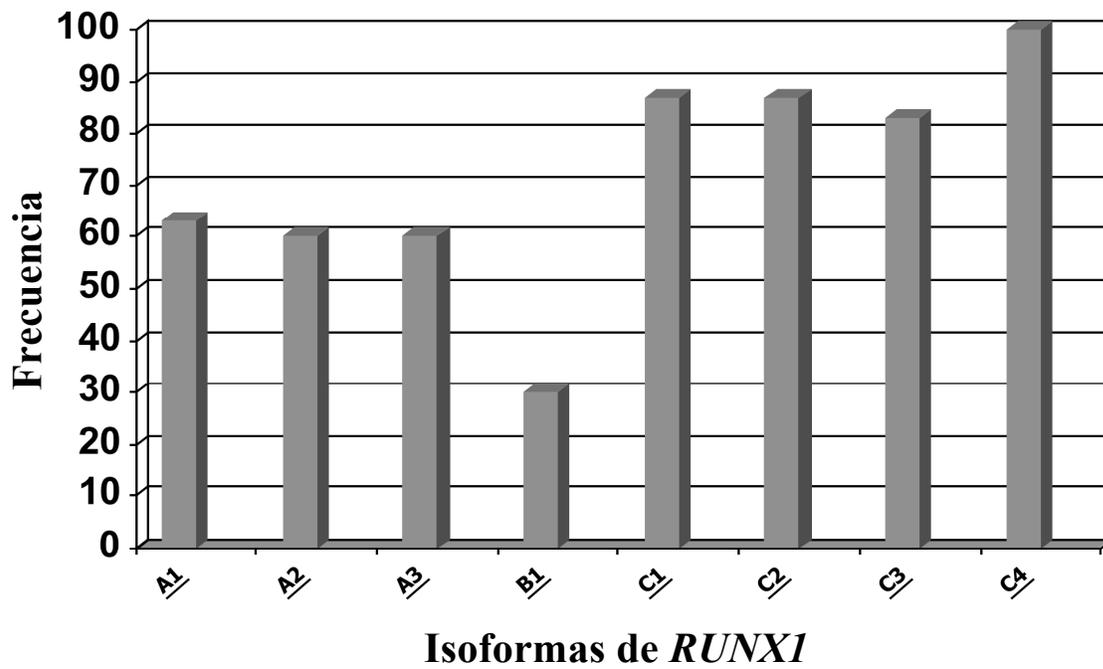


Fig. 8.- Frecuencia de aparición de las diversas isoformas de RUNX1 y sus variantes en los 30 pacientes analizados.

#### **7.4.- Caracterización de las variantes de las isoformas de *RUNX1* por secuenciación.**

Con el análisis de las secuencias de los tres productos de PCR de la isoforma AML1a (Fig. 9) se encontró lo siguiente:

a) Para la variante A1, se corroboró la identidad del producto esperado de 465 pb; b) Se determinó que la variante A2, de 400pb, carece de 65 pb donde 51pb corresponden a la región 3' del exón 6 y 14pb al extremo 5' del exón 7A; c) La variante A3 carece del exón 6 completo, formando un producto de 263pb.

Con respecto a la isoforma B1, se corroboró la secuencia del producto esperado de 293pb.

Para la isoforma AML1c (Fig. 10) se confirmó la identidad de la isoforma C2, cuyo producto esperado es de 404pb. Se determinó que la variante C4 presenta 196pb y carece de 208pb dentro del exón 1. No fue posible purificar los productos C1 y C2 debido a su baja concentración.

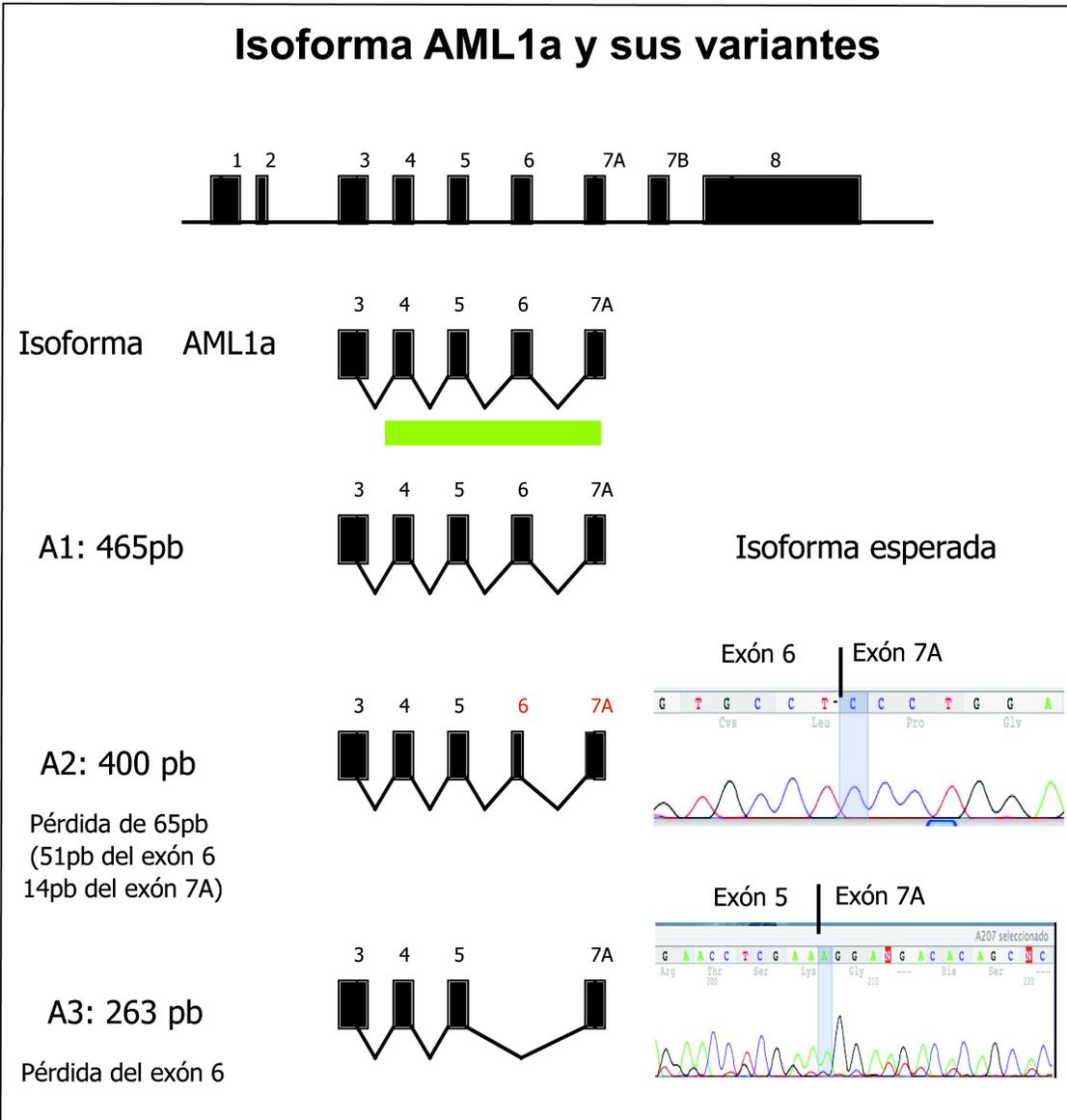


Fig. 9.- Esquema de la isoforma AML1a y sus variantes. Con números en rojo se indican los exones que presenta la deleción. La marca verde indica la ubicación del fragmento analizado para esta isoforma.

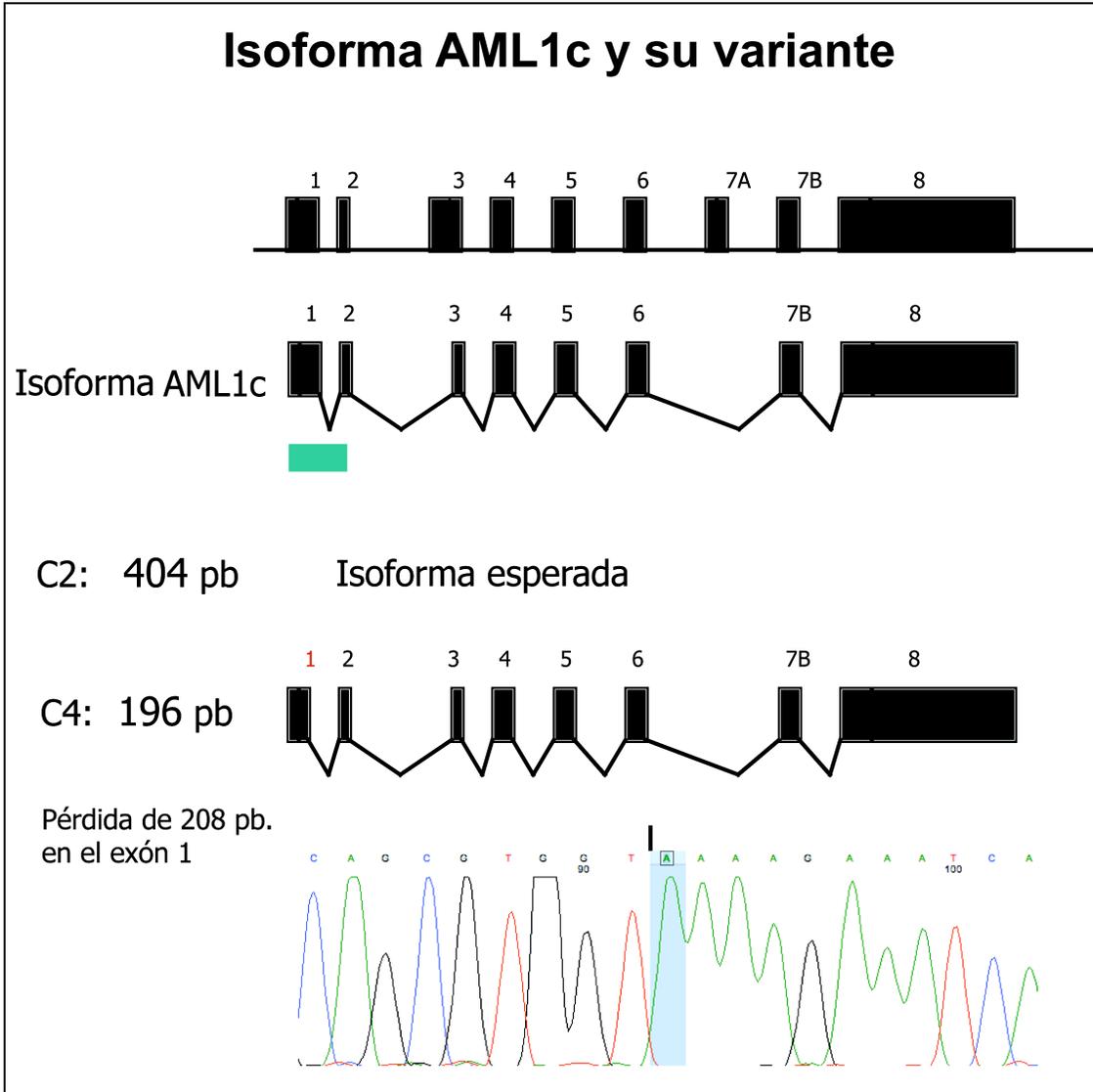


Fig. 10.- Esquema de la isoforma AML1c y su variante. Con número en rojo se indica el exón que presenta la deleción. La marca verde indica la ubicación del fragmento analizado para esta isoforma.

### **7.5.- Análisis de expresión de las isoformas de *RUNX1* en linfocitos del grupo comparativo.**

En los linfocitos de sangre de los 10 individuos del grupo comparativo, se detectó la isoforma AML1c y sus variantes. En cuanto a otras isoformas, sólo 3 individuos mostraron la isoforma AML1a y sus variantes (Fig. 11, barras blancas). La densidad de las bandas de los productos de AML1a y sus variantes fue apenas perceptible con respecto a las de AML1c (Fig. 12). En estas muestras no se observó la presencia de la isoforma AML1b. En cuanto a las líneas celulares estudiadas, RS4 sólo presentó la isoforma C4, mientras que la línea celular REH mostró las 4 variantes de la isoforma AML1c (C1, C2, C3 y C4).

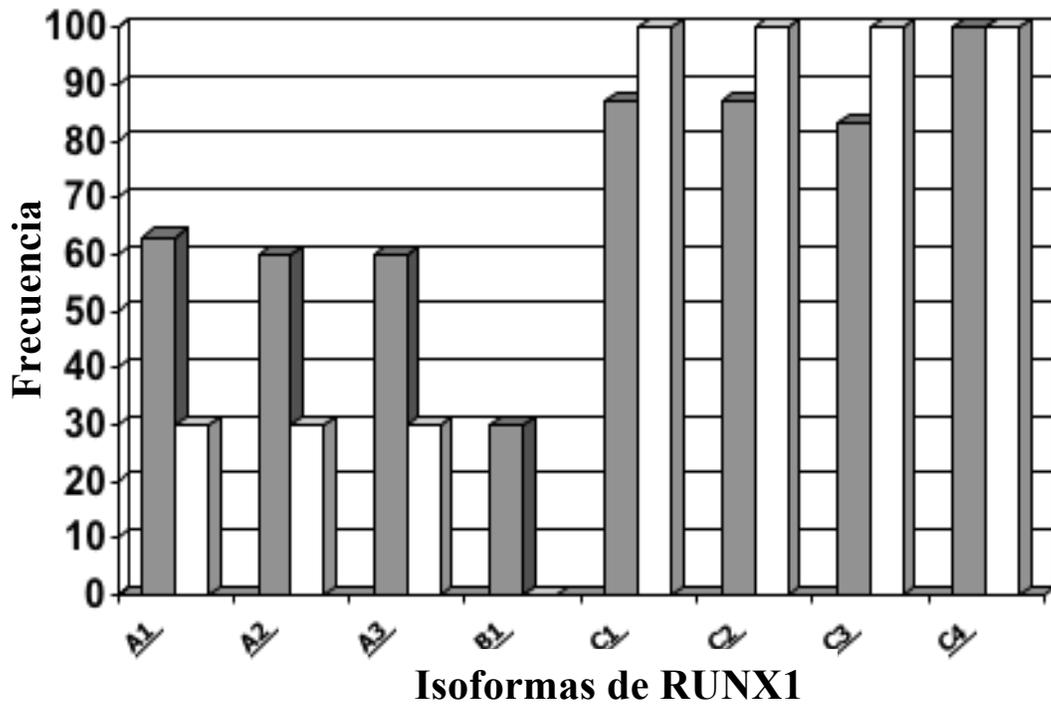


Fig. 11.- Frecuencia de presentación de las diversas isoformas de RUNX1 y sus variantes presentes en los 30 pacientes (barras grises) y 10 individuos del grupo comparativo (barras blancas) en donde se muestra la ausencia de la isoforma B1.

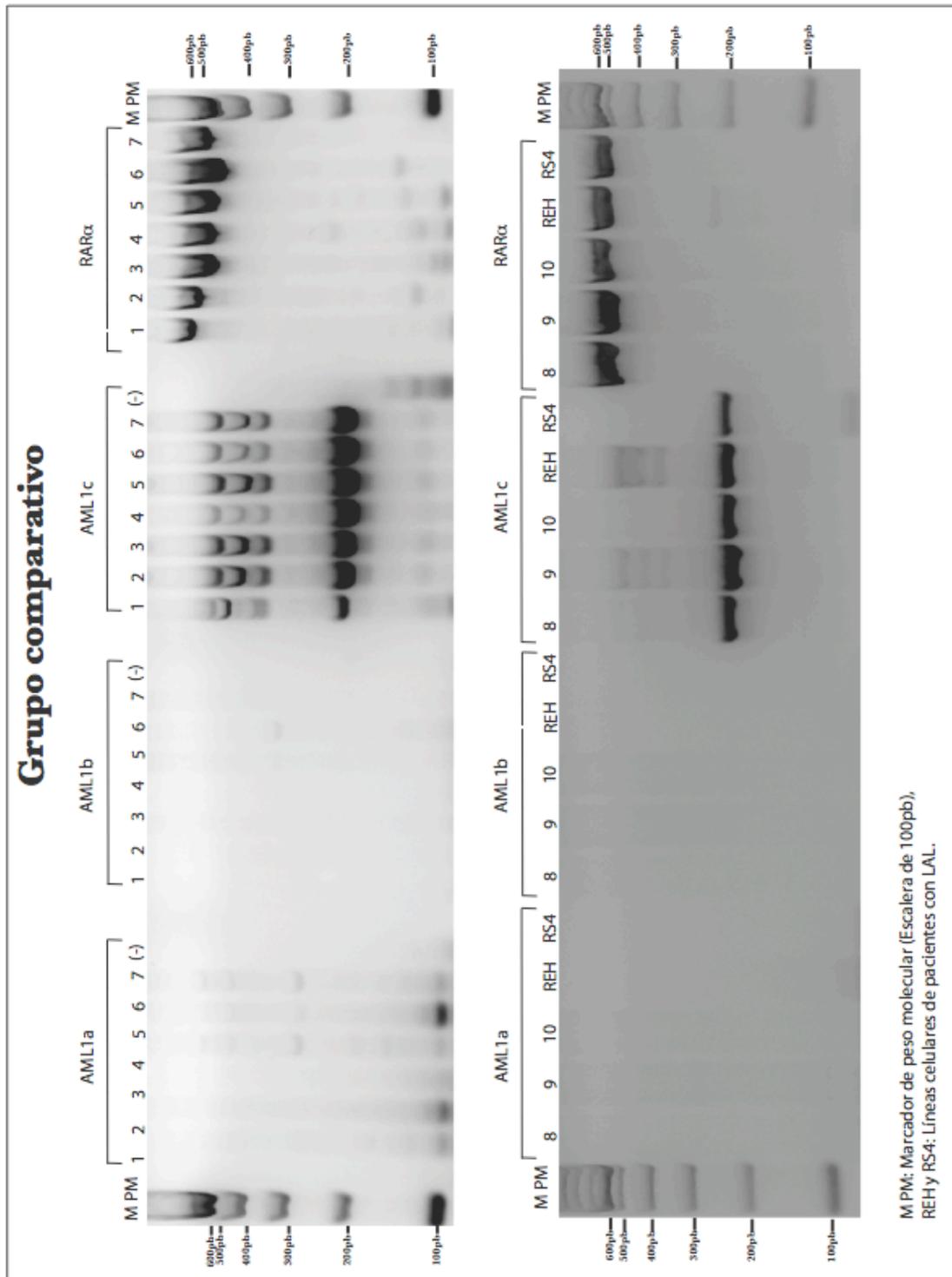


Fig. 12.- Geles de agarosa con los productos de RT-PCR para las isoformas AML1a, b y c y el control RAR $\alpha$  del grupo comparativo: a) linfocitos de los individuos 1-7; b) de los linfocitos de los individuos 8-10 y las líneas celulares REH y RS4.

### **7.6.- Perfil de expresión de las isoformas de RUNX1 en los pacientes con LAL.**

El patrón de expresión de las 3 isoformas y sus variantes en cada uno de los pacientes, se presentan en la tabla 5. Dependiendo de las combinaciones de isoformas encontradas y de la frecuencia en que se presentaron, se hizo una clasificación en 4 grupos. En el primer grupo, 9 pacientes mostraron exclusivamente la isoforma C y sus variantes, este patrón también se observó en la mayoría de los individuos sanos (7/10) y fue la combinación más frecuente. En el segundo grupo, los pacientes mostraron las isoformas de A y C y todas sus variantes, este perfil también se encontró en 3 individuos sanos. El tercer grupo consistió en 6 pacientes que presentaron combinaciones de algunas de las isoformas A o C, estos patrones no se encontraron en el grupo comparativo. En el cuarto grupo se incluyeron pacientes que expresaron la isoforma B, un subgrupo mostró todos los tipos de isoformas detectados y el segundo subgrupo fue similar, excepto porque sólo expresó una variante de la isoforma C (C4); estos patrones no se observaron en el grupo comparativo. La única isoforma que se encontró exclusivamente en las células de los pacientes con LAL fue la B.

Tabla 5.- Combinación de isoformas.

GRUPO	Combinación de isoformas	Pacientes n=30	Controles n=10
1	C1,C2,C3,C4	9	7
2	A1,A2,A3,C1,C2,C3,C4	6	3
3	A1,C1,C2,C3,C4	2	0
	A1,A2,A3,C4	2	0
	A2,A3,C1,C2,C3,C4	1	0
	C1,C2,C4	1	0
4	A1,A2,A3,B,C1,C2,C3,C4	7	0
	A1,A2,A3,B,C4	2	0

### 7.7.- Análisis estadístico.

La prueba de Fisher, con tabla de contingencia de 2x2 reveló que las variantes empleadas en este estudio no fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), excepto para la presencia de alteraciones cromosómicas con respecto a la isoforma B. La isoforma AML1c no se incluyó en este análisis debido a que su expresión fue documentada en todos los pacientes.

## 8.- DISCUSIÓN.

En este trabajo, a través de los análisis citogenético y de FISH con la sonda *ETV6* y *RUNX1* se encontraron las alteraciones numéricas y estructurales esperadas, dentro de las que sobresalen el incremento en el número de copias del gen *RUNX1*, ya sea por polisomías 21 o por la presencia de duplicación en tandem sobre el mismo cromosoma 21; la polisomía 21 se encuentra frecuentemente en LAL debido a que el 21 es el cromosoma que mayormente se gana en hiperdiploidías mayores de 50 cromosomas, estas alteraciones se detectan hasta en el 19.7% de los casos. La amplificación de *RUNX1* es una alteración que se ha descrito recientemente, es poco frecuente y se encuentra del 1.5% al 3% de los niños con LAL (Harewood *et al*, 2003 y Soulier *et al*, 2003). Adicionalmente se observaron las translocaciones recurrentes en la LAL, la t(1;19), la t(4;11) y la t(12;21); esta última es una translocación críptica, es decir, que es una alteración citogenética que involucra a dos bandas claras pequeñas en los extremos de los cromosomas 12p y 21q, y no se observa con la resolución del bandeo GTW, por lo que sólo se identifica con FISH utilizando las sondas específicas de los genes involucrados. Al ocurrir la t(12;21) se produce la fusión génica *ETV6/RUNX1* que origina una proteína quimérica capaz de cambiar su función de activadora transcripcional a represora transcripcional, esto debido a que facilita la participación de HDAC1 y mSin3A. La fusión *ETV6/RUNX1* se detecta con amplia variación en los pacientes

pediátricos con LAL, desde el 2.7% hasta el 25%. En México la frecuencia es del 8.5% (Pérez-Vera y Montero-Ruíz, 2006).

En el estudio realizado por Gutiérrez-Angulo y colaboradores (2005), se asoció la expresión de la isoforma A con la presencia de alteraciones cromosómicas presentes en las células de pacientes con LAL. En el presente trabajo, no se encontró esta asociación ni tampoco hubo relación entre la expresión de una o varias isoformas con la presencia de alteraciones cromosómicas específicas.

La expresión de las isoformas de RUNX1 en LAL es controvertida, ya que no se conoce si se presenta una isoforma en particular o si co-existen diferentes transcritos.

A diferencia de los estudios realizados por Mikhail y colaboradores (2002), y Gutiérrez-Angulo y colaboradores (2005), el diseño de oligonucleótidos empleado para la RT-PCR de este proyecto, permitió el análisis independiente de las isoformas A, B y C en los pacientes con LAL. Mikhail y colaboradores (2002) estudiaron en un grupo de pacientes la expresión de las isoformas B y C en conjunto utilizando sólo el exón 8 (dominio de transactivación), y encontraron expresión significativamente mayor en sangre periférica obtenida de individuos sanos. En el estudio realizado por Gutiérrez-Angulo y colaboradores (2005), se analizó la expresión de la isoforma AML1a (exones 5 y 7A) y el RNAm AML1 total (dominio Runt), concluyeron que la isoforma que predomina en los pacientes es la AML1a. En el presente estudio se determinó que la variante C4 de la isoforma AML1c, está presente en todos los pacientes

y se observó que no existe una isoforma particular de la LAL, sino que se presentan diversas combinaciones y variantes a diferencia de lo reportado.

La remoción alternativa de intrones del gen *RUNX1* se regula por la presencia de 2 promotores que producen RNAm de diferentes tamaños, esto por el uso diferencial de 3 sitios de poliadenilación que favorecen la remoción alternativa de intrones. Entre el primero y el segundo sitio de poliadenilación se encuentran múltiples copias de la secuencia AUUUA, la cual puede ser la responsable de la desestabilización del RNAm (Shaw y Kamen, 1986). Hasta la fecha se han descrito 11 isoformas proteicas (Levanon *et al*, 2001), algunas se expresan en tejidos específicos como hígado, músculo esquelético, timo, colon, sangre periférica, excepto cerebro y corazón (Miyoshi *et al*, 1995); otras se han observado en determinadas patologías, como en el cáncer de ovario, donde se identificó una variante de isoforma de AML1b que presenta la pérdida del exón 6 completo y posiblemente contribuya al desarrollo de la enfermedad (Nanjundan *et al*, 2007).

En general, el proceso de remoción alternativa de intrones es responsable de la diversidad de proteínas funcionales dentro del genoma humano (Ast, 2004). También se ha reportado que al menos el 15% de todas las mutaciones puntuales que causan enfermedad, afectan el proceso de remoción de intrones (Srebrow y Kornblihtt, 2006). En este trabajo, al analizar las isoformas A, B y C en LAL, que ya habían sido detectadas por otros autores (Gutiérrez-Angulo *et al*, 2005 y Mikhail *et al*, 2002), se identificaron 3 variantes más y 2 productos

(C1 y C3) que no pudieron ser secuenciados y, por lo tanto, hasta el momento no se consideraron como variantes de la isoforma AML1c.

Con el estudio de secuenciación de nucleótidos de los productos obtenidos, se corroboró la identidad de la isoforma A1, que es el producto esperado. En cuanto a A2 se determinó que presenta una pérdida de 65pb que incluye parte de los exones 6 y 7A. El mecanismo de formación de esta isoforma parece combinar 2 tipos de remoción de intrones: 1) puede existir un sitio donador de remoción alternativo en 3' del exón 6 y adicionalmente 2) un sitio aceptor de remoción alternativo en la región 5' del exón 7A; esta remoción produce un cambio del marco de lectura (Tabla 6). En un análisis posterior se verificará este cambio y la isoforma resultante a nivel de proteína. La variante A2 no ha sido reportada en la literatura, por lo cual aún no se conocen sus implicaciones. La isoforma A3 muestra la pérdida del exón 6 completo, este evento se ha reportado como un tipo de remoción alternativa donde se realiza el salto de un exón completo, se considera uno de los principales eventos conservados de remoción alternativa de intrones en genomas de humano y ratón (Ast, 2004). Esta isoforma provoca un cambio en el marco de lectura de la secuencia de aminoácidos por la inserción del aminoácido lisina (K) (Tabla 6), que podría resultar en una proteína no funcional. Esta isoforma ya ha sido descrita en la línea celular Namalwa, proveniente de un paciente con linfoma de Burkitt (Miyoshi *et al*, 1995).

La isoforma B fue la menos frecuente, ya que sólo se observó en el 30% de los pacientes y fue la única que no se detectó en el grupo comparativo. Chimienti y

colaboradores (2000) observaron esta isoforma en el 90% de los pacientes con linfoma no Hodking, y determinaron que estaba ausente en los linfocitos de sangre periférica en personas normales de un grupo comparativo. Con base en este resultado, los autores sugieren que la isoforma B está relacionada con el proceso neoplásico. En este trabajo, la isoforma B se detectó con menor frecuencia, sin embargo fué la única que se observó en los pacientes con LAL, lo cual coincide con lo referido en pacientes con linfoma no Hodking.

Tabla 6. Cambio de marco de lectura en variantes A2 y A3.

<b>VARIANTE A2</b>	
Exón 6	Exón 7A
.....AAC CCT CGT GCC TCC....	CCC TGG AGA TGT TAA
N P R A S	P W R C
Sitio de unión	
.....AAC CCT CGT GCC TCC CTG GAG ATG TTA A	
N P R A S L E M	
<b>VARIANTE A3</b>	
Exón 5	Exón 7A
....GAA CCT CGA A	...AG GAA GAC ACA GCA CCC TGG AGA TGT TAA
E P R	E E D T A P W R C
Sitio de unión	
....GAA CCT CGA AAG GAA GAC ACA GCA CCC TGG AGA TGT TAA	
E P R K E D T A P W R C	

Con azul se muestra la secuencia de DNA nativa del extremo 5'; en verde la secuencia de nucleótidos del extremo 3'; en amarillo se muestran los nucleótidos perdidos durante el empalme; en lila se encuentra el codón de paro; en negro se presenta la secuencia de aminoácidos nativos; en rojo los aminoácidos producidos por la nueva secuencia de nucleótidos.

Para la isoforma C y sus variantes, se identificó por secuenciación automática la variante C4, que muestra la pérdida de 208pb dentro del exón 1. Esta variante ha sido descrita por Miyoshi y colaboradores (1995), en la línea celular Namalwa y en pacientes con linfoma no-Hodgkin (Chimienti *et al*, 2000). A diferencia de la variante A2, la isoforma C4 no presenta remoción alternativa de intrones. La variante C4 muestra una delección dentro del exón 1, lo cual podría obedecer a la existencia de sitios críticos de remoción alternativa dentro de esta secuencia. Esta posibilidad no se puede confirmar, ya que aún no se cuenta con datos precisos sobre la organización exón-intrón del gen *RUNX1*. La pérdida de 208pb de esta variante se encuentra en la región 5'UTR (Región no codificante), por lo que no afecta el marco de lectura de la secuencia de la proteína. Por otro lado, se corroboró la identidad de la isoforma C2, que es el producto esperado. En cuanto a las variantes C1 y C3, no fue posible llevar a cabo su caracterización por dificultades en la purificación, ya que los productos de RT-PCR se obtuvieron en baja concentración.

Los estudios realizados en líneas de células B y T sólo muestran que la isoforma expresada es la AML1c (Telfer y Rothenberg, 2001), este hallazgo apoya los resultados obtenidos en este estudio.

El uso de sitios de remoción alternativa de intrones con frecuencia lleva a un cambio de marco de lectura en la secuencia de la proteína (Sadusky *et al*, 2004). Por esta razón es importante determinar si las isoformas de RNAm detectadas en este estudio afectan la traducción de las isoformas proteicas y

además se afecte la función específica dentro de la célula, y si estos cambios favorecen el proceso leucémico.

Con respecto al grupo comparativo, se analizaron los linfocitos de 10 individuos sanos y se observó que todos presentan la isoforma AML1c y sus variantes, en 3 individuos se detectó la presencia de las variantes de AML1a, mientras que AML1b está ausente en todas las muestras. Este resultado difiere de lo reportado por Chimienti y colaboradores (2000), que analizaron la expresión de *RUNX1* en los linfocitos B CD19+, purificados por métodos inmunológicos a partir de muestras de sangre periférica de individuos sanos, en los cuales no encontraron la isoforma AML1a. Los autores sugieren que AML1a es una proteína que no está involucrada en la diferenciación y proliferación de las células B (Chimienti *et al*, 2000). En este estudio, los individuos sanos que expresaron la isoforma AML1a lo presentan en concentraciones bajas en comparación con las isoformas C (Fig. 12); este resultado puede ser un falso positivo asociado al método de separación de linfocitos empleado, ya que el estudio citomorfológico por tinción de Wright reveló que aunque el 90% de las células eran linfocitos, el 10% de las células eran monocíticas. Debido a la sensibilidad de la metodología de PCR, cabe la posibilidad de que la expresión de la isoforma A sea propia de los monocitos (Levanon *et al*, 1994). Es importante valorar la pureza de la selección de células que se utilizan como control, ya que el tipo de análisis de RT-PCR punto final da resultados cualitativos.

A diferencia de los estudios ya reportados, con el diseño empleado en este proyecto se puede hacer un análisis independiente de cada una de las isoformas y sus variantes, por lo que se observa que no necesariamente una isoforma específica puede estar asociada con este tipo de leucemia, sino la combinación de éstas.

Se ha reportado que existen 2 dominios reguladores de la proteína RUNX1 que afectan la unión con el DNA, los cuales se encuentran en la región N-terminal y C-terminal con respecto al dominio Runt y se conocen como NRDBn/NRHn y NRDBc respectivamente. Las regiones en el extremo N-terminal impiden que el dominio Runt interaccione con el CBF $\beta$  o el DNA. Se ha demostrado que las deleciones *in vitro* en estos sitios permiten al dominio Runt incrementar la dimerización con el CBF $\beta$  o su capacidad de unión al DNA (Ito, 1999). Las 3 variantes de las isoformas caracterizadas (A2, A3 y C4) presentan deleciones en las regiones descritas, el posible efecto que esto puede tener es la dismunición de la regulación negativa con el consecuente incremento de la transcripción de sus genes blanco. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios funcionales para comprobar esta hipótesis.

No se observó una correlación entre las alteraciones del gen *RUNX1* ni la presencia de polisomías 21 con la expresión cualitativa de sus isoformas. Esto puede ser por la gran variedad de combinaciones de isoformas presentes en este grupo de pacientes. Es probable que sólo se puedan correlacionar al

analizar una muestra de mayor tamaño o con un análisis cuantitativo por RT-PCR en tiempo real.

El gen *RUNX1* participa en el desarrollo de células hematopoyéticas, por lo que se podría relacionar con alguno de los marcadores de inmunofenotipo relacionados con diferenciación celular, sin embargo, no se demostró una correlación al analizar cada uno de estos (Anexo 9) presentes en los linfoblastos al diagnóstico de la leucemia.

*RUNX1* es un factor de transcripción que regula la expresión de numerosos genes relacionados con hematopoyesis, incluyendo citocinas, sin embargo, se conoce poco acerca del potencial que tiene la regulación de las isoformas de *RUNX1* tanto en células normales como en leucémicas. Los resultados obtenidos en este estudio dan pauta para continuar con el análisis de las isoformas a nivel de proteínas y de la expresión de los genes que modulan. Estos estudios permitirán conocer si las isoformas y sus variantes son funcionales, si compiten entre ellas por dominios de unión o si interaccionan con otras proteínas y permiten la transcripción de sus genes subordinados.

## 9.- CONCLUSIONES

Con estos resultados se puede concluir que:

- No se encontró una relación entre las alteraciones del gen *RUNX1*, las alteraciones cromosómicas, ni el inmunofenotipo, con la expresión de las 3 isoformas de *RUNX1*.
- Con el diseño empleado para el estudio de expresión de las isoformas, se analizó de manera independiente a las isoformas AML1a, AML1b y AML1c del gen *RUNX1*. Se detectaron y caracterizaron 3 variantes de las isoformas que suman en total 6 y se observaron adicionalmente 2 productos aún no caracterizados.
- Se identificó una nueva variante que no ha sido reportada por lo que no se conoce su relación con la LAL.
- Se determinó que no existe una isoforma específica asociada con la LAL, sino la presencia de combinaciones de las diversas isoformas y sus variantes. Sin embargo, la isoforma B se expresó exclusivamente en las células de los pacientes con LAL.
- La presencia de estas isoformas pueden implicar competencia entre ellas y podría estar relacionada con la regulación de expresión de los

genes subordinados y de esta manera estar relacionados con el origen de la LAL.

## **10.- PERSPECTIVAS.**

- Se corroborará la expresión de las isoformas AML1a en linfocitos de individuos sanos separados con anticuerpos específicos de este tipo celular, con el fin de sustentar los resultados obtenidos del grupo comparativo.
- Se caracterizará la presencia de las isoformas proteicas de RUNX1 en el mismo grupo de pacientes con LAL por análisis de Western Blot para determinar la participación de las isoformas en esta enfermedad y se corroborará la traducción de los RNAm analizados.
- Se estudiará la expresión un gen subordinado de *RUNX1*, para determinar si éste es regulado por alguna de las isoformas de RUNX1 y por lo tanto verificar que las isoformas sean proteínas funcionales.

## 11.- ANEXOS

### ANEXO 1.- Hoja de captación de datos.

DATOS DE LABORATORIO	
SANGRE	MEDULA OSEA
LEUCOCITOS:	HIPERCELULAR:
PLAQUETAS:	HIPOCELULAR:
Hg/Ht:	NORMAL:
% DE BLASTOS:	% DE BLASTOS:

HOJA DE CAPTACIÓN DE DATOS DEL PROYECTO: "EXPRESIÓN DEL GEN  
*RUNX1* EN CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA  
 LINFOBLÁSTICA"

NO. DE PACIENTE \_\_\_\_\_ FECHA \_\_\_\_\_ SERVICIO \_\_\_\_\_

NOMBRE \_\_\_\_\_

REGISTRO \_\_\_\_\_ EDAD \_\_\_\_\_ SEXO \_\_\_\_\_

DIAGNÓSTICO CITOMORFOLÓGICO \_\_\_\_\_

INMUNOFENOTIPO \_\_\_\_\_

HEPATOMEGALIA \_\_\_\_\_ ESPLENOMEGALIA \_\_\_\_\_

ADENOMEGALIAS \_\_\_\_\_ MASA MEDIASTINAL \_\_\_\_\_

ENFERMEDAD EXTRAMEDULAR \_\_\_\_\_ LOCALIZACIÓN \_\_\_\_\_

TIEMPO TRANSCURRIDO DESDE EL INICIO DE LA SINTOMATOLOGÍA \_\_\_\_\_

PRESENCIA DE PADECIMIENTO GENÉTICO O CONGÉNITO \_\_\_\_\_

¿CUÁL? \_\_\_\_\_

## ANEXO 2.- Carta de consentimiento informado.

### CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México, D.F.

200

A través de la presente informo que estoy de acuerdo en que mi hijo (a) \_\_\_\_\_ con expediente \_\_\_\_\_, participe en el proyecto titulado “**EXPRESIÓN DEL GEN *RUNXI* EN CÉLULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA**”. Se me ha informado que la muestra que se utilizará para realizar dicho estudio será parte de la misma que se utiliza para llevar a cabo los análisis rutinarios que se requieren para el diagnóstico de su enfermedad, por lo que no se necesita que se tomen muestras extra. También he sido informado que este estudio puede contribuir al conocimiento de la enfermedad que presenta mi hijo y en un futuro los datos que se obtengan pueden ser útiles en el manejo de los pacientes que tengan la misma enfermedad. Por otro lado, sé que los datos que se generen de esta investigación serán confidenciales.

También se me ha explicado que si no deseo que mi hijo participe en el estudio, la atención que se le brinda no se verá alterada.

Acepto participar

\_\_\_\_\_  
Padre o tutor (nombre y firma)

Testigo

Testigo

Dirección

Dirección

### **ANEXO 3.- Criopreservación de células mononucleadas de médula ósea.**

#### Separación de células mononucleadas por gradiente de densidad.

En un tubo cónico de 15 ml se coloca una parte de solución de linfoprep® (densidad 1.077g/ml) por cada 2 partes de médula ósea diluida en partes iguales en medio de cultivo, se centrifuga a 1500 rpm. durante 15 min.

El material se separa en tres fases: 1) eritrocitos y granulocitos, 2) interfase con células mononucleadas en linfoprep y 3) plasma.

Lavado con PBS: Se obtiene la interfase y se le agregan aproximadamente 10 ml de PBS. Se resuspende y se centrifuga 10 min a 1500 rpm. Se repite este paso hasta que el sobrenadante sea transparente.

Se hace el conteo celular en una cámara de Neubauer para obtener el número de células / ml.

No. de células/ml= Promedio de los 4 cuadrantes x 10,000.

Se separan las células en viales con las concentraciones necesarias para preservar ácidos nucleicos y para conservar la viabilidad celular. ( $4 \times 10^6$ ,  $10 \times 10^6$  células).

#### Para criopreservar ácidos nucleicos:

Se utiliza el buffer QRL1 del estuche comercial de extracción de DNA/RNA, o RLT del estuche de extracción de RNA (Qiagen®, Hillden, Germany) que contiene isotiocianato de guanidina.

Solución de trabajo: Por cada 1 ml de buffer QRL1 o RLT, 10  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol.

Se preparan viales con  $4 \times 10^6$  células en 1 ml de buffer QRL1 o RLT (solución de trabajo). Se congela inmediatamente en nitrógeno líquido.

Para criopreservar células vivas:

Se preparan viales con  $10 \times 10^6$  células en 1 ml de solución DMSO/SFB (dimetilsulfóxido y suero fetal de bovino). Se congela inmediatamente en nitrógeno líquido.

## **SOLUCIONES**

### **PBS**

Buffer de sales de fosfato de Dulbecco (Gibco).

### **Solución de DMSO/SFB (Dimetilsulfóxido/Suero fetal bovino)**

Para preparar 1 ml de solución

100  $\mu$ l de Dimetilsulfóxido (Sigma)

900  $\mu$ l de Suero fetal de bovino (Gibco)

#### **ANEXO 4. Estudio citogenético con bandas GTW.**

##### Cultivo y cosecha para obtención de cromosomas (Williams *et al.*, 1984)

En un tubo cónico de 15 ml, se agregan 8 ml de medio de cultivo RPMI1640/SFB y de 0.5 a 1 ml de médula ósea dependiendo de la cantidad de células de la muestra. Se realiza un cultivo directo y otro de 24 h a 37°C; se cosecha de la siguiente manera:

- Se agregan 2  $\mu$ l de colchicina (10  $\mu$ g/ml) durante 30 min a temperatura ambiente. Se centrifuga 10 min a 1500 rpm. Se retira el sobrenadante.
- Se resuspende el paquete celular con solución hipotónica KCl 0.075M y se incuba 20 min a temperatura ambiente.
- Se fija la suspensión celular (solución hipotónica-células) con 1 ml de fijador frío y se resuspende.
- Se centrifuga a 1500 rpm durante 10 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el paquete celular. Se agregan 10 ml de fijador y se resuspende. Se repite este procedimiento hasta que los paquetes celulares queden completamente blancos y el sobrenadante transparente. Las muestras fijadas se guardan a 4°C hasta su uso.
- Se hacen las preparaciones por goteo sobre portaobjetos, se secan a la flama y se maduran a 60°C por 1 a 2 días antes de hacer bandas GTW.

### Bandas GTW.

➤ Las preparaciones se tratan las en las siguientes soluciones:

- 1.- Solución de tripsina-EDTA de 4 a 8 seg,
- 2.- Enjuague en solución buffer de Sörensen, 2 seg,
- 3.- Enjuague en solución buffer de Sörensen, 1 min,
- 4.- Tinción en solución de Wrigth 1.5 min,
- 5.- Tinción en solución de Giemsa 1.5 min,
- 6.- Enjuague con agua destilada y se secan al aire.

## **SOLUCIONES**

### **Medio de cultivo RPMI 1640/SFB**

Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco)

Suero fetal de bovino al 10 % (Gibco)

### **Solución hipotónica KCl 0.075M**

KCl                      2.796 g (Merck)

Agua destilada      400 mL

ajustar a pH 7, aforar a 500 ml con agua destilada.

### **Fijador**

Metanol-ácido acético glacial (Merck) en proporción 3:1

Preparar cada vez que se utilice

### **Buffer de Sörensen**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6.63 g (Merck)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.56 g (Merck)
Agua destilada	900 ml

Aforar a 1000 ml y ajustar a pH 7.

### **Solución de tripsina-EDTA**

Tripsina (porcina, 1:250) (Gibco)	0.01 g
EDTA (Sigma)	0.01 g
Buffer Sörensen	50 mL

Ajustar a pH 7

Preparar cada vez que se utilice

### **Tinción de Wright**

Solución stock:

Wright	0.8 g (Merck)
Metanol	480 mL (Merck)

Disolver en un mortero y agitar durante 1 h. Filtrar.

Solución de trabajo:

Solución stock de Wright	20 mL
Buffer Sörensen	30 mL

Preparar cada vez que se utilice

➤ **Tinción de Giemsa**

Solución stock:

Giemsa	1g (Merck)
Glicerol precalentado a 60°C	66 mL (Merck)

Disolver en un mortero y dejar durante 30 min a 60°C.

Agregar:

Metanol	132 mL (Merck)
---------	----------------

Disolver en un mortero y agitar durante 1 h. Filtrar.

Almacenar a 4°C protegido de la luz. Desechar a los 6 meses o si se contamina.

Solución de trabajo:

Solución stock de Giemsa	10 mL (filtrar)
Buffer Sörensen	40 mL

Preparar cada vez que se utilice.

## **ANEXO 5.- Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).**

Preparación del portaobjetos con material (células fijadas en metanol:ácido acético 3:1) para hibridar:

Colocar una gota de material en suspensión en un portaobjetos limpio, revisar en contraste de fases el índice mitótico y valorar la cantidad de núcleos para analizar.

Se selecciona la mejor área para hibridar.

Pretratamiento: Sumergir la lámina en 2XSSC (solución salina de citrato de sodio) pH 7, a 37°C, durante 30 min. Deshidratar 2 min en una serie de alcoholes (alcohol etílico al 70%, 85% y 100%) a temperatura ambiente.

Desnaturalización: Colocar un vaso Coplin con la solución de desnaturalización (Formamida 70%/2XSSC) en baño de agua a 73°C, aproximadamente 30 min antes de usar la solución. Sumergir la lámina en la solución de desnaturalización 5 min (no sumergir más de 4 láminas simultáneamente). Deshidratar 2 min en una serie de alcoholes fríos (alcohol etílico a 70%, 85% y 100%). Secar a temperatura ambiente y se realiza la hibridación.

Preparación de la sonda (Vysis) (los siguientes pasos se realizan en oscuridad):

En un tubo de microcentrifuga se colocan 7 µl de Buffer de hibridación LSI/WCP, 1 µl de sonda y 2 µl de agua destilada, se centrifuga la mezcla de 1 a 3 seg a máxima velocidad, se agita en el vortex y se centrifuga otra vez. Se coloca el tubo en un baño de agua a 73°C durante 5 min, se retira y se aplica rápidamente en la lámina ya desnaturalizada.

Hibridación: Se prepara una cámara húmeda y se precalienta a 37°C. Se aplican 10 µl de la mezcla de la sonda en el área específica a hibridar de la lámina. Colocar un cubreobjetos (22 x 22mm), sellar con goma, colocar la lámina en la cámara húmeda protegida de la luz é incubar a 37°C durante 16 horas.

Lavados post-hibridación (para sonda Vysis): En un vaso coplin se agregan 70 ml de 0.4XSSC/0.3%NP40 en un baño de agua a 73°C, 30 min antes de usarse. Se retira el cubreobjetos e inmediatamente sumergir la lámina en la solución 0.4XSSX/0.3%NP40 durante 2 min; posteriormente sumergir en 2XSSC/0.1%NP40 de 1 a 3 seg. Se mantiene en esta solución hasta proceder a la contra-tinción.

Contratinción: Se escurre la lámina y se aplican 10 µl de una solución de DAPI (4,6-Diamidino-2-fenilindol) 1:20 con Vectashield en el área de hibridación. Se coloca un cubreobjetos y se sella con goma. Observar en el microscopio de fluorescencia.

#### Para sondas alfa-satélite (Oncor)

Preparación de la sonda:

En un tubo de microcentrifuga se colocan 1 µl de sonda y 15 µl de hibrisol VI. Se centrifuga 3 seg a máxima velocidad, se desnaturaliza a 72°C durante 5 min y se pone la sonda en baño de hielo. Se coloca la sonda en la zona a hibridar y se monta con un cubreobjetos de 22 x 22. Se hibrida a 37°C durante 16 horas.

Lavados post-hibridación (Oncor): Retirar con cuidado la goma y el cubreobjetos, lavar inmediatamente la preparación en 0.25XSSC, a 73°C por 2 min.

Posteriormente lavar en una solución de Tween 20 a temperatura ambiente por 5 min.

Detección: Aplicar 60  $\mu$ l de una solución de anticuerpos (fluoresceína-antidigoxigenina). Incubar en oscuridad a 37°C por 30 min. Lavar la preparación 3 veces en solución de Tween 20 a temperatura ambiente durante 2 min en cada una. Posteriormente se contratiñe con DAPI.

## SOLUCIONES

### 20XSSC

NaCl	175.3 g (Merck)
Citrato de sodio	88.2 g (Merck)
Agua destilada	600 mL
ajustar a pH 7, Aforar a 1000 mL	

### 2XSSC

20XSSC	50 mL
Agua destilada	450 mL

### 0.25XSSC

20XSSC	6.25 mL
Agua destilada	493.75 mL

### **Solución desnaturizadora (70% Formamida/2XSSC)**

Formamida	28 mL
20XSSC	4 mL
Agua destilada	4 mL

Ajustar a pH 7, aforar a 40 mL.

### **Sondas de DNA**

Sonda de secuencia única *ETV6* (12p13, marcada con fluorocromo verde) y el gen *RUNX1* (21q22.3, marcada con fluorocromo naranja) (Vysis, IL,USA).

Sonda centromérica alfa-satélite del cromosoma 13/21 marcada con digoxigenina (Oncor).

### **Solución de Tween**

2XSSC	50 mL
Agua destilada	200 mL
Tween 20	125 $\mu$ L (Sigma)

## **ANEXO 6.- ESTUDIOS DE EXPRESIÓN ANALIZADOS POR RT-PCR**

Extracción de RNA por el sistema de columna RNAeasy Mini Kit (250) (Qiagen®,  
Hilden, Alemania)

En un tubo de microcentrifuga colocar: 300 µl de la muestra (células en suspensión), 4 µl de 2-mercaptoetanol y 400 µl de buffer RLT, se mezclan en vortex.

Añadir 400 µl de alcohol etílico al 70%, mezclar en vortex. (La cantidad de alcohol etílico al 70% debe ser igual a la del buffer RLT).

El material se pasa por una columna de sílica y se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 min, se desecha el filtrado. Se repite el paso por la columna de 3 ó 4 veces.

Se agregan 700 µl de buffer RW1, se centrifuga durante 1 min a 13,000 rpm. Repetir este paso. Se desecha el tubo con filtrado. Se pasa la columna a un tubo nuevo.

Se agregan 500 µl de buffer RPE, se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 min.

Se desecha el filtrado y se repite el mismo paso con 3 min de centrifugación.

Se desecha el filtrado y se centrifuga a 13,000 rpm durante 1 min, para secar completamente la columna y eliminar el etanol residual.

Se agregan 40 µl de agua DEPC, y se deja reposar 1 min.

Se centrifuga 2 min para eluir y obtener el RNA. Se mantiene el RNA en hielo si se va a utilizar en ese momento, o se puede almacenar a temperaturas de -20 a -70°C.

### Electroforesis para productos de RT-PCR

Preparar un gel de agarosa al 3% en amortiguador TBE1x, con bromuro de etidio.

En una cámara de electroforesis horizontal, se agrega el amortiguador TBE 1X para cubrir el gel. Los productos de RT-PCR se mezclan con un acarreador (solución de carga) y se separa por diferencia de peso molecular por electroforesis. Colocar las muestras en cada uno de los pozos y se corren aproximadamente 40 min a 100 V.

Purificación de productos de PCR para secuenciación de nucleótidos automatizada, a partir de un gel de agarosa, QIAquick Gel extraction Kit (250) (Qiagen<sup>®</sup>, Hildden, Alemania)

Cortar el fragmento de DNA a purificar, del gel de agarosa. Se pesa el fragmento del gel cortado.

Se añaden 3 volúmenes de buffer QG por cada volumen de gel (100mg~100µl). Para geles al 2%, se añaden 6 volúmenes. La máxima cantidad de gel por columna son 400mg, si se supera esta cantidad, es necesario usar más de una columna.

Se incuba a 50°C por 10 min (o hasta que el gel se haya disuelto por completo). Para ayudar a disolver el gel, se agita con el vortex cada 2 a 3 min durante la incubación.

Después de que el gel se haya disuelto completamente, se verifica que el color de la mezcla sea amarillo (similar al color del buffer QG). Si el color es anaranjado o violeta, se añaden 10 µl de acetato de sodio 3M pH 5.0 y se mezcla. El color de la mezcla debe virar a amarillo.

Se agrega 1 volumen (igual al gel) de isopropanol y se mezcla en vortex.

Se coloca el contenido en una columna nueva y se centrifuga 1 min a 13,000 rpm, y se desecha el filtrado.

Se agregan 500 µl de buffer QG, se centrifuga por 1 min a 13,000 rpm, y se desecha el filtrado.

Se agregan 750  $\mu$ l de buffer PE, se deja reposar de 2 a 5 min y se centrifuga 1 min, se desecha el filtrado y se repite este paso.

Se centrifuga por 1 min y se desecha el filtrado, se coloca la columna a un tubo nuevo.

Para eluir el DNA se agregan 30  $\mu$ l de agua, se centrifuga 1 min.

## SOLUCIONES

### **BUFFER TBE 10X**

Tris base	0.89 M
Acido bórico	0.89 M
EDTA	0.02 M
Ajustar pH a 8.3	

### **BUFFER TBE 1X**

Buffer TBE 10X	100 mL
Agua destilada	900 mL

### **ACARREADOR**

Azul de bromofenol	0.25%
Xilencianol	0.25%
Glicerol	30%
Agua destilada	

### **GEL DE AGAROSA AL 3%**

Agarosa	1.5 g
Buffer TBE 1X	50 mL
Bromuro de etidio	0.5mg por mL.

## **ANEXO 7.- SEPARACIÓN DE LINFOCITOS A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA.**

A partir de una muestra de 10 ml de sangre periférica obtenida con heparina, se separan las células mononucleadas (linfocitos y monocitos) por gradiente de densidad (Anexo 3). Hacer un cultivo de 3 horas para permitir la adhesión de los monocitos en la superficie del frasco de cultivo.

Las células se colocan en un frasco de cultivo con medio de cultivo RPMI1640 y se mantienen 3 horas a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub>, para permitir la adhesión de monocitos en la superficie del frasco (Freshney I, 1987). Se colecta el sobrenadante con los linfocitos en suspensión, y se someten a un análisis citomorfológico con tinción de Wright. Se corrobora que más del 90% de las células sean linfocitos. Los linfocitos en suspensión se congelaron en las mismas condiciones que las muestras de médula ósea para realizar el estudio de expresión de las isoformas por RT-PCR.

### ANEXO 8.- Características clínicas de los 30 pacientes con LAL

	EDAD	GENERO	LEUCOCITOS X 10 <sup>9</sup> /L	BLASTOS %	INMUNOFENOTIPO
1	5a	M	5.9	100	pre-B
2	11a	F	15.3	94	pre-B
3	12a	M	410.6	66	T
4	4a	M	13.5	38	pre-B
5	12a	F	13.2	98	pre-B
6	8m	F	51.7	90	pre-B
7	1a 2m	M	4.2	76	pre-B
8	10a	M	30.0	100	pre-B
9	2a	M	37.8	90	pre-B
10	3a	F	21.0	80	pre-B
11	16a	M	20.5	74	pre-B
12	9a	M	1.0	90	pre-B
13	14a	F	198.0	94	pre-B
14	16a	M	123.0	80	pre-B
15	4a	F	1.1	78	pre-B
16	?	F	?	91	pre-B
17	11a	M	4.3	84	pre-B
18	10a	F	7.0	89	pre-B
19	5a8m	F	32.3	90	pre-B
20	9a	F	6.1	86	pre-B
21	2a	F	4.4	84	pre-B
22	8m	F	102.0	99	pre-B
23	10a	M	25.3	100	pre-B
24	5a	F	1.7	96	pre-B
25	1a5m	M	93.4	82	T
26	3a	F	5.8	70	pre-B
27	3a5m	M	4.8	90	pre-B
28	7a	M	74.8	92	pre-B
29	13a	F	24.7	90	pre-B
30	8m	M	10.9	44	pre-B

a= años; m= meses; F=femenino; M= masculino; ?= dato desconocido

## ANEXO 9.- Marcadores de inmunofenotipo al diagnóstico de los pacientes con LAL.

	HLA-DR	TdT	CD 10	CD 19	CD 20	CD 22	CD 79a	λ	κ	μs	μc	CD 2	CD 5	CD 7	CD 3	CD 56	CD 13	CD 14	CD 33	CD 41	CD 42	MPO	CD 61
1	42	29	78	58	13	29	33	0	0	X	X	14	12	9	0	X	0	0	X	0	0	0	X
2	35	74	98	94	13	15	50	0	0	0	0	2	4	2	0	X	23	2	4	0	0	2	X
3	57	67	60	0	0	18	2	8	0	X	X	79	98	47	43	X	4	0	X	18	6	8	X
4	80	52	67	37	15	51	72	0	0	0	0	18	10	7	18	X	0	0	0	0	0	1	X
5	12	80	96	84	9	87	80	1	0	0	0	12	3	3	2	X	0	0	0	0	7	10	X
6	8	80	56	47	2	0	74	0	0	0	18	2	1	0	3	X	0	0	X	0	0	2	X
7	40	80	40	48	19	56	49	12	0	0	2	14	12	3	3	X	3	0	X	6	4	3	X
8	95	29	92	97	10	0	51	0	0	0	11	10	3	8	20	0	9	X	2	0	0	2	X
9	91	X	82	88	41	97	65	0	5	2	X	8	2	X	3	0	2	X	5	0	0	1	X
10	80	86	92	91	64	35	94	0	0	6	0	11	5	8	4	X	0	0	0	0	0	0	X
11	75	88	74	68	34	17	97	0	2	1	1	2	2	1	3	50	18	0	0	0	0	1	X
12	60	95	62	52	8	X	22	1	0	28	17	2	2	8	1	X	2	1	0	3	4	2	X
13	3	97	97	98	95	X	98	0	0	1	0	0	2	2	1	0	79	0	24	2	0	28	X
14	36	54	74	98	X	70	42	0	0	16	0	0	3	2	5	X	0	0	0	0	0	0	X
15	5	67	12	76	X	5	48	6	0	4	12	0	2	4	0	X	58	X	0	0	0	10	X
16	22	87	43	93	X	44	76	1	0	5	1	X	4	3	4	X	4	0	1	0	1	6	X
17	15	37	46	67	X	39	50	0	0	0	0	X	6	2	X	X	0	2	0	3	0	1	X
18	6	27	69	36	30	33	53	1	0	0	1	2	5	15	4	X	7	X	1	41	13	4	X
19	6	28	34	63	10	16	70	6	0	0	0	X	33	24	0	X	3	X	0	0	0	0	X
20	2	90	76	91	19	92	87	8	0	6	1	X	5	4	5	X	1	0	0	10	5	6	X
21	1	44	55	27	0	13	52	0	0	0	4	26	26	27	28	0	19	0	1	2	2	0	0
22	45	12	37	80	11	0	81	0	1	2	14	10	14	13	15	X	31	0	0	0	1	9	X
23	2	47	96	79	2	0	55	1	0	1	4	0	2	1.5	0	0	1	0	0	0	0	3	X
24	20	34	74	84	14	2	77	0	0	1	3	10	12	11	16	0	7	0	0	0	0	0	0
25	3	14	30	0	0	0	50	6	0	1	3	10	12	11	91	X	0	0	2	0	0	4	X
26	51	37	43	56	43	38	54	0	0	0	0	0	35	36	29	X	3	0	0	2	0	0	X
27	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
28	8	70	92	95	18	0	93	0	0	0	0	4	4	5	4	0	2	0	0	52	22	1	23
29	47.7	X	43.6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	0	X	X	X	X	0	X	X	X	X
30	X	28	14	63	X	79	45	X	X	1	4	X	16	6	1	0	0	0	0	0	0	5	0

Las celdas sombreadas representa los porcentajes de positividad para los marcadores, tomando el criterio de positivo= >25%, la X indica que no se realizó el estudio.

**ANEXO 10.- RESULTADOS DE CARIOTIPO Y FISH.**

	<b>CARIOTIPO</b>	<b>FISH TEL/AML1</b>
1	56-57,XY,+8,+14,+18,+21inc [cp5]/46,XY[6]	Nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x5)[103/200]/(ETV6x2) (RUNX1x4)[56/200]/(ETV6x2)(RUNX1x3)[2 /200]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[39/200]
2	46,XX[20]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
3	46,XY[cp7]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
4	44,XY,der(1)t(1;?8)(p22;q21),- 7,der(9)t(1;9)(p32;p13),- 16[11]/44,idem,del(17)(p13)[3]/4 5,idem,+mar[3]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
5	56- 58,XX,+4,+6,+18,+21inc[12]/46, XX[1]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x4)[180/200](ETV6x2) (RUNX1x3)[4/200]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[16 /200]
6	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[4]/46,XX [9]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
7	45,XY,der(9)t(9;20)(p11;q11),- 20[4]/46,XY[16]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
8	46,XY,add(4)(q31),add(21)(q22) [21]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x5)[46/71](ETV6x2)(R UNX1x4)[12/71]/(ETV6x2)(RUNX1x3)[3/71] (ETV6x2)(RUNX1x6)[1/71]/(ETV6x2)(R UNX1x2)[10/71]
9	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[9]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
10	NO	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x3)[155/200]/(ETV6x2) (RUNX1x2)[45/200]
11	46,XY,del(20)(q11)[15]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
12	50- 53,XY,dup(1)(q31q32),+del(6)(q ?),+14,+21inc[18]/46,XY[4]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x4)[329/357](ETV6x2) (RUNX1x3)[11/357]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[1 7/357]
13	46,XX,add(22)(q13)[11]/46,XX[1 ]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
14	45,XY,der(9)t(9;17)(p22;q21),- 17,der(19)t(1;19)(q23;p13)[9]/46 ,XY[1]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
15	46,XX,t(1;19)(q23;p13)[10]/46,X X[5]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]

	<b>CARIOTIPO</b>	<b>FISH TEL/AML1</b>
16	46,XX[20]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
17	NO	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x4)[133/200](ETV6x2)(RUNX1x5)[34/200]/(ETV6x4)(RUNX1x4)[1/200]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[32/200]
18	46,XX,add(9)(q34)[3]/46,XX[8]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]
19	47,XX,der(7)t(7;12)(p22;q13),del(9)(p13),-12,+mar1,+mar2[13]	nuc ish(ETV6x1)(RUNX1x3)(ETV6conRUNX1x1)[85/200]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[115/200]
20	47,XX,del(7)(p?11.1),add(21)(q22.3),+mar[6]/47,XX[8]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x5)[200/213]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[200/213]
21	46,XX[17], se observó una metafase con 47 cromosomas	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x4)(ETV6conRUNX1x2)[160/200]/(ETV6x2)(RUNX1x3)(ETV6conRUNX1x1)[1](ETV6x2)(RUNX1x2)[39/200]
22	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[10]/46,XX[2]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[372]
23	47,XY,i(7)(p10),+i(7)(q10),der(19)t(1;19)(q23;p13)[14]/46,XY[1]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[204]
24	46,XX,+10,add(12)(p13),-13[15]	nuc ish(ETV6x1)(RUNX1x3)(ETV6conRUNX1x1)[175/200]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[25/200]
25	NO	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[209]
26	46,XX,del(22)(q13)[9]/46,XX[4]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x3)[15/205]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[190/205]
27	NO	nuc ish(ETV6x1)(RUNX1x3)(ETV6conRUNX1x1)[160/203]/(ETV6x2)(RUNX1x3)(ETV6conRUNX1x1)[4/203]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[39/203]
28	50-54,XY,+X,+5,+6,+21,+mar,inc[cp9]/46,XY[3]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x3)[181/200]/(ETV6x2)(RUNX1x4)[2/200]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[17/200]
29	46,XX[20]	nuc ish(ETV6x2)(RUNX1x3)[50/201]/(ETV6x4)(RUNX1x4)[18/201]/(ETV6x2)(RUNX1x2)[133/201]
30	46,XY,inv(2)(p21q11.2),9qh+[4]/46,XY[11]	nuc ish(ETV6,RUNX1)x2[200]

## 12.- REFERENCIAS

- Antonarakis S. 1998. 10 years of genomics, chromosome 21, and Down syndrome. *Genomic*, 51:1-16.
- Ast G. 2004. How did alternative splicing evolve? *Nature Reviews Genetics*, 5:773-782.
- Bae S, Ogawa E, Maruyama M, Oka H, Satake M, Shigesada K, Jenkins N, Gilbert D, Copeland N, Ito Y. 1994. *PEBP2 $\alpha\beta$ /mouse AML1* consists of multiple isoforms that possess differential transactivation potentials. *Molecular and Cellular Biology*, 14:3242-3252.
- Berger R. 1997. Acute lymphoblastic leukemia and chromosome 21. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1:8-12.
- Chimienti G, Alaibac M, Marzullo F, Carbone A, Pepe G. 2000. The expression pattern of the AML1 gene in Non-Hodgkin's B-cell lymphomas and normal B lymphocytes. *Blood Cell, Molecules, and Disease*, 26:186-192.
- Choi S, Oba T, Callander N, Jelinek D, Roodman D. 2003. AML1A and AMLB regulation of MIP-1a expression in multiple myeloma. *Blood*, 101:3778-3783.
- Dufresne-Zacharia M, Dahmane N, Theophile D, Orti R, Chettouh Z, Sinet P, Delabar J. 1994. 3.6-Mb genomic and YAC physical map of the Down syndrome chromosome region on chromosome 21. *Genomics*, 19:462-469.

- Freshney, I. Specialized Techniques. En: Freshney I. editor. Culture of animal cell. Alan R. Liss, Inc, EUA: p 318.
- Giegerich, F. Meyer, C. Schleiermacher, 2007, ISMB-96, Proceedings of the Fourth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology. Universidad de Bielefeld, Alemania. <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/old.html>
- Gurbuxani S, Vyas P, Crispino J. 2004. Recent insights into the mechanisms of myeloid leukemogenesis in Down syndrome. Blood, 103:399-406.
- Gutiérrez-Angulo M, González-García J, Meza-Espinoza J, Picos-Cárdenas V, Esparza-Flores M, López-Guido B, Rivera H. 2005. Increased expression of AML1-a and acquired chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Hematological Oncology, 22:1-6.
- Harewood L. Robinson H, Harris R, Jabbar M, Obaidi A, Jalali LR, Martineau M, Moorman AV, Sumption N, Richards S, Mitchell C, Harrison CJ. 2003. Amplification of AML1 on a duplicated chromosome 21 in acute lymphoblastic leukemia: a study of 20 cases. Leukemia, 17:547-553.
- Head D, Pui C-H. 1999. Diagnoses and Classification. En: Pui C-H, editor. Childhood leukemias. Cambridge University Press. EUA: p 19-37.
- Hoelzer D, Gökbuget N. Acute lymphocytic leukemia in adults. En: Hoffman R, Benz E, Shattil S, Furie B, Cohen H, Silberstein L, McGlave P, editores. Hematology, Basic principles and practice. Elsevier Churchill Livingstone. EUA: p 1175-1194.

- Hunter A. 2005. Down Syndrome. En: Cassidy SB y Allanson JE editores. Management of genetic syndromes. Wiley. EUA:p. 191-210.
- Ito Y. 1999. Molecular basis of tissue-specific gene expression mediated by the Runt domain transcription factor PEBP2/CBF. *Genes to Cells*, 4:685-696.
- Kurokawa M, Hirai H. 2003. Role of *AML1/Runx1* in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer Science*, 94:841-846.
- Levanon D, Negreanu V, Bernstein Y, Bar-Am I, Avivi L, Groner Y. 1994. *AML1*, *AML2* and *AML3*, the human members of the runt domain gene-family: cDNA structure, expression, and chromosomal localization. *Genomics*, 23:425-432.
- Levanon D, Glusman G, Bangsow T, Ben-Asher E, Male DA, Avidan N, Bangsow C, Hattori M, Taylor TD, Taudien S, Blechschmidt K, Shimizu N, Rosenthal A, Sakaki Y, Lancet D, Groner Y. 2001. Architecture and anatomy of the genomic locus encoding the human leukemia-associated transcription factor *RUNX1/AML1*. *Gene*, 262:23-33.
- Mikhail F, Serry K, Hatem N, Mourad Z, Farawela H, El Kaffash D, Coignet L, Nucifora G. 2002. *AML1* gene over-expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 16:658-668.
- Miyoshi H, Ohira M, Shimizu K, Mitani K, Hirai H, Imai T, Yokoyama K, Soeda E, Ojki M. 1995. Alternative splicing and genomic structure of the *AML1* gene involved in acute myeloid leukemia. *Nucleic Acids Research*, 23:2762-2769.

- Nanjundan M, Zhang F, Schmandt R, Smith-McCune K, Mills GB. 2007. Identificación of a novel splice variant of AML1b in ovarian cancer patients conferring loss of wild-type tumor suppressive functions. *Oncogene*, 26:2574-2584.
- Otto F, Lubbert M, Stock M. Upstream and downstream targets of RUNX proteins. 2003. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89:9–18.
- Penther D, Preudhomme C, Talmant P, Roumier C, Godon A, Méchinaud F, Milpied N, Bataille R, Aver-Loiseau H. 2002. Amplification of *AML1* gene is present in childhood acute lymphoblastic leukemia but not in adult, and is not associated with *AML1* gene mutation. *Leukemia*, 16:1131-1134.
- Pérez-Vera P, Montero-Ruíz O, Frías S, Ulloa-Avilés V, Cárdenas-Cardós R, Paredes-Aguilera R, Rivera-Luna R, Carnevale A. 2005. Detection of *ETV6* and *RUNX1* gene rearrangements using the FISH method in mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: Experience at a single institution. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 162:140–145.
- Pérez-Vera P, Montero-Ruíz O. 2006. Citogenética en leucemias. En: Rivera-Luna R, editor. *Hemato-oncología pediátrica, principios generales*. Editores de Textos Mexicanos, México: p 179-191.
- Raimondi S, Pui C, Head D, Behm F, Privitera E, Roberson P, Rivera G, Williams D. 1991. Trisomy 21 as a sole acquired chromosomal abnormality in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 6:171-175.

- Reeves R, Baxter L, Richtsmeier J. 2001. Too much of a good thing: mechanisms of gene action in Down syndrome. *Trends in Genetics*, 17:83-88.
- Rivera-Luna R. 2006. Conceptos epidemiológicos del cáncer infantil en México. En: Rivera Luna R, editor. *Hemato-oncología pediátrica, principios generales*. Editores de Textos Mexicanos, México: p 1-16.
- Roumier C, Fenaux P, Lafage M, Imbert M, Eclache V, Preudhomme C. 2003. New mechanisms of *AML1* gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia*, 17:9-16.
- Rowley J. 1999. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Seminars in Hematology*, 36:59-72.
- Ruíz-Argüelles G, McArthur J. 2003. Leucemias agudas. En: Ruíz-Argüelles G, editor. *Fundamentos de Hematología*. Editorial Médica Panamericana, México: p 225-245.
- Sadosky T, Newman J, Dibb J. 2004. Exon junction sequences as cryptic splice sites implications for intron origin. *Current Biology*, 14:505-509.
- Shaffer L, Tommerup N. 2005. En: *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. Editorial Karger, Switzerland.
- Shaw G, Kamen R. 1986. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, 46:659-667.
- Song W, Sullivan M, Legare R, Hutchings S, Tan X, Kufrin D, Ratajczak J, Resende I, Haworth C, Hock R, Lou M, Felix C, Roy D, Busque L, Kurnit D,

- Willman C, Gewirtz A, Speck N, Bushweller J, Li F, Gardiner K, Poncz M, Maris J, Gilliland D. 1999. Haploinsufficiency of *CBFA2* causes familial thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. *Nature Genetics*, 23:166-175.
- Soulier J, Trakhtenbrot L, Najfeld V, Lipton JM, Mathew S, AvetLoiseau H, De Braekeleer M, Salem S, Baruchel A, Raimondi SC, Raynaud SD. 2003. Amplification of band q22 of chromosome 21, including *AML1*, in older children with acute lymphoblastic leukemia: an emerging molecular cytogenetic subgroup. *Leukemia*, 17:1679-1682.
  - Srebrow A, Kornblihtt A. 2006. The connection between splicing and cancer. *Journal of Cell Science*, 119:2635-2641.
  - Tanaka T, Tanaka K, Ogawa S, Kurokawa M, Mitani K, Nishida J, Shibata Y, Yazaki, Y, Hirai H. 1995. An acute myeloid leukemia gene, *AML1*, regulates hemopoietic myeloid cell differentiation and transcriptional activation antagonistically by two alternative spliced forms. *European Molecular Biology Organization Journal*, 14:341-350.
  - Telfer JC, Rothenberg EV. 2001. Expression and function of a stem cell promoter for the murine *CBFalpha2* gene: distinct roles and regulation in natural killer and T cell development. *Developmental Biology*, 299:363-382.
  - Warren A, Bravo J, William R, Rabbitts T. 2000. Structural basis for the heterodimeric interaction between the acute leukaemia-associated

transcription factors AML1 and CBF $\beta$ . *European Molecular Biology Organization Journal*, 19:3004-3015.

- Williams D, Harris A, Williams K, Brosius M, Lemonds W. 1984. A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 13:239-247.
- Yabagida M, Osato M, Yamashita N, Liqun H, Jacob B, Wu F, Cao X, Nakamura T, Yokomizo T, Takahashi S, Yamamoto M, Shigesada K, Ito Y. 2005. Increased dosage of Runx1/AML1 acts as a positive modulator of myeloid leukemogenesis in BXH2 mice. *Oncogene*, 24:4477-4485.
- Zhang Y, Bae S, Huang G, Fu Y, Lu J, Ahn M, Kanno Y, Kanno T, Ito Y. 1997. A novel transcript encoding an N-Terminally truncated AML1/PEBP2 $\alpha$ B protein interferes with transactivation and blocks granulocytic differentiation of 32Dcl3 myeloid cells. *Molecular and Cellular Biology*, 17:4133-4145.

