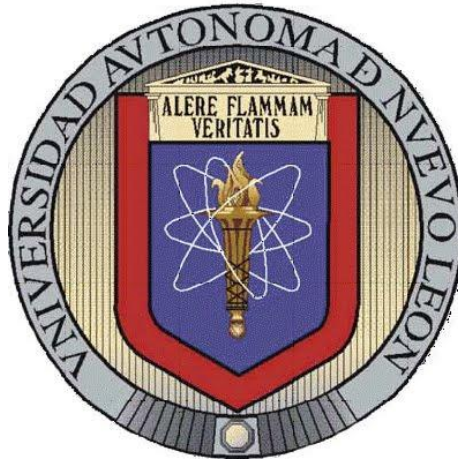


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE GENES REGULADOS POR microRNAs,
INVOLUCRADOS EN LA LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA TIPO B (LLA-B)**

Por

M.C. Claudia Maribel Luna Aguirre

**Como requisito parcial para obtener el grado de Doctorado en Ciencias
con orientación en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

Enero 2013

Determinación de genes regulados por microRNAs, involucrados en la leucemia Linfocítica Aguda tipo B (LLA-B).

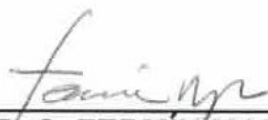
Aprobación de la Tesis:



DR. C. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Director de Tesis



DR. med. CARLOS JAIME PÉREZ
Co-Director



DR. C. FERMÍN MAR AGUILAR
Comisión de Tesis



DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ
Comisión de Tesis



DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ
Comisión de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Ortiz López y la co-asesoría del Dr. Fermín Mar Aguilar.



AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Rocío Ortíz López, por su paciencia, apoyo y comprensión. Gracias Rocío!

Al Dr. Fermín Mar Aguilar, por proporcionar la idea principal de este proyecto, la aventura de trabajar en el incipiente mundo de los microRNAs.

A la Dra. Herminia Mtz. Rdz., por su confianza y determinación en que concluyera este trabajo.

Al personal del Servicio de Hematología del Centro Universitario Contra el Cáncer (CUCC) del Hospital Universitario: QCB Rosario Salazar, QCB Nereyda, QCB Odra, y en especial a la QCB Angélica Peña; a los residentes Jorge Cuervo, Ramón Mtz., Antonio López, Manuel, Iliana, Marcela y Laura, quienes colaboraron en la obtención de las muestras de sangre de los pacientes con LLA.

Al Dr. Alfredo Hidalgo (INMEGEN, México, DF), por proporcionarme un lugar en su laboratorio para la realización de la RT-qPCR utilizando las placas TLDA.

A la M.C. Sandra Romero (INMEGEN, México, DF), por su valiosa asesoría en el desarrollo de la técnica de RT-qPCR utilizando las placas TLDA.

A la M.C. Carol, (INMEGEN, México, DF), por su apoyo en la utilización del termociclador 7900 HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystem).

A Vicky, por estar siempre dispuesta a ayudar en todo momento.

A Mauricio Salinas, por el ánimo brindado y apoyo en la tesis.

A Arturo Quintanilla, por su amistad y por recordarme a cada instante que la vida es “alegrííííí”, además de su valiosa ayuda y colaboración en la realización de la tesis.

A mi amiga Idalia, por compartir conmigo agradable e irónicamente la amargosidad que trastocó mi vida durante el trayecto de este trabajo.

A la Dra. Margarita Mtz. Fierro por su valiosa aportación.

A Javier Saucedo, por su solidaridad y confianza.

A Nadia López, por su apoyo y colaboración en la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada.

DEDICATORIA

A Dios, la puerta que jamás se cierra, la luz que nunca se extingue, el ser que siempre nos acompaña.

A mis Padres: Salvador Luna López y Sanjuana Elvia Aguirre Arriaga, por creer en mi y estar presentes en todo momento.

A mis hijos Lucía y Alejandro Mar Luna, perdón por las horas restadas, gracias por compartirme su alegría y su corazón.

A mi primo Laco, por recordarme el sentido de la vida, TAp.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La leucemia en México.....	1
1.2. Leucemia Linfocítica Aguda.....	2
1.2.1. Patogénesis.....	2
1.2.2. Manifestaciones clínicas.....	3
1.2.3. Diagnóstico.....	4
1.2.4. Pronóstico.....	6
1.2.5. Tratamiento.....	7
1.2.6. Genética Molecular.....	9
1.3. Antecedentes Directos.....	10
1.4. MicroRNAs.....	12
1.4.1. Herramientas bioinformáticas.....	13
1.4.2. Biogénesis y función de los miRNAs.....	14
1.4.3. Regulación de la expresión de genes por miRNAs.....	17
1.4.4. MiRNAs como oncogenes y genes supresores de tumor.....	19
1.4.5. MiRNAs en la hematopoyesis normal.....	20
1.4.6. MiRNAs en desórdenes hematológicos.....	20
1.4.7. MiRNAs circulantes.....	23
1.4.8. Aplicación potencial clínica y terapéutica de miRNAs.....	25
2. JUSTIFICACIÓN.....	28
3. HIPÓTESIS.....	29
4. OBJETIVOS.....	29
4.1. Objetivo general.....	29
4.2. Objetivos específicos.....	29
5. ESTRATEGIA GENERAL.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1. Características del estudio.....	31
6.2. Obtención de muestras.....	31
6.3. Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con LLA.....	32
6.3.1. Extracción de RNA.....	32
6.3.2. Síntesis del DNA complementario (DNAc).....	33
6.3.3. Pre-amplificación.....	34
6.3.4. PCR tiempo real utilizando placas TaqMan Low Density Array (TLDA).....	35
6.3.5. Análisis de datos.....	36
6.4. Selección y validación de miRNAs por RT-qPCR.....	36

6.4.1 Extracción de RNA total con Trizol.....	36
6.4.2 Validación de miRNAs mediante RT-qPCR.....	37
6.4.3 Análisis de datos.....	39
6.5. Determinación en cultivo celular (SUP-B15) de los genes que son regulados.....	40
por los miRNAs seleccionados.....	40
6.5.1. Valoración de los niveles de expresión de los miRNAs seleccionados en SUP-B15.....	41
6.5.2. Estandarización de las condiciones de transfección de miRNAs en SUP-B15.....	41
6.5.3. Transfección del los miRNAs seleccionados en la línea celular SUP-B15.....	47
6.5.4. Análisis de expresión de genes regulados por miRNAs mediante microarreglos.....	48
6.6. Vías de señalización en la que participan los genes regulados por los miRNAs y selección de miRNAs involucrados en la leucemogénesis con posible utilidad clínica.....	54
7. RESULTADOS.....	55
7.1. Obtención de muestras.....	55
7.2. Perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con LLA.....	55
7.2.1. Extracción de RNA total.....	55
7.2.2. RT-qPCR utilizando placas TLDA.....	55
7.2.3. Análisis de datos.....	56
7.3. Selección de miRNAs para su validación.....	60
7.4. Validación de los miRNAs seleccionados mediante RT-qPCR.....	63
7.4.1. Extracción de RNA total con trizol.....	63
7.4.2. Validación de miRNAs mediante RT-qPCR.....	63
7.4.3. Análisis de datos.....	64
7.5. Determinación en cultivo celular (SUP-B15) de los genes que son regulados por los miRNAs seleccionados.....	68
7.5.1. Valoración de los niveles de expresión de los miRNAs seleccionados en SUP-B15.....	68
7.5.2. Estandarización de las condiciones de transfección de miRNAs en SUP-B15.....	68
7.5.3. Transfección del los miRNAs seleccionados en la línea celular SUP-B15.....	69
7.5.4. Análisis de expresión de genes regulados por miRNAs mediante microarreglos.....	70
7.6. Vías de señalización y selección de miRNAs involucrados en la leucemogénesis con posible utilidad clínica.....	77
8. DISCUSION.....	79
9. CONCLUSIONES.....	86
10. PERSPECTIVAS.....	88

REFERENCIAS

APÉNDICE

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Fig. 1. Hematopoyesis	1
Fig. 2. Linfoblastos en sangre periférica.....	2
Fig. 3. Biogénesis de los miRNAs.	16
Fig. 4. Localización genómica de los miRNAs.	17
Fig. 5. MiRNAs desregulados en cáncer.	18
Fig. 6. MiRNAs como oncogenes y genes supresores de tumor.....	19
Fig. 7. Estrategias terapéuticas contra el cáncer basadas en miRNAs.	26
Fig. 8. Estrategia general.....	30
Fig. 9. Procedimiento general para la obtención del perfil de microRNAs.	32
Fig. 10. Estrategia de selección y validación de miRNAs.	37
Fig. 11. Eficiencia de transfección.....	44
Fig. 12. Curva de amplificación utilizando una placa TLDA.....	56
Fig. 13. Gráficas de dispersión.....	57
Fig. 14. Gráficas de expresión de miRNAs candidatos a genes de referencia.....	59
Fig. 15. Gráficas de volcán de miRNAs diferencialmente expresados en las placas A y B.....	60
Fig. 16. Amplificación de la curva de rango dinámico.....	63
Fig. 17. Curvas de rango dinámico de miRNAs.	65
Fig. 18. Gráficas para determinar la validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$	66
Fig. 19. Gráficas de expresión relativa de miRNAs validados.	67
Fig. 20. Curvas ROC.....	67
Fig. 21. Gráfica de dispersión y dendograma de SUP-B15 transfectada con miRNAs.	70
Fig. 22. Mapa de calor.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla I. Factores pronósticos en LLA [9].....	8
Tabla II. Genes predictivos de respuesta al tratamiento (Tesis de maestría, Garza-Veloz 2009).....	11
Tabla III. Herramientas computacionales para miRNAs.....	15
Tabla IV. MiRNAs como oncogenes y genes supresores de tumor en leucemias	21
Tabla V. MiRNAs desregulados en diferentes estudios de LLA.	22
Tabla VI. MiRNAs en el desarrollo terapéutico.....	27
Tabla VII. Reactivos de RT para la obtención de DNAc a utilizar en las placas TLDA.....	34
Tabla VIII. Programa de RT para la obtención de DNAc a utilizar en las placas TLDA.	34
Tabla IX. Reactivos de pre-amplificación.....	35
Tabla X. Programa de pre-amplificación.....	35
Tabla XI. Reactivos para la qPCR utilizando las placas TLDA.	36
Tabla XII. Reactivos para la RT de miRNAs individuales	38
Tabla XIII. Programa de RT para miRNAs individuales.....	38
Tabla XIV. Reactivos para la qPCR de miRNAs individuales.....	39
Tabla XV. Programa de qPCR de miRNAs individuales.....	39
Tabla XVI. Parámetros de transfección reversa con SiPORT <i>NeoFX</i>	43
Tabla XVII. Pulsos para la transfección por electroporación en SUP-B15	43
Tabla XVIII. Reactivos de RT para RNAm de SUP-B15.....	46
Tabla XIX. Programa de RT para RNAm de SUP-B15.....	46
Tabla XX. Reactivos empleados en los ensayos de qPCR para RNAm.....	47
Tabla XXI. Programa de qPCR para RNAm.	47
Tabla XXII. A) Diluciones seriadas del Stock RNA Control Poly-A.....	49
Tabla XXIII. Reactivos para síntesis de 1ª cadena de DNAc.....	49
Tabla XXIV. Reactivos para síntesis de 2ª cadena de DNAc	50
Tabla XXV. Mezcla de IVT	50
Tabla XXVI. Mezcla de reactivos para la purificación del RNAa	51
Tabla XXVII. Mezcla de reactivos para la fragmentación del RNAa	52
Tabla XXVIII. Reactivos para la hibridación en arreglos con formato 49 (Standard)/64	53
Tabla XXIX. Perfil de expresión de miRNAs obtenido de las placas TLDA	61
Tabla XXX. Selección de miRNAs para validación	62
Tabla XXXI. Cuantificación relativa de miRNAs en la línea celular SUP-B15	68
Tabla XXXII. Transfección por electroporación.....	69

Tabla XXXIII. Genes diferencialmente expresados en SUP-B15 transfectada con anti-miR-511, anti-miR-34a y pre-miR-223.....	73
Tabla XXXIV. Genes diferencialmente expresados en SUP-B15 transfectada con anti-miR-511 y anti-miR-34a vs células transfectadas con pre-miR-223.	74
Tabla XXXV. Análisis funcional de agrupación de genes relacionados con procesos biológicos.....	75
Tabla XXXVI. Asociación gen-enfermedad (OMIM).....	77
Tabla XXXVII. Vías KEGG en las que participan los genes alterados por anti-miR-511, anti-miR-34 y pre-miR-223.....	78

NOMENCLATURA

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
μ	mu
μl	Microlitros
μM	Micromolar
3'UTR	Extremo 3' no traducible
AMOs	Oligonucleótidos anti-miRNAs
ATCC	American Type Culture Colection
AUC	Área bajo la curva
CA	California
CAGRs	Regiones Genómicas Asociadas a Cáncer
CD	Grupos de Diferenciación
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Bióxido de carbono
Conc.	Concentración
Ctr.	Control
CUCC	Centro Universitario Contra el Cáncer
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
DEPC	Dietil pirocarbonato
der.	Derecha
DGCR8	DiGeorge síndrome Critical Región 8
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNAc	DNA complementario
dNTPs	Desoxiribonucleósidos trifosfatados
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
E	Eficiencia de amplificación
EDTA	Ácido Etilendiaminotetracético
EMR	Enfermedad Mínima Residual
FAB	Franco Americano Británico
FBS	Suero fetal bovino
FC	Factor de citotoxicidad
Fig.	Figura
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia
GDP	Glucosa difosfato
GTP	Glucosa trifosfato
HDL	Lipoproteínas de alta densidad

hrs	horas
IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
ITD	Duplicación Interna en Tándem
IVT	Transcripción in vitro
izq.	Izquierda
kb	kilobase
kd	kilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
L	Litro
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
LMA	Leucemia Mielocítica Aguda
LMC	Leucemia Mielocítica Crónica
LNAs	Locked Nucleic acid Antisense
LOH	Pérdida de heterocigocidad
<i>m</i>	Pendiente de la recta
min	Minutos
miR	MicroRNA
miRNA*	microRNA antisentido
miRNAs	microRNAs
ml	Militros
mM	Milimolar
MN	Mononucleares
mRNA	RNA mensajero
MVB	Cuerpos multivesiculares
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
nmol	Nanomoles
nt	Nucleótidos
OG	Oncogenes
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
P/S	Penicilina/Estreptomicina
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Ph	Philadelphia
pH	Logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno
pM	Picomolar
qPCR	PCR cuantitativa
<i>r</i>	Coefficiente de correlación de Pearson
ref.	Referencia
RNA	Ácido ribonucleico
RNAa	RNA amplificado
ROC	Operating Characteristics Curves
rpm	Revoluciones por minuto

RQ	Cuantificación relativa
rRNA	RNA ribosomal
RT	Transcripción Reversa
seg	Segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
t	Translocación
TLDA	TaqMan Low Density Array
TSG	Genes Supresores de Tumor
tx	Tratamiento
U/ μ l	Unidades por microlitro
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UDG	Uracil-DNA Glycosilasa
Vol.	Volumen

RESUMEN

Claudia Maribel Luna Aguirre
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Diciembre de 2012

Título del estudio: **Determinación de genes regulados por microRNAs, involucrados en la Leucemia Linfocítica Aguda tipo B (LLA-B)**

Número de páginas: 114

Candidata al grado de Doctorado en
Ciencias con Especialidad en Biología
Molecular e Ingeniería Genética

Área de estudio: Biología Molecular

Objetivo y Método del estudio. La LLA presenta una alta incidencia y mortalidad en México. Los esfuerzos para el estudio de las leucemias se enfocan en la búsqueda de biomarcadores pronósticos de respuesta al tratamiento. En nuestro laboratorio se encontró mediante expresión génica, 13 genes asociados con la sobrevida de pacientes con LLA. Las secuencias de algunos de estos genes no mostró alteraciones que pudieran justificar los cambios en su expresión por lo que se decidió abordar otros mecanismos de regulación como los microRNAs (miRNAs), que se han visto involucrados en la regulación de procesos celulares, así como en la oncogénesis, incluyendo la LLA, sin embargo los perfiles de expresión de miRNAs varían entre los diferentes estudios y no se han analizado miRNAs circulantes en LLA, siendo que éstos pueden tener potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como blancos terapéuticos, por lo que nuestro objetivo fue determinar el perfil de expresión de miRNAs en el plasma de pacientes con LLA y su interacción con genes asociados a sobrevida. Se realizó la extracción del RNA total y el perfil de expresión de 667 miRNAs mediante RT-qPCR (Plataforma Megaplex) a partir de 13 muestras y 5 controles. Se determinaron 2 miRNAs como genes de referencia y posteriormente se seleccionaron y validaron 6 miRNAs en 39 muestras y 7 controles por RT-qPCR. Se determinó la sensibilidad y especificidad de éstos miRNAs mediante curvas ROC. Se transfectaron 3 miRNAs (miR-511, miR-34a y miR-223) en células SUP-B15 y se determinaron los genes afectados utilizando microarreglos de expresión, con los cuales se obtuvieron *in silico* los procesos biológicos y vías de señalización comunes, relacionados con leucemogénesis.

Contribuciones y Conclusiones.

Este es el primer estudio que analiza miRNAs circulantes en pacientes con LLA en el cual se determinaron 2 miRNAs estables (miR-106a y miR-26b) como genes de referencia, los cuales se utilizaron para obtener el perfil de expresión de miRNAs circulantes utilizando las placas TLDA. De los miRNAs diferencialmente expresados, 20 ya se han encontrado desregulados en células MN leucémicas, de estos, 18 en LLA, que pueden utilizarse como biomarcadores de ERM, previa validación, después del tratamiento y disminución de células leucémicas. De los 18 miRNAs desregulados, ya reportados, se seleccionaron 5 (miR-34a, miR-222, miR-26a, miR-221, y miR-223) y uno, miR-511, que no ha sido reportado, los cuales se unen (*In silico*) a genes asociados a sobrevida, para su validación y se obtuvo una diferencia de expresión significativa de las muestras con respecto a los controles ($p=6 \times 10^{-6}-0.04$). MiR-511 y miR-34a presentaron una sensibilidad y especificidad del 100%, lo que los hace buenos candidatos como biomarcadores asociados a LLA. La transfección de miR-511, miR-34a y miR-223 da por resultado un grupo de genes co-regulados directa o indirectamente por estos miRNAs, la función de algunos de estos genes, así como los procesos biológicos y vías de señalización comunes en las que están implicados *in silico*, corresponden a procesos celulares normales que al alterarse desencadenan procesos neoplásicos, o bien, están directamente relacionados con algún tipo de cáncer incluyendo LLC-B, LMA, LMC y LLA.

FIRMA DEL ASESOR:



1. INTRODUCCIÓN

1.1. La leucemia en México

Las leucemias son un grupo heterogéneo de enfermedades que se distinguen por infiltración de células neoplásicas del sistema hematopoyético a la médula ósea, sangre y otros tejidos. [1]

La importancia de las enfermedades hemato-oncológicas radica en que algunas de ellas presentan elevada incidencia y mortalidad en población infantil o adulta joven. Tal es el caso de las leucemias, en México en el año 2002 ocuparon el segundo lugar en mortalidad, por neoplasias malignas en niños de 5 a 14 años de edad, con una tasa de 2.71 por 100,000 habitantes. De igual manera las enfermedades hemato-oncológicas resultan importantes por el incremento observado en sus tendencias durante las últimas décadas. Del total de casos nuevos con diagnóstico histopatológico de cáncer, el linfoma no Hodgkin y la leucemia linfoide representaron el 8.2%. Del total de defunciones registradas para el año 2002 (58,612), el 5.8% (3,428) correspondieron a leucemias, lo que significó una tasa de 3.2 por 100 000 habitantes. [2]

Los egresos hospitalarios por tumores malignos permiten conocer el número de personas que han sido dadas de alta en un hospital por esta causa específica. Entre los tumores malignos, la leucemia concentra el mayor número de casos en 2007 (13.2 para las mujeres y 19.4% para los hombres) (Fuente: SSA, SINAI. Egresos Hospitalarios 2004 a 2007. Cubos dinámicos. INEGI).

Las leucemias pueden clasificarse según su estirpe celular afectada, en mieloide o linfoide (Fig. 1), y de acuerdo a su evolución, desde las que conducen rápidamente a la muerte hasta las que evolucionan con lentitud, como agudas o crónicas, respectivamente [1], por lo que los tipos de leucemia son: leucemia mielocítica aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC). La LLA tiene dos picos de frecuencia por edad, el

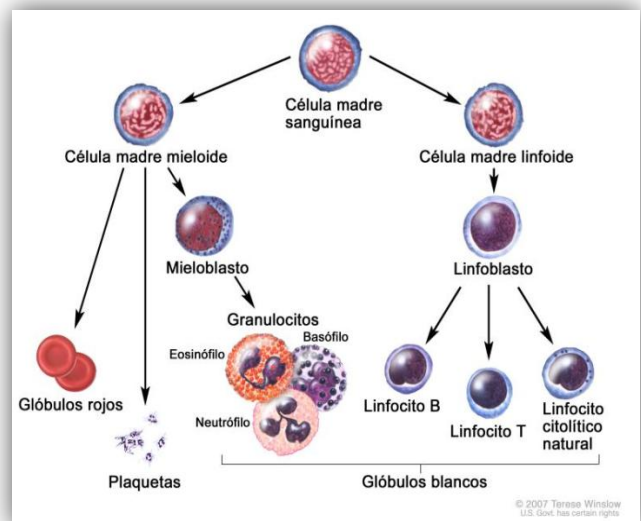


Fig. 1. Hematopoyesis

primero de dos a cinco años y el segundo en la sexta década de la vida. La LLA es la neoplasia más común diagnosticada en pacientes menores de 15 años, constituye la cuarta parte de las neoplasias diagnosticadas en este grupo de edad y 76% de todas las leucemias [3].

Un estudio realizado en el Noreste de México en el 2010, con 443 niños con leucemia aguda, reportó una incidencia de leucemia aguda de precursores de células B del 90.5%, 8.2% de precursores de células T y 1.3% de células B inmaduras; el porcentaje de presentación por grupos de edad fue: < 1 año 3%, 1-10 años 74% (con un pico de incidencia entre los 2 a 5 años con 46%) y más de 10 años 24% [4]. La incidencia de LLA en adultos mayores es de 1/100,000 habitantes al año, es más frecuente en varones que en mujeres, así como en personas de raza caucásica que en personas de raza negra [5]

1.2. Leucemia Linfocítica Aguda

La Leucemia linfocítica de precursores B, es una neoplasia que se debe a mutación somática de la célula progenitora que compromete el linaje de células B, compuesto de células blásticas de tamaño pequeño a mediano, con escaso citoplasma, cromatinas dispersas o moderadamente condensadas y nucléolos mínimos (Fig.2), que involucra la médula ósea y la sangre [6].

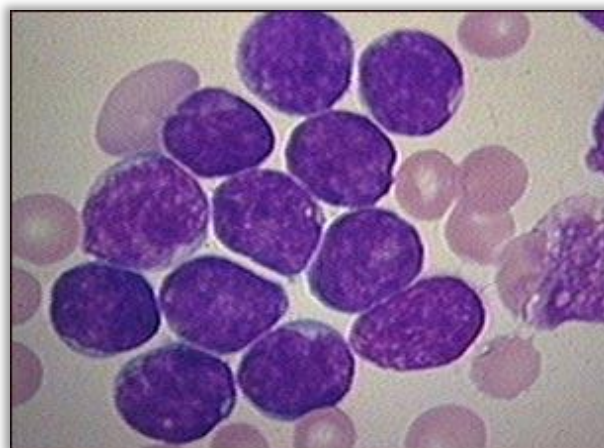


Fig. 2. Linfoblastos en sangre periférica.

1.2.1. Patogénesis

Se ha postulado que la combinación de la regulación por disminución (regulación negativa) de genes supresores de tumor y por aumento (regulación positiva) de oncogenes, sumado a un desencadenante medioambiental generan el cambio neoplásico en las células [7]. Hay evidencia que sugiere un factor genético en algunos casos [6], y otras que están relacionadas con enfermedades específicas como el síndrome de Down o la anemia de Fanconi, pero ellos cuentan sólo para la minoría de casos [8, 9].

Aparentemente, la leucemia se inicia con un evento *in-utero*, el cual se ha demostrado por análisis molecular de células MN de muestras de sangre de cordón luego del nacimiento; dichas alteraciones, luego de varios años, son expresadas de igual modo en el fenotipo neoplásico.[8, 10, 11].

Se ha establecido que el uso por la gestante de ciertas sustancias como marihuana, antihistamínicos, anfetaminas, entre otras, pueden incrementar el riesgo en el hijo de presentar leucemia en la niñez, mientras que el uso sistemático de folato durante el embarazo ha reducido hasta en 60% los casos de neoplasia [8]. No se ha podido establecer el papel de factores medioambientales tales como campos electromagnéticos, exposición a radón, pesticidas y tabaquismo materno en el desarrollo de la enfermedad [9]. Otros factores posiblemente implicados incluyen exposición nuclear residencial u ocupacional en los niños o los padres, radiaciones no ionizantes, pesticidas, benceno, vitamina K, aceite de hígado de bacalao, inhibidores de la topoisomerasa II naturales y manufacturados, nitratos de la dieta (“hot dogs”) y el consumo de agua contaminada con tricloroetileno [7].

1.2.2. Manifestaciones clínicas

La aparición de LLA varía según sus manifestaciones clínicas, que reflejan el grado de insuficiencia de la médula ósea, de infiltración extramedular y de agudeza. Casi la mitad de los pacientes cursa con fiebre y la tercera parte tiene como origen de la fiebre un foco infeccioso. Otras manifestaciones clínicas frecuentes son astenia y adinamia debidas a anemia. Del 33 al 43% tiene sangrado por trombocitopenia y 25% refiere dolor articular u óseo debido a la infiltración leucémica del periostio, hueso o articulación. Los síntomas menos comunes son cefalea, vómito, alteraciones de las funciones mentales, oliguria y anuria. Los signos que se observan en la piel y las mucosas son petequias y equimosis. El hígado, bazo y los ganglios linfáticos son los sitios extramedulares más afectados, y el grado de organomegalia es más importante en niños que en adultos: en 17% se encuentra hepatomegalia; en 44%, esplenomegalia, y en 15%, linfadenopatía. También puede presentarse infiltración pulmonar, cardiomegalia e insuficiencia cardiaca congestiva [3].

La LLA casi siempre produce signos o síntomas y se detecta en el examen rutinario. La anemia, la neutropenia y la trombocitopenia son hallazgos comunes en pacientes recientemente diagnosticados con LLA, que muestran grave afección de la médula ósea por las células leucémicas. En los pacientes con anemia hay relación inversa entre la concentración de la hemoglobina y la edad de manifestación: la anemia grave es dato de buen pronóstico para la leucemia linfocítica infantil. Dicha anemia se debe a invasión tumoral de la médula ósea y casi siempre la más grave es la de la LLA, en niños se reporta hasta un gramo de hemoglobina, el grado más bajo de anemia [3, 12]. La leucocitosis ocurre en 10 a 16% de los casos, mientras que la neutropenia o leucopenia se encuentran en 20 a 40% de los casos, con alto riesgo de infección. En algunos casos hay eosinofilia reactiva que precede por meses al diagnóstico de LLA. Sin embargo el 92% de las células circulantes son células blásticas leucémicas (Fig. 2) [3].

1.2.3. Diagnóstico

Por su comportamiento es indispensable valorar los estudios de laboratorio, estos incluyen: biometría hemática, química sanguínea, electrolitos séricos completos (incluido calcio) y pruebas de la función hepática. En estos estudios se obtiene la deshidrogenasa láctica (DHL) y el ácido úrico, importantes para la valoración del paciente con leucemia.

La punción lumbar es una prueba importante que debe practicarse a todo paciente con leucemia linfoblástica, en especial la que se origina en estirpe B. El procedimiento se lleva a cabo para estudiar el líquido cefalorraquídeo en búsqueda de células blásticas, que se identifican en más de la tercera parte de los pacientes con síntomas neurológicos. El procedimiento diagnóstico por excelencia en todo paciente en quien se sospecha leucemia es el aspirado de médula ósea, pues sirve para el estudio morfológico de las células de la médula [1].

A) Morfología

Por su morfología, las leucemias linfocíticas agudas se clasifican según la FAB (que debe su nombre a que fue practicada por el consejo Franco-Americano-Británico en 1976), y hay tres subtipos [12, 13]. Además clasifica a las de estirpe mieloides desde M0 hasta M7 [5].

- 1) LLA típica o LLA-L1: en 75% de los casos con células B y anomalías citogenéticas t(9:22), t(4:11) y t(1:19).
- 2) LLA atípica o LLA-L2: en 20%, y puede estar representada por células T y anomalías citogenéticas 14q11 o 7q34.
- 3) LLA parecida al linfoma de Burkitt o LLA-L3: con células B en 95% y células similares al linfoma de Burkitt que tiene t(8:14), t(8:22), t(2:8).

Si se utiliza la morfología como medio único para clasificar las leucemias agudas puede haber margen de error diagnóstico, y por tanto de tratamiento, de casi 20% de los casos, puede no diferenciarse por ejemplo entre L1 y M0, L2 y M0, L1 y M1 [12, 13], por lo que el uso de las clasificaciones inmunológica, citogenética y de biología molecular, y en ocasiones de microscopía electrónica, permite establecer un diagnóstico más certero y el tratamiento adecuado.

B) Inmunofenotipo

Como la LLA carece de hallazgos morfológicos y citoquímicos específicos, para la evaluación diagnóstica es esencial llevar a cabo el inmunofenotipo. Mediante los métodos inmunológicos es posible reconocer antígenos en la membrana celular o en su citoplasma, y algunos son específicos para diferentes poblaciones celulares. Los anticuerpos que distinguen los conjuntos de diferenciación, mejor conocidos como CD (*clusters of differentiation*), reconocen al mismo antígeno celular. La mayor parte de los antígenos leucocitarios carece de especificidad, por tanto se requiere panel de anticuerpos para

establecer el diagnóstico y distinguir entre las diferentes subclases inmunológicas de las células leucémicas. El panel que se recomienda incluye marcador sensible para CD19: linaje de células B; CD7: linaje de células T; CD13 y CD33: células mieloides, y marcador citoplasmático específico para CD79: linaje de células B; CD3: células T, y mieloperoxidasa para células mieloides. Mediante este método se puede confirmar el diagnóstico en 99% de los casos [1].

Alrededor de 80% de las leucemias linfoblásticas procede de las células B, así como 90% de los linfomas no Hodgkin. La mayor parte de las LLA son pre-B que expresan CD19 y CD10, y 50% expresa CD20. Entre 20 y 30% de las LLA de adultos expresan antígenos mieloides CD13 y CD33, que se relacionan con peor pronóstico [5].

C) Citogenética

Por último, se utiliza la clasificación basada en la citogenética, pues en la mayor parte de las leucemias se encuentra alteración cromosómica. Esto porque la LLA proviene de una célula madre linfopoyética que ha sufrido daño genético, y que origina transformación maligna y proliferación no controlada de la misma [1].

Las alteraciones citogenéticas en neoplasias de precursores B se consideran en varios grupos como [6, 9]:

- Hipoploidías
- Hipodiploidías <50 cromosomas
- Hiperdiploidías >50 cromosomas
- Peudodiploidías
- Translocaciones:
 - t(9;22)(q34;q11.2); BCR/ABL
 - t(v;11q23); rearreglo MLL
 - t(12;21)(p13;q22); TEL/AML1
 - t(1;19)(q23;p13.3); PBX/E2A

Algunas entidades genéticamente definidas tienen inmunofenotipos característicos. Leucemias con rearreglos de MLL son característicamente CD10-, y frecuentemente CD24- y CD15+. LLA-B t(1;19) es CD10+, CD34-, y CD20- o débil y usualmente μ citoplásmica positivas; este fenotipo se relaciona con alta tasa de recurrencia con protocolos basados en edad y conteo de blancos, pero con intensificación de terapia se ha logrado mejorar el panorama. LLA-B t(12;21) muestra alta densidad de expresión de CD10 y HLA-DR con CD19 y CD20 usualmente negativos [6]. Otras translocaciones de importancia reconocidas por técnicas moleculares no detectadas por citogenética incluyen la t(12;22) críptica, que confiere buen pronóstico [9].

1.2.4. Pronóstico

La estratificación de riesgo se basa en características clínicas, inmunológicas y citogenéticas para predecir el desenlace de la enfermedad y brindar una terapia óptima. Para tal fin se han definido tres estratos de riesgo: bajo, estándar y alto, aunque la mayoría emplea los dos últimos e incluyen un estrato de altísimo riesgo. En general, los de bajo riesgo tienen mejor desenlace, requieren terapia menos intensiva y tienen menos probabilidad de recurrencia.

Las alteraciones genéticas son marcadores pronósticos importantes, detectándose hasta en el 75% de las leucemias linfocíticas [10] y son usados para modificar el tratamiento en enfermedad pediátrica.

Los grupos de buen pronóstico son:

- 1) Hiperdiploidía entre 51 y 65 cromosomas, correspondiente a DI (contenido de DNA) por citometría de flujo de 1.16 a 1.6.
- 2) $t(12;21)(p12;q22)$, la cual es resultado de la fusión del gen *TEL* en 12p13 con el gen del factor codificante de transcripción *AML1* en 21q22.

Los hallazgos relacionados con pobre pronóstico son:

- 1) $t(9;22)$, la cual resulta de la fusión de *BCR* en 22q11.2 y el gen de tirosina quinasa citoplásmica *ABL* en 9q34, y produce una proteína de fusión en niños p190kd BCR/ABL y en la mitad de casos de adultos p210kd y los restantes p190 (predomina en LMC).
- 2) LLA de precursores B en estados tempranos de diferenciación pueden tener $t(4;11)$ con fusión del gen *MLL* en 11q23 que codifica una proteína putativa que liga DNA y AF4 en 4q21; otra translocación en 11q23 resulta de la fusión del locus *MLL* con otras parejas de genes. LLA con anormalidades 11q23 pueden surgir también relacionadas a la terapia de leucemia secundaria a etopósido.
- 3) $t(1;19)$, encontrada en el 25% de las LLA-B de niños con expresión citoplásmica de μ , fusiona el gen *E2A* que codifica el factor de transcripción E2A en 19p13.3 con *PBX* en 1q23, asociado con pobre pronóstico.
- 4) Hipodiploidía está asociada con pobre pronóstico. Otras anormalidades (del(6q), del(9p), del(12p), hiperploidías <51, triploidía cercana y tetraploidía cercana) se asocian con pronóstico intermedio [6]

En los últimos años, la terapéutica ha mejorado alcanzando tasas de supervivencia a 5 años sin recurrencia de hasta 70% [10]. Sin embargo, pese a los esfuerzos, hasta el 20% de los niños recurren y fallecen, y los sobrevivientes presentan serios problemas de salud por los efectos adversos del tratamiento [8]. Varios trabajos se han publicado al respecto encontrando remisión completa en grupos de riesgo bajo del 99%, intermedio 98-99% y

alto 88-97%. Las tasas de supervivencia a 5 años libres de enfermedad se encuentran en 68%, 63% y 62%, respectivamente [7].

LLA-B son generalmente leucemias de buen pronóstico. En el grupo pediátrico la tasa de remisión completa es del 95%, y en adultos entre 60-85%. La tasa de supervivencia libre de eventos es del 70% en niños; aproximadamente, el 80% de los niños aparentan curación [6].

Los grupos de riesgos pediátricos de LLA-B se basan en perfiles citogenéticos, edad, conteo de leucocitos, sexo y respuesta a la terapia inicial. Hay una alta asociación en niños con traslocaciones que involucran el gen *MLL* en 11q23 con pobre pronóstico independiente de la edad. En edad pediátrica, más del 50% de los pacientes tienen buen pronóstico relacionado con cariotipos de hiperploidías o cambios genéticos t(12;21) con supervivencia a largo plazo del 85-90%. En adultos se carece de estratos de riesgo, aunque las alteraciones citogenéticas presentan un panorama diferente respecto a los niños [6].

Las características genéticas son importantes pero resultan heterogéneas si se tienen en cuenta otros factores. Es conocido que el cromosoma Philadelphia (Ph) es de pobre pronóstico; sin embargo, la mayoría de niños entre 1-9 años, Ph+, son curados con quimioterapia sola. La t(4;11) es de pobre pronóstico en niños menores de 1 año, no así en mayores de esta edad [10].

Factores predictivos para remisión durable y supervivencia prolongada son: edad entre 4 y 10 años, hiperploidías (54-62 cromosomas) con trisomías 4, 10 y/o 17, t(12;21)(p13;q22) y conteo normal o bajo de leucocitos al diagnóstico [6, 10]. Factores adversos incluyen edad <1 año, t(9;22)(q34;q11.2) y t(4;11)(q21;q23) [6]. Las hipoploidías presentan relación directamente proporcional con el pronóstico: a menor número de cromosomas, menor supervivencia [10]. Clásicamente se ha considerado como factores pronósticos los que se muestran en la Tabla I [9].

1.2.5. Tratamiento

El tratamiento inmediato de la LLA requiere manejo efectivo de los efectos colaterales de la enfermedad, destrucción de las células tumorales, y manejo apropiado de los efectos adversos del tratamiento [7].

Durante muchos años se ha considerado que la terapia de LLA debe ser diseñada acorde al riesgo, sin embargo, estudios recientes han demostrado que la terapia en sí, es el factor pronóstico individual de mayor impacto, y que la intensificación de terapia acorde a la respuesta medida a los 7, 14 y 28 días, ha llegado a ser la práctica estándar [9].

Tabla I. Factores pronósticos en LLA [9].

	Favorable	Desfavorable
Sexo	Femenino	Masculino
Raza	Blanco	Negro, hispano
Edad	1-9 años	<1 y >10 años
Conteo de blancos	<10x10 ⁹ /L	>10x10 ⁹ /L*
Enfermedad "sólida"¹	Ausente	Presente
Leucemia extramedular	Ausente	Presente
Morfología (FAB)	L1	L2, L3
Inmunofenotipo	Precursor B	B y T
Citogenética	t(12;21) Hiperdiploidía (54-68 cromosomas)	t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(8;14), t(11;14), 11p23* Hpodiploidía (<45 cromosomas)
Respuesta a tx (7-14 días)	Rápido	Lento*

*Modificable por el tratamiento (tx)

¹ Visceromegalia masiva (tumor mediastinal, infiltración testicular, infiltración renal, infiltración SNC)

Establecido el grupo de riesgo al que pertenece el paciente se diseña la terapia. En el grupo de bajo riesgo (40%) se emplean antimetabolitos estándar. El tratamiento de intensificación es útil en pacientes con riesgo estándar y alto riesgo empleando medicamentos más fuertes evitando la aparición de resistencias. 51% son pacientes de riesgo estándar que requieren poli quimioterapia de intensificación. Los pacientes de más alto riesgo (9%) son candidatos a trasplante de células madre luego de la primera remisión [7].

El tratamiento de las leucemias que afectan a las precursoras de las células B y T consiste en tres fases [3, 12]:

A) Inducción de la remisión

En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos sin efectos mayores a la síntesis de DNA, como vincristina, prednisona y L-asparaginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina o mitoxantrona para adultos, estos no producen daño a la médula ósea normal y actúan pronto; sin embargo, no son útiles para el tratamiento a largo plazo. Con tratamiento adecuado y cuidado de soporte efectivo, el grado de remisión actual es de 70 a 90%. El esquema de inducción con índice de remisión más alto es el mencionado por Kantarjian, que incluye vincristina, dexametasona, daunorrubicina y ciclofosfamida con remisión del 91%.[14].

B) Tratamiento de consolidación o postremisión

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

C) Tratamiento de mantenimiento

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

El paciente con recaída puede optar por tratamiento de trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, pues el trasplante autólogo no ofrece ventaja alguna sobre la quimioterapia como tratamiento postinducción. Los enfermos con riesgo alto, sobre todo quienes tienen cromosoma Ph+ en la primera remisión, se consideran sujetos susceptibles inmediatos a trasplante alogénico. Parece la única forma de tratamiento que permite supervivencia significativa libre de enfermedad [15-17]. El trasplante de médula ósea puede llevar a cinco años de supervivencia libre de enfermedad hasta en 50% de los casos, con recaída del 40 a 60% que varía según los diferentes estudios sobre el tema [3].

Algunos de los avances más significativos en la terapia de leucemias en los últimos veinte años han ocurrido con las leucemias linfocíticas agudas B y T. La "tasa de cura", o períodos libres de enfermedad a cinco años, supera para algunas leucemias B el 80%. Sin embargo, algunos tipos están relacionados con bajas tasas de remisión y altas tasas de recurrencia. Los perfiles citogenéticos, el genotipo y el inmunofenotipo de las células malignas han tenido considerable impacto en el reconocimiento de la estratificación de riesgo con el reconocimiento de grupos de bajo y alto riesgos. Esta estratificación ha permitido el desarrollo de regímenes terapéuticos más específicos, logrando tasas de remisión más altas en grupos de alto riesgo, y reduciendo la toxicidad en los grupos de bajo riesgo [6, 18, 19].

1.2.6. Genética Molecular

Los estudios de genética molecular en el cáncer han ido adquiriendo en los últimos años una importancia trascendental. Los avances en estas técnicas han permitido aumentar

el conocimiento de distintos genes implicados en el desarrollo tumoral. Estas diferentes alteraciones génicas ocurren en tres grandes grupos de genes: oncogenes, genes supresores y genes reparadores de DNA. Los estudios citogenéticos (cariotipo) se complementan con diferentes técnicas moleculares como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o el cariotipo espectral (SKY), mejorando su sensibilidad [20].

Para evaluar la remisión completa (< 5% de blastos en médula ósea) se realizan controles de médula ósea a los 14 días de tratamiento, al final de la inducción (día +34) y tras finalizar el mismo. Mediante el empleo de las actuales técnicas de citometría de flujo y citogenética; así como mediante distintas técnicas moleculares como FISH de interfase y, sobre todo, la RT-PCR (con una sensibilidad 100 veces superior), es posible detectar la enfermedad mínima residual (EMR) en numerosos pacientes en remisión [21-23]. La EMR consiste en la persistencia de células anormales, aun en niveles bajos, durante y después de terminar el tratamiento, y tiene un valor pronóstico.

Se recomienda realizar el estudio al final de la inducción, al final de la consolidación y tras finalizar el tratamiento. La introducción de estas técnicas ha conducido a una nueva definición de remisión en las LLA según la cual podría considerarse remisión hematológica cuando no se detecta EMR a nivel de 1×10^{-4} [18]. Diversos trabajos ponen de manifiesto que los pacientes con $EMR \geq 1 \times 10^{-2}$ al finalizar la inducción tienen un riesgo de recidiva superior al 60 % en el curso de los 3 años siguientes frente a menos del 15 % en los que no se detecta EMR [22, 24]. Con niveles $\geq 1 \times 10^{-3}$ después del tratamiento de consolidación se tiene un riesgo de recidiva de aproximadamente el 70% [23]. En todos los grupos la persistencia de EMR por más de 6 meses tras la terapia de inducción, o la reaparición de EMR está invariablemente asociada con recidiva. Por lo tanto, la detección de la EMR aporta una valiosa información sobre la predicción del curso clínico de la enfermedad y puede permitir en consecuencia adoptar actitudes terapéuticas.

1.3. Antecedentes Directos

Los parámetros más aceptados y utilizados para determinar los grupos de riesgo son la edad, el número de leucocitos al diagnóstico, la respuesta inicial al tratamiento y el genotipo de las células leucémicas, sin embargo del 20-40% de los pacientes presentan un cariotipo normal. En los últimos años se han empleado estudios genómicos con el propósito de encontrar biomarcadores con valor pronóstico de respuesta al tratamiento, que sean útiles en todos los pacientes con LLA. Con esta finalidad, en el 2007, en nuestro laboratorio, como parte del proyecto “Búsqueda de marcadores útiles en el seguimiento de la EMR en pacientes con LLA”, se realizó un estudio en pacientes con LLA utilizando microarreglos de expresión, para identificar genes blanco o rutas de señalización comunes, que pudieran asociarse a la enfermedad y que pudieran tener un valor pronóstico o de seguimiento (Tesis de Doctorado, Lugo Trampe 2007). En este estudio se identificaron más de 200 genes con

expresión alterada, de los cuales, la ruta de señalización más común entre ellos fue la vía Wnt.

Las proteínas Wnt dirigen la diferenciación de varios tipos de células en embriones [25]. Estas proteínas constituyen una familia de moléculas de señalización altamente conservadas que regulan las interacciones intercelulares durante la embriogénesis. Las proteínas de la vía de señalización Wnt participan en diversos tejidos como la piel, tejido graso, tejido hematopoyético, y otros [26]. Se ha probado que los genes Wnt también están implicados en el cáncer (Van Es y cols., 2001).

Para validar este grupo de genes, se seleccionaron 48 de ellos y se analizó su expresión mediante PCR en tiempo real utilizando SYBR Green en un grupo de 100 pacientes, a los que se les analizó la expresión a tres tiempos diferentes: al momento del diagnóstico, al mes y a los tres meses después del tratamiento. En este estudio se encontró que 13 de los genes estudiados (cuya función se describe en la Tabla II), podían ser predictivos de respuesta al tratamiento (Tesis de maestría, Garza Veloz, 2009).

Algunos de estos genes han sido previamente reportados en la literatura y asociados a leucemia, como el caso del gen *Flt3* que se ha asociado a mal pronóstico en LMC.

Tabla II. Genes predictivos de respuesta al tratamiento (Tesis de maestría, Garza-Veloz 2009).

Gen	Función
<i>Stat5</i>	Transductor de señales y activador de la transcripción. Función antiapoptótica.
<i>Pax5</i>	Codifica para un factor de transcripción específico para la diferenciación de linfocitos B.
<i>Flt3</i>	Mutaciones en este receptor permite el desarrollo de leucemia.
<i>Opal1</i>	Gen predictor de leucemias agudas.
<i>Notch1</i>	Regulador de proliferación cel., diferenciación y apoptosis, función norm. de linfocitos.
<i>Hk2</i>	Aumento de la glicolisis, crecimiento acelerado de células cancerosas.
<i>Bcl2a1</i>	Retarda la apoptosis inducida por disminución de IL-3.
<i>Bcl11a</i>	Proto-oncogen mieloide y de células B. Papel importante en leucemogénesis y hematopoyesis.
<i>Bcl2l1</i>	Inhibidor potente de muerte celular.
<i>Fos</i>	Regulador de proliferación celular, diferenciación y transformación, muerte cel. apoptótica.
<i>Rxra</i>	Receptor nuclear de hormonas. Involucrado en la vía de señalización del ácido retinoico.
<i>Sort1</i>	Promueve la apoptosis neuronal.
<i>Socs1</i>	Regulador importante de la vía de señalización de la IL-6 y factor inhibidor de leucemia (LIF).

Se ha demostrado una expresión de *Flt3* elevada en diversas patologías hematopoyéticas como las leucemias mielocíticas agudas, incluyendo la LMA-M3, la LLA, y los síndromes mielodisplásicos (SMD). Se han identificado mutaciones en dos regiones del gen *Flt3*. La mutación más frecuente es una duplicación interna en tándem (ITD) en la región yuxtamembrana (JM) del gen, en el 20-30% de las LMA, en una pequeña proporción de las LLA (1-3%) y en el 5-10% de los SMD. La presencia de una mutación ITD en LMA es indicativa de mal pronóstico, asociándose a menor supervivencia debido a recaída temprana o resistencia al tratamiento. La segunda región comúnmente alterada del gen *Flt3* es el dominio activador de la tirosina quinasa (TKD). La mayoría de las mutaciones en esta región afectan a los codones 835 y 836 del exón 20, y su frecuencia en las LMA se estima del 5-10%.

Con los antecedentes mencionados, se analizaron estas dos mutaciones en los pacientes con LLA donde se había encontrado alterada su expresión, pero ninguna de estas dos mutaciones pudo ser identificada. Con la finalidad de identificar los cambios en el resto de la secuencia de este gen y de los otros doce genes, que pudieran justificar las diferencias en su expresión, se realizó un análisis de su secuencia, mediante secuenciación con el método de Sanger y electroforesis capilar.

Del análisis de secuenciación, no se encontraron mutaciones que pudieran justificar los cambios en la expresión de estos genes, por lo que postulamos, que pudiera haber un mecanismo de regulación diferente responsable de los cambios en su expresión y por consiguiente estuviera ejerciendo un control crítico en la determinación del linaje celular en la leucemia. Estos mecanismos indirectos de regulación de expresión pueden ser por ejemplo **a)** cambios epigenéticos que alteran exclusivamente los patrones de metilación, o **b)** regulaciones post transcripcionales a nivel de los RNAs mensajeros (RNAm) generados, y que de ser así, la secuencia del gen no está alterada.

Para resolver esta incógnita, este proyecto se enfocó al análisis de microRNAs (miRNAs) en pacientes con LLA, para determinar si este pudiera ser el mecanismo de regulación que estuviera afectando la expresión alterada en los 13 genes previamente seleccionados.

1.4. MicroRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son una clase abundante de RNAs pequeños no codificantes que han sido identificados en plantas y animales y juegan un papel importante como reguladores de la expresión génica en gran variedad de procesos biológicos [27, 28]. Fueron descubiertas por Victor Ambros, Rosalind Lee y Rhonda Feinbaum en 1993, quienes encontraron que *lin-4*, un gen que actúa en el desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína, pero producía 2 transcritos pequeños de aproximadamente 22 y 61 nucleótidos (nt), éste último podía adoptar una conformación de horquilla (stem loop) y era el

precursor del primero. Encontraron que estos RNAs contenían secuencias complementarias al extremo 3' no traducible (3'UTR) del RNAm de *lin-14*, sugiriendo que *lin-4* regulaba la traducción de *lin-14* mediante una interacción RNA-RNA antisentido [29]. Posteriormente Ruvkun y cols. mostraron una disminución de la proteína sin disminución de los niveles de RNAm [30]. *Lin-4* es, en consecuencia conocido como el fundador de la clase abundante de RNAs pequeños reguladores denominados miRNAs [31-33], los cuales presentan patrones de expresión dependientes del tipo celular y tejido [34]. El segundo miRNA conocido fue *let-7*, otro gen de *C. elegans* que codifica para un RNA regulador de aproximadamente 22 nt [35].

Mediante análisis bioinformáticos se predice que alrededor de una tercera parte de todos los RNAm parecen ser blancos de miRNAs, con un promedio de 200 genes blanco para cada uno de los miRNAs [36, 37], lo que los hace una de las clases más abundantes de genes reguladores en mamíferos [38].

1.4.1. Herramientas bioinformáticas

El descubrimiento de que los miRNAs son sintetizados como precursores en forma de horquilla, ha originado el desarrollo de herramientas computacionales para identificar genes de miRNAs nuevos en varias especies animales, usando métodos que se basan en la conservación de la secuencia dentro y entre las especies y/o similitud estructural con precursores conocidos de miRNAs, algunas de estas herramientas se enlistan en la Tabla IIIA.

Por otra parte, la identificación de blancos de miRNAs en animales es difícil, particularmente porque no se requiere complementaridad perfecta del miRNA al RNAm blanco. Aunque estudios recientes [39] sugieren que los miRNAs pueden afectar la expresión génica uniéndose al extremo 5' o 3'UTR del RNAm, la mayoría de los estudios han encontrado que los miRNAs degradan o suprimen la traducción de su RNAm blanco, uniéndose a su extremo 3'UTR, por lo que la mayoría de los programas se basan en esta unión. Estos estudios han sugerido que el fragmento semilla del miRNA, el cual incluye de 6-8 nt en el extremos 5' de la secuencia del miRNA maduro, es muy importante en la selección de los sitios blanco. Por lo tanto, la mayoría de las herramientas computacionales que se han desarrollado para la identificación de secuencias de RNAm blancos, depende en gran parte de la complementaridad entre la secuencia semilla del miRNA y la secuencia blanco. Los métodos para la predicción de blancos de miRNAs usan principalmente la complementaridad de la secuencias, cálculos de estabilidad termodinámica y la conservación evolutiva entre las especies para determinar la posibilidad de formación de un dúplex miRNA-RNAm [27, 40], Tabla IIIB.

Hay una variedad de bases de datos que proveen una cantidad significativa de información de miRNAs y predicciones de blancos (Tabla IIIC). La base de datos más grande

tanto para miRNAs como para secuencias blanco, es miRBase [41], miRBase contiene secuencias de miRNAs maduros, secuencias de precursores y anotaciones asociadas, en primates, roedores, aves, peces, lombrices, moscas, plantas y virus, también contiene genes blanco predichos de miRNAs en miRBase Targets, y provee el nombre del gen y nomenclatura en el registro de miRBase. Los genes blanco de miRNAs son predichos usando el programa miRanda [42] y no están necesariamente validados experimentalmente. TarBase [43] contiene un grupo de blancos soportados experimentalmente en diferentes especies que son colectados manualmente de la literatura. Argonauta es una compilación de información comprensiva de miRNAs de mamíferos, su origen y genes blanco regulados. Su fuente de información es la literatura y otras bases de datos. La base de datos miRecords [44], es una fuente integrada de interacciones miRNA-blanco para animales, cuenta con blancos de miRNAs predichos y producidos por 11 programas establecidos de predicción de blancos de miRNAs.

1.4.2. Biogénesis y función de los miRNAs.

Los miRNAs maduros son moléculas de RNA de doble cadena de 20-25 nt de longitud con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Derivan de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y terminan en el citoplasma donde realizan su función (Fig. 2). La mayoría de los miRNAs son producidos como un transcrito primario (pri-miRNA) de aproximadamente 1 kb por la RNA polimerasa II [45, 46], aunque algunos miRNAs localizados en zonas repetitivas son transcritos por la RNA polimerasa III. Estos transcritos primarios pueden codificar para un solo miRNA, o para grupos (clusters) de estas moléculas [47, 48]. El pri-miRNA adquiere una conformación de horquilla con un apareamiento imperfecto, esta molécula se une al complejo microprocesador el cual está formado por una RNasa de tipo III conocida como Drosha, asociada a la proteína de unión a RNA DGCR8 (DiGeorge síndrome Critical Región 8) [49, 50] y otras proteínas, este complejo corta la horquilla y libera el miRNA precursor (pre-miRNA) de 60-70 nt [45, 46], del transcrito primario, el cual, finalmente es exportado hacia citoplasma a través del poro nuclear mediado por una proteína denominada exportina-5 dependiente de RAN-GTP [51, 52]. RAN es un cofactor que une GTP durante la exportación nuclear de RNA. En citoplasma la molécula de GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador. Ya en el citoplasma, el pre-miRNA es procesado por una RNasa de tipo III (Dicer) asociada a proteínas TRBP o TRBP2 y PACT las cuales contienen dominios de unión a RNA de doble cadena que estabilizan la interacción de Dicer con el pre-miRNA [53], Dicer rompe el precursor y lo convierte en un miRNA de doble cadena (dúplex) [38, 54], compuesto por el miRNA maduro y la otra cadena referida como miRNA*[32]. El paso final de la biogénesis de los miRNAs es la subsecuente incorporación del miRNA dúplex al complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC, por sus siglas en inglés) compuesto por Dicer, proteínas Argonauta (AGO), TRBP y PACT. De este miRNA dúplex, se separan las 2 cadenas y una de ellas da lugar al miRNA maduro de unos 20-25 nt, la cual se une al RNAm blanco a través de una región del miRNA denominada semilla, que consiste en

Tabla III. Herramientas computacionales para miRNAs**A) Herramientas computacionales para predicciones de miRNAs**

Algoritmo	Dirección web
MiRseeker	
MiRscan	http://genes.mit.edu/mirscan/
miRank	MiRank es programado en MATLAB
proMiR II	http://cbit.snu.ac.kr/~ProMiR2/
mir-abela	http://www.mirz.unibas.ch/cgi/pred_miRNA_genes.cgi
Triplet-SVM	http://bioinfo.au.tsinghua.edu.cn/mirnasvm/
Vmir	http://www.hpi-hamburg.de/fileadmin/downloads/VMir.zip
RNA micro	http://www.bioinf.uni-leipzig.de/~jana/software/index.html
Micros	Basado en el paquete LIBSVM
BayesMiRNAFind	https://bioinfo.wistar.upenn.edu/miRNA/miRNA/login.php
One-ClassMirnaFind	http://wotan.wistar.upenn.edu/OneClassmiRNA/

B) Herramientas para la predicción de blancos de miRNAs

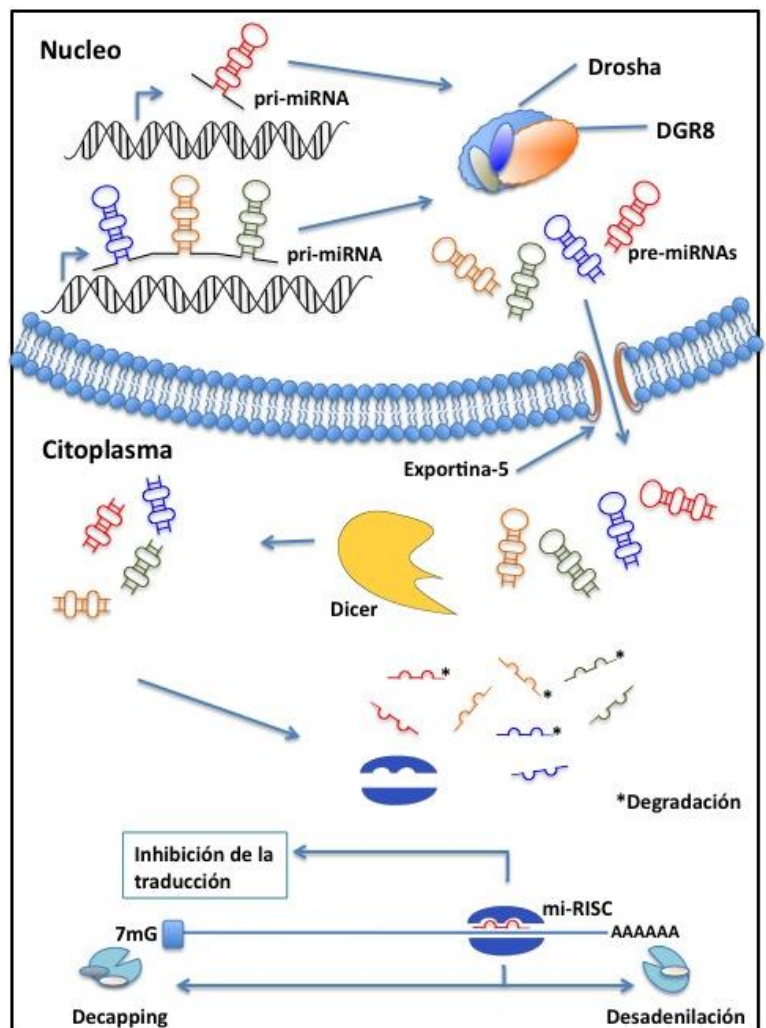
Algoritmo	Dirección web
TargetScanS	http://genes.mit.edu/targetscan
miRanda	http://www.microma.org
PicTar	http://pictar.bio.nyu.edu
RNAhybrid	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid
Diana-microT	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/micro_t.cgi
Target Boost	http://demo1.interagon.com/demo
Rna22	http://cbcsrv-watson.ibm.com/rna22_targets.html
MicroTar	http://tiger.dbs.nus.edu.sg/microtar/
NBmiRTar	http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar
miRecords	https://mirecords.umn.edu/miRecords/

C) Bases de datos para miRNAs y blancos

Base de Datos	Dirección web
MirBase	http://microrna.sanger.ac.uk/
TarBase	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase/
Argonaute	http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/argonaute
miRecords	http://mirecords.umn.edu/miRecords/

Fig. 3. Biogénesis de los miRNAs.

Los miRNAs son transcritos en el núcleo por la RNA polimerasa II o III como pri-miRNAs, estos pueden codificar para un solo miRNA o para un grupo de miRNAs, los pri-miRNAs son procesados por Drosha, RNasa tipo III asociada a cofactores como DGCR8 y otras proteínas, este complejo corta la horquilla liberando el miRNA precursor (pre-miRNA) de aproximadamente 60-70 nt, el cual es transportado al citoplasma a través del poro nuclear mediado por la exportina-5. Una vez en el citoplasma, Dicer, otra RNasa tipo III, reconoce el pre-miRNA y corta el lazo (loop) de la horquilla creando el miRNA de doble cadena (dúplex) de aproximadamente 22 nt, una de las cadenas, el miRNA maduro, es incorporado al complejo miRISC y guiado al RNAm blanco, dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y el extremo 3'UTR del RNAm blanco se lleva a cabo la inhibición de la traducción (complementaridad imperfecta) o degradación del RNAm (complementaridad perfecta), la cadena RNA* es degradada o liberada del dúplex.

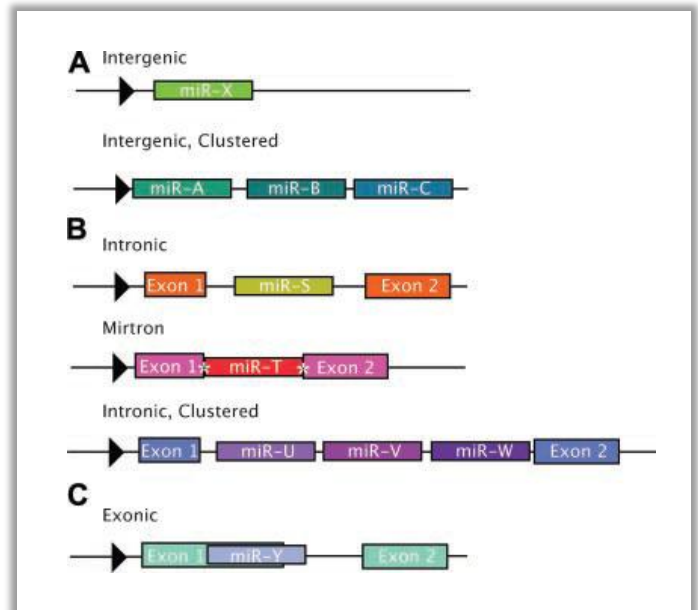


8 nt iniciando en el segundo nucleótido del extremo 5' del miRNA [37]. Se conoce que el miRNA dúplex es cargado a una proteína AGO, componente central del complejo miRISC, una vez cargado el miRNA, la cadena menos estable por alineamiento de su extremo 5', permanece asociada con la proteína AGO, mientras la otra cadena, miRNA*, es degradada o liberada del dúplex [55].

Los genes que codifican para los miRNAs están localizados principalmente, al menos la mitad de los miRNAs humanos, en intrones de genes codificantes para proteínas, mientras que el resto están localizados en regiones intergénicas o exónicas [56, 57] (Fig. 4). En los miRNAs intrónicos y exónicos, su expresión puede ir correlacionada con la regulación transcripcional de su gen hospedero, de esta manera se explicaría la especificidad tisular debida a la expresión de diferentes grupos de genes [27, 58]. En los miRNAs intergénicos, su expresión viene regulada de forma independiente a través de sus propios elementos reguladores [57]. También se ha observado que los miRNAs pueden derivarse de secuencias repetitivas de DNA [59].

Fig. 4. Localización genómica de los miRNAs.

A) Los miRNAs intergénicos están presentes en regiones genómicas distintas de las unidades de transcripción conocidas. Estos miRNAs pueden ser monocistrónicos con su propio promotor (flecha negra), o policistrónicos, en donde algunos miRNAs son transcritos como un grupo de transcritos primarios con promotor compartido. **B)** Los miRNAs intrónicos están presentes en los intrones de genes conocidos, tanto de los que codifican para proteínas como los no codificantes. Estos miRNAs pueden estar presentes como un solo miRNA o en un grupo de varios miRNAs. Se piensa que los miRNAs intrónicos son transcritos del mismo promotor del gen hospedero y procesados de los intrones de los transcritos del gen hospedero. En el caso especial de los mirtrones, el intron es la secuencia exacta del pre-miRNA, en este caso, se piensa que es innecesario el complejo microprocesador en la maduración del mirtron [60]. **C)** Los miRNAs exónicos son los más raros de los descritos anteriormente y a menudo se traslapan entre un exón y un intron de un gen no codificante. Se piensa que estos miRNAs también son transcritos por el promotor del gen hospedero y su maduración a menudo excluye la función del gen hospedero [56].



1.4.3. Regulación de la expresión de genes por miRNAs

Se ha visto que los miRNAs están involucrados en la regulación de procesos celulares críticos como desarrollo, proliferación celular, diferenciación y apoptosis [61], además de resistencia al estrés y metabolismo de grasas, esto a través de la regulación de la expresión de genes [27].

Esta regulación la ejercen por medio de la unión perfecta o imperfecta a la región 3'UTR del RNAm blanco, resultando en la degradación o represión de la traducción ya sea por medio de la desadenilación o por la remoción del CAP (Decapping) del RNAm [62]. Este alineamiento imperfecto de los miRNAs con su blanco implica que cada miRNA puede unirse a diferentes RNAm. También se ha sugerido que los miRNAs pueden unirse al extremo 5'UTR de los RNAm blanco regulando positivamente la traducción de éste en condiciones específicas [54], sin embargo la regulación mediada por la unión del miRNA al 5'UTR del RNAm no es tan eficiente como su unión al 3'UTR.

La importancia de los miRNAs en el cáncer es debido a los hallazgos de que, más de la mitad de los genes de miRNA están localizados en sitios frágiles o regiones genómicas asociadas a cáncer (CAGRs por sus siglas en inglés), como regiones mínimas de pérdida de heterocigosidad (LOH por sus siglas en inglés), regiones mínimas de amplificación o regiones comunes de corte, descritas en una variedad de tumores incluyendo pulmón, mama, ovario, colon, gástrico y carcinoma hepatocelular, así como leucemias y linfomas [63].

Si la localización de los miRNAs es relevante para la tumorigénesis, entonces las alteraciones funcionales o estructurales de los miRNAs pueden ser identificadas en varios tipos de cáncer. Existe evidencia de que la expresión aberrante de miRNAs es una característica común de malignidad, encontrada en distintas enfermedades, especialmente en la oncogénesis [64], tanto en tumores sólidos como en desórdenes hematológicos (Fig. 5) [65]. Más aún, se ha sugerido que el perfil de expresión de miRNAs puede diferenciar los diferentes tipos de cáncer y estadio del tumor de una manera más exacta que el análisis tradicional de expresión de genes [66].

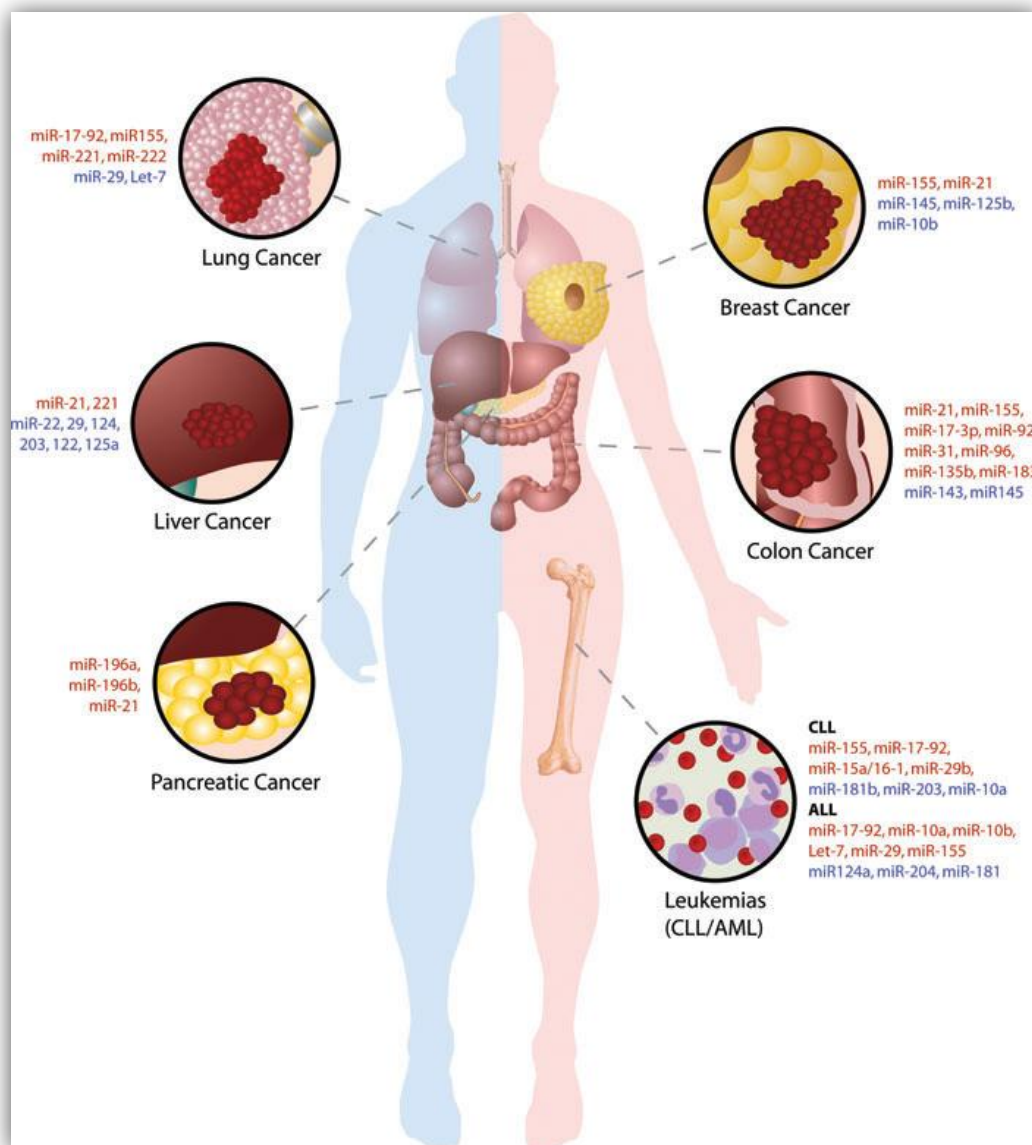


Fig. 5. MiRNAs desregulados en cáncer.

Expresión aberrante de miRNAs en tumores sólidos como cáncer de pulmón, hígado, pancreático, mama y colon; y en desórdenes hematológicos como leucemias. MiRNAs con expresión aumentada (letra roja), miRNAs con expresión disminuida (letra azul) [65].

1.4.4. MiRNAs como oncogenes y genes supresores de tumor

Como se ha visto, los miRNAs juegan un papel importante en la oncogénesis, varios experimentos sugieren que pueden funcionar como una nueva clase de oncogenes (OG) o Genes Supresores de Tumor (TSG por sus siglas en inglés). Aquellos miRNAs que tienen una expresión elevada pueden ser considerados como oncogenes. Estos miRNAs, llamados “oncomirs”, usualmente promueven el desarrollo de tumores por inhibición negativa de genes supresores de tumor y/o genes que controlan la diferenciación celular o apoptosis. Se ha encontrado que muchos genes de miRNA están significativamente sobreexpresados en diferentes tipos de cáncer. Todos ellos parecen funcionar como oncogenes, sin embargo solo unos cuantos de ellos han sido bien caracterizados. Por otra parte, la expresión de algunos miRNAs está disminuida en células cancerosas, estos tipos de miRNAs son considerados como genes supresores de tumor y usualmente previenen el desarrollo de tumores por medio de la inhibición de oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación celular o apoptosis. Actualmente, varios miRNAs son considerados como genes supresores de tumor, por ejemplo el miRNA let-7 [67], lo anterior se ejemplifica en la Fig. 6.

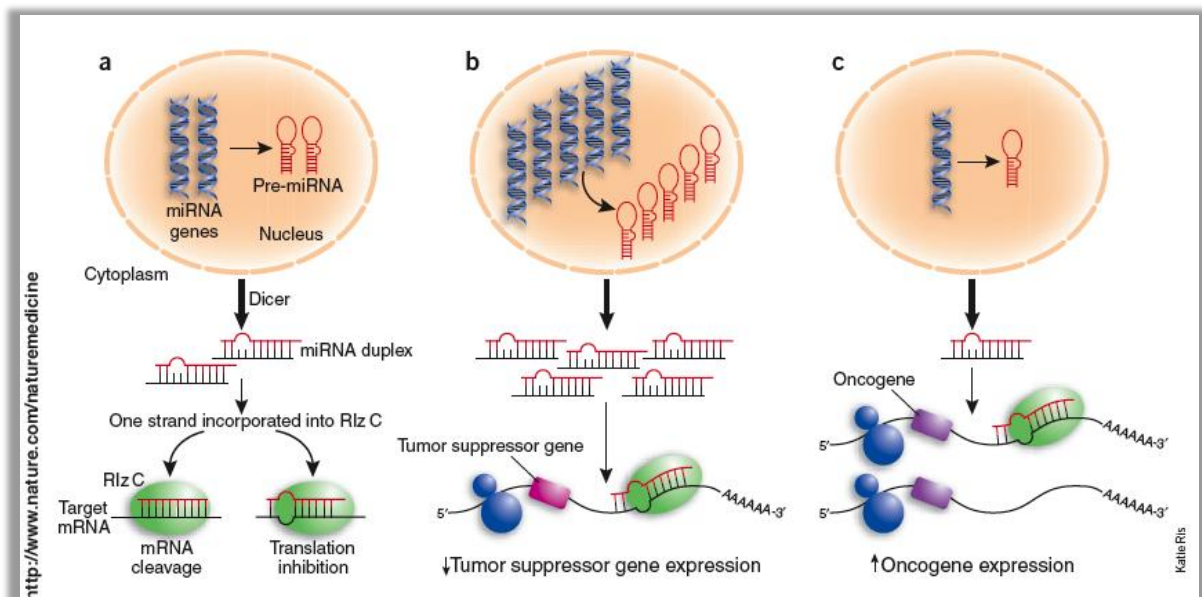


Fig. 6. MiRNAs como oncogenes y genes supresores de tumor.

a) Expresión normal de miRNAs. **b)** MiRNAs como oncogenes. Una expresión elevada de los oncomirs promueve el desarrollo de tumor por inhibición de TSG. **c)** MiRNAs como TSG, su expresión disminuida origina la no inhibición de oncogenes y en consecuencia el aumento en la expresión de los mismos. [67].

1.4.5. MiRNAs en la hematopoyesis normal

Durante la hematopoyesis la célula progenitora común da lugar a células de diferentes linajes, este proceso es gobernado por la alteración en la expresión de algunos genes a la vez. Dada la capacidad de que un solo miRNA puede controlar la expresión de varios genes, es conceptualmente aceptable que los miRNAs regulen este proceso.

El papel de los miRNAs en la hematopoyesis normal humana ha sido extensamente estudiado por muchos grupos. El primer indicio de que los miRNAs están implicados en la hematopoyesis fue proporcionada por Chen y cols [68]. Ellos clonaron aproximadamente 150 miRNAs de la médula ósea de ratón y encontraron 3 miRNAs (miR-223, miR-142 y miR-181) expresados preferencialmente en tejido hematopoyético. MiR-181 se encontró altamente expresado en muestras de células del linaje B; la expresión de miR-223 fue restringida a las células de origen mieloide y miR-142 fue el más expresado en el linaje mieloide y en células del linaje B. Posteriormente, estos miRNAs fueron sobreexpresados en células no comprometidas, con la sobreexpresión de miR-181, hubo un incremento en la proporción de células del linaje B, como se esperaba, sin embargo con miR-142 y miR-223, hubo un incremento en la proporción de células del linaje T y una modesta alteración en la proporción de células mieloides.

Se ha reportado que la expresión de miRNAs está regulada durante la diferenciación hematopoyética, sugiriendo que los miRNAs están involucrados en este proceso [68], así como en desórdenes hematológicos [69].

1.4.6. MiRNAs en desórdenes hematológicos

A pesar del gran avance biológico que ha hecho posible el aumento en el conocimiento de la leucemogénesis, se sabe poco acerca de los eventos patológicos que desencadenan el inicio y progresión de esta enfermedad [70].

Los primeros reportes de miRNAs en leucemia fue en la LLC debido a que la primera evidencia directa que involucra a los miRNAs en cáncer fue la localización de miR-15 y miR-16 en la región genómica 13q14.3, región deletada de 30 kb en más del 65% de los casos de LLC, *miR-15a/miR-16-1*, cuyos niveles de expresión se encuentran disminuidos en el 75% de los casos de LLC que presentan esta anomalía cromosómica [71]. Entre los blancos del grupo *miR-15a/miR-16-1* se ha identificado a la proteína antiapoptótica BCL2, la cual está sobreexpresada en la mayoría de CLL-B [72] y en otros desórdenes hematológicos así como en tumores sólidos [73]. Se ha demostrado que la expresión de miR-15a y miR-16-1 está inversamente correlacionada con la expresión de BCL2 en CLL y que ambos miRNAs regulan negativamente a *Bcl2* a nivel post-transcripcional. La represión de *Bcl2* por estos miRNAs induce apoptosis en una línea celular leucémica, lo que sugiere a *mir-15a* y *mir-16-1* como TSGs en LLC y quizás en otras patologías donde estos genes se pierden o son

regulados negativamente [74]. En la Tabla IV [69] se resumen los miRNAs que se han encontrado como OG y TSG en leucemias.

Tabla IV. MiRNAs como oncogenes y genes supresores de tumor en leucemias

MicroRNA	Function in cancer	Expression	CAGR location/ host gene cancer connection	Identified targets	Reference
MiR-155	OG	↑DLBCL(ABC), CLL, HL, PMBL, PTLD, pediatric BL; ↓adult BL	BIC	AGTR1, FADD, IKKε, RIPK1, TP53INP1, BACH1	References ⁵²⁻⁶⁰
MiR-17-92 cluster	OG/TSG	↑DLBCL, B-cell lymphoma, MCL	c13orf25	E2F1	References ⁶¹⁻⁶³
MiR-21	OG	↑CLL, DLBCL(ABC)		PTEN, BCL2	Calin <i>et al.</i> ⁵⁷ and Lawrie <i>et al.</i> ⁶⁴
MiR-221	OG	↑DLBCL(ABC)		c-KIT, p27KIP1	Felli <i>et al.</i> ²⁸ and Galardi <i>et al.</i> ⁶⁵
MiR-15a/16-1	TSG	↓CLL; ↑APL	13q14 deletion (CLL)	BCL2	References ^{29,57,66-68}
MiR-29	OG/TSG	↑CLL	FRA7	TCL1, DNMT3A, DNMT3B	Fabbri <i>et al.</i> ⁴⁵ and Pekarsky <i>et al.</i> ⁴⁴
MiR-181	OG/TSG	↑CLL, AML(M1,M2); ↓APL, AML(M4,M5)	NR6A1 (miR-181-b-2)	TCL1, HOXA11	References ^{41,45,66,69-71}
MiR-143/145	TSG	↓CLL, DLBCL, MALT, BL		ERK5	Akao <i>et al.</i> ⁷²
MiR-142	TSG	Translocated in B-PLL patient			Gauwerky <i>et al.</i> ⁷³
MiR-125b	TSG	Translocated in B-ALL patient			Sonoki <i>et al.</i> ⁴⁸
UC.73A(P)	TSG/OG	↓CLL	BC017741		Calin <i>et al.</i> ²¹
UC.135(E)	TSG	↓CLL	EVI1		Calin <i>et al.</i> ²¹
UC.233(E)	TSG	↓CLL	CENTG3		Calin <i>et al.</i> ²¹
UC.291(P)	TSG	↓CLL	c10orf11		Calin <i>et al.</i> ²¹

Abreviaciones: ABC, fenotipo activado de células B; AML, Leucemia mielocítica aguda; APL, Leucemia promielocítica aguda; BL, Linfoma de Burkitt; CLL, Leucemia linfocítica crónica; DLBCL, Linfoma difuso de células B largas; HL, Linfoma de Hodgkin; MALT, Linfoma extranodal de zona marginal de células B de tejido linfoide asociado a mucosa; MCL, Linfoma de células del manto; PMBL, Linfoma primario mediastinal de células B; PTLD, Desorden linfoproliferativo post-transplante; OG, Oncogen; TSG, Gen supresor de tumor. (E) exónico; (P) posiblemente exónico. [69].

MiRNAs en LLA

Hasta la fecha son pocos los estudios enfocados en la relación de los miRNAs con la LLA, en la Tabla V se resumen los trabajos que se describen a continuación. La primera evidencia fue un rearrreglo de miR-125-1 (homólogo humano de *lin-4*) en el locus del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina en un paciente con LLA-B [75].

Recientemente se encontraron 8 genes nuevos de miRNAs clonados de un paciente con LLA-B con rearrreglo MML t(1;11), los cuales a diferencia de todos los miRNAs conocidos, no están conservados entre humanos y ratón, estos son hsa-miR-1972 hasta hsa-miR-1979. También se mostró que el perfil de expresión de miRNAs es específico del subtipo de LLA-B (LLA-B con rearrreglos MLL y LLA-B sin rearrreglos MLL [76].

En la búsqueda de miRNAs que permitan diferenciar los tipos de leucemia, con posible valor pronóstico, varios trabajos se han enfocado en la aplicación de perfiles de expresión de miRNAs, con este propósito Mi y cols. identificaron 4 miRNAs capaces de diferenciar la LLA y la LMA con una exactitud del 97-99%, estos son miR-128a y miR-128b que están significativamente sobreexpresados y let-7b y miR-223 que están subexpresados

en LLA con respecto a LMA, esta diferencia de expresión, no fue consecuencia de la alteración en el número de copias de DNA genómico, pero sí, en parte a regulación epigenética, particularmente por hipometilación de islas CpG en la región del promotor, en el caso de miR-128b [77], este miRNA, también se encontró sobreexpresado en LLA, entre otros, en un estudio donde se realizó el perfil de expresión de miRNAs en LLA y LLC [78].

Se ha encontrado que la expresión de miR-16 tiene valor pronóstico en LLA infantil. MiR-16 está involucrado en la regulación de la apoptosis (al tener como blanco a BCL-2) y proliferación celular, puede interferir con las vías oncogénicas o supresoras de tumor y está implicado en la leucemogénesis. De manera global, los niveles bajos de expresión de miR-16 fueron asociados con el mejor pronóstico, mientras que los niveles de expresión más altos se asociaron con el peor pronóstico, estos resultados fueron reforzados al demostrar que la tendencia de sobrevida aumenta (para Disease Free-Survival=DFS y Overall Survival=OS) conforme va disminuyendo el nivel de expresión de miR-16 en ALL tipo T [79].

Tabla V. MiRNAs desregulados en diferentes estudios de LLA.

No. muestras	Observaciones	Referencia
1 LLA-B	Inserción de miR-125b-1 en gen de la cadena pesada de Ig	Sonoki T, et al. 2005
7 ALL, 9 CLL	↑ miR-128b, 204, 218, 331, 181b, miR-17-92 ↓ miR-135b, 132, 199s, 139, 150	Zanette, et al. 2007
54 ALL, 44 AML, 10 Norm.	↑ miR-128a, miR-128b ↓ let-7b, miR-223	Shuangli Mi, et al. 2007
93 ALL	miR-16 con valor pronóstico.	Kaddar T, et al. 2008
40 ALL-B	↑ miR-222, miR-339, miR-142-3p ↓ miR-451, miR-373*	Ju X, et al. 2009
22 LLA	Nuevos hsa-miR-1972 al 1979 Perfil miRNAs LLA-B (MLL)/sin (MLL)	D Schotte, et al. 2009
31 LLA 5 Norm.	↑ miR-34a, miR-126, miR-18b, miR-28-5p, miR-363, miR-374a, miR-128a, miR-128b, and miR-146a ↓ miR-27a, miR-30b	Hua Zhang, et al. 2009
54 AML, 7 ALL 16 Norm.	↑ miR-92a	Masami T, et al. 2009
53 AML 32 ALL	miR-23a, miR-27a/b, miR-128a, miR-128b, miR-221, miR-222, miR-223, and let-7b, miR-17, miR-20a, miR-29a/c, miR-29b, miR-146a, miR-150, miR-155, and miR-196b	Wang Y, et al. 2010

1.4.7. MiRNAs circulantes

Los miRNAs son una clase nueva de reguladores, que recientemente han sido estudiados como biomarcadores en circulación periférica para la detección de cáncer. Sin embargo el origen y valor de estos miRNAs tienen todavía que ser elucidados [80]

Se ha encontrado una cantidad significativa de miRNAs extracelulares en fluidos corporales humanos como, plasma [81, 82], suero [83] y orina [84]. Algunos miRNAs circulantes en la sangre se han propuesto exitosamente como biomarcadores para algunas enfermedades como enfermedad cardiovascular [85], enfermedad pediátrica de Crohn [86], esclerosis múltiple [87], incluyendo cáncer [81, 88].

Los miRNAs son notablemente estables en muestras de suero y plasma [81-83, 89, 90]. Los miRNAs extraídos del suero pueden sobrevivir el tratamiento de RNasa A (tratamiento durante toda la noche), comparado a otros RNAs endógenos como 18s rRNA, 28s rRNA, GAPDH, β -actina y U6 que son degradados después de 3 hrs de tratamiento [90]. De la misma manera, los ciclos repetidos de congelación-descongelación [83, 90] y tratamientos con soluciones de pH alto y bajo [90], no afectan a los miRNAs presentes en el suero. De manera similar, los miRNAs del plasma pueden permanecer estables a temperatura ambiente por 24 hrs y durante 8 ciclos de congelación-descongelación, sin embargo, los miRNAs sintéticos son degradados rápidamente en el plasma [81]. Esto indica que los miRNAs endógenos en plasma, en un sistema en circulación enriquecido con RNasa, existen en una forma que es resistente a la actividad de la RNasa plasmática [80].

El modelo dominante que confiere estabilidad a los miRNAs circulantes, es que la mayoría de los miRNAs circulantes están acompañados por varios acarreadores como exosomas, lipoproteínas de alta densidad (HDL) y lipoproteínas de baja densidad (LDL), Ago2, etc. [91], de tal manera que los miRNAs libres de acarreadores son degradados por acción de la RNasa y otros factores ambientales [92-94].

A) Exosomas

Los exosomas son una de las alternativas propuestas por los investigadores, como acarreadores de los miRNAs circulantes liberados por exocitosis. Este modelo es soportado por la detección de exosomas asociados con miRNAs [95-98] y miRNAs encapsulados en vesículas en el suero y plasma [93, 99-101]. Los exosomas son vesículas pequeñas (50-90 nm) de membrana lipoproteica de origen endocítico, estos son la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con membranas plasmáticas secretadas en el espacio extracelular. Los exosomas median la comunicación célula-célula vía interacción ligando-receptor y componentes de transporte intracelular, incluyendo entrega de miRNAs en exosomas a células receptoras por fusión o endocitosis [96]. Gran variedad de células son capaces de liberar exosomas, incluyendo reticulocitos, células dendríticas, células epiteliales y células tumorales [80]. Para el crecimiento y progresión de tumores, estos reportes arrojan la posibilidad que los miRNAs exosomales derivados del tumor afecten a las células que lo

rodean a través del silenciamiento de la expresión de genes supresores de tumor [102], o por el contrario, la inhibición del crecimiento celular puede ser inducida por la liberación de miRNAs supresores de tumor [97].

B) HDL y LDL

Además de exosomas, se han encontrado HDL y LDL con capacidad de acarrear miRNAs en el plasma y entregarlos a células receptoras distantes [103]. Más aún, se ha demostrado que ciertos miRNAs son encapsulados exclusivamente o en HDL o exosomas. Esto conlleva a preguntas adicionales, por ejemplo, ¿Hacen las células una selección específica de acarreadores para diferentes miRNAs dependiendo de la función particular? [104], ¿Son regulados por diferentes vías, como endocitosis o fusión de membrana? [105].

C) Proteínas Ago2

Sin embargo, el modelo acarreador vesicular no puede ser el mecanismo predominante para los miRNAs secretados por los tejidos. Se ha encontrado que la mayoría de los miRNAs circulantes están co-fraccionados con complejos proteicos más que con microvesículas, tanto en células en cultivo y plasma humano [92, 106]. Los miRNAs extracelulares están predominantemente asociados con la proteína Argonauta 2 (Ago2, ~96kDa) [80]. Ago2 es el componente efector del complejo de silenciamiento inducido por miRNAs (miRISC) que se une directamente a los miRNAs y llevan a cabo la represión del RNAm en las células [107]. La mayoría de los miRNAs extracelulares pueden ser productos de células muertas que permanecen en el espacio extracelular debido a la alta estabilidad de la proteína Ago2 y el complejo Ago2-miRNA [106].

Los miRNAs circulantes pueden provenir no solamente de células tumorales circulantes [82, 108], sino también pueden ser liberados en el torrente sanguíneo directamente de las células de la sangre [89] u otras células de tejidos afectados por la enfermedad [90]. Se sabe que las firmas de miRNAs en suero o plasma pueden reflejar correlación entre las condiciones fisiológicas o enfermedad. En un estudio se observó correlación de la desregulación de miRNAs entre tejido y suero en ambos, animales transgénicos *Kras*^{G12D} y en pacientes con cáncer de próstata [109], además, también se ha demostrado que los niveles de miRNAs oncogénicos circulantes disminuyen después de la resección del tumor, como por ejemplo miR-21 en carcinoma de células escamosas esofágicas (ESCC) [110], miR-31 en pacientes con carcinoma de células escamosas orales (OSCC) [111], miR-29a y miR-92 en cáncer colorectal (CRC) [112], miR-21 y miR-106b en cáncer gástrico [113] y miR-195 y let-7a en cáncer de mama (CaMa) [82]. Al contrario, los niveles de miRNAs supresores de tumor fueron, incrementados, como por ejemplo la relación de miR-92a/miR-638 en carcinoma hepatocelular (HCC) [114].

1.4.8. Aplicación potencial clínica y terapéutica de miRNAs

La identificación de alteraciones que posiblemente afecten loci de miRNAs mediante técnicas citogenéticas pueden ser de ayuda para el diagnóstico o pronóstico, por ejemplo deleciones o translocaciones que involucren a *miR-15a/miR-16-1* en el locus 13q14.3 en pacientes con LLC puede señalar un buen pronóstico, debido a que la deleción 13q14 está asociada con los mayores intervalos libres de tratamiento [115]. Por otra parte la identificación de la disminución de la expresión de miembros de la familia de miR-29 y miR-181, que tienen como blanco al OG TCL1, cuya sobreexpresión está asociada con un pronóstico pobre [116], puede señalar un mal pronóstico. Con este enfoque, el perfil de miRNAs puede representar un buen indicador de discriminación entre pacientes con un pronóstico prometedor contra aquellos con un mal pronóstico [117].

Considerando el hecho de que los miRNAs están involucrados en la iniciación, progresión y metástasis de tumor, es de esperarse que sean blanco de opciones terapéuticas efectivas para el tratamiento del cáncer. El enfoque para la terapia puede incluir la ganancia o pérdida de función de miRNAs en las células cancerosas (Fig. 7).

Muchos miRNAs han sido identificados con efecto supresor de tumor, la restauración de su expresión puede producir efectos terapéuticos, tal es el caso de los miRNAs miméticos que han sido utilizados para restaurar la función del miRNA dentro de la célula tumoral [118].

Para los miRNAs oncogénicos, se han diseñado y probado múltiples estrategias para lograr su disminución. Estas estrategias incluyen el uso de oligonucleótidos anti-miRNAs (AMOs), moléculas pequeñas inhibidoras, esponjas de miRNAs y miRNAs máscara.

- Los AMOs pueden bloquear la interacción de los miRNAs y su RNAm blanco a través de inhibición competitiva del alineamiento de las bases [119].
- La disminución de los miRNAs también puede llevarse a cabo bloqueando su biogénesis. En un estudio reciente, se probaron varias moléculas orgánicas pequeñas para probar su potencial contra la función de miR-21, y se identificó al azobenceno como un inhibidor eficiente de la expresión de miR-21 [120].
- Las esponjas de miRNAs son RNAm sintéticos que contienen múltiples sitios de alineamiento para el miRNA endógeno, funcionan mediante la absorción de los miRNAs blanco originando el bloqueo de su función reguladora en la célula [121].
- Los protectores de blancos (miR-máscara) son semejantes a los AMOs, sin embargo, los miRs-máscara no interactúan directamente con el miRNA blanco, sino que se unen al sitio de alineamiento del miRNA en la región 3'UTR del mRNA blanco mediante un mecanismo de complementaridad total [122, 123].

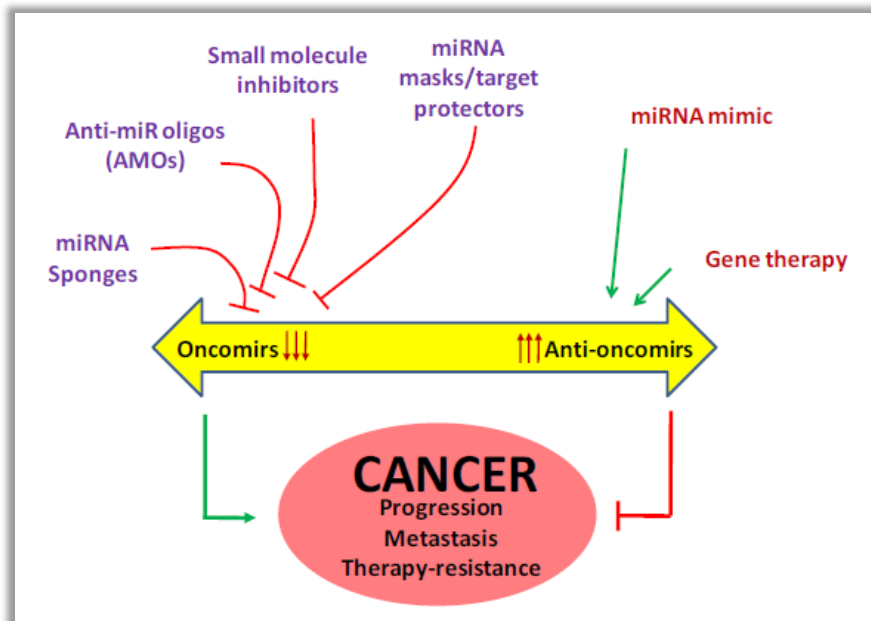


Fig. 7. Estrategias terapéuticas contra el cáncer basadas en miRNAs.

Inhibición de la función de oncomirs mediante el uso de oligonucleótidos anti-miRNAs (AMOs), moléculas pequeñas inhibitoras, esponjas de miRNAs y miRNAs máscara/protectores de blancos. Promoción de la actividad de anti-oncomirs a través de terapia génica o mediante miRNAs miméticos, pueden servir como opciones terapéuticas nuevas contra el cáncer [124].

En resumen, la inhibición de un miRNA particular relacionado con la aparición o progresión del cáncer, puede eliminar la inhibición de la traducción de una proteína terapéutica o supresora de tumor, contrariamente, la administración de miRNAs miméticos, pueden aumentar la población de miRNAs endógenos que repriman la traducción de una proteína oncogénica [125].

Si el defecto molecular primario de una enfermedad está en los miRNAs o en su vía, en consecuencia la expresión de determinados RNAm que codifican para proteínas está desregulada, se podría intervenir normalizando o corrigiendo la expresión de miRNAs, lo que podría resultar en la recuperación del fenotipo normal de las células desde el estado de enfermedad o incluso inducir la muerte celular por apoptosis. Por el contrario, en enfermedades en las que vemos que el problema viene dado por una desregulación de los patrones de expresión de RNAm, pero que el patrón de miRNAs es relativamente normal, se podría intentar normalizar utilizando miRNAs sintéticos que corrijan estos defectos de expresión de los mensajeros, de esta manera los miRNAs pueden tener una importante relevancia clínica [126].

Para la modificación de los niveles de expresión de miRNAs endógenos, existen diferentes estrategias basadas en la administración de AMOs complementarios al miRNA maduro endógeno, estos oligonucleótidos anti-miRNAs inactivan específicamente los miRNAs. Los oligonucleótidos que contienen en el extremo 5' un grupo -O-metilo o 2'-O-metoxietilo son versiones mejoradas. También se han diseñado oligonucleótidos LNAs (Locked Nucleic acid Antisense), sondas en las que hay una mezcla de oligonucleótidos

DNA/LNA que forman uniones fuertes con su RNA complementario en las células. También encontramos anti-miRNAs conjugados con colesterol, que tienen una elevada eficiencia para inhibir la actividad de miRNAs en varios órganos cuando se inyectan en ratón, pudiendo tener aplicaciones terapéuticas.

La sobreexpresión de miRNAs endógenos se puede conseguir a través de sistemas de expresión que usen sistemas víricos o liposomales para introducirse en la célula. En estos sistemas la expresión de miRNAs se produce mediante vectores de expresión que contienen promotores para la polimerasa III, algunos pueden utilizar también promotores de polimerasa II, en éste último método hay una mayor eficacia cuando se expresa el pri-miRNA en lugar del miRNA maduro.

Otra estrategia, es el diseño de miRNA para disminuir las cantidades de múltiples RNAm. La regulación de múltiples blancos mediante un miRNA sintético, con la habilidad de unirse a sitios blanco similares en diferentes RNAm, es difícil. Actualmente existen programas informáticos que pueden ser usados para diseñar siRNAs dirigidos a un único blanco, pero es bastante más complicado el diseño para múltiples blancos a la vez, debido a que se tienen que tener en cuenta muchos factores, entre ellos los blancos predichos, las homologías entre RNAm y miRNAs, todo de manera empíricamente, para conseguir disminuir las cantidades de varios RNAm a la vez, partiendo de un solo miRNA.

Todas estas estrategias están todavía en fase inicial, sin embargo, con el desarrollo de nuevas tecnologías, de nuevos algoritmos y sobre todo, con el avance experimental tan rápido que se está produciendo en el campo de regulación génica y en el descubrimiento de nuevos blancos de estos miRNAs, pronto llegará a ser una herramienta terapéutica plausible en el tratamiento de múltiples enfermedades, entre ellas el cáncer [126].

Algunos candidatos han ya progresado a la fase clínica. Los miRNAs bajo investigación son aquellos que no solamente producen resultados eficaces en varias enfermedades, sino que también se cuenta con suficientes datos que permiten la colocación exacta del miRNA en la vía relacionada a la enfermedad. De acuerdo a la información publicada, los miRNAs candidatos más avanzados se muestran en la Tabla VI. Entre estos están los miRNAs let-7 y miR-34, los cuales están desregulados en un amplio espectro de tumores sólidos [127-130].

Tabla VI. MiRNAs en el desarrollo terapéutico.

miRNA	Indicación	Estado de desarrollo
Anti-miRNAs		
miR-122	Virus de la Hepatitis C	Ensayos clínicos fase 2
miR-208/499	Falla crónica del corazón	Desarrollo preclínico
miR-195	Infarto cardíaco	Desarrollo preclínico
miRNAs		
miR-34	Cáncer	Desarrollo preclínico
Let-7	Cáncer	Desarrollo preclínico

2. JUSTIFICACIÓN

Se han reportado perfiles de expresión de miRNAs con valor diagnóstico y pronóstico en pacientes con LLA, sin embargo, dependiendo del enfoque del estudio es el perfil obtenido, los perfiles pueden ser diferentes si el objetivo es diferenciar un tipo específico de leucemia con respecto a sujetos sanos, diferenciar entre dos tipos o subtipos de leucemia, u obtener un perfil asociado a determinada alteración cromosómica, si bien, hay miRNAs alterados que se presentan consistentemente en los diferentes perfiles, muchos otros varían, por lo que se requieren más trabajos que soporten un perfil de miRNAs consenso para cada leucemia o en nuestro caso, específico para la LLA, además se sabe que la expresión de genes varía dentro de una población, por lo que para obtener perfiles de expresión de miRNAs confiables, relacionados a una enfermedad, es importante determinar el rango de variabilidad normal a través de una población demográfica o en una población específica, en este caso, el noreste de México.

Todos los estudios han sido realizados a partir de células MN, y el objetivo de nuestro trabajo es obtener un perfil de expresión de miRNAs a partir del plasma de los pacientes con LLA, este análisis es muy importante puesto que los miRNAs circulantes tienen un gran potencial como biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como blancos terapéuticos.

Por otro lado, aunque existen algunos trabajos donde se ha asociado la expresión de miRNAs a algunas leucemias, estos trabajos no se han enfocado a la asociación o identificación de los genes que pudieran estar siendo afectados por estos miRNAs desregulados. Por lo que, es importante no solo identificar los miRNAs involucrados en la LLA, sino identificar los genes a los que estos miRNAs están regulando directa o indirectamente.

A pesar del gran avance biológico que ha hecho posible el aumento en el conocimiento de la leucemogénesis, se sabe poco acerca de los eventos patológicos que desencadenan el inicio y progresión de esta enfermedad [70]. La caracterización de una nueva vía de regulación de los genes alterados por miRNAs que se encuentran desregulados en la LLA ampliará nuestro conocimiento acerca del desarrollo de esta enfermedad.

En este trabajo, nos propusimos obtener el perfil de expresión de un grupo de aproximadamente 667 miRNAs para identificar los que pudieran estar asociados a LLA-B y posteriormente validarlos en un grupo de pacientes mayor de nuestra población, obtener miRNAs de valor diagnóstico y pronóstico. Por otra parte, determinar los genes que son regulados por estos miRNAs con el fin de conocer las rutas de señalización alteradas en las que participan estos genes y por ende los miRNAs asociados a ellos.

3. HIPÓTESIS

Los miRNAs expresados diferencialmente en pacientes con LLA alteran la expresión de genes involucrados en la leucemogénesis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar el perfil de expresión de miRNAs en pacientes con LLA-B y su interacción con genes asociados a sobrevida.

4.2. Objetivos específicos

- 1) Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con LLA respecto a sujetos sanos.
- 2) Seleccionar miRNAs para su validación.
- 3) Determinar en cultivo (línea celular SUP-B15) los genes que son regulados por los miRNAs seleccionados.
- 4) Analizar las vías de señalización en la que participan los genes regulados por los miRNAs y seleccionar los miRNAs involucrados en la leucemogénesis con posible utilidad clínica.

5. ESTRATEGIA GENERAL

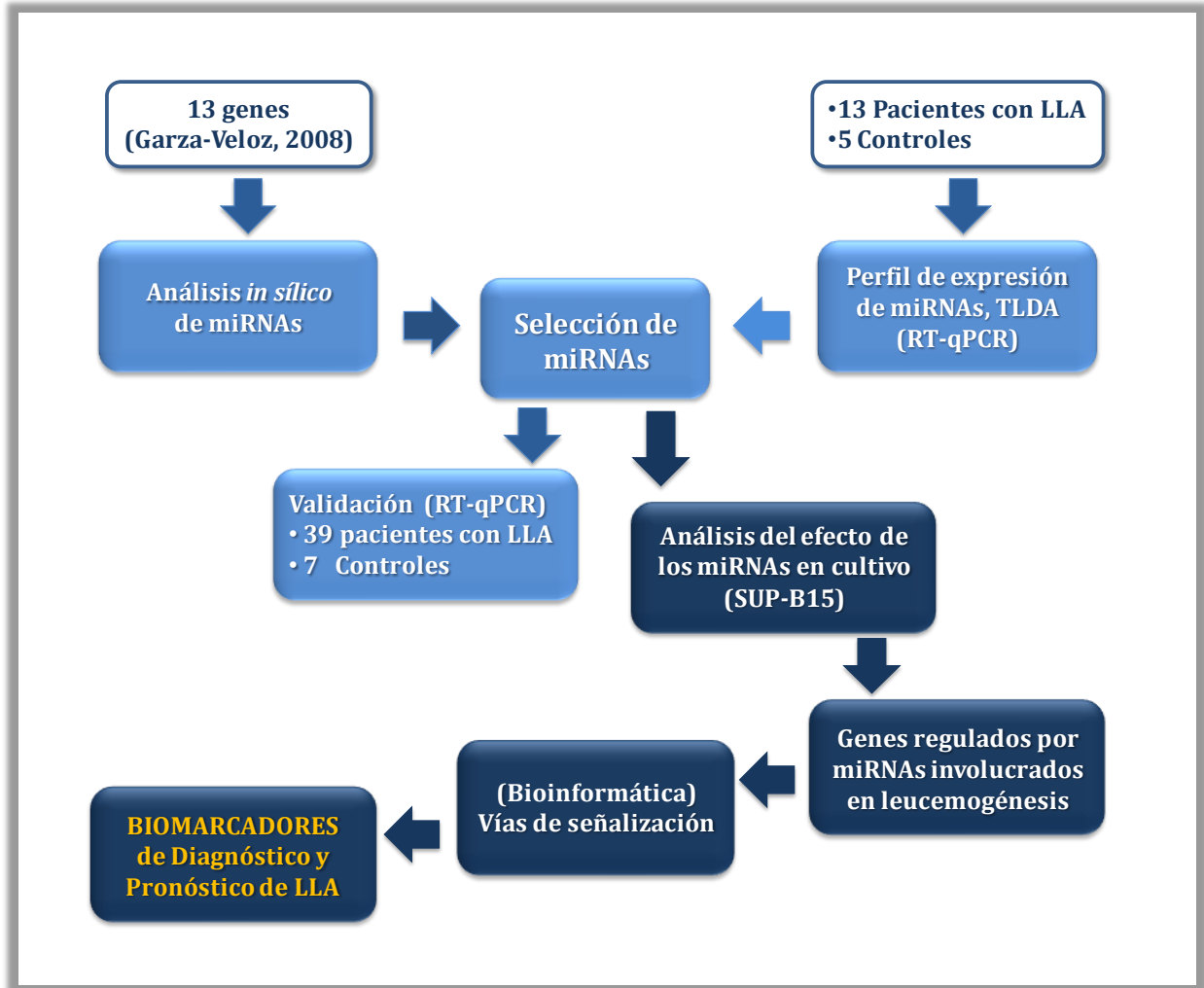


Fig. 8. Estrategia general.

En un estudio previo de expresión mediante RT-qPCR en muestras (células MN de sangre periférica) de pacientes con LLA, se obtuvieron 13 genes asociados a sobrevida (Tesis de maestría de Garza-Veloz, 2008), en el presente trabajo se realizó un análisis *in silico* para obtener los miRNAs que se unen a los 13 genes mencionados. Por otra parte se obtuvo el perfil de expresión de miRNAs mediante PCR tiempo real (RT-qPCR) a partir del plasma de 13 pacientes con LLA, se compararon los miRNAs obtenidos en este estudio con los obtenidos del análisis *in silico* y se seleccionaron miRNAs para validarlos mediante RT-qPCR en 39 muestras de plasma de pacientes con LLA y 7 sujetos sanos como controles. Posteriormente se transfectaron estos miRNAs en células SUP-B15 para determinar los genes que se alteran por su efecto mediante microarreglos de expresión. Utilizando estos genes y empleando análisis bioinformático se obtuvieron las principales vías de señalización en las que participan la mayoría de los genes afectados por los miRNAs desregulados en pacientes con LLA, para finalmente obtener los miRNAs que pudieran ser útiles como biomarcadores en el seguimiento y pronóstico de estos pacientes.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Características del estudio

El tipo de estudio que se llevó a cabo fue transversal, comparativo y observacional. El Universo fue constituido por pacientes mexicanos recién diagnosticados con LLA-B del Servicio de Hematología del Centro Universitario Contra el Cáncer (CUCC) del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”.

- *Criterios de inclusión:* pacientes recién diagnosticados con LLA-B, que aceptaron participar en el trabajo de investigación y firmaron la carta de consentimiento informado. En caso de pacientes menores de edad, la carta fué firmada por el padre o tutor.
- *Criterios de exclusión:* pacientes que no aceptaron participar en el estudio y de los que no se cuenta con la carta de consentimiento informado.
- *Criterios de eliminación:* Muestra insuficiente.
- *Variables:* Expresión relativa de 667 miRNAs.
- *Tamaño de la muestra:* se realizó el análisis de 39 muestras de pacientes con LLA-B y 7 sujetos sanos.

6.2. Obtención de muestras

A los nuevos pacientes que llegaban al Servicio de Hematología del Centro Universitario Contra el Cáncer (CUCC) del Hospital Universitario, con sospecha de leucemia, se les extrajo sangre periférica en un tubo con anticoagulante EDTA, al día siguiente, después de haber sido diagnosticados mediante técnicas estándares como morfología, citoquímica e inmunofluorescencia, nos proporcionaban la muestra de aquellos pacientes con LLA, la cual habían almacenado a 4°C, se separó el plasma y se hicieron alícuotas en tubos eppendorf de 1.5 ml que se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Previo al análisis de las muestras, se les propuso a los pacientes participar en el estudio, se les explicó éste y se les solicitó firmaran la carta de consentimiento informado, en el caso de menores de edad, se solicitó el consentimiento a los padres o tutores. También fueron incluidos en el estudio 7 sujetos adultos, sanos clínicamente, que aceptaron participar.

Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética con el número de registro BI08-009.

6.3. Obtención del perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con LLA

Para llevar a cabo el perfil de microRNAs se emplearon 13 muestras de plasma de pacientes con LLA y 5 controles (2 muestras de plasma individuales y un pool de 3 muestras de plasma de sujetos sanos), a partir de los cuales se obtuvo el RNA. Para analizar un total de 667 miRNAs humanos se utilizó la plataforma Megaplex y reactivos de Applied Biosystems (Foster City, CA), esta plataforma consiste en 2 reacciones de RT Megaplex (Pool A y B), 2 reacciones de pre-amplificación (Pool A y B), y 2 placas TaqMan MicroRNA Arrays (Array A y B) por muestra donde se lleva a cabo la qPCR (Fig. 9).

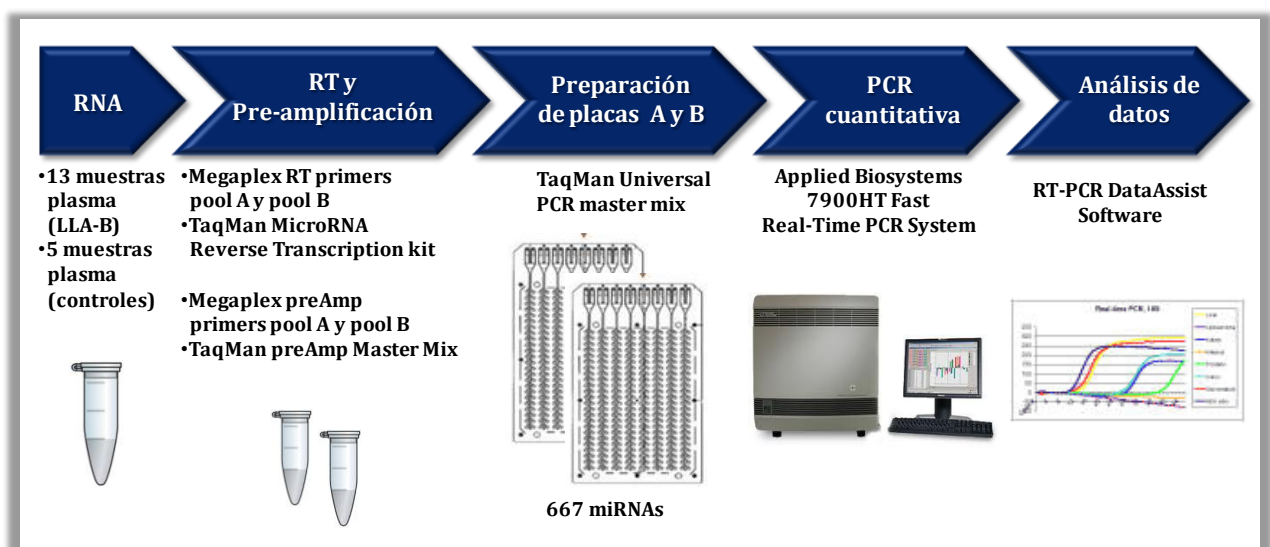


Fig. 9. Procedimiento general para la obtención del perfil de microRNAs.

6.3.1. Extracción de RNA

Para la obtención del perfil de miRNAs se extrajo el RNA total de 13 muestras y 5 sujetos sanos (controles) utilizando el kit miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, UK). Se descongeló el plasma, se colocaron 200 μ l en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se le añadieron 700 μ l del reactivo de lisis QIAzol, se mezcló en vórtex y se dejó 5 min a temperatura ambiente para promover la disociación de los complejos de nucleoproteínas; se añadieron 140 μ l de cloroformo, se mezcló en vórtex por 15 seg y se incubó 3 min a temperatura ambiente, se centrifugó 15 min a 14,000 rpm y 4°C y posteriormente se transfirió la fase superior acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml, se añadieron 1.5 volúmenes de etanol y se mezcló por inversión del tubo; se transfirieron 700 μ l de la mezcla a una minicolumna colocada en un tubo colector y se centrifugó 15 seg a 10,000 rpm a temperatura ambiente, se descartó la solución filtrada y se repitió este proceso con la mezcla restante; se añadieron 700 μ l de buffer RWT a la minicolumna y se centrifugó 15 seg a 10,000 rpm, se descartó la solución filtrada; se añadieron 500 μ l de buffer RPE a la minicolumna y se centrifugó 15 seg a 10,000

rpm, se descartó la solución filtrada; se añadieron otros 500 µl de buffer RPE a la minicolumna y esta vez se centrifugó 2 min a 10,000 rpm para secar la membrana de la minicolumna; se transfirió la minicolumna a un tubo colector nuevo y se centrifugó 1 min a 14,000 rpm para eliminar restos del buffer RPE que pudiera haber quedado; posteriormente se transfirió la minicolumna a un tubo de 1.5 ml nuevo y se eluyó el RNA con 30 µl de agua libre de RNAsas que se dispensó directamente sobre la membrana de la minicolumna, se centrifugó 1 min a 10,000 rpm; se volvieron a colocar los 30 µl de la elución en la minicolumna y se centrifugó 1 min a 14,000 rpm.

La concentración y pureza del RNA se determinó mediante medición espectrofotométrica a 260 nm en el NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA). Todas las muestras de RNA se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

6.3.2. Síntesis del DNA complementario (DNAc)

Se realizó la RT usando 30-1000 ng de RNA total empleando el kit TaqMan microRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) y 2 juegos de primers megaplex por separado, pool A y pool B (Megaplex RT Primers Human Pool Set, Applied Biosystems), estos son pools predefinidos de 381 y 294 primers, respectivamente, para realizar la síntesis simultánea de DNAc de miRNAs maduros. Por lo que se obtuvieron 2 tubos de DNAc por muestra, el correspondiente al pool A y el del pool B. Se prepararon 2 mezclas con los reactivos y cantidades descritas en la Tabla VII, excepto el RNA, se mezcló en vórtex, se centrifugó brevemente y se colocaron 4.5 µl de esta mezcla en tubos de 0.6 ml, se agregó el RNA, se mezcló en el vórtex, se centrifugaron brevemente y se colocaron en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem). El programa de RT se muestra en la Tabla VIII. Se colocaron los tubos a 4°C hasta su uso o se almacenaron a -20°C hasta por una semana.

Tabla VII. Reactivos de RT para la obtención de DNAc a utilizar en las placas TLDA

Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (μ l)	Conc. final
Megaplex RT Primers*	10X	0.8	1X
dNTP mix	100 mM	0.2	2.6 mM
Enzima Multiscribe RT	50U/ μ l	1.5	10U/ μ l
Buffer RT	10X	0.8	1X
MgCl ₂	25mM	0.9	3 mM
RNAse Inhibitor	20U/ μ l	0.1	0.26 U/ μ l
Agua libre de nucleasas	-	0.2	-
RNA (30-1000 ng)	-	3	-
Volumen final	-	7.5	-

*Se prepararon de manera independiente las mezclas con Pool A y Pool B.

Tabla VIII. Programa de RT para la obtención de DNAc a utilizar en las placas TLDA.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	16°C	2 min	40
	42°C	1 min	
	50°C	1 seg	
2	85°C	5 min	1
3	4°C	∞	1

6.3.3. Pre-amplificación

Enseguida se realizó la pre-amplificación del producto de la RT utilizando 2 juegos de primers Megaplex RT, pool A y pool B (Megaplex preAmp Primers Human Pool set, Applied Biosystems), estos son pools de primers sentido y antisentido específicos, útiles cuando se parte de cantidades pequeñas de RNA. Se prepararon 2 cocteles (A y B) con los reactivos en las cantidades descritas en la Tabla IX, excepto el DNAc, se mezcló en vórtex, se centrifugó brevemente y se colocaron 22.5 μ l del coctel en tubos de 1.5 ml a los cuales se les agregaron 2.5 μ l de DNAc correspondiente, se mezcló en el vórtex, se centrifugaron brevemente y se incubaron en hielo durante 5 min., posteriormente se colocaron en el termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem). El programa de pre-amplificación se muestra en la Tabla X. Se colocaron los tubos a 4°C hasta su uso o se almacenaron a -20°C hasta por una semana.

Tabla IX. Reactivos de pre-amplificación.

Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (µl)	Conc. final
PreAmp Master Mix	2X	12.5	1X
Megaplex preAmp Primers*	10X	2.5	1X
Agua libre de nucleasas	-	7.5	-
DNAc	-	2.5	-
Volumen final	-	25	-

*Se prepararon de manera independiente las mezclas con Pool A y Pool B.

Tabla X. Programa de pre-amplificación.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	95°C	10 min	1
2	55°C	2 min	1
3	72°C	2 min	1
4	95°C	15 seg	12
	60°C	4 min	
5	4°C	∞	1

6.3.4. PCR tiempo real utilizando placas TaqMan Low Density Array (TLDA).

Se diluyeron los 25 µl de los productos pre-amplificados añadiendo 25 µl de buffer Tris-EDTA 0.1X pH 8; posteriormente en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezclaron los reactivos con las cantidades descritas en la Tabla XI.

Se cargaron cada uno de los 8 carriles de la placa TaqMan Human MicroRNA Array Set v2.0 (Placa A y B) con 100 µl de la mezcla correspondiente A y B, se centrifugaron las placas, se sellaron y se cargaron en el termociclador 7900 HT Fast Real Time PCR (Applied Biosystem) donde se corrió el programa para 384 well TaqMan Low Density Array. Se realizó la qPCR por duplicado de una muestra y un control para la placa A y de un control para la placa B.

Tabla XI. Reactivos para la qPCR utilizando las placas TLDA.

Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (µl)	Conc. final
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	2X	450	1X
Agua libre de nucleasas	-	441	-
Producto pre-amplificado diluido	-	9	-
Volumen final	-	900	-

6.3.5. Análisis de datos

Los datos fueron analizados con el software SDS versión 2.4 y el programa RQ manager 1.2 (Applied Biosystems, Foster City, CA), para la determinación de la cuantificación relativa se utilizó el programa DataAssist (Applied Biosystems, Foster City, CA) empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

6.4. Selección y validación de miRNAs por RT-qPCR

Se realizó un análisis *in silico* de miRNAs en los 13 genes asociados a sobrevida en pacientes con LLA, obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Tesis de maestría, Garza-Veloz, 2009) mediante el programa computacional TargetScan (<http://www.targetscan.org/>), el cual predice los genes blanco para miRNAs. Se compararon estos miRNAs con los del perfil de expresión que se obtuvieron de las placas TLDA, y se seleccionaron los miRNAs encontrados en ambos estudios para su validación mediante RT-PCR tiempo real (RT-qPCR) en 39 muestras y 7 controles (Fig. 10). Se extrajo el RNA total con trizol debido a que se necesitaba mayor cantidad de RNA puesto que se contempló no realizar la preamplificación que se llevó a cabo cuando se obtuvo el perfil de expresión de miRNAs utilizando las placas TLDA.

6.4.1 Extracción de RNA total con Trizol

Para realizar la validación de los miRNAs individuales se extrajo el RNA total con trizol (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), de 39 muestras y 7 sujetos sanos (controles), se utilizaron 200 µl de plasma previamente descongelado, se añadieron 600 µl de trizol, se mezcló con vórtex y se incubaron 5 min a temperatura ambiente; después se agregaron 160 µl de cloroformo, se mezclaron 15 seg en el vórtex y se incubaron 15 min a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C; se transfirió la fase superior

acuosa a un tubo nuevo de 1.5 ml y se precipitó el RNA con 500 µl de isopropanol mezclando por inversión del tubo y centrifugando a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C; se eliminó el sobrenadante y se

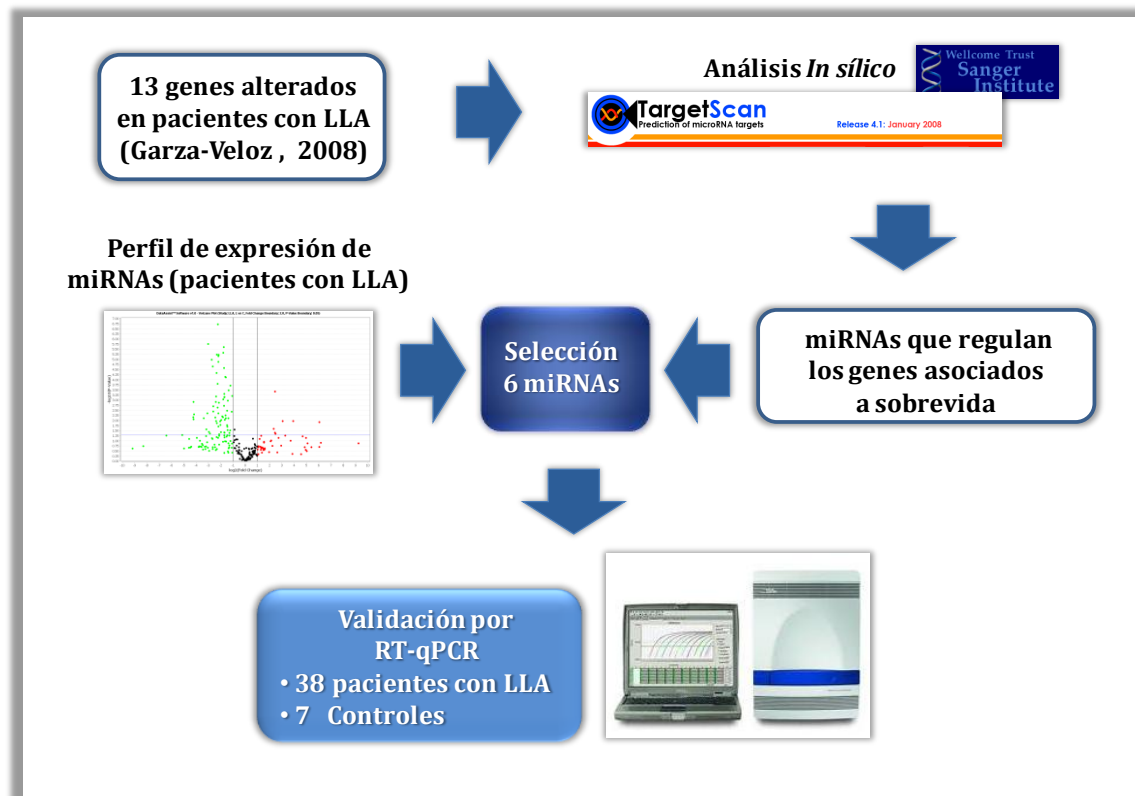


Fig. 10. Estrategia de selección y validación de miRNAs.

lavó la pastilla de RNA con 800 µl de etanol al 75%, se mezcló en el vórtex y se volvió a centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el exceso de humedad dejando los tubos abiertos y finalmente se resuspendió el RNA en 30 µl de agua libre de RNAsas.

La concentración y pureza del RNA se determinó mediante medición espectrofotométrica a 260 nm en el NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA). Todas las muestras de RNA se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

6.4.2 Validación de miRNAs mediante RT-qPCR

Se realizó la RT usando 100ng de RNA total con el kit de RT TaqMan miRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) y primers de RT específicos para cada miRNA (TaqMan MicroRNA Assay, Applied Biosystem, Foster City, CA).

Para un volumen final de reacción de 7.5 μ l se utilizaron los reactivos en el orden y volumen descrito en la Tabla XII. Se utilizó el termociclador PTC-100 (MJ Research) con el programa de la Tabla XIII. Los DNAs se colocaron a 4°C o se almacenaron a -20°C hasta su utilización. Posteriormente se realizó la PCR tiempo real por triplicado incluyendo controles negativos sin templado. En un volumen final de reacción de 10 μ l se mezclaron los reactivos en el orden y volumen descrito en la Tabla XIV. Se empleó el termociclador 7500 Fast Real Time (Applied Biosystems, Foster City, CA) con el programa de la Tabla XV.

Tabla XII. Reactivos para la RT de miRNAs individuales

Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (μ l)	Conc. final
Agua libre de nucleasas	-	2.58	-
Buffer RT	10X	0.75	1X
RNAse Inhibitor	20 U/ μ l	0.095	0.25 U/ μ l
dNTP mix	100 mM	0.075	1 mM
Enzima Multiscribe RT	50 U/ μ l	0.5	3.3 U/ μ l
Primers RT (TaqMan MicroRNA Assay)*	5X	1.5	1X
RNA (50ng/ μ)	-	2	13.3 ng/ μ l
Volumen final	-	7.5	-

*Primers de RT específicos para determinado miRNA.

Tabla XIII. Programa de RT para miRNAs individuales

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	16°C	30 min	1
2	42°C	30 min	1
3	85°C	5 min	1
4	4°C	∞	1

Tabla XIV. Reactivos para la qPCR de miRNAs individuales

Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (μl)	Conc. final
Agua libre de nucleasas	-	3.5	-
TaqMan Gene Expression Master Mix	2X	5	1X
Primers qPCR (TaqMan MicroRNA Assay)*	20X	0.5	-
DNAc	-	1	-
Volumen final	-	10	-

*Primers de RT específicos para determinado miRNA.

Tabla XV. Programa de qPCR de miRNAs individuales

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1		50°C	2 min	1
2	Activación AmpliTaq Gold	95°C	10 min	1
3	Desnaturalización	95°C	15 seg	40
	Alineamiento y Extensión	60°C	1 min	
4	Mantenimiento	4°C	∞	1

6.4.3 Análisis de datos

De los datos obtenidos para la validación se calculó el índice de similitud, correlación y estabilidad de los miRNAs utilizados como genes de referencia, posteriormente se determinaron los niveles de expresión relativa de los miRNAs seleccionados con respecto a los genes de referencia tomando como calibrador a las muestras provenientes de los sujetos sanos (controles) empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$RQ = 2^{- (Ct \text{ miR} - Ct \text{ gen ref.})_{Mtra LLA} - (Ct \text{ miR} - Ct \text{ gen ref.})_{Ctr}}$$

También se determinó la sensibilidad y especificidad de los miRNAs desregulados mediante curvas ROC (Operating Characteristics Curves) y el área bajo la curva asociada (AUC).

6.5. Determinación en cultivo celular (SUP-B15) de los genes que son regulados por los miRNAs seleccionados

La primera parte de este trabajo consistió en obtener el perfil de expresión de miRNAs en pacientes con LLA-B utilizando la plataforma megaplex y las placas TLDA, y seleccionar algunos miRNAs para su validación en un número de muestras mayor para corroborar su alteración. La segunda parte del trabajo inicia en este apartado, consiste en realizar un análisis funcional de los miRNAs en cultivo celular mediante la inducción de niveles de miRNAs contrarias a las encontradas en las células leucémicas (línea celular), con el fin de determinar los genes que se alteran directa o indirectamente por el efecto de determinado miRNA, y finalmente obtener procesos biológicos y vías comunes en las que participan estos genes, que se ven afectadas por un desequilibrio en la homeostasis celular.

La determinación del efecto de los miRNAs en cultivo celular se llevó a cabo en la línea celular SUP-B15 de American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1929, línea derivada de células malignas colectadas de la médula ósea de un niño de 8 años de edad con LLA tipo B, positivo para el cromosoma Philadelphia.

Se descongeló la línea celular en baño de agua a 37°C y se colocó el cultivo en un frasco de cultivo de 75 cm³ con 9 ml de medio IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, ATCC 30-2005, contiene 4 mM de L-glutamina), el cual incluye 20% de suero fetal bovino (FBS ATCC 30-2020) y Penicilina/Estreptomina al 1X (P/S Stock 100X: 10,000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomina), previamente atemperado a 37°C. El cultivo se colocó en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y humedad relativa. Se mantuvo el cultivo entre 5x10⁵ y 2x10⁶ células/ml, cambiando el medio 2 veces por semana en condiciones asépticas en una campana de cultivo celular, se transfirió el cultivo a un tubo falcon de 15 ml, se centrifugó a 5000 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 4 ml de medio IMDM (con 20% de FBS y P/S 1X), el cual se transfirió a un frasco de cultivo de 75 cm³ conteniendo 6 ml del mismo medio y se incubó bajo las condiciones descritas anteriormente. El conteo celular se realizó utilizando la cámara de Neubauer mezclando 20 µl del cultivo y 20 µl de Azul Tripán (dilución 1:2), colorante azoico que se utiliza para ensayos de viabilidad celular, las células vivas con la membrana celular intacta no son coloreadas debido a que el colorante no es absorbido, sin embargo, el colorante atraviesa la membrana de las células muertas. Por lo que las células vivas se observan refringentes y las células muertas presentan una coloración azul bajo el microscopio óptico. Se llena la cámara de Neubauer por capilaridad con la dilución, se cuentan las células vivas en los cuatro cuadrantes de las esquinas, el promedio se multiplica por 2 que es la dilución y posteriormente por 1x10⁴ para obtener la concentración celular en número de células/ml.

6.5.1. Valoración de los niveles de expresión de los miRNAs seleccionados en SUP-B15

Para determinar los genes que son regulados por los miRNAs seleccionados, primero se obtuvieron los niveles de expresión basales de estos miRNAs en la línea celular SUP-B15 mediante RT-qPCR, se obtuvo la expresión relativa de los miRNAs vs el RNU44 (RNA nucleolar pequeño) como gen de referencia utilizando células MN de sujetos sanos como calibrador empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con la siguiente fórmula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = (Ct_{miR} - Ct_{RNU44})_{SUP-B15} - (Ct_{miR} - Ct_{RNU44})_{MN}$$

Se realizó la extracción del RNA total del paquete celular del cultivo (1×10^7 células totales) y del paquete de células MN utilizando el kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen, UK) y se determinó la concentración y pureza del RNA como se describe en la sección 6.3.1.; posteriormente se realizó la RT-qPCR siguiendo la metodología descrita previamente (sección 6.4.2.) en el termociclador LightCycler 480 (Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland). Una vez obtenidos los resultados, se transfectaron en las células SUP-B15 solo los miRNAs cuya expresión se comportó de manera semejante (sobre o subexpresión) a la obtenida en los pacientes.

6.5.2. Estandarización de las condiciones de transfección de miRNAs en SUP-B15

La estandarización de la transfección en la línea celular SUP-B15 se realizó con el kit Pre-miR miRNA Precursor Starter Kit (Ambion, Foster City, CA), este kit incluye:

- miRNA precursor como control positivo, Pre-miR hsa-miR-1
- miRNA precursor como control negativo Pre-miR Negative Control #1

El miR-1 endógeno regula negativamente al RNAm de PTK9 en células en cultivo, uniéndose a su extremo 3' no traducible, originando el rompimiento del RNAm, cuando el Pre-miR hsa-miR-1 se transfecta en líneas celulares humanas emula el miR-1 endógeno reduciendo la expresión de PTK9, la cual es detectada mediante RT-qPCR. El control negativo Pre-miR Negative Control #1 es una secuencia que no tiene RNAm blanco, empíricamente se ha mostrado que no tiene efecto sobre los niveles del RNAm de PTK9 o sobre la proliferación, sobrevivencia o morfología celular.

Se resuspendieron los miRNAs precursores Pre-miR control positivo y control negativo a una concentración final de $6.25 \mu M$ añadiendo $800 \mu l$ de agua libre de nucleasas a cada uno de los tubos conteniendo 5 nmoles de los miRNAs precursores (Pre-miR hsa-miR-1 y Pre-miR Negative Control #1), se mezclaron en el vórtex y se almacenaron a $-20^\circ C$ hasta su uso.

Se probaron 2 metodologías de transfección: la transfección reversa utilizando el agente transfectante siPORT *NeoFX*, incluido en el kit Pre-miR miRNA Precursor Starter Kit (Ambion, Foster City, CA); y transfección por electroporación.

A) Transfección Reversa

Antes de iniciar la transfección, se atemperaron el agente transfectante siPORT *NeoFX* y el Opti-MEM I (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se incluyeron 3 grupos de transfección que se realizaron por duplicado para cada parámetro de transfección:

- Pre-miR hsa-miR-1 (Control positivo)
- Pre-miR Negative Control #1 (Control negativo)
- Células sin transfectar (células con Opti-MEM I pero sin agente transfectante y sin miRNA precursor Pre-miR).

Se resuspendieron las células SUP-B15 en medio IMDM a la concentración final deseada (Tabla XVI) en un volumen suficiente para el número total de transfecciones a realizar y se incubó a 37°C hasta su utilización.

Se preparó el complejo de transfección miRNA precursor Pre-miR/siPORT *NeoFX* de la siguiente manera. En un tubo estéril de 1.5 ml se diluyó la cantidad necesaria del siPORT *NeoFX* en Opti-MEM I para obtener la dilución deseada en el volumen determinado (Tabla XIV), y se incubó 10 min a temperatura ambiente; en 2 tubos de 1.5 ml se diluyó la cantidad necesaria del Pre-miR hsa-miR-1 6.25 μ M y Pre-miR Negative Control #1 6.25 μ M en Opti-MEM I para obtener la dilución deseada en el volumen determinado (Tabla XVI); se mezclaron por pipeteo el Pre-miR diluido y el siPORT *NeoFX* diluido y se incubaron 10 min a temperatura ambiente; se dispensó este complejo de transfección en los pozos vacíos de la placa de cultivo, en los pozos correspondientes a las células sin transfectar, solamente se dispensó la cantidad adecuada de medio Opti-MEM I de acuerdo al experimento, posteriormente se añadió a los pozos el volumen del cultivo celular determinado (Tabla XVI), se mezcló por pipeteo y se incubó a 37°C durante 48 hrs.

B) Transfección por electroporación

Un día antes de la transfección, se les cambió el medio a las células SUP-B15 por medio fresco (IMDM con 20% FBS y P/S 1X). Se incluyeron 3 grupos de transfección que se realizaron por duplicado para cada uno de los 4 parámetros de transfección probados: Pre-miR hsa-miR-1, Pre-miR Negative Control #1 y Células sin transfectar (células con Opti-MEM I pero sin agente transfectante y sin miRNA precursor Pre-miR). Se transfirió el cultivo celular a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min. a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en Opti-MEM I a una concentración final de 2.5×10^6 células/ml, en un volumen suficiente para el número total de transfecciones a realizar y se incubó a 37°C hasta su utilización. Se dispensó en una cubeta de electroporación 6.4 μ l del Pre-miR 6.25 μ M correspondiente (control positivo hsa-miR-1 y control negativo Pre-miR Negative Control #1) para obtener una concentración final de 100 nM, se añadieron 400 μ l del cultivo, se tapó la cubeta y se colocó en la cámara (SockPod) del electroporador Gene Pulser Xcell (BioRad, Hercules, CA),

se aplicó el pulso correspondiente (Tabla XVII) e inmediatamente se transfirieron las células a una placa de cultivo de 6 pozos conteniendo 1 ml de medio IMDM con 20% de FBS y P/S 1X, mezclando por pipeteo; se incubaron las transfecciones a 37°C con 5% de CO₂ y humedad relativa durante 48 hrs.

Tabla XVI. Parámetros de transfección reversa con SiPORT NeoFX.

Parámetros de transfección						
Placa de cultivo	24 pozos	6 pozos	24 pozos	24 pozos	12 pozos	12 pozos
Vol. Cel. (μl)	400	2,400	300	300	600	600
Cels. ml	3.2X10⁴	8X10⁵	2.3X10⁵	2.3X10⁵	2.1X10⁵	2.1X10⁵
SiPORT NeoFX (μl)	1.5	10	3	6	5	8
Opti-MEM I a vol. final de (μl)	50	300	50	50	100	100
Dilución SiPORT NeoFX	1:33	1:30	1:16	1:8	1:20	1:12.5
Pre-miR* 6.25 μM (μl)	4	24	7	7	19	19
Opti-MEM I a vol. final de (μl)	50	300	50	50	100	100
Dil. final SiPORT NeoFX	1:333	1:300	1:133	1:66	1:160	1:100
[Pre-miR] final (nM)	50	50	109	109	148	148
Vol final (μl)	500	3,000	400	400	800	800

* Control positivo (Pre-miR hsa-miR-1), control negativo (Pre-miR Negative Control #1).

Tabla XVII. Pulsos para la transfección por electroporación en SUP-B15

Tipo de pulso	PL (mseg)	C (μF)	PC (ohm)	V	Cubeta (cm)	Vol Cel (μl)
Square wave	25			140	0.4	400
Exponential Decay		1000	~	140	0.4	400
Exponential Decay		50	200	1000	0.4	400
Square Wave (2PL)	1.0	10		1000	0.4	400

PL-Longitud del Pulso, C-Capacitancia, PC-Resistencia, V-Voltaje.

Determinación de la eficiencia de transfección

Una vez transcurridas las 48 hrs de la transfección, se transfirieron las células a tubos de 1.5 ml, se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min., se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 µl de RNA later (Ambion, Foster City, CA), colocándolas a 4°C, posteriormente se extrajo el RNA, se cuantificó y se realizó la RT-qPCR (Fig. 11). Se determinó el porcentaje de disminución de la expresión del RNAm de PTK9 en las células transfectadas con el control positivo Pre-miR hsa-miR-1 con respecto a las células transfectadas con el control negativo Pre-miR Negative Control #1 utilizando las siguientes fórmulas:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{PTK9} - Ct_{\beta\text{-act}})_{\text{miR-1}} - (Ct_{PTK9} - Ct_{\beta\text{-act}})_{\text{Neg \#1}}$$

$$\% \text{ disminución expresión PTK9} = 100 - (100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})$$

También se evaluó el porcentaje de citotoxicidad, puesto que los agentes de transfección son en ocasiones tóxicos para las células. Tomando en cuenta que la transfección con el miRNA precursor Pre-miR Negative Control #1 no afecta la expresión génica, cualquier disminución en los niveles de expresión del gen de referencia (β -actina) en los cultivos transfectados con este control, con respecto a los niveles de expresión del mismo gen en los cultivos sin transfectar, puede ser atribuido a citotoxicidad. Con base en esto, usando los datos del gen de referencia se determinó el factor de citotoxicidad (FC) obteniendo la relación $Ct_{\text{Neg \#1}}/Ct_{\text{células sin transfectar}}$, donde una relación de 1 o muy cercana a 1 indica menor citotoxicidad.

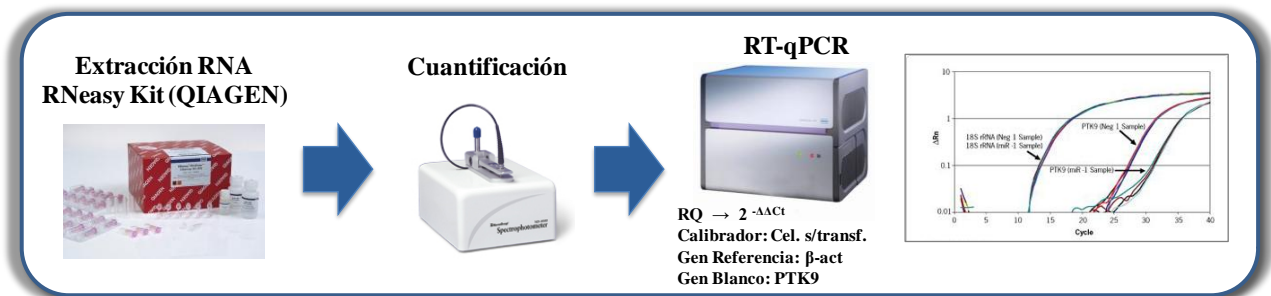


Fig. 11. Eficiencia de transfección.

Para obtener la eficiencia de la transfección se extrajo el RNA de los cultivos transfectados con los controles para determinar el porcentaje de disminución de la expresión de PTK9 en las células transfectadas con el control positivo Pre-miR hsa-miR-1 con respecto a las células transfectadas con el control negativo Pre-miR Negative Control #1, utilizando las fórmulas: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{PTK9} - Ct_{\beta\text{-act}})_{\text{miR-1}} - (Ct_{PTK9} - Ct_{\beta\text{-act}})_{\text{Neg \#1}}$ y $\% \text{ disminución de expresión} = 100 - (100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})$.

Extracción de RNA total. Se centrifugaron los células resuspendidas en RNA later a 10,000 rpm durante 5 min., se eliminó completamente el sobrenadante y posteriormente se extrajo el RNA total con el kit RNeasy (QIAGEN, UK). Se añadieron al paquete celular 350 µl de buffer RLT y se mezcló en el vórtex, se agregaron 350 µl de etanol al 70% mezclando por

inversión del tubo y posteriormente se transfirieron 700 μ l a la columna, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 seg y se descartó el eluido puesto que el RNA queda unido a la columna. Se lavó la columna con 350 μ l de buffer RW1, se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 seg. y se descartó el eluido. Se preparó una solución de 10 μ l de DNAsa I en 70 μ l de buffer RDD, se mezcló por inversión del tubo y se transfirieron los 80 μ l a la columna previamente lavada, se incubó 15 min a temperatura ambiente, al final de los cuales se lavó la columna nuevamente con 350 μ l de buffer RW1 y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 seg, se añadieron 500 μ l de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm por 15 seg, se agregaron nuevamente 500 μ l de buffer RPE y se centrifugó a 10,000 rpm esta vez por 2 min. Se colocaron las columnas en tubos colectores nuevos y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min para eliminar completamente buffer remanente, se transfirió la columna a un tubo de 1.5 ml y se eluyó el RNA de la columna con 30 μ l de agua libre de nucleasas centrifugando a 10,000 rpm durante 1 min, se volvió a pasar este eluido por la columna para recuperar mayor cantidad de RNA centrifugando con las mismas condiciones.

El RNA se cuantificó y se determinó su pureza mediante medición espectrofotométrica a 260 nm en el NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc., USA). Las muestras de RNA se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

RT-qPCR. Se llevó a cabo la síntesis del DNAC utilizando el kit SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) utilizando los reactivos y volúmenes descritos en la Tabla XVIII. Se realizó la mezcla de reacción 1, se agitó en vórtex y se centrifugó brevemente, se incubó a 65°C por 5 min y se colocó en hielo al menos por un min. A continuación se preparó la mezcla de reacción 2 en el orden indicado en la Tabla XVIII, se agitó en vórtex y se centrifugó brevemente, posteriormente se le añadió la mezcla 1, se mezcló gentilmente y se centrifugó brevemente para después colocar los tubos en el termociclador PTC-100 (MJ Research) con el programa descrito en la Tabla XIX. Los DNAC se colocaron a 4°C o se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

Después de obtener el DNAC se procedió a realizar la qPCR empleando TaqMan Gene Expression Master Mix y TaqMan Gene Expression Assay para PTK9 y β -actina, para la detección de los niveles de expresión del RNAm de PTK9 y del RNAm de β -actina, respectivamente, éste último como gen de referencia para la cuantificación relativa con la cual se realizó la determinación del porcentaje de disminución de PTK9. Los TaqMan Gene Expression Assay están compuestos por una mezcla de los primers sentido y antisentido para la PCR y una sonda TaqMan marcada con un fluoróforo, 6FAM para PTK9 y VIC para β -actina. El TaqMan Gene Expression Master Mix, contiene AmpliTaq Gold DNA Polimerasa UP (Ultra Pura), Uracil-DNA Glycosilasa (UDG), desoxiribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) con desoxiuridina trifosfato (dUTP), Referencia pasiva ROX y componentes del buffer. La UDG puede prevenir la reamplificación de productos de PCR contaminantes, removiendo cualquier uracilo incorporado en los amplicones de una o doble cadena, si todas las reacciones de PCR previas se realizaron usando master mix conteniendo dUTP. La referencia pasiva ROX provee una referencia interna con la cual la señal del reportero

puede ser normalizada durante el análisis de datos, la normalización es necesaria para corregir fluctuaciones de la fluorescencia debido a cambios en concentración o volumen.

De la misma muestra de DNAC se realizaron por separado las reacciones de qPCR para PTK9 y para β -actina, por triplicado, incluyendo un control negativo sin templado. Se realizó un coctel con los reactivos y cantidades que se muestran en la Tabla XX excepto el DNAC, se mezcló en el vórtex, se centrifugó brevemente y se dispensaron 9 μ l en tubos de 0.2 ml, a los cuales se añadió 1 μ l del DNAC. Finalmente se colocaron los tubos en el termociclador 7500 Fast Real Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA), con el programa descrito en la Tabla XXI

Tabla XVIII. Reactivos de RT para RNAm de SUP-B15

Mezcla de reacción	Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (μ l)	Conc. final
1	Agua DEPC	-	1	-
	RNA (80-1000 ng)	-	3	-
	Random Hexamers	50 ng/ μ l	0.5	2.5 ng/ μ l
	dNTP mix	10 mM	0.5	0.5 mM
	Volumen final	-	5	-
2	Buffer RT	10X	1	1X
	MgCl ₂	25mM	2	5 mM
	DTT	0.1 M	1	0.01 M
	RNaseOUT	40 U/ μ l	0.5	2 U/ μ l
	SuperScript III RT	200 U/ μ l	0.5	10 U/ μ l
	Volumen final	-	5	-

Tabla XIX. Programa de RT para RNAm de SUP-B15.

Estado	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	25°C	10 min	1
2	50°C	50 min	1
3	85°C	5 min	1
5	4°C	∞	1

Tabla XX. Reactivos empleados en los ensayos de qPCR para RNAm.

Reactivo	[Stock]	Vol./Rx (μ l)	Conc. final
Agua libre de nucleasas	-	3.5	-
TaqMan Gene Expression Master Mix	2X	5	1X
Primers (TaqMan Gene Expression Assay)*	20X	0.5	1X
DNAc	-	1	-
Volumen final	-	10	-

*Se realizó la qPCR por separado para PTK9 y β -actina del mismo DNAc.

Tabla XXI. Programa de qPCR para RNAm.

Estado	Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1		50°C	2 min	1
2	Activación AmpliTaq Gold	95°C	10 min	1
3	Desnaturalización	95°C	15 seg	40
	Alineamiento y Extensión	60°C	1 min	
4	Mantenimiento	4°C	∞	1

6.5.3. Transfección de los miRNAs seleccionados en la línea celular SUP-B15

Una vez que se obtuvieron las condiciones de transfección, bajo las cuales se obtuvo un porcentaje mayor al 50% de disminución de la expresión de PTK9, el siguiente paso fue la transfección de los miRNAs, cuyos niveles de expresión en las células SUP-B15 concuerdan con los obtenidos tanto en el perfil como en la validación de los miRNAs seleccionados para este fin. Los miRNAs que se encontraron sobre-expresados, se utilizaron los correspondientes miRNAs inhibidores (Anti-miR miRNA Inhibitor, Ambion, Foster City, CA) y los miRNAs que se encontraron sub-expresados, se utilizaron los correspondientes miRNAs precursores (Pre-miR miRNA Precursor, Ambion, Foster City, CA) para su transfección por triplicado en las células SUP-B15 con las condiciones estandarizadas previamente, incluyendo nuevamente transfecciones de los controles positivo y negativo: miRNAs precursores hsa-miR-1, pre-miR Negative Control #1, respectivamente, los cuales se procesaron como se describe previamente en las secciones de: Determinación de la eficiencia de transfección, Extracción de RNA total y RT-qPCR.

6.5.4. Análisis de expresión de genes regulados por miRNAs mediante microarreglos

Por otra parte, las células transfectadas con los miRNAs sintéticos (inhibidores y precursores), terminadas las 48 hrs. de transfección, se empastillaron en tubos de 1.5 ml centrifugando a 5000 rpm durante 5 min., se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 50 µl de RNA later (Ambion, Foster City, CA), colocándolas a 4°C, posteriormente se extrajo el RNA total con el kit RNeasy (QIAGEN, UK) como se describió previamente.

Se determinó la concentración e integridad del RNA y se llevó a cabo el análisis de expresión de genes mediante microarreglos utilizando el kit GeneChip 3' IVT Express Kit (Affimetrix, Santa Clara, CA) que se describe brevemente a continuación. Se realiza la retrotranscripción del RNA total para sintetizar la primera cadena de DNAc, este DNAc es convertido a DNA de doble cadena, templado para la transcripción. La transcripción *In vitro* sintetiza RNAa e incorpora un nucleótido conjugado con biotina (RNAC, también conocido como RNA amplificado o RNAa). El RNAa es purificado para remover NTPs no incorporados, sales, enzimas y fosfato. El RNAa marcado con biotina se fragmenta para la hibridación en los arreglos de expresión GeneChip 3'.

A) Integridad del RNA.

La calidad del RNA es el factor más importante que afecta la amplificación del RNA utilizando GeneChip 3' IVT Express kit, por lo que las muestras de RNA deben estar libres de contaminantes como proteínas, DNA y restos celulares, así como también de fenol, etanol y sales asociadas con el procedimiento de extracción del RNA. Las impurezas pueden disminuir la eficiencia de la RT y subsecuentemente reduce los niveles de amplificación. La pureza del RNA se mide mediante la relación de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm, ésta debe caer en el rango de 1.7-2.1. La integridad del RNA es otro de los componentes importantes de la calidad del RNA, RNAm parcialmente degradados, después de la retrotranscripción generan DNAc incompletos, cuyas porciones faltantes de los transcritos pueden coincidir con sondas complementarias presentes en los arreglos.

Las muestras de RNA se cuantificaron y se determinó su calidad en el equipo Experion RNA (BIO-RAD, Berkeley, CA) utilizando el kit de reactivos y chips RNA StdSens.

B) Amplificación de RNAa.

Preparación de Controles RNA Poly-A. Los controles RNA Poly-A son controles positivos exógenos para monitorear el proceso completo de marcaje de las muestras eucarióticas. Consisten en transcritos poliadenilados de genes (*lys, phe, thr, dap*) de *B. subtilis* sintetizados *in vitro* y mezclados en concentraciones escalonadas. Cada GeneChip eucariótico contiene sondas para estos genes, ausentes en muestras eucarióticas.

Se realizaron diluciones seriadas del Control RNA Poly-A concentrado (stock) con Buffer de dilución de Control Poly-A como se indica en la Tabla XXII-A, estas diluciones son las sugeridas tomando en cuenta que partimos de 100 ng de RNA total. Se mezcló cada dilución antes de preparar la siguiente y se centrifugó brevemente; se añadieron 2 µl de la 4ª dilución a 2 µl de muestra conteniendo 100 ng de RNA, más 1 µl de agua libre de

nucleasas (Tabla XXII-B). La 1ª dilución del Control Poly-A se puede almacenar 6 semanas a -20°C y sufrir 8 ciclos de descongelado.

Síntesis de la 1ª cadena de DNAc. Con los reactivos colocados en hielo, se realizó la mezcla de 1ª cadena en el orden indicado en la Tabla XXIII, se agitó en vórtex, se centrifugó brevemente y se dejó la mezcla en hielo. Se añadieron 5 µl de esta mezcla a cada tubo de mezcla RNA total-RNA Control Poly-A (Tabla XXII-B) obteniéndose así un volumen final de 10 µl, se mezclaron gentilmente en vórtex, se centrifugaron brevemente y se colocaron los tubos en hielo; se incubaron 2 hrs a 42°C en un termociclador, se centrifugaron brevemente y se volvieron a colocar los tubos en hielo, e inmediatamente se procedió a realizar la síntesis de la 2ª cadena de DNAc.

**Tabla XXII. A) Diluciones seriadas del Stock RNA Control Poly-A.
B) Mezcla de RNA total-RNA Control Poly-A**

A	Diluciones seriadas	1ª	2ª	3ª	4ª
	Control RNA Poly-A	(1:20)	(1:50)	(1:50)	(1:10)
	Stock Control RNA Poly-A (µl)	2			
	Buffer dil. Control Poly-A (µl)	38	98	98	18
	Dilución anterior (µl)		2	2	2

B	Reactivos	Volumen (µl)
		4ª Dilución
	100 ng RNA total de la muestra	2
	Agua libre de nucleasas	1
	Volumen final	5

Tabla XXIII. Reactivos para síntesis de 1ª cadena de DNAc.

Reactivos	Volumen (µl)
Buffer de 1ª cadena	4
Enzima de 1ª cadena	1
Volumen final	5

Síntesis de la 2ª cadena de DNAC. Con los reactivos colocados en hielo, se realizó la mezcla de 2ª cadena en el orden indicado en la Tabla XXIV, se agitó en vórtex, se centrifugó brevemente y se dejó la mezcla en hielo, se transfirieron 20 µl de esta mezcla a cada tubo conteniendo 10 µl de DNAC 1ª cadena (volumen final: 30 µl), se mezcló suavemente en vórtex, centrifugó brevemente y se colocaron los tubos en hielo; se incubaron 1 hr a 16°C seguido por 10 min a 65°C en un termociclador, se centrifugaron brevemente y se volvieron a colocar los tubos en hielo, e inmediatamente se procedió a realizar la IVT o se almacenaron los tubos a -20°C.

Tabla XXIV. Reactivos para síntesis de 2ª cadena de DNAC

Reactivos	Volumen (µl)
Agua libre de nucleasas	13
Buffer de 2ª cadena	5
Enzima de 2ª cadena	2
Volumen final	20

Transcripción *In Vitro* (IVT) para la síntesis de RNAa marcado. Se preparó a temperatura ambiente la mezcla de IVT con los reactivos y orden indicado en la Tabla XXV, se mezcló en vórtex, se centrifugó brevemente y se colocó el coctel en hielo; se transfirieron 30 µl de este coctel a cada tubo conteniendo 30 µl de DNAC 2ª cadena (volumen final: 60 µl), se mezcló suavemente, centrifugó brevemente y se incubó 16 hr a 40°C en un termociclador. Se colocaron los tubos en hielo y se procedió a realizar la purificación del RNAa. Se pueden almacenar los tubos a -20°C toda la noche.

Tabla XXV. Mezcla de IVT

Reactivos	Volumen (µl)
IVT Biotina	4
IVT Buffer de marcaje	20
IVT Enzima	6
Volumen final	30

Purificación de RNAA. Después de la síntesis, el RNAA se purificó para remover enzimas, sales y nucleótidos no incorporados. Se precalentó la solución de elución de RNAA de 50-60°C mínimo 10 min. Se preparó a temperatura ambiente la mezcla de unión a RNAA con los reactivos y orden indicado en la Tabla XXVI, se añadieron 60 µl de esta mezcla a cada muestra de RNAA y se transfirió cada muestra a una placa con fondo en U y se mezcló varias veces por pipeteo, se añadieron 120 µl de etanol al 100% a cada muestra, se mezcló varias veces por pipeteo y se agitó la placa durante 2 min. Durante esta incubación el RNAA se une a las perlas de unión a RNA. Posteriormente se colocó la placa en el adaptador magnético por 5 min, hasta que la mezcla se hizo transparente y las perlas se aglomeran en el lado del magneto, se aspiró cuidadosamente y descartó el sobrenadante, después se separó la placa del adaptador magnético; se añadieron 100 µl de solución de lavado de RNAA a cada muestra y se agitó la placa por 1 min., se volvió a colocar la placa en el adaptador magnético hasta que las perlas se aglomeraron en el lado del magneto, se aspiró cuidadosamente y descartó el sobrenadante, después se separó la placa del adaptador magnético y se repitió este procedimiento con un segundo lavado utilizando 100 µl de solución de lavado de RNAA. Se colocó la placa en un agitador y se dejó agitando vigorosamente por 1 min para evaporar residuos de etanol. Se separó el RNAA purificado de las perlas añadiendo 50 µl de solución de elución de RNAA (50-60°C) a cada muestra, se agitó la placa vigorosamente en el agitador por 3 min. o hasta que las perlas se hayan dispersado completamente, se transfirió la placa al adaptador magnético hasta la aglomeración de las perlas en el lado del magneto, se transfirió el sobrenadante, el cual contiene el RNAA separado de las perlas, a un tubo nuevo. Se almacenó el RNAA a -20°C o se colocó en hielo para proceder con la cuantificación y fragmentación. El RNAA puede ser almacenado a -20°C por un año.

Tabla XXVI. Mezcla de reactivos para la purificación del RNAA

Reactivos	Volumen (µl)
Perlas de unión a RNA	10
Buffer de unión a RNAA	50
Volumen final	60

C) Evaluación y fragmentación de RNAA.

Se cuantificó el RNAA en el NanoDrop midiendo la Absorbancia a 260 nm. Se evaluó la distribución de tamaños del RNAA en el Experion RNA (BIO-RAD, Berkeley, CA) utilizando el kit de reactivos y chips RNA StdSens. El perfil de distribución esperado de tamaños es de 250-5500 nt, la mayoría entre 600-1200 nt. Se ajustó la concentración de las muestras a 500 ng/µl y después se realizó la mezcla de fragmentación del RNAA como se describe en la

Tabla XXVII, se incubó a 94°C por 35 min. al final de los cuales se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente se analizó el tamaño de los productos de reacción de la fragmentación utilizando 300 ng de la muestra de reacción en el Experion RNA (BIO-RAD, Berkeley, CA) utilizando el kit de reactivos y chips RNA StdSens. La reacción debe producir fragmentos de RNAa de 35-200 nt con un pico de aproximadamente 100-120 nt. Si no se usa el RNAa fragmentado inmediatamente, debe almacenarse a -20°C o a -70°C si se va a almacenar por mayor tiempo.

Tabla XXVII. Mezcla de reactivos para la fragmentación del RNAa

Reactivos	[Stock]	Volumen (µl)	Conc. final
RNAa (15µg)	500 ng/µl	30	375 ng/µl
Buffer de fragmentación	5X	8	1X
Agua libre de nucleasas	-	2	-
Volumen final	-	40	-

D) Hibridación.

Se realizó la hibridación con los kits GeneChip Hybridization, wash y stain kit. Se mezclaron los reactivos con las cantidades y en el orden indicado en la tabla XXVIII. El DMSO se solidifica cuando se almacena de 2-8°C, por lo que hay que asegurarse que esté completamente descongelado antes de su uso, después de usarlo por primera vez, se recomienda almacenarlo a temperatura ambiente. El stock 20X de los controles eucarióticos de hibridación mantenidos en congelación, se incubaron a 65°C por 5 min. para resuspender completamente el RNAa. Se equilibraron los arreglos GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array (HG-U133 Plus 2.0) a temperatura ambiente antes de usarse. Una vez terminada la mezcla de hibridación (Tabla XXVIII) se incubó a 99°C durante 5 min en un bloque de calentamiento; por otra parte se cargaron los arreglos colocando una puntilla amarilla limpia en uno de los orificios de la cámara, con la finalidad de desplazar el aire y por el otro orificio se cargaron 200 µl de la mezcla de pre-hibridación utilizando una micropipeta con una puntilla amarilla, se incubaron los arreglos a 45°C por 10 min con rotación en un horno de hibridación; una vez terminados los 5 min de incubación a 99°C de la mezcla de hibridación, ésta se transfirió a un bloque de calentamiento a 45°C por 5 min., al término de los cuales se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min. para precipitar cualquier material insoluble; se removieron los arreglos del horno de hibridación, se extrajo la mezcla de pre-hibridación a través de uno de los orificios de la cámara utilizando una micropipeta con puntilla amarilla y colocando previamente una puntilla amarilla en el otro orificio; posteriormente se cargaron los arreglos con la mezcla de hibridación clarificada (precipitada) evitando tomar cualquier material insoluble del fondo del tubo y se colocaron

en el horno de hibridación (Affimetrix® GeneChip® Hybridization Oven 640), en una configuración balanceada alrededor del eje, se incubaron a 45°C y una velocidad de rotación de 60 rpm durante 16 hrs.

Tabla XXVIII. Reactivos para la hibridación en arreglos con formato 49 (Standard)/64

Reactivos	[Stock]	Volumen (μl)	Conc. final
RNAa fragmentado y marcado	-	33.3 (12.5μg)	0.05 μg/μl
Oligonucleótido control B2	3 nM	4.2	50 pM
Controles de hibridación (<i>bioB, bioC, bioD, cre</i>)	20X	12.5	1X (1.5, 5, 25, 100 pM*)
Mezcla de hibridación	2X	125	1X
DMSO	-	25	10%
Agua libre de nucleasas	-	50	-
Volumen final	-	250	-

E) Lavado, tinción y escaneo de los microarreglos.

Transcurrido el tiempo de incubación de los arreglos, se recuperó la mezcla de hibridación y se colocó en un tubo de 1.5 ml y se almacenó a 4°C, ésta mezcla puede ser utilizada para una nueva hibridación en caso de ser necesario. Se cargaron los arreglos con 250 μl de holding buffer; se colocaron en la estación de lavado (Affimetrix® GeneChip® Fluidics Station 450DX) 600 μl de solución Stain 1, 600 μl de Stain 2 y 800 μl de Array Holding Buffer; se ingresó el código de barras del arreglo y se configuró la estación de lavado. Terminado el lavado (aproximadamente 1.5 hrs), se transfirieron los arreglos al carrusel del escáner (Affimetrix® GeneChip® Scanner 3000), el cual se prendió 10 min antes de terminado el lavado para asegurar que el láser del escáner se haya calentado y se corrió el protocolo de escaneado HGU 133 Plus. Posteriormente, se exportaron los datos, incluidos los archivos .CEL los cuales contienen los datos crudos que se utilizan para el análisis de los perfiles de expresión.

F) Análisis de expresión de los microarreglos HG-U133 Plus 2.0.

Se realizó un análisis preliminar de los archivos con extensión .CEL obtenidos de los resultados de los microarreglos utilizando GeneChip® Command Console Software (AGCC). Este consta de 3 tipos de análisis:

- Control de calidad. Se analizaron los datos crudos, la distribución y comportamiento de los controles establecidos por el fabricante para detectar errores de hibridación.
- Corrección del ruido de fondo. Se eliminaron errores producidos por hibridación inespecífica y se ajustó el escáner.

- Normalización. Se eliminó la variación sistemática y se ajustaron los niveles de expresión entre los microarreglos analizados para que fueran comparables entre sí.
- Integración. Se resumió y promedió la información de las sondas de cada transcrito analizado en un solo valor, que es el nivel de expresión.

El HG-U133 Plus 2.0 es un microarreglo que cubre aproximadamente 47,400 transcritos y variantes, que representan aproximadamente 39,000 de los genes mejor caracterizados; también contiene 9,921 sondas nuevas que representan aproximadamente 6,500 genes nuevos. La calidad de las hibridaciones y normalización de los datos se llevaron a cabo utilizando el paquete affyPLM y la función RMA del programa Bioconductor. Los datos de los microarreglos fueron normalizados y corregidos mediante Benjamini y Hochber. Los genes que presentaron expresión diferencial fueron filtrados de acuerdo con valores de $P \leq 0.05$.

6.6. Vías de señalización en la que participan los genes regulados por los miRNAs y selección de miRNAs involucrados en la leucemogénesis con posible utilidad clínica

Una vez que se obtuvieron los genes diferencialmente expresados en los cultivos transfectados con los miRNAs sintéticos (pre-miR, anti-miR) con respecto al cultivo control que no fue transfectado, fueron analizados mediante el empleo de la base de datos DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatics Resources 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), la cual nos permite realizar anotaciones, clasificación y agrupación funcional de cada gen, así como las vías de señalización y regulación en la que participan estos genes empleando la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), la cual realiza redes de interacción molecular.

7. RESULTADOS

7.1. Obtención de muestras

Se logró establecer un banco de 180 muestras de sangre periférica en tubos con EDTA a partir de 50 pacientes con LLA, de las cuales 50 muestras fueron obtenidas de pacientes recién diagnosticados, y 128 muestras de 19 pacientes a los cuales se les siguieron tomando muestras desde 1 semana hasta 6 meses después del tratamiento. Las muestras se obtuvieron en el período de enero de 2009 a mayo de 2011 y se incluyeron tanto niños como adultos, por lo que el volumen de sangre periférica obtenida fue de 300 a 4000 μl , y el volumen de plasma obtenido a partir de estas muestras de 100 a 2750 μl . Algunas muestras se eliminaron porque no cumplieron con los criterios de inclusión, por lo que, para la realización de este trabajo, se utilizaron 39 muestras de plasma de pacientes con LLA-B al diagnóstico y 7 sujetos sanos como controles.

7.2. Perfil de expresión diferencial de miRNAs en muestras de pacientes con LLA

7.2.1. Extracción de RNA total

Para realizar el perfil de expresión de miRNAs se extrajo el RNA total del plasma de 13 pacientes utilizando el kit miRNeasy Mini Kit (QIAGEN, UK) obteniendo concentraciones desde 10 hasta 394 $\text{ng}/\mu\text{l}$ y pureza (relación 260/280) de 0.75 a 1.96.

7.2.2. RT-qPCR utilizando placas TLDA

A partir del RNA de estas 13 muestras y 5 controles, se realizó el perfil de expresión de 667 miRNAs en total, utilizando 2 placas TLDA (A y B, con 377 y 290 miRNAs respectivamente) y 4 controles para cada placa: 3 RNAs pequeños (RNU44, RNU48, U6) como controles positivos, para utilizarlos como genes endógenos en el análisis de cuantificación relativa y un control negativo ath-miR-159a (*Arabidopsis thaliana* miR159a). En la Fig. 12 se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación de miRNAs obtenida para una de las muestras en una de las placas. Se utilizó el programa RQ Manager 1.2 para obtener los valores de Ct crudos aplicando una línea base automática y el umbral definido manualmente en 0.2.

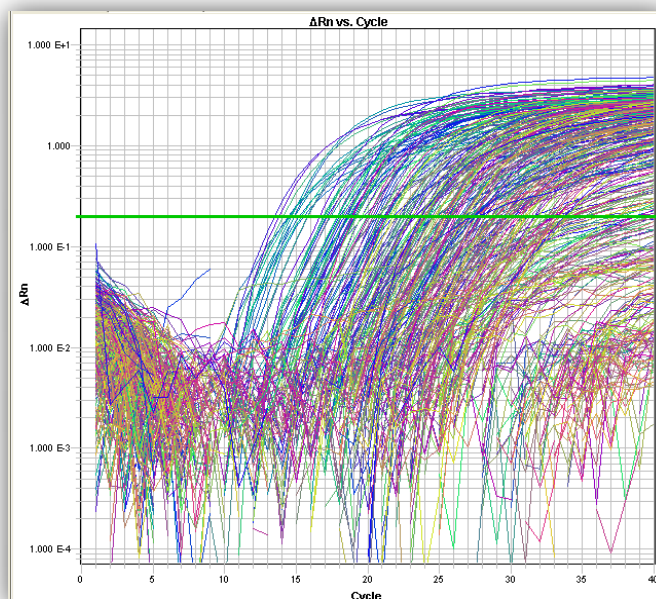


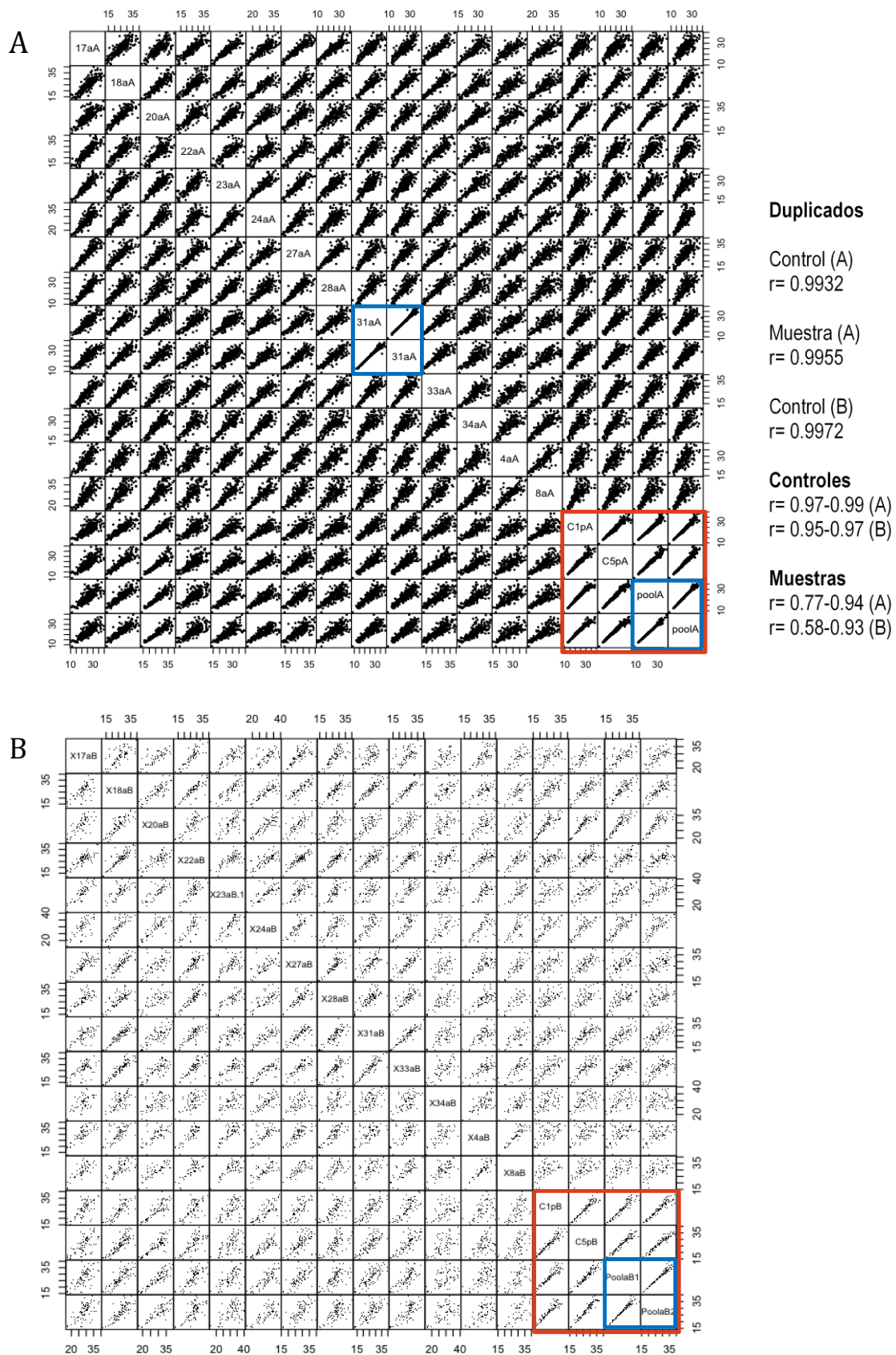
Fig. 12. Curva de amplificación utilizando una placa TLDA.

Ciclos de la PCR (Ct) vs la señal linealizada de Rn (ΔRn =Intensidad de señal del reportero/intensidad de señal de la referencia pasiva). Línea base automática, umbral=0.2.

Con el programa DataAssist se obtuvieron las gráficas de dispersión (Fig.13) para evaluar el grado de similitud entre 2 muestras mediante el coeficiente de correlación de Pearson (r), se calculó para cada par de muestras en un grupo seleccionado, es decir, entre los duplicados, los controles y entre las muestras. Para los duplicados se obtuvo una correlación positiva muy alta $r=0.9932-0.9972$, como esperábamos, lo que indica que el trabajo experimental fue adecuado. Entre los controles de las placas A y B, también se obtuvo buena correlación, los valores de r variaron de 0.97-0.99 y 0.95-0.97 respectivamente; y para las muestras, el rango de r fue más amplio, $r=0.77-0.94$ y 0.58-0.93, respectivamente, estos valores indican que hay una correlación débil entre la expresión de miRNAs entre algunas muestras, lo que puede ser válido, tomando en cuenta que se partió de muestras de plasma en donde la población de miRNAs no es exclusiva de la enfermedad, sino que representa la expresión global de miRNAs de cada individuo, sujetos a condiciones diferentes propias o ajenas a la enfermedad y no solo a una población celular específica.

7.2.3. Análisis de datos

Para el análisis de los datos obtenidos de las placas, se utilizó el software DataAssist v2.0 (Applied Biosystems) el cual utiliza el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para determinar la cuantificación relativa de todos los miRNAs utilizando la media geométrica de 2 miRNAs como genes de referencia [131], el programa realiza un análisis de varianza (ANOVA) en el cual se utilizó una tasa de cambio de 2 y un grado de confianza del 95% ($p<0.05$).



Selección de miRNAs como candidatos a genes de referencia.

La RT-qPCR es la técnica de cuantificación de la expresión de genes más sensible y reproducible, sin embargo, para llevar a cabo la interpretación de los datos de una manera exacta y confiable, es necesario el uso de múltiples genes de referencia estables para eliminar o minimizar la variación entre las muestras debido a la cantidad de RNA inicial, eficiencia enzimática y calidad del RNA [131]. Para seleccionar los miRNAs candidatos a genes de referencia, se importaron los datos a Microsoft Excel, se seleccionaron los miRNAs que amplificaron en todas las muestras y se obtuvo el valor de expresión promedio de todos los miRNAs que amplificaron hasta el Ct 35 para cada placa, y se calculó la diferencia entre el valor de expresión promedio y los valores de Ct de cada miRNA por muestra, así como la desviación estándar de estas diferencias para cada miRNA. Se seleccionaron los miRNAs con la desviación más baja, puesto que son los que se parecen más al valor de expresión promedio [132], posteriormente, en el programa DataAssist se determinaron cuales de estos miRNAs fueron los más establemente expresados. El DataAssist emplea el algoritmo del programa geNorm para calcular la estabilidad (M) [131].

En la Fig. 14 se muestran las gráficas de expresión de los miRNAs candidatos a genes de referencia, obtenidos con base al valor de expresión promedio de miRNAs. Para las placas A se escogió a miR-106a y miR-26b y para las placas B a miR-30a y miR-30d, los cuales están localizados en regiones genómicas diferentes, de tal manera que no son coexpresados, requisito para la selección de los genes de referencia. Estos miRNAs fueron los que presentaron la mayor estabilidad (menor valor M), y un patrón de expresión muy similar entre sí.

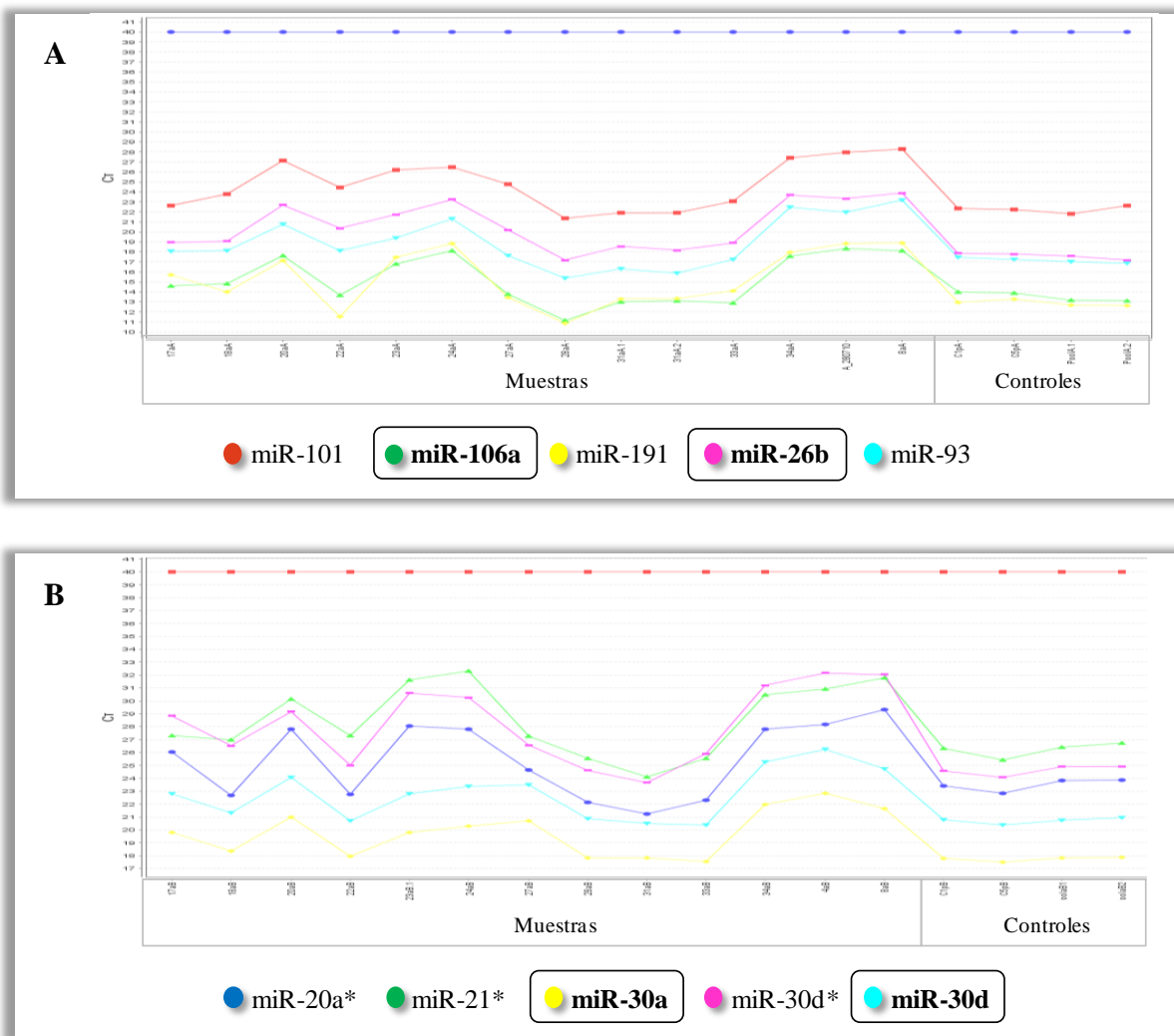


Fig. 14. Gráficas de expresión de miRNAs candidatas a genes de referencia.

A) MiRNAs que presentaron mayor estabilidad en las placas A: miR-106a $M=0.8269$, miR-26b $M=0.8442$. B) MiRNAs que presentaron mayor estabilidad en las placas B: miR-30a $M= 1.1636$, miR-30d $M=1.027$.

Perfil de expresión de miRNAs.

Una vez seleccionados los miRNAs de referencia (miR-106a y miR-26b para las placas A; miR-30a y miR-30d para las placas B) se procedió a determinar la expresión relativa de todos los demás miRNAs de las placas TLDA correspondientes a las 13 muestras de pacientes con LLA, respecto a los 5 sujetos sanos.

Se obtuvieron los miRNAs diferencialmente expresados mediante el Análisis de varianza (ANOVA), estos se representan en las gráficas de volcán obtenidas de las placas A y B (Fig. 15), en las cuales se identificaron los miRNAs que presentaron diferencia estadísticamente significativa (Tabla XXIX), con el 95% de confianza y variación en la expresión de las muestras con respecto a los controles de 2 veces o más (tasa de cambio=2). En total se obtuvieron 77 miRNAs desregulados: 40 sobreexpresados y 37 subexpresados, la mayoría provenientes de las placas A, 20 se obtuvieron de las placas B. De estos 81 miRNAs, 21 ya han sido reportados en LLA, LLC y LMA, y nuestros resultados concuerdan

con estos hallazgos respecto a la condición de expresión (sobre o subexpresados), (Tabla XXIX).

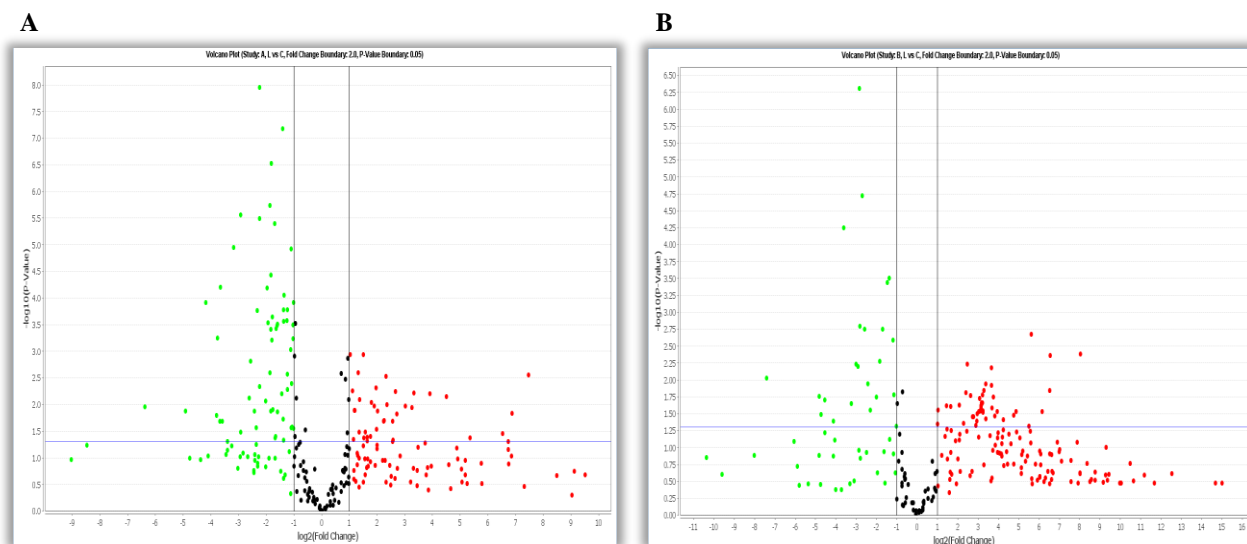


Fig. 15. Gráficas de volcán de miRNAs diferencialmente expresados en las placas A y B.

Valores de corte de $p=0.05$ en el eje de las y ($-\log_{10} 0.05=1.3$) y una tasa de cambio de 2 en el eje de las x ($\log_2=1$). Los puntos verdes representan a los miRNAs sobre-expresados y los puntos rojos a los sub-expresados.

7.3. Selección de miRNAs para su validación

Una vez obtenido el perfil de expresión de miRNAs en pacientes con LLA, se compararon con los obtenidos del análisis *In silico* que se realizó a partir de los 13 genes asociados a sobrevida, los miRNAs presentes en ambos análisis se muestran en la Tabla XXX. De estos, se seleccionaron tres de los miRNAs sobre-expresados: miR-511, miR-34a y miR-222; y tres de los miRNAs sub-expresados: miR-26a, miR-221 y miR-223 para analizarlos en un número de muestras mayor.

Los criterios de selección de los miRNAs candidatos a validación fueron los siguientes. En primer lugar se escogieron los miRNAs que presentaron los niveles más altos de desregulación, es decir, que presentaron una diferencia de expresión mayor entre los controles y las muestras de LLA, y que además han sido reportados previamente en esta enfermedad, excepto miR-511, el cual no ha sido reportado ni asociado a ningún tipo de leucemia, sin embargo fue el que presentó mayor sobreexpresión, por lo que es el mejor candidato a validar, los otros miRNAs seleccionados, ya se han encontrado desregulados en LLA, y decidimos incluirlos para verificar sus patrones de expresión en nuestra población y reforzar su importancia en este tipo de enfermedad.

Tabla XXIX. Perfil de expresión de miRNAs obtenido de las placas TLDA

miRNAs sobre-expresados	RQ	p-value	Reportados en	miRNAs sub-expresados	RQ	p-value	Reportados en
hsa-miR-511	159.55	0.002		hsa-miR-199a-3p	-13.48	0.000	
hsa-miR-34a*	98.56	0.015		hsa-miR-340*	-7.03	0.000	
hsa-miR-565	92.04	0.004		hsa-miR-151-3p	-5.74	0.002	
hsa-miR-34a	20.03	0.004	LLA	hsa-miR-335	-4.94	0.000	
hsa-miR-10b*	19.37	0.039		hsa-miR-99b	-4.51	0.000	
hsa-miR-630	15.11	0.029		hsa-miR-425*	-3.96	0.017	
hsa-miR-610	13.64	0.035		hsa-miR-224	-3.95	0.001	LLC
hsa-miR-181a	13.24	0.013	LLC, LMA	hsa-miR-221	-3.89	0.000	LLA, LMA
hsa-miR-181c	9.26	0.014		hsa-miR-744	-3.86	0.000	
hsa-miR-222	8.74	0.004	LLA, LMA	hsa-miR-15b	-3.71	0.008	
hsa-miR-138-1*	7.74	0.031		hsa-miR-223	-3.67	0.000	LLA, LMA
hsa-miR-363	7.44	0.006	LLA	hsa-miR-26a	-3.67	0.000	LLA
hsa-miR-144*	7.01	0.034		hsa-miR-454*	-3.56	0.005	
hsa-miR-451	5.94	0.008	LLA	hsa-miR-452	-3.55	0.001	
hsa-miR-99a	5.51	0.048		hsa-miR-491-5p	-3.39	0.000	
hsa-miR-155	5.14	0.026	LLC, LLA, LMA	hsa-miR-340	-3.39	0.001	
hsa-miR-886-3p	5.02	0.031		hsa-miR-196b	-3.28	0.001	LLC, LLA, LMA
hsa-miR-223*	4.95	0.044		hsa-miR-301a	-3.23	0.005	
hsa-miR-422a	4.91	0.007		hsa-miR-324-5p	-3.21	0.047	
hsa-miR-146a	4.90	0.018	LLA, LMA	hsa-miR-126*	-3.17	0.002	
hsa-miR-192	4.78	0.005		hsa-miR-152	-3.00	0.005	
hsa-miR-190b	4.40	0.022		hsa-miR-330-3p	-2.92	0.041	
hsa-miR-95	3.94	0.019		hsa-miR-652	-2.77	0.000	
hsa-miR-140-3p	3.82	0.013		hsa-miR-374b	-2.71	0.000	
hsa-miR-660	3.77	0.005		hsa-miR-148b	-2.59	0.000	
hsa-miR-886-5p	3.60	0.021		hsa-miR-671-3p	-2.57	0.002	
hsa-miR-25	3.41	0.019		hsa-miR-18a	-2.52	0.046	
hsa-miR-320	3.28	0.014		hsa-let-7d	-2.44	0.003	
hsa-miR-30e	3.18	0.024		hsa-miR-339-3p	-2.32	0.013	
hsa-miR-16	2.84	0.015	LLC, LLA	hsa-miR-126	-2.32	0.000	LLA
hsa-miR-19b	2.66	0.002		hsa-miR-30b	-2.30	0.000	LLA
hsa-miR-500	2.58	0.046		hsa-miR-148b*	-2.25	0.004	
hsa-miR-29a	2.56	0.042	LLA, LMA	hsa-miR-27a	-2.22	0.006	LLA, LMA
hsa-miR-502-3p	2.48	0.039		hsa-miR-30c	-2.12	0.000	
hsa-miR-195	2.39	0.002		hsa-miR-374a	-2.10	0.000	LLA
hsa-miR-20b	2.20	0.009		hsa-miR-331-3p	-2.06	0.001	LLC, LLA
hsa-miR-579	2.17	0.029		hsa-miR-28-5p	-2.05	0.000	LLA
hsa-miR-7	2.08	0.024					
hsa-miR-19a	2.05	0.010					
hsa-miR-768-3p	2.04	0.043					

Perfil de miRNAs obtenido de 13 pacientes con LLA vs 5 controles (sujetos sanos). Se utilizó como genes de referencia a miR-106a y miR-26b para las placas A y miR-30a y miR-30d para las placas B. MiRNAs sobreexpresados (izq.) miRNAs subexpresados (der.) MiRNAs obtenidos de la placa A (letra negra), miRNAs obtenidos de la placa B (letra morada). 20 miRNAs previamente reportados en LLA, LLC y LMA.

Tabla XXX. Selección de miRNAs para validación

Genes	miRNA	RQ	p-value	Ref.
Stat5a	miR-511	159.55	0.002	
Opal1, Bcl11a	miR-206	47.70	0.056	
Notch1	miR-34a	20.03	0.004	LLA
Pax5, Fos	miR-181a	13.24	0.013	LLC
Pax5, Fos	miR-181c	9.26	0.014	
Fos, Socs1	miR-222	8.74	0.004	LLA, LMA
Bcl11a, Notch1	miR-363	7.44	0.006	LLA
Opal1, Socs1	miR-155	5.14	0.026	LLC, LLA, LMA
Bcl11a, Sort1	miR-146a	4.90	0.018	LLA, LMA
Bcl11a	miR-190b	4.40	0.022	
Bcl11a, Notch1	miR-25	3.41	0.019	
Stat5a, Pax5	miR-942	3.26	0.054	
Bcl11a, Opal1, Notch1, Socs1	miR-30e	3.18	0.024	
Flt3, Sort1	miR-16	2.84	0.015	LLC, LLA
Fos, Opal1, Bcl11a	miR-29a	2.56	0.042	LLA, LMA
Opal1, Socs1	miR-19b	2.66	0.002	
Flt3, Sort1	miR-195	2.39	0.002	
Pax5	miR-502-3p	2.48	0.039	
Opal1, Socs1	miR-19a	2.05	0.010	
Sort1, Bcl211	miR-7	2.08	0.024	
Pax5, Bcl2a1	miR-768-3p	2.04	0.043	

Genes	miRNA	RQ	p-value	Ref.
Stat5a, Pax5, Hk2,	miR-143	-4.20	0.059	LLC
Fos, Socs1	miR-221	-3.89	0.000	LLA, LMA
Flt3, Sort1	miR-15b	-3.71	0.008	LLC
Stat5a	miR-223	-3.67	0.000	LLA, LMA
Bcl11a	miR-26a	-3.67	0.000	LLA
Stat5a	miR-452	-3.55	0.001	
Pax5, Stat5a	miR-491-5p	-3.39	0.000	
Bcl11a	miR-196b	-3.28	0.001	LLC, LLA, LMA
Bcl11a	miR-301a	-3.23	0.005	
Bcl11a	miR-152	-3.00	0.005	
Bcl11a	miR-148b	-2.59	0.000	
Hk2, Bcl211	let-7d	-2.44	0.003	
Pax5	miR-339-3p	-2.32	0.013	
Bcl11a, Opal1, Notch1, Socs1	miR-30b	-2.30	0.000	LLA
Stat5a, Rxra, Bcl11a, Opal1	miR-27a	-2.22	0.006	LLA, LMA
Bcl11a, Opal1, Notch1, Socs1	miR-30c	-2.12	0.000	

Genes asociados a sobrevida que presentan sitios de unión (*In silico*) para los miRNAs obtenidos del perfil de expresión de pacientes con LLA. MiRNAs sobreexpresados (tabla superior); miRNAs subexpresados (tabla inferior). MiRNAs obtenidos de la placa A (letra negra), miRNAs obtenidos de la placa B (letra morada). RQ=Cuantificación Relativa. Las filas resaltadas corresponden a los miRNAs seleccionados para su validación en un número de muestras mayor debido a que presentaron una diferencia de expresión mayor entre los controles y las muestras de LLA y que además ya han sido reportados en LLA, excepto miR-511.

7.4. Validación de los miRNAs seleccionados mediante RT-qPCR

7.4.1. Extracción de RNA total con trizol

Para la validación de los miRNAs en ensayos individuales se utilizaron 39 muestras de plasma a las cuales se extrajo el RNA total con trizol, obteniendo concentraciones desde 45 hasta 1251 ng/ μ l con purezas (relación 260/280) de 0.8 como mínimo, la mayoría de las muestras presentaron valores de 1.5, hasta 1.87 la más alta.

7.4.2. Validación de miRNAs mediante RT-qPCR

Se procedió a realizar la validación en estas muestras de los 6 miRNAs seleccionados y 7 controles mediante qRT-PCR utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, para determinar si en un número mayor de muestras se seguían observando los patrones alterados que se observaron en el perfil obtenido de las placas.

Para que el uso del método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ sea válido, la eficiencia (E) de amplificación de los miRNAs de interés y los de referencia deben ser aproximadamente igual y cercana al 100 %. En primer lugar se realizaron las curvas de rango dinámico de los 8 miRNAs (Fig. 16), para saber el rango de amplificación (Ct) en el cual obtenemos una eficiencia cercana al 100% y en el cual deben caer todas las amplificaciones de las muestras. Se calculó la E para cada miRNA usando el valor de la pendiente (m) (Fig. 17) de la gráfica correspondiente con la fórmula %E descrita a continuación. Se obtuvieron las E de los 8 miRNAs en un rango de 88.3 a 94%.

$$\%E = 1 - (10^{-1/m} - 1)100$$

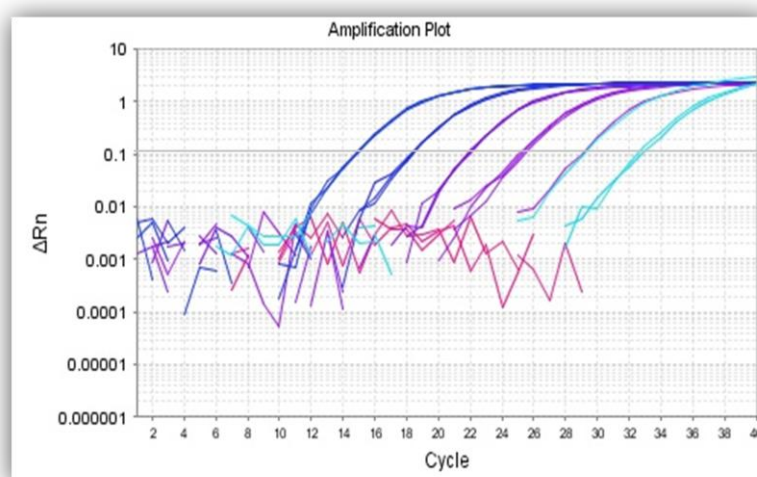


Fig. 16. Amplificación de la curva de rango dinámico.

Ejemplo de la amplificación de un miRNA a partir de diluciones seriadas del DNAC para determinar la eficiencia de amplificación (E) de cada miRNA. La gráfica representa el ciclo (Ct) vs el nivel de fluorescencia (ΔR_n).

Posteriormente se graficó el ΔC_t entre el miRNAs de interés y los de referencia vs la dilución correspondiente del DNAc (Fig. 18), un valor de la $m < 0.1$ nos indica que el rango de C_t de la curva es adecuado para la evaluación del miRNA en cuestión puesto que su E es similar a los miRNAs de referencia. En todos los casos, obtuvimos una $m < 0.1$, excepto para miR-222.

7.4.3. Análisis de datos

Una vez validado el método de cuantificación, se procedió a la realización de la amplificación de cada uno de los 6 miRNAs seleccionados y los 2 de referencia en las 39 muestras y 7 controles.

Con respecto a los miRNAs seleccionados como controles de referencia miR-106a y miR-26b, se obtuvo una correlación positiva (Rho de Spearman) de 0.89; el índice de similitud de los patrones de expresión entre estos 2 genes de referencia fue de 84% en los controles, 77% en las muestras, dándonos una similitud total de 76% entre los 2 miRNAs; la estabilidad de los mismos fue alta, con un valor de $M = 1.387$.

En la validación de los 6 miRNAs desregulados: miR-511, miR-34a, miR-222, miR-26a, miR-221 y miR-223, se observó en todos, una diferencia de expresión estadísticamente significativa de las muestras con respecto a los controles ($p = 6 \times 10^{-6} - 0.04$) (Fig. 19), siendo el rango de esta diferencia de expresión (RQ) para cada uno de los miRNAs, la siguiente: para miR-511 de 4.5 a 3649, miR-34a de 1 a 299, miR-222 de 0.07 a 23.6, miR-26a de -0.3 a -122.5, miR-221 de -0.4 a -243.6, y miR-223 de -0.3 a -257.2.

Posteriormente se analizó el valor predictivo del cambio en los niveles de expresión de los 6 miRNAs mediante curvas ROC y el AUC, la cual determina la sensibilidad y especificidad. Los valores obtenidos son los siguientes: para miR-511 se obtuvo un 100% de sensibilidad y especificidad, con un valor de corte de 6.3 (RQ), de igual manera, se obtuvo el 100% de sensibilidad y especificidad para miR-34a, con un valor de corte de 5.7 (RQ), para miR-222 se obtuvo un 83% y 100%, respectivamente, con valor de corte de 0.75 (RQ), miR-26a 100% y 82%, con valor de corte de -7.7 (RQ), miR-221 100% y 83%, con valor de corte de -1.6 (RQ) y para miR-223 100% y 91%, de sensibilidad y especificidad, respectivamente, con valor de corte de -2.3 (RQ) (Fig. 20).

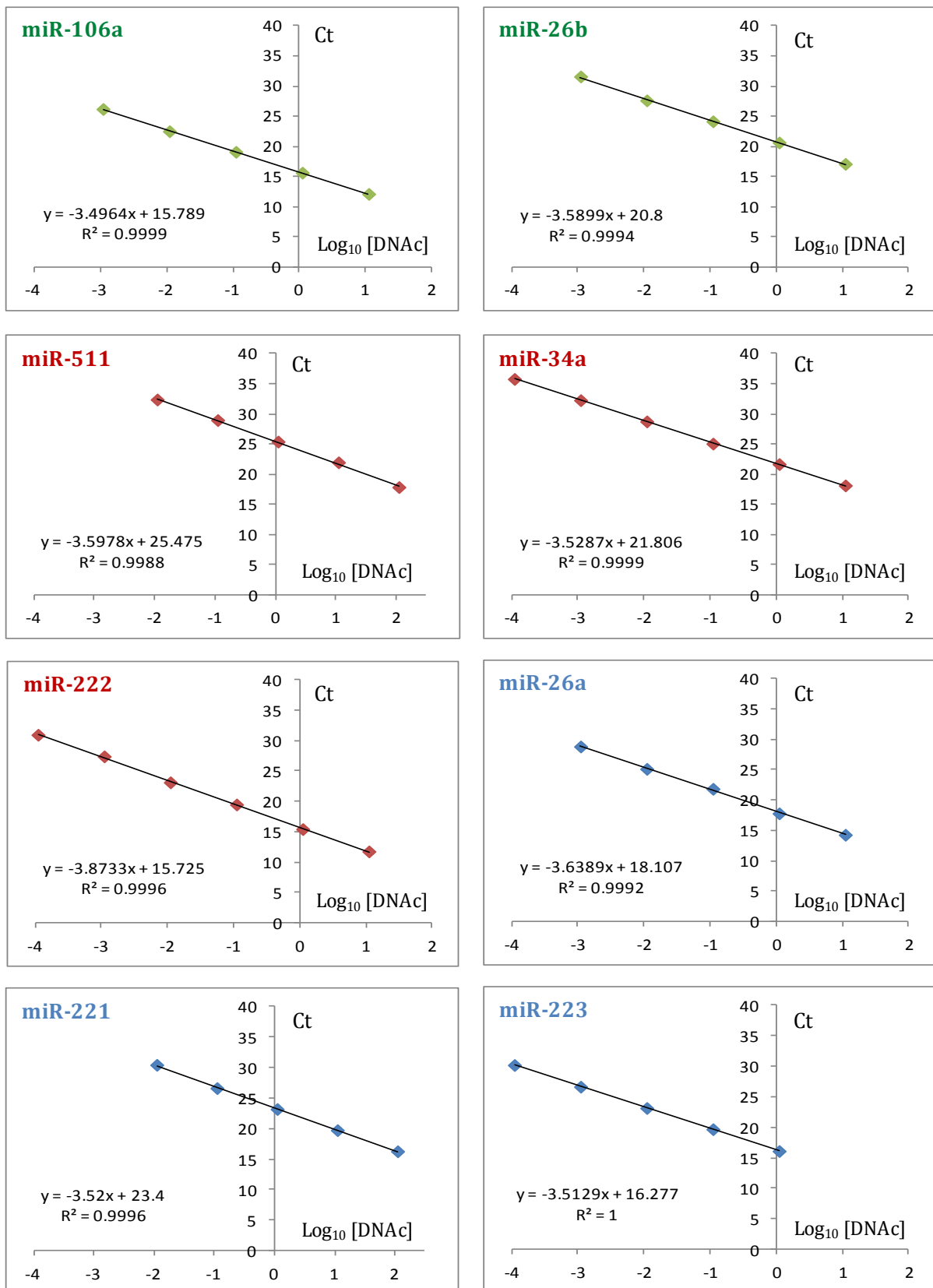


Fig. 17. Curvas de rango dinámico de miRNAs.

Se graficó el Log₁₀ de la concentración del DNAc (diluciones seriadas) vs Ct. Con el valor de la pendiente (*m*) obtenida de la ecuación de la recta se determinó la E.

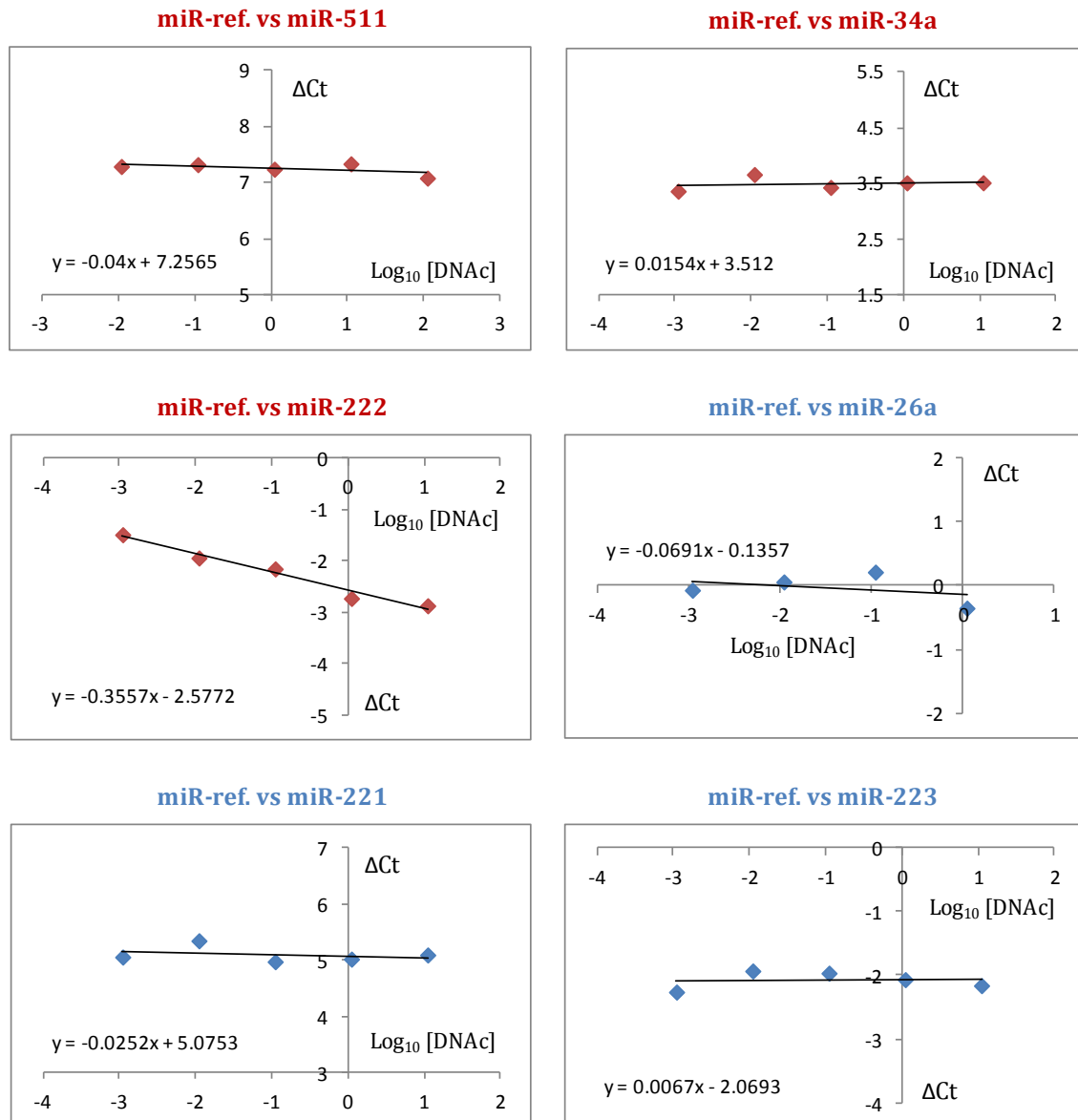


Fig. 18. Gráficas para determinar la validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Gráfica del ΔCt entre el miRNA de interés y el gen de referencia vs el log de la concentración del DNAC en cada dilución. Una pendiente ≤ 0.1 indicó que las eficiencias del miRNA de interés y el de referencia son muy similares, por lo que se puede realizar la cuantificación relativa con el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, excepto para miR-222.

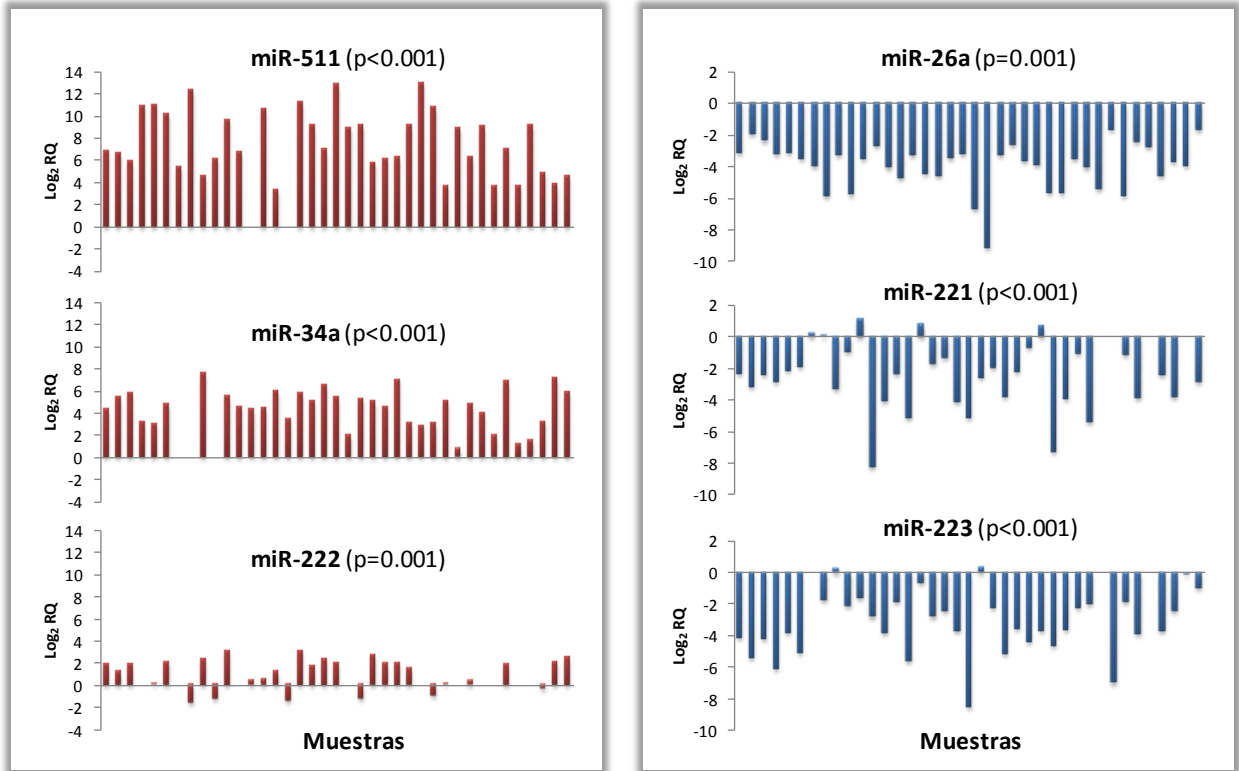


Fig. 19. Gráficas de expresión relativa de miRNAs validados.

Expresión relativa de muestras de pacientes con LLA vs controles (sujetos sanos). Se graficaron las muestras de LLA (eje x) vs Log₂ de la cuantificación relativa (RQ) (eje y). El valor de p obtenido muestra que las diferencias en la expresión génica entre muestras y controles es estadísticamente significativo.

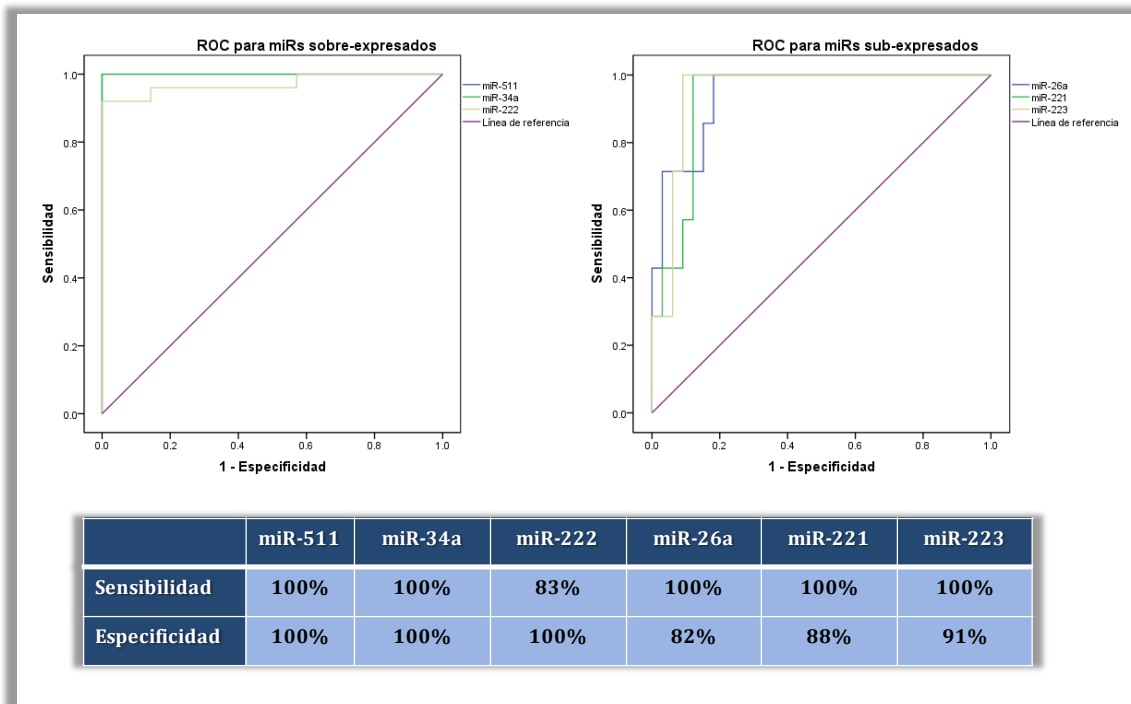


Fig. 20. Curvas ROC.

Gráficas de Especificidad vs Sensibilidad de miRNAs A) sobreexpresados y B) subexpresados en pacientes con LLA-B. C) Tabla con los valores en % de la sensibilidad y especificidad para cada miRNA.

7.5. Determinación en cultivo celular (SUP-B15) de los genes que son regulados por los miRNAs seleccionados

La segunda parte del trabajo consistió en determinar en cultivo celular, los genes que son regulados por los 6 miRNAs seleccionados individualmente en el análisis proveniente de los pacientes, para esto, se logró mantener la línea celular SUP-B15, realizando todas las determinaciones del mismo pase.

7.5.1. Valoración de los niveles de expresión de los miRNAs seleccionados en SUP-B15

Se obtuvieron los niveles de expresión basales de los miRNAs en la línea celular SUP-B15, para asegurarnos que las condiciones de expresión obtenidas en las muestras fueran similares en la línea celular, es decir, que también estuvieran sobre o sub-expresados según el miRNA en cuestión.

Se obtuvo la expresión relativa de los 6 miRNAs (Tabla XXXI), los 3 miRNAs sobre-expresados en los pacientes, también se encontraban sobre-expresados en la línea celular, sin embargo, de los 3 miRNAs sub-expresados en los pacientes, solamente miR-223 se encontró sub-expresado en la línea celular. Con base en estos resultados, se seleccionaron los 2 miRNAs con mayor sobre-expresión, miR-511 y miR-34a; y el miRNA sub-expresado, miR-223 para transfectarlos por separado en la línea celular y obtener los genes que regulan mediante microarreglos de expresión.

Tabla XXXI. Cuantificación relativa de miRNAs en la línea celular SUP-B15

miRNA	RQ	miRNA	RQ
miR-511	57.97	miR-26a	3.04
miR-34a	467.41	miR-221	3.84
miR-222	8.58	miR-223	-79.86

Se determinó la cuantificación relativa (RQ) empleando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ donde $\Delta\Delta Ct = (Ct_{miR} - Ct_{RNU44})_{SUP-B15} - (Ct_{miR} - Ct_{RNU44})_{MN}$. Se utilizó RNU44 como gen de referencia y células MN de sujetos sanos como calibrador. Datos en letra roja: miRNAs sobre-expresados en pacientes, también se encontraron sobre-expresados en la línea celular. Datos en letra azul: miRNAs sub-expresados en pacientes, solamente uno, miR-223 se encontró sub-expresado en la línea celular. Se seleccionaron los miRNAs en negritas (miR-511, miR-34a y miR-223) para realizar el análisis de transfección en cultivo celular.

7.5.2. Estandarización de las condiciones de transfección de miRNAs en SUP-B15

Se realizaron 2 tipos de transfección utilizando diferentes condiciones para cada tipo, se obtuvo la eficiencia de transfección mediante la medición de los niveles de

expresión del RNAm de PTK9, una disminución en la expresión de éste, es indicativo de una transfección eficiente.

Transfección Reversa. No se logró transfectar eficientemente los miRNAs en ninguna de las condiciones utilizadas (Tabla XVI), puesto que no se observó cambio de la expresión de PTK9 en cada condición, por lo que se decidió probar la transfección mediante electroporación.

Transfección por electroporación. Se probaron 4 parámetros de electroporación cuyos resultados se muestran en la tabla XXXII. Se obtuvo una eficiencia de transfección mayor cuando se utilizaron 2 pulsos tipo Square Wave puesto que bajo esta condición de electroporación se observó mayor disminución de la expresión del RNAm de PTK9 (76.2%); y baja citotoxicidad indicada por el FC, cuyo valor fue muy cercano a 1 (0.99). Con base en estos resultados se escogió este parámetro de electroporación para realizar la transfección de los miRNAs seleccionados (sección 6.5.3).

Tabla XXXII. Transfección por electroporación

A					B	
Tipo de pulso	PL (mseg)	C (µF)	PC (ohm)	V	% ↓ PTK9	FC
Square wave	25			140	47.7	1.02
Exponential Decay		1000	..	140	61.3	1.05
Exponential Decay		50	200	1000	--	--
Square Wave (2PL)	1.0	10		1000	76.2	0.99
					71.1 *	0.98 *

A) Condiciones utilizadas de transfección. B) Resultados obtenidos en cada condición de transfección. % ↓PTK9 = $100 - (100 \times 2^{-\Delta\Delta Ct})$. $\Delta\Delta Ct = (Ct_{PTK9} - Ct_{\beta-act})_{miR-1} - (Ct_{PTK9} - Ct_{\beta-act})_{Neg \#1}$. FC (Factor de Citotoxicidad) = $(Ct_{Neg \#1} / Ct_{cel. sin transfectar})_{\beta-actina}$. *Datos correspondientes a los controles durante la transfección de los 3 miRNAs seleccionados.

7.5.3. Transfección de los miRNAs seleccionados en la línea celular SUP-B15

Se transfectaron por separado los miRNAs inhibidores de miR-511 y miR-34a (anti-miR-511 y anti-miR-34a respectivamente) y el miRNA precursor de miR-223 (pre-miR-223), seleccionados durante la valoración de los niveles de expresión de 6 miRNAs en la línea celular SUP-B15 (sección 6.5.1), utilizando las condiciones bajo las que se obtuvo la mayor eficiencia de transfección: Square Wave 2PL (Tabla XXXII). En paralelo se transfectaron también los controles positivo y negativo: miRNAs precursores hsa-miR-1 y pre-miR Negative Control #1, respectivamente, cuyos resultados de eficiencia de transfección se muestran en la Tabla XXXII, estos corresponden a un 71.1% de disminución del RNAm de PTK9 y una baja citotoxicidad FC=0.98.

7.5.4. Análisis de expresión de genes regulados por miRNAs mediante microarreglos

Una vez transcurrido el tiempo de transfección de los miRNAs, se extrajo el RNA total y se realizó el análisis de expresión utilizando microarreglos HG-U133 Plus 2.0. Se obtuvieron 68 genes diferencialmente expresados realizando la comparación de la expresión de genes en la línea celular SUP-B15 sin transfectar contra la expresión de genes en la línea celular transfectada de manera independiente con anti-miR-511, anti-miR-34a y pre-miR-223. En la Fig. 21 se muestran las gráficas de dispersión donde se observa una mayor correlación en la expresión de genes entre las células transfectadas con los anti-miRNAs (anti-miR-511 y anti-miR-34a) que estos mismos cultivos vs las células transfectadas con el pre-miRNA (pre-miR-223), y por último, una correlación menor entre las células sin transfectar (Control) vs las transfectadas con anti-miR-511, anti-miR-34a y pre-miR-223, estas correlaciones se representan gráficamente mediante un dendograma, el cual resume el proceso de agrupación en un análisis de conglomerados (clusters).

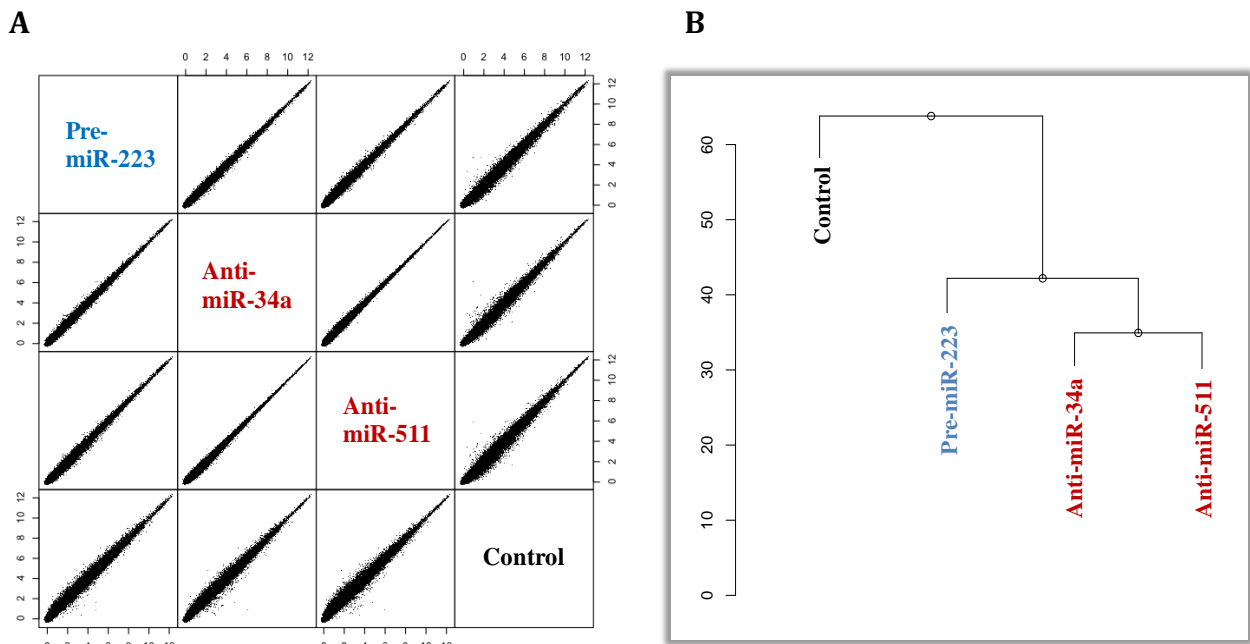


Fig. 21. Gráfica de dispersión y dendograma de SUP-B15 transfectada con miRNAs.

A) Gráficas de dispersión entre pares de muestras de la línea celular SUP-B15 no transfectada (Control) y transfectada con pre-miR-223, anti-miR-511 y anti-miR-34a. Se observa mayor correlación en la expresión de genes entre las células transfectadas con los anti-miRNAs (anti-miR-511 y anti-miR-34a) que estos mismos cultivos vs las células transfectadas con el pre-miRNA (pre-miR-223), y una correlación menor entre las células sin transfectar (Control) vs las transfectadas. **B)** Dendograma que representa gráficamente estas correlaciones mediante un análisis de conglomerados (clusters).

La diferencia de expresión ($p > 0.05$) de los genes se representó mediante un mapa de calor (Fig. 22), la lista de estos genes se presentan en la Tabla XXXIII y en la Tabla XXXIV se presentan solo los genes que presentan diferencias de expresión entre las células transfectadas con los anti-miRs (anti-miR-511, anti-miR-34a) contra las células

transfectadas con el pre-miR-223. Los genes fueron identificados en la base de datos DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) de acuerdo a su número de ID en los arreglos, con esta lista de genes, en el mismo programa se realizó un análisis de relación de grupos de genes con procesos biológicos (Tabla XXXV), así como también las posibles interacciones gen-enfermedad de acuerdo a la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)(Tabla XXXVI).

Algunos de los genes de la tabla XXXIII, cuya función está relacionada con el desarrollo de cáncer, especialmente leucemia, se describen brevemente a continuación:

Deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding); deleted in lymphocytic leukemia 2 -like. RNA antisentido, en humanos es codificado por el gen DLEU2, identificado como un potencial TSG y a menudo deletado en pacientes con LLC-B [133].

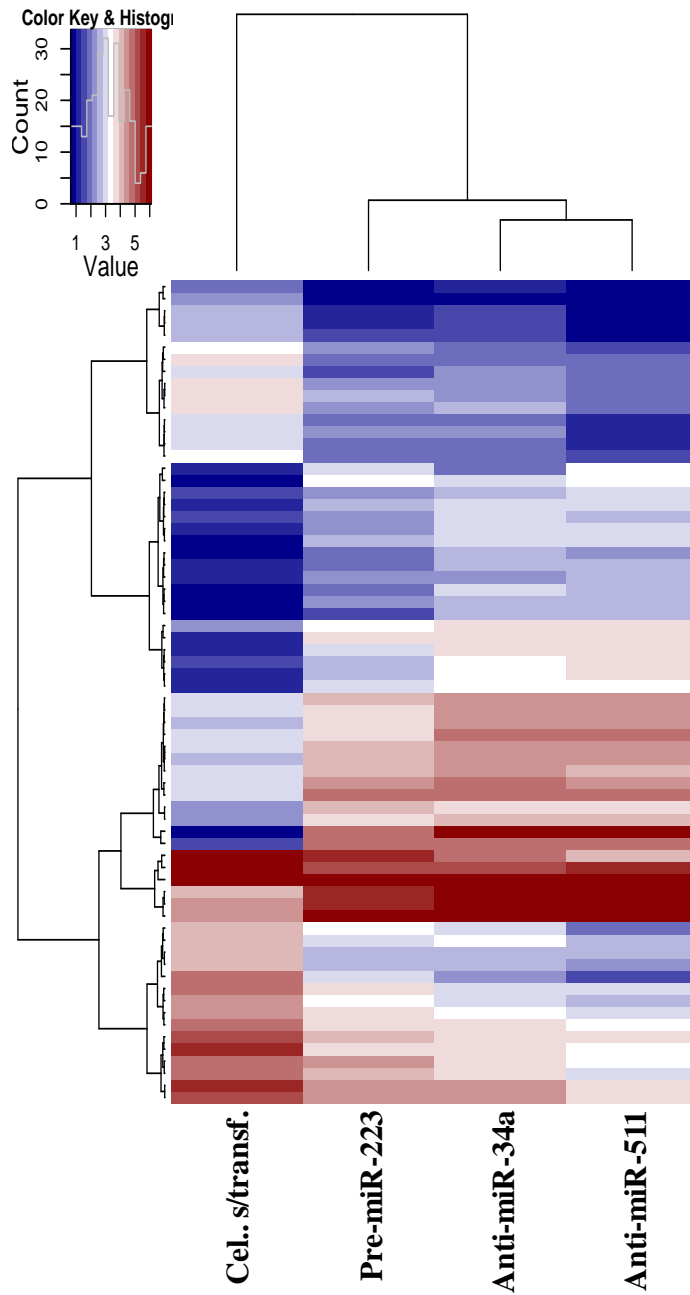
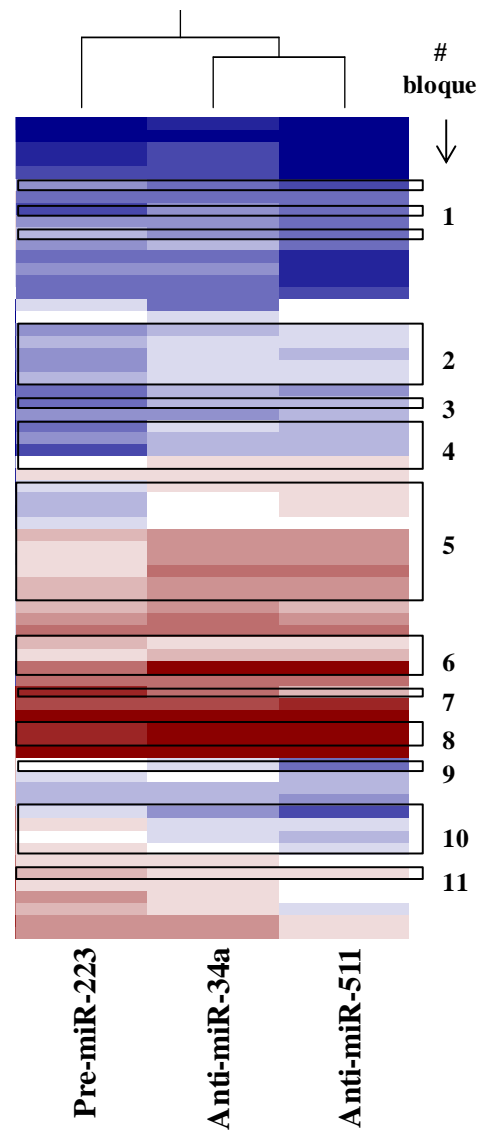
GRB2-associated binding protein 2. Este gen es miembro de la familia de genes que codifican para proteínas de unión asociadas a GRB2 (GAB), las cuales actúan como adaptadores para la transmisión de señales en respuesta a estímulos a través de citocinas, receptores de factor de crecimiento y receptores de antígenos de células B y T (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9846>).

CD44 molecule (Indian blood group). La proteína codificada por este gen es una glicoproteína de superficie celular involucrada en interacciones célula-célula, adhesión y migración celular. Participa en una amplia variedad de funciones celulares incluyendo activación de linfocitos, hematopoyesis y metástasis de tumor (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/960>).

Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein. (PICALM). Proteína involucrada en endocitosis mediada por clatrina dependiente de AP2 en la unión neuromuscular. Una translocación cromosómica t(10;11)(p13;q14) que permite la fusión de este gen al gen MLLT10 está presente en LLA, LMA y linfomas malignos. Los polimorfismos de este gen están asociados con el riesgo de la enfermedad de Alzheimer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/8301>).

Brain and acute leukemia, cytoplasmic. (BAALC). Gen identificado mediante estudios de expresión en pacientes con LMA. Está conservado en los mamíferos y no está presente en organismos inferiores. Algunas variantes del transcrito están presentes solamente en líneas celulares de LMA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/79870>).

IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros). (IZKF1). Este gen codifica un factor de transcripción perteneciente a la familia de dedos de zinc, proteínas de unión a DNA, asociadas con remodelación de la cromatina. La expresión de esta proteína está restringida al sistema linfo-hematopoyético en etapas fetales y adultos. Su función es regular la diferenciación de linfocitos. La sobre-expresión de algunas isoformas-negativas dominantes han sido asociadas con células B malignas, como en la LLA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10320>).

A**B****Fig. 22. Mapa de calor.**

A) Genes diferencialmente expresados entre las células sin transfectar vs las células transfectadas con miRNAs. B) Genes diferencialmente expresados entre las células transfectadas con los miRNAs precursores (Pre-miRs) vs las células transfectadas con los miRNAs inhibidores (Anti-miRs). #=Número de identificación del bloque de genes en la tabla XXXIV.

Tabla XXXIII. Genes diferencialmente expresados en SUP-B15 transfectada con anti-miR-511, anti-miR-34a y pre-miR-223

Nombre del Gen	Símbolo	Nombre del Gen	Símbolo
Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 12	<i>SLC39A12</i>	Solute carrier family 16, member 10 (aromatic amino acid transporter)	<i>SLC16A10</i>
Deleted in lymphocytic leukemia 2 (non-protein coding); deleted in lymphocytic leukemia 2-like	<i>DLEU2</i>	CXXC finger 5	<i>CXXC5</i>
Ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)	<i>ARIH1</i>	Collagen triple helix repeat containing 1	<i>CTHRC1</i>
Polypyrimidine tract binding protein 2	<i>PTBP1</i>	Hypothetical LOC541471; non-protein coding RNA 152	<i>LOC541471</i>
Glutamate decarboxylase-like 1	<i>GADL1</i>	Ankyrin repeat domain 10	<i>ANKRD10</i>
GRB2-associated binding protein 2	<i>GAB2</i>	EPH receptor A4	<i>EPHA4</i>
Annexin A1	<i>ANXA1</i>	PIFI 5'- to-3' DNA helicase homolog (S. cerevisiae)	
Interferon, gamma-inducible protein 30	<i>IFI30</i>	Kelch-like 14 (Drosophila)	<i>KLHL14</i>
Nuclear receptor interacting protein 1	<i>NRIP1</i>	Aryl-hydrocarbon receptor repressor; programmed cell death 6	<i>AHRR</i>
Pregnancy specific beta-1 glycoprotein 3	<i>PSG3</i>	SHC (Src homology 2 domain containing) family, member 4	<i>SHC4</i>
Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	<i>APOBEC3B</i>	Hypothetical LOC 646113	<i>LINC00643</i>
FXFD domain containing ion transport regulator 2	<i>FXFD2</i>	Asp (abnormal spindle) homolog, microcephaly associated (Drosophila)	<i>ASPM</i>
Glypican 3	<i>GPC3</i>	Forkhead box O1	<i>FOXO1</i>
Ectonucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 2	<i>ENPP2</i>	Cytokine receptor-like factor 3	<i>CRLF3</i>
Sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit	<i>SCN3A</i>	Calcyphosine-like	<i>CAPSL</i>
CD44 molecule (Indian blood group)	<i>CD44</i>	YEATS domain containing 2	<i>YEATS2</i>
KIAA0746 protein (Suppressor of lin-12-like protein)	<i>SEL1L3</i>	PI-3-Kinase-related Kinase SMG-1 pseudogene	<i>SMG1</i>
CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	<i>CAP2</i>	KIAA1267	<i>KANSL1</i>
Chromosome 17 open reading frame 91	<i>C17orf91</i>	Neuropilin 1	<i>NRP1</i>
Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	<i>PICALM</i>	A Kinase (PRKA) anchor protein 12	<i>AKAP12</i>
Brain and acute leukemia, cytoplasmic	<i>BAALC</i>	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D (AU-rich element RNA binding protein 1,37KDa)	<i>HNRNPD</i>
EH-domain containing 3	<i>EHD3</i>	TAF15 RNA POLYMERASE II, TATA box binding protein (TBP)- associated factor, 68 KDa	<i>TAF15</i>
Ureidopropionase, beta	<i>UPB1</i>	Peroxisredoxin 6	<i>PRDX6</i>
IKAROS family zinc finger 1 (Ikaros)	<i>IKZF1</i>	Nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)	<i>NASP</i>
Coactosin-like 1 (Dictyostelium)	<i>COTL1</i>	Cyclin-dependent Kinase 6	<i>CDK6</i>
Transmembrane 7 superfamily member 4	<i>TM7SF4</i>	Amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family B, member 2	<i>APBB2</i>
Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 3	<i>KCNE3</i>		

Genes involucrados en leucemia (letra roja).

Tabla XXXIV. Genes diferencialmente expresados en SUP-B15 transfectada con anti-miR-511 y anti-miR-34a vs células transfectadas con pre-miR-223.

ID	Símbolo del gen	# bloque
236462	<i>YEATS2</i>	1
215236	<i>PICALM</i>	
220704	<i>IKZF1</i>	
228377	<i>KLHL14</i>	2
207434	<i>FXD2</i>	
222939	<i>SLC16A10</i>	
224583	<i>COTL1</i>	
221266	<i>TM7SF4</i>	
214696	<i>C17orf91</i>	3
231186	<i>LINC00643</i>	4
222780	<i>BAALC</i>	
210432	<i>SCN3A</i>	
221059	<i>COTL1</i>	
235238	<i>SHC4</i>	5
225799	<i>LOC541471</i>	
230538	<i>SHC4</i>	
218899	<i>BAALC</i>	
211741	<i>PSG3</i>	
206632	<i>APOBEC3B</i>	
236085	<i>CAPSL</i>	
212314	<i>SEL1L3</i>	
40148	<i>APBB2</i>	
203399	<i>PSG3</i>	
229354	<i>AHRR</i>	6
212063	<i>CD44</i>	
201012	<i>ANXA1</i>	
242918	<i>NASP</i>	7
224516	<i>CXXC5</i>	8
222996	<i>CXXC5</i>	
238774	<i>KANSL1</i>	9
1563533	<i>GADL1</i>	10
232238	<i>ASPM</i>	
1566959	<i>GAB2</i>	
241679	<i>AKAP12</i>	
243808	<i>CDK6</i>	11

bloque: identificación del bloque de genes en la Fig. 22-B. Genes involucrados en leucemia (letra roja)

Cyclin-dependent Kinase 6. (CDK6). La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de proteínquinasas dependientes de ciclina (CDK), conocidas por ser reguladores importantes de la progresión del ciclo celular. La expresión de esta proteína está sobreexpresada en algunos tipos de cáncer (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1021>). Involucrada en el inicio y mantenimiento del ciclo celular durante la diferenciación celular, previene la proliferación celular y regula negativamente la diferenciación celular, requerida para la proliferación de tipos celulares específicos como células hematopoyéticas. Un rearrreglo cromosómico puede permitir la sobreexpresión de *Cdk4* en linfomas, leucemias y melanoma. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CDK6&search=Cyclin-dependent+Kinase+6>).

Utilizando la lista de genes diferencialmente expresados, en el mismo programa DAVID se realizó un análisis funcional que relaciona grupos de genes con procesos biológicos, en la tabla XXXV se indica el número de genes que se encuentran involucrados en determinado proceso, el porcentaje que representan estos genes del número total analizado, el valor de p y la corrección de Benjamini Hochberg (BH).

Tabla XXXV. Análisis funcional de agrupación de genes relacionados con procesos biológicos.

Término	No. de Genes	%	Valor de p	BH
Fosfoproteína	28	52.8	1.0E-2	5.1E-1
Procesamiento alternativo	27	50.9	3.1E-2	6.7E-1
Procesamiento variante	27	50.9	3.2E-2	1.0E0
Citoplasma	16	30.20	1.6E-2	5.3E-1
Mutagénesis	11	20.8	3.2E-2	9.9E-1
Movimiento celular	8	15.1	1.5E-4	6.9E-2
Regulación de la proliferación celular	6	11.3	4.5E-2	8.4E-1
Regulación del crecimiento celular	5	9.4	1.0E-2	7.1E-1
Migración celular	5	9.4	4.9E-3	6.9E-1
Motilidad celular	5	9.4	7.1E-3	6.8E-1
Localización celular	5	9.4	7.1E-3	6.8E-1
Desarrollo neuronal	4	7.5	5.3E-2	8.7E-1
Desarrollo de la proyección neuronal	4	7.5	2.6E-2	8.4E-1
Leucemia Mieloide Crónica	3	5.7	1.3E-2	3.3E-1
Proteoglicano	3	5.7	8.4E-3	6.9E-1
Regulación de procesos homeostáticos	3	5.7	3.3E-2	8.0E-1

Posteriormente se realizó la asociación de estos genes con la o las enfermedades en que se han visto implicados al alterarse su expresión, de acuerdo a la base de datos OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (Tabla XXXVI). Se obtuvieron 17 genes que fueron relacionados con una enfermedad, siendo 2 de estos genes implicados en leucemia, para los cuales, se describen brevemente algunos hallazgos que apoyan esta asociación.

- **IKAROS.** Esta proteína tiene función en la diferenciación mieloide y linfoide. Está involucrada en la regulación de STAT4 en células T [134]. La translocación *BCR-ABL1* induce splicing aberrante de IKAROS, el cual interfiere con la identidad del linaje y la diferenciación de células pre-B en la leucemia linfoblástica [135]. Algunos estudios sugieren que las lesiones genéticas que producen la pérdida de función de ikaros es un evento importante en el desarrollo de LLA *BCR-ABL1* [136]. Ambas alteraciones, un splicing aberrante y delección genómica originan diferentes transcritos de DNAc de ikaros no-DNA-binding, características comunes de LLA con cromosoma Ph+ [137]. Las alteraciones genéticas de IKAROS están asociadas con un pronóstico muy pobre en pacientes con LLA de células B progenitoras [138]. La expresión de varias isoformas de ikaros están asociadas con LLA pre-B [139]. En conclusión, las proteínas IKAROS están activas a través de todo el proceso de diferenciación de células B, antes y después de la aparición del antígeno de superficie CD19 [140].
- **PICALM.** Relacionada tanto en LMA como en LLA de células T. PICALM o CALM fue primero identificado como la pareja de fusión de AF10 en la translocación t(10;11)(p13;q14), la cual es observada en LMA, LLA y linfomas malignos, esta proteína de fusión CALM/AF10 juega un papel crucial en la leucemogénesis. Por otra parte la expresión de una nueva proteína CATS (proteína de interacción con CALM expresada en timo y bazo) aumentó marcadamente la localización nuclear de CALM y de la proteína de fusión leucemogénica CALM/AF10 [141]. Como se ha visto, IKAROS se requiere para el desarrollo normal de linfocitos, la proteína de fusión leucemogénica CALM/AF10 altera la localización subcelular de IKAROS interfiriendo con su función normal y por lo tanto bloqueando la diferenciación linfoide en leucemias positivas para CALM/AF10 [142].

Tabla XXXVI. Asociación gen-enfermedad (OMIM)

Gen	Enfermedad (OMIM)
CAP2	Muchas variantes de la secuencia afectan el peso de los humanos en la etapa adulta.
CD44	Grupo sanguíneo, sistema indio.
FXD2	Hipomagnesemia-2 renal.
GAB2	Alelos GAB2 modifican el riesgo de Alzheimer en portadores de APOE epsilon4.
IKZF1	LLA.
TAF15	Condrosarcoma mixoide extraesquelético.
APBB2	Enfermedad de Alzheimer de inicio tardío.
ASPM	Microcefalea autosómica recesiva primaria 5, sin o con patrón gyral simplificado.
CAPSL	Asociación de 4 regiones cromosómicas nuevas a diabetes tipo 1.
CDK6	Riesgo de artritis reumatoide, influencia en el peso de los humanos en la etapa adulta.
CRLF3	Muchas variantes de la secuencia afectan el peso de los humanos en la etapa adulta.
FOXO1	Rabdomiosarcoma alveolar.
GPC3	Síndrome de Simpson-Golabi-Behmel, tipo 1, tumor de Wilms.
LOC646113	Variantes en TF y HFE explican aproximadamente el 40% de la variación genética de los niveles de transferrina en suero.
PICALM	Leucemia, LMA, LLA-T.
KCNE3	Parálisis periódica hipocalcémica.
UPB1	Déficit de Beta ureidopropionasa.

Genes involucrados en leucemia (letra roja).

7.6. Vías de señalización y selección de miRNAs involucrados en la leucemogénesis con posible utilidad clínica

Partiendo de los genes diferencialmente expresados obtenidos de los cultivos de SUP-B15 sin transfectar vs los cultivos transfectados con anti-miR-511, anti-miR-34 y pre-miR-223, se procedió a la obtención *in silico* de las vías en la que participan estos genes, los cuales son regulados directa o indirectamente por los 3 miRNAs en cuestión de acuerdo a nuestros resultados.

Este análisis se realizó en la base de datos DAVID, que recopila información de interacciones publicadas en artículos científicos. Se obtuvieron 13 genes y las vías KEGG ([Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes](#)) en las que participan (Tabla XXXVII).

Se observó que los genes participan en vías comunes de procesos celulares normales relacionados con componentes sanguíneos como endocitosis, fagocitosis, citotoxicidad mediada por células natural killer, vías de señalización de insulina, presentación y procesamiento de antígeno, etc. Sin embargo, es relevante mencionar las vías que pueden desembocar en procesos neoplásicos como la vía del linaje celular hematopoyético, ciclo

celular y vía de señalización de p53; así como vías de diferentes tipos de cáncer como glioma, cáncer pancreático, melanoma, cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de células no pequeñas de pulmón, cáncer de próstata y LMC, ésta última se presentó para 3 genes y fue la más representativa.

Tabla XXXVII. Vías KEGG en las que participan los genes alterados por anti-miR-511, anti-miR-34 y pre-miR-223.

Gen	Vía de señalización (KEGG)
CD44	Interacción con el receptor ECM , Linaje celular hematopoyético.
EHD3	Endocitosis.
EPH A4	Orientación del axón.
FXD2	Contracción del músculo cardíaco.
GAB2	Fagocitosis mediada por R Fc gamma, vía de señalización Fc epsilon RI, LMC.
SHC 4	Vía de señalización ErbB, quimiocinas, neurotrofina, insulina, citotoxicidad mediada por células naturales asesinas, adhesión focal, glioma, LMC.
CDK6	Ciclo celular; vía de señalización de p53, vías en cáncer; cáncer pancreático, glioma, melanoma, LMC, cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de células no pequeñas de pulmón.
ENPP2	Metabolismo de lípidos, metabolismo de beta-alanina, biosíntesis de pantotenato y CoA, metabolismo de drogas.
FOXO1	Vía de señalización de la insulina, vías en cáncer; cáncer de próstata.
IFI30	Presentación y procesamiento de antígeno.
NRP1	Orientación del axón.
PRDX6	Metabolismo de fenilalanina, metabolismo del metano.
UPB1	Metabolismo de pirimidina.

8. DISCUSION

A pesar de los grandes avances que se han hecho para mejorar la sobrevida en pacientes con leucemia, sabemos muy poco acerca de los acontecimientos que conducen a la iniciación y progresión de esta enfermedad. Los microRNAs (miRNAs) son ahora reconocidos como una clase de moléculas pequeñas de RNA no codificantes, que forman una compleja red de regulación génica.

Existe evidencia significativa que muestra que los miRNAs juegan un papel importante en la enfermedad, especialmente en la oncogénesis. Estudios recientes han ampliado nuestra comprensión de cómo las alteraciones en la expresión de miRNAs pueden contribuir al desarrollo de un fenotipo leucémico. Recientemente, se ha identificado un nuevo modelo patogénico de participación de miRNAs que explica las implicaciones pronósticas de las alteraciones cromosómicas más recurrentes en la LLC-B.

En este estudio, se realizó el análisis de expresión de miRNAs en LLA-B, debido a que este tipo de leucemia es la más común en nuestra población y porque es de la que menos trabajos hay a la fecha. El interés primordial de este estudio fue asociar a los miRNAs que se obtuvieron en el perfil de expresión, con genes blanco que previamente se habían identificado como asociados a pronóstico, en trabajos anteriores de nuestro grupo, seleccionar miRNAs e identificar a otros genes afectados directa o indirectamente por estos miRNAs, para obtener en conjunto las rutas de señalización mediante las cuales los miRNAs pueden estar regulando el fenotipo leucémico.

Obtención y almacenamiento de las muestras

Las muestras de sangre para los exámenes de detección de leucemia se toman generalmente de una vena del brazo. En infantes y niños de corta edad, se pueden tomar de una punción en el dedo. Las pruebas que se hacen con estas muestras generalmente son cuentas sanguíneas (Biometria Hemática) y frotis de sangre, para las cuales es suficiente el volumen de muestra que se recolecta de la punción en el dedo, de 1-2 ml generalmente. Sin necesidad de tomas de muestra adicionales, difíciles sobre todo en niños, estas muestras fueron suficientes para llevar a cabo nuestro estudio, al trabajar con un volumen mínimo de plasma de 100 μ l, provenientes de muestras de sangre total de aproximadamente 250 μ l, le da un valor agregado al análisis, al ser un método menos invasivo.

El objetivo de este trabajo fue obtener el perfil de expresión de miRNAs en pacientes con LLA-B y determinar los genes que son regulados por estos miRNAs, por tal razón

trabajamos solo con las muestras de los pacientes al diagnóstico, sin embargo, se cuenta con muestras de seguimiento de 12 pacientes incluidos en el estudio, que como perspectiva del proyecto, pueden utilizarse para determinar el valor pronóstico de los miRNAs validados en este trabajo, al correlacionar sus niveles de expresión con parámetros como respuesta al tratamiento y la ERM, que se realiza durante y al final del tratamiento de inducción, al final de la consolidación y al finalizar el tratamiento [18].

Pese a las condiciones de almacenamiento previo de las muestras hasta la extracción de RNA, esto es, plasma congelado a -80°C , proveniente de muestras de sangre almacenadas aproximadamente 24 hrs a 4°C , se logró realizar el análisis de los miRNAs a partir del RNA total extraído tanto con el kit de Qiagen como con trizol, debido a que los miRNAs son notablemente estables en muestras de suero y plasma [81-83, 89, 90], según trabajos publicados en los que los miRNAs extraídos del suero pueden sobrevivir el tratamiento de RNasa A [90], ciclos repetidos de congelación-descongelación [83, 90] y tratamientos con soluciones de pH alto y bajo [90]. De manera similar, los miRNAs del plasma pueden permanecer estables a temperatura ambiente por 24 hrs y durante 8 ciclos de congelación-descongelación [81]. Esto indica que los miRNAs que se obtuvieron de las muestras de plasma, en el presente trabajo, existen en una forma resistente a la RNasa plasmática, como ya se ha descrito en otros estudios [80].

Genes de referencia

La RT-qPCR, es el método más sensible y reproducible para la cuantificación de la expresión génica, para realizar una cuantificación relativa, se requiere de la normalización apropiada de los datos obtenidos usando genes de referencia expresados de manera estable [131], este punto es crítico para asegurar resultados precisos y confiables [143], especialmente cuando se estudia el significado biológico de diferencias finas de expresión de genes. En este proyecto, para obtener el perfil de expresión de miRNAs, se realizó RT-qPCR empleando la plataforma megaplex y 2 placas TLDA por muestra, estas placas cuentan con 3 RNAs nucleolares pequeños útiles como genes de referencia en el análisis de la cuantificación relativa. En un estudio realizado en 38 tejidos humanos normales, estos genes fueron los que se encontraron en mayor abundancia y se expresaron más uniformemente en todos los tejidos (Application Note TaqMan MicroRNA Assays). Sin embargo, la expresión de estos genes no fue constante en las muestras incluidas en nuestro estudio, incluso en algunas muestras no amplificaron, debido probablemente a la naturaleza y almacenamiento de la muestra, estos genes fueron probados en tejidos, no en plasma, y es posible que se hayan degradado bajo las condiciones de almacenamiento que se llevaron a cabo. De tal manera que se tuvieron que analizar todos los miRNAs de las placas para obtener mínimo 2 miRNAs con la expresión menos variable en las 13 muestras y con mayor estabilidad M [131]. Estudios previos han reportado que el uso de más de un gen de referencia, aumenta la exactitud de la cuantificación comparado con el uso de un solo gen de referencia, además se recomienda utilizar genes de referencia de la misma naturaleza de

los genes a cuantificar, es decir, si se van a cuantificar miRNAs, emplear miRNAs como genes de referencia [131, 143-145].

Perfil de expresión diferencial (Tabla XXX)

Desde que la desregulación de miRNAs está asociada con el desarrollo y progresión del cáncer, se han usado perfiles de miRNAs circulantes para identificar nuevos miRNAs biomarcadores de manera menos invasiva. En este estudio se obtuvo un perfil de 77 miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con LLA-B vs sujetos control sanos, 20 de estos miRNAs cuentan con reportes previos de desregulación en diferentes tipos de leucemia, incluyendo 18 en LLA, esta concordancia nos puede dar cierta garantía de confiabilidad del análisis, tanto de los miRNAs de referencia que se escogieron (miR-106a y miR-26b), como de los miRNAs desregulados que se obtuvieron y que no han sido reportados. Los 20 miRNAs previamente reportados, en nuestro estudio fueron obtenidos de las placas A, que comprenden a los miRNAs más altamente caracterizados. De los 77 miRNAs desregulados, 18 se obtuvieron de las placas B, que comprende a los miRNAs descubiertos más recientemente, junto con los miRNAs* (cadena antisentido del miRNA maduro), para ninguno de estos se cuenta con reportes previos, por lo que es conveniente realizar la validación tanto de los miRNAs de referencia (miR-30a y miR-30d) como de los miRNAs obtenidos como desregulados en un número de muestras mayor.

En el 75% de los casos de LLC, la expresión de miR-16 se encuentra disminuida [71], contrario a lo observado en nuestro estudio, donde en LLA-B lo encontramos sobreexpresado, dato que coincide con otros reportes, en donde incluso la sobreexpresión está relacionada con un pronóstico pobre y la subexpresión con un buen pronóstico [79]. Con base en estos hallazgos, miR-16 pudiera ser un miRNA con valor diagnóstico para diferenciar entre LLA y LLC, además puede ser importante en la determinación de la evolución de la enfermedad. Por otra parte, este hecho es un claro ejemplo de la compleja red de regulación ejercida por los miRNAs, puesto que mientras en la LLC miR-16 tiene función de TSG al regular negativamente a *Bcl2*, cuya proteína induce apoptosis, en la LLA miR-16 pudiera tener función de OG, y evidentemente los genes blanco y/o las vías de regulación diferir en ambos tipos de leucemia. Otro ejemplo similar lo encontramos con miR-143, el cual en nuestro estudio lo encontramos subexpresado, contrariamente, se ha reportado sobreexpresado en LLC-B y otros desórdenes de células B, miR-143 tiene como gen blanco a *Erk5* en un estudio realizado en la línea celular Raji (de linfoma de células B) [146], en la cual se vió disminución de la proteína ERK5 con niveles normales del RNAm, ERK5 es miembro de la familia MAPK, es activada por factores de crecimiento e interviene en procesos celulares como regulación de la proliferación y diferenciación celular, lo que sugiere un amplio impacto de la vía ERK5 en la carcinogénesis humana. Estos ejemplos pueden aplicar para el resto de los miRNAs que se han reportado en diferentes tipos de leucemia y de los cuales se desconoce su función.

En diversos estudios se observó correlación de la desregulación de miRNAs entre tejido y suero en pacientes con cáncer [109], también se ha demostrado que los niveles de miRNAs oncogénicos circulantes disminuyen después de la extracción del tumor [110], y al contrario, los niveles de miRNAs supresores de tumor se incrementaron [114]. En nuestro estudio, se obtuvo un perfil de expresión de miRNAs desregulados en el plasma de pacientes con LLA-B, al comparar este perfil con la literatura, encontramos algunos miRNAs que ya han sido reportados desregulados en células MN de pacientes con LLA, esto refleja una posible correlación entre los miRNAs alterados en plasma y células MN, tipo celular afectado en la LLA, lo que nos lleva a sugerir que estos miRNAs, o al menos los que presentan una diferencia de expresión mayor, puedan cambiar sus niveles de expresión después del tratamiento que conlleva a la disminución de células leucémicas y por ende utilizarse como biomarcadores de ERM, previa validación. Los miRNAs en cuestión son los siguientes: Sobreexpresados: miR34a, miR-222, miR-363, miR-451, miR-155, miR-146a, miR-16, miR-29a; Subexpresados: miR-221, miR-223, miR-26a, miR-196b, miR-126, miR-30b, miR-27a, miR-374a, miR-331-3p, miR-28-5p.

Selección de miRNAs para su validación

Posterior a la obtención del perfil de expresión, se escogieron 3 miRNAs sobre y 3 miRNAs subexpresados para validarlos en una n mayor, para llevar a cabo esta selección se compararon los miRNAs obtenidos en el perfil vs los miRNAs obtenidos de un análisis *in silico* en el que se determinaron los miRNAs que pudieran tener como gen blanco a uno o varios de los 13 genes que se asociaron a sobrevida en pacientes con LLA en el estudio de Garza-Veloz. En este análisis se observa claramente como un miRNA puede estar regulando a varios genes blanco y como un gen blanco puede presentar varios sitios de unión a diferentes miRNAs. Teniendo presente el ejemplo citado en el que miR-16 parece tener función opuesta en LLC [71] y LLA ([79] y según nuestros resultados), se seleccionaron los miRNAs que ya se han reportado desregulados en LLA, excepto miR-511, que fue el que se obtuvo con mayor sobreexpresión y que al no contar con reportes previos, es un aporte significativo en el estudio de los miRNAs en LLA.

Validación de miRNAs

Los biomarcadores de cáncer son usados para detección temprana, pronóstico [82, 147], y guías terapéuticos [82, 90]. Un biomarcador ideal debe ser altamente específico, sensible y con un alto valor predictivo, y que pueda ser detectado de manera rápida, simple, exacto y barato [83, 108]. Según estos criterios, miR-511 y miR-34a, pueden utilizarse como biomarcadores de ERM, debido a que la muestra de sangre se obtiene de manera rápida y sencilla, la metodología de RT-qPCR es de las más sensibles, de costo moderado y accesible, y de acuerdo al análisis, estos miRNAs tienen diferencias de expresión (RQ) alta: 159 y 20,

respectivamente, fueron validados obteniéndose un valor predictivo del 100% tanto de especificidad como de sensibilidad, para los 2 miRNAs.

Análisis funcional en la línea celular SUP-B15

Mucho de los esfuerzos actuales en el estudio de los miRNAs está enfocado en la elucidación de su función. Típicamente los miRNAs han sido estudiados proponiendo un perfil de genes, este fue el abordaje de la primera parte de este estudio, donde se obtuvo un perfil de expresión diferencial en LLA, se analizó la contribución aislada de cada uno de los 3 miRNAs desregulados, sin embargo, el efecto de los miRNAs en la patología y fisiología celular es mucho más compleja por dos razones: 1) su actividad es ejercida de muchas maneras, debido a que cada miRNA puede controlar la traducción de decenas, e incluso cientos de diferentes mensajeros codificantes, y 2) un solo mensajero puede ser controlado por más de un miRNA. Por lo tanto, la segunda parte del estudio de los miRNAs en LLA, fue analizar el efecto de 3 miRNAs que presentaron expresión alterada en el plasma de pacientes con LLA-B, en un sistema biológico comparable representado por la línea celular SUP-B15, cuyos resultados conjuntos arrojan un grupo de genes co-regulados directa o indirectamente por estos miRNAs.

Los hallazgos del análisis posterior de estos genes en el programa DAVID (*in silico*) son congruentes con nuestro tipo de estudio, desde las anotaciones, clasificación y agrupación funcional, hasta las vías de señalización obtenidas.

En primera instancia la función de algunos de estos genes tienen implicación directa con procesos celulares normales que si se alteran pueden desencadenar procesos neoplásicos, o bien, se han encontrado relacionados directamente con algún tipo de cáncer incluyendo leucemia, como por ejemplo:

- DLEU2, la inactivación de esta proteína promueve la proliferación celular y la progresión de tumor; deletado en pacientes con LLC-B [133];
- CD44, participa en la hematopoyesis, en la activación de linfocitos, adhesión de células tumorales y en metástasis de tumor en carcinoma colorectal y cáncer pulmonar; CD44-HCELL dirige la migración de cel madre hematopoyéticas y cel madre mesenquimales a la médula ósea;
- GRB2, receptores de factor de crecimiento y receptores de antígenos de células B y T;
- PICALM, la translocación cromosómica t(10;11)(p13;q14) con el gen MLLT10 está presente en LLA, LMA y linfomas malignos;
- BAALC, expresada por células neurales y hematopoyéticas, expresada en células madre normales y en la mayoría de los tipos inmaduros de blastos en leucemia aguda pero no en células hematopoyéticas maduras;

- IKAROS son reguladores importantes en la diferenciación de linfocitos, algunas isoformas han sido asociadas con LLA-B;
- CDK6, regula el ciclo celular, proliferación y diferenciación celular, requerida para la proliferación de células hematopoyéticas.

Al realizar la asociación *in silico* de estos genes con la enfermedad en que se han visto implicados, de acuerdo a la base de datos OMIM, se obtuvieron 2 genes relacionados con LLA: IKAROS y PICALM. Estos resultados nos sugieren que el perfil de miRNAs obtenido de plasma, refleja las condiciones fisiológicas o de enfermedad de los pacientes, debido posiblemente a que los miRNAs circulantes pueden derivar directamente de las células cancerosas y que la alteración de los miRNAs puede reflejar de manera directa la actividad biológica del cáncer [80].

Al realizar un agrupamiento de genes *in silico*, de acuerdo a procesos biológicos comunes, aproximadamente el 50%, (27 genes) de los genes codifican para fosfoproteínas, presentan procesamiento alternativo o variante; el 30% (16 genes) codifican para proteínas citoplasmáticas; el 21% (11 genes) presentan sitios de mutagénesis; el 15% (8 genes) codifican para proteínas relacionadas con el movimiento celular; 11% (6 genes) relacionados con la regulación de la proliferación celular; el 9% (5 genes) de los genes están implicados en la regulación del crecimiento celular; otro 9% en migración celular; e igualmente un 9% en localización celular. Tomando en cuenta que los miRNAs que regulan a estos genes se encontraron alterados en el plasma de los pacientes, no en células sanguíneas, los procesos biológicos en los que se ven involucrados estos genes, apoyan los estudios de que los miRNAs circulantes pueden proceder no solo de células tumorales circulantes [82, 108], como lo sugieren los procesos biológicos de mutagénesis, regulación del crecimiento y proliferación celular, sino también ser liberados al torrente sanguíneo directamente de las células sanguíneas [89] o de otros tejidos afectados por la enfermedad [90].

Vías de señalización

La obtención de las vías de señalización *in silico*, implica el análisis global del estado patológico del paciente con LLA. Esto debido a que los miRNAs involucrados en esta enfermedad fueron determinados en plasma y se sabe que los miRNAs pueden provenir no solamente de las células leucémicas, sino también de células sanguíneas sanas y otras células de tejidos afectados por la enfermedad [90], lo que se ve reflejado en la regulación de genes involucrados en procesos y vías fisiológicas propias del sistema sanguíneo como el linaje de células hematopoyéticas, vía de señalización de la insulina, presentación y procesamiento de antígenos, citotoxicidad mediada por células natural killer, fagocitosis mediada por receptor, etc., vías relacionadas con procesos de otros tejidos como contracción del músculo cardíaco, adhesión focal, el metabolismo de drogas, lípidos, beta-alanina, metano, fenilalanina, pirimidina, etc. y evidentemente los miRNAs alterados en LLA

afectan genes que desembocan en vías comunes propias de cáncer, como melanoma, glioma, cáncer pancreático, cáncer de células pequeñas de pulmón, cáncer de células no pequeñas de pulmón, cáncer de próstata y LMC, así como la vía de señalización de p53 y del ciclo celular. Otra de las vías obtenidas fue la de endocitosis, que pudiera reflejar la naturaleza del acarreador de miRNAs circulantes involucrados, como son los exosomas, estos son capaces de ser liberados por gran variedad de células incluyendo células tumorales [96, 148] y células dendríticas [149]. La capacidad de las células dendríticas de liberar miRNAs mediante exosomas también pudiera justificar la obtención de la vía de orientación del axón, en el proceso final de regulación de genes por miRNAs alterados en LLA.

9. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron 4 genes de miRNAs, útiles como genes de referencia para la determinación de la expresión relativa de miRNAs circulantes en pacientes con LLA-B: **miR-106a, miR-26b, miR-30a y miR-30d**.
2. Nuestro trabajo ha sido el primero en aportar un perfil de 77 miRNAs específicos de plasma asociado a LLA-B, con potencial como biomarcadores de diagnóstico y como blancos de agentes terapéuticos para el tratamiento de la LLA-B.
3. De los 77 miRNAs circulantes diferencialmente expresados en LLA-B, 20 miRNAs han sido reportados alterados en células leucémicas, 57 miRNAs no han sido reportados.
4. Mediante un análisis *in silico*, se determinó que 37 miRNAs (tabla XXVIII) del perfil de expresión obtenido en este trabajo, se unen a uno o varios de los 13 genes asociados a sobrevida (Tesis de maestría de Garza-Veloz, 2009) en pacientes con LLA, probablemente estos miRNAs estén regulando directamente a los 13 genes y por lo tanto, estar indirectamente asociados a sobrevida en pacientes con esta enfermedad.
5. Se obtuvo un miRNA altamente sobreexpresado que no ha sido reportado, miR-511, es posible que este miRNA circulante sea específico de plasma para la LLA-B.
6. Se proponen a **mir-511, miR-34a y miR-223**, como excelentes candidatos para biomarcadores plasmáticos de LLA-B debido a que presentaron alto valor predictivo (sensibilidad y especificidad alta).
7. Los miRNAs mir-511, miR-34a y miR-223 presentes en circulación y desregulados en LLA, regulan directa o indirectamente la expresión de genes (en cultivo celular) involucrados en el desarrollo de la leucemia y otros tipos de cáncer. Algunos de estos genes son los siguientes.
 - Gen *BAALC*, se ha visto que la sobreexpresión de éste gen es un factor pronóstico adverso en adultos con AML y ALL-T con citogenética normal (Blood. 2010 May 6;115(18):3737-44. Epub 2010 Jan 11).
 - *CD44*, cuya proteína participa en la activación de linfocitos, recirculación, hematopoyesis y metástasis. Además, su transcripción es activada en parte por la vía wnt/beta-catenina (relacionadas a desarrollo de tumor).

- *IKAROS*, el cual regula negativamente a la vía wnt/beta-catenina, vía que encontramos involucrada en LLA en el análisis de microarreglos realizado en nuestro laboratorio.
8. La determinación hipotética (*in silico*) de las vías de señalización de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los miRNAs miR-511, miR-34a y miR-223 están involucrados en la patogénesis de la leucemia.

10. PERSPECTIVAS

1. Validar el resto de los miRNAs obtenidos en el perfil de expresión, tanto los que ya han sido reportados, como los menos caracterizados, que son los provenientes de las placas B, en un número de muestras mayor. Correlacionar los niveles de expresión de los miRNAs con parámetros asociados a pronóstico como respuesta al tratamiento, ERM y algunas translocaciones como t(12;21), t(9;22), t(1;19).
2. Determinar si los miRNAs desregulados circulantes obtenidos en el perfil de LLA, sobre todo de miR-511 (que no ha sido reportado alterado ni en células ni en suero, plasma u orina), tienen un comportamiento similar en las células leucémicas u otro fluido corporal.
3. De los genes que se encontraron alterados en cultivo celular, determinar aquellos que son regulados directamente por miR-511, miR-34a y miR-223 mediante sistemas de transfección in vitro. Realizar un análisis in silico para obtener los genes que presenten sitios de unión para uno, dos o los 3 miRNAs, posteriormente co-transfectar el miRNA con un constructo que contenga el sitio de unión hipotético para el miRNA y observar el efecto mediante análisis de los cambios en los niveles de expresión del gen en cuestión, con un sistema de luciferasa, por ejemplo.
4. Probar en modelos murinos el poder terapéutico de los miRNAs con los niveles más altos de desregulación, por ejemplo, inyectando directamente al torrente sanguíneo antagonistas (anti-miRs) de los miRNAs más sobreexpresados como miR-511, miR-34a*, miR-565, y miR-34a, como se ha mostrado en un estudio donde la administración intravenosa de AMOs contra miR-16, miR-122, miR-192 y miR-194 en animales originó el silenciamiento eficiente y sostenido de los miRNAs correspondientes [150]. Por otra parte, la administración de miRNAs miméticos de los miRNAs más subexpresados como miR-199a-3p, miR-340*, miR-151-3p, etc., de manera independiente y las combinaciones compatibles de acuerdo a los mismos genes blanco de determinado grupo de miRNAs.

REFERENCIAS

1. Manuel Alfredo Ortega Sánchez, M.L.O.O., José Vicente Rosas Barrientos, *Leucemia linfoblástica aguda*. Med Int Mex, 2007. **23**: p. 26-33.
2. Laura Leticia Tirado-Gómez M.C., D.y.A.M.B., *Epidemiología de las Neoplasias Hemato-Oncológicas*, in *Cancerología*. 2007, Instituto Nacional de Cancerología. p. 109-120.
3. Beutler E, L.M., Coller B, Kipps T, et al. Williams ed. *Hematology*. 6th ed. ed. 2001, McGraw-Hill: York. 1141-1161.
4. Laura Rodríguez, O.G.-L., Consuelo Mancias, Teresa Pompa, Guadalupe González, Adriana Sandoval, María Teresa Palafox, Liliana Támez, Cristina Tovar, David Gómez-Almaguer, *Observaciones sobre la incidencia de leucemias agudas en el Noreste de México*. Revista de Hematología, 2010. **11**(2): p. 78-81.
5. Fauci A, B.E., Isselbacher K, Wilson J, y col. Harrison, ed. *Principios de medicina interna*. 4a ed. ed. 1998, McGraw-Hill Interamericana: Madrid. 781-792.
6. Brunning RD, B.M., Matutes E, Head D, Flandrin G, Swerdlow SH, Bennett JM, ed. *Precursor B-cell and T-cell neoplasms*. 2001, World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues: Lyon. 109-117.
7. Redaelli, A., et al., *A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL)*. Eur J Cancer Care (Engl), 2005. **14**(1): p. 53-62.
8. Ziegler, D.S., et al., *Advances in childhood leukaemia: successful clinical-trials research leads to individualised therapy*. Med J Aust, 2005. **182**(2): p. 78-81.
9. Chan, K.W., *Acute lymphoblastic leukemia*. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care, 2002. **32**(2): p. 40-9.
10. Rubnitz, J.E. and C.H. Pui, *Recent advances in the treatment and understanding of childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Cancer Treat Rev, 2003. **29**(1): p. 31-44.
11. Ravindranath, Y., *Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia*. Curr Opin Oncol, 2003. **15**(1): p. 23-35.
12. GJ, R.A., ed. *Fundamentos de hematología*. 2a ed. ed. 1998, Panamericana: México.
13. Bennet JM, C.D., Daniel MT, Flandrin G, et al., *Proposals for the classification of the acute leukemias. French-American-British (FAB) co-operative group*. Br J Hematol 1976. **33**: p. 451.
14. Kantarjian, H.M., et al., *Results of treatment with hyper-CVAD, a dose-intensive regimen, in adult acute lymphocytic leukemia*. J Clin Oncol, 2000. **18**(3): p. 547-61.
15. Lazarus, H.M. and J.M. Rowe, *Bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia (ALL)*. Med Oncol, 1994. **11**(2): p. 75-88.
16. Fiere D, S.C., Reiffers J., *Comparison of allogeneic transplantation, autologous transplantation, and chemotherapy as post induction treatment in adult acute lymphoblastic leukemia, long term report of the French group of treatment of adult ALL*. Proc Am Soc Clin Oncol 1998. **17**: p. 14.
17. Miyamura, K., et al., *Detection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction: possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation*. Blood, 1992. **79**(5): p. 1366-70.
18. Pui, C.H. and D. Campana, *New definition of remission in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2000. **14**(5): p. 783-5.
19. Campana, D. and E. Coustan-Smith, *Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia*. Acta Haematol, 2004. **112**(1-2): p. 8-15.
20. R. López Almaraz, A.M.M.y.J.R.L., *Papel de la genética molecular en el cáncer infantil*. An Pediatr (Barc), 2003. **59**(4): p. 334-344.

21. CJ, H., *The management of patients with leukemia: The role of cytogenetics in this molecular area*. Br J Haematol, 2000. **108**: p. 19-30.
22. Coustan-Smith, E., et al., *Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood, 2000. **96**(8): p. 2691-6.
23. Bolufer, P., et al., *Rapid quantitative detection of TEL-AML1 fusion transcripts in pediatric acute lymphoblastic leukemia by real-time reverse transcription polymerase chain reaction using fluorescently labeled probes*. Haematologica, 2002. **87**(1): p. 23-32.
24. Eckert, C., et al., *Prognostic value of minimal residual disease in relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia*. Lancet, 2001. **358**(9289): p. 1239-41.
25. McEwen, D.G. and M. Peifer, *Wnt signaling: the naked truth?* Curr Biol, 2001. **11**(13): p. R524-6.
26. Huelsken, J. and W. Birchmeier, *New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 547-53.
27. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
28. Carrington, J.C. and V. Ambros, *Role of microRNAs in plant and animal development*. Science, 2003. **301**(5631): p. 336-8.
29. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
30. Wightman, B., I. Ha, and G. Ruvkun, *Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans*. Cell, 1993. **75**(5): p. 855-62.
31. Lee, R.C. and V. Ambros, *An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 862-4.
32. Lau, N.C., et al., *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science, 2001. **294**(5543): p. 858-62.
33. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of novel genes coding for small expressed RNAs*. Science, 2001. **294**(5543): p. 853-8.
34. Lagos-Quintana, M., et al., *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr Biol, 2002. **12**(9): p. 735-9.
35. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
36. Krek, A., et al., *Combinatorial microRNA target predictions*. Nat Genet, 2005. **37**(5): p. 495-500.
37. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. **120**(1): p. 15-20.
38. Ketting, R.F., et al., *Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans*. Genes Dev, 2001. **15**(20): p. 2654-9.
39. Lytle, J.R., T.A. Yario, and J.A. Steitz, *Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(23): p. 9667-72.
40. Lai, E.C., *Predicting and validating microRNA targets*. Genome Biol, 2004. **5**(9): p. 115.
41. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Database issue): p. D154-8.
42. John, B., et al., *Human MicroRNA targets*. PLoS Biol, 2004. **2**(11): p. e363.
43. Sethupathy, P., B. Corda, and A.G. Hatzigeorgiou, *TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets*. RNA, 2006. **12**(2): p. 192-7.
44. Xiao, F., et al., *miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Database issue): p. D105-10.
45. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
46. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
47. Altuvia, Y., et al., *Clustering and conservation patterns of human microRNAs*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(8): p. 2697-706.

48. Hertel, J. and P.F. Stadler, *Hairpins in a Haystack: recognizing microRNA precursors in comparative genomics data*. *Bioinformatics*, 2006. **22**(14): p. e197-202.
49. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. *Nature*, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
50. Denli, A.M., et al., *Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex*. *Nature*, 2004. **432**(7014): p. 231-5.
51. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes Dev*, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
52. Lund, E., et al., *Nuclear export of microRNA precursors*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 95-8.
53. Chendrimada, T.P., et al., *TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 740-4.
54. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. **293**(5531): p. 834-8.
55. Khvorova, A., A. Reynolds, and S.D. Jayasena, *Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias*. *Cell*, 2003. **115**(2): p. 209-16.
56. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. *Genome Res*, 2004. **14**(10A): p. 1902-10.
57. Zeng, Y., *Principles of micro-RNA production and maturation*. *Oncogene*, 2006. **25**(46): p. 6156-62.
58. Lin, S.L., J.D. Miller, and S.Y. Ying, *Intronic microRNA (miRNA)*. *J Biomed Biotechnol*, 2006. **2006**(4): p. 26818.
59. Smalheiser, N.R. and V.I. Torvik, *Mammalian microRNAs derived from genomic repeats*. *Trends Genet*, 2005. **21**(6): p. 322-6.
60. Okamura, K., et al., *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. *Cell*, 2007. **130**(1): p. 89-100.
61. Kato, M. and F.J. Slack, *microRNAs: small molecules with big roles - C. elegans to human cancer*. *Biol Cell*, 2008. **100**(2): p. 71-81.
62. Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, and E. Izaurralde, *MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2006. **71**: p. 523-30.
63. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(9): p. 2999-3004.
64. Calin, G.A. and C.M. Croce, *MicroRNA signatures in human cancers*. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(11): p. 857-66.
65. Nana-Sinkam, S.P., M. Fabbri, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer: personalizing diagnosis and therapy*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1210**: p. 25-33.
66. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
67. Caldas, C. and J.D. Brenton, *Sizing up miRNAs as cancer genes*. *Nat Med*, 2005. **11**(7): p. 712-4.
68. Chen, C.Z., et al., *MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation*. *Science*, 2004. **303**(5654): p. 83-6.
69. Fabbri, M., et al., *MicroRNAs and noncoding RNAs in hematological malignancies: molecular, clinical and therapeutic implications*. *Leukemia*, 2008. **22**(6): p. 1095-105.
70. Severson, R.K. and J.A. Ross, *The causes of acute leukemia*. *Curr Opin Oncol*, 1999. **11**(1): p. 20-4.
71. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
72. Kitada, S., et al., *Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with In vitro and In vivo chemoresponses*. *Blood*, 1998. **91**(9): p. 3379-89.
73. Sanchez-Beato, M., A. Sanchez-Aguilera, and M.A. Piris, *Cell cycle deregulation in B-cell lymphomas*. *Blood*, 2003. **101**(4): p. 1220-35.

74. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
75. Sonoki, T., et al., *Insertion of microRNA-125b-1, a human homologue of lin-4, into a rearranged immunoglobulin heavy chain gene locus in a patient with precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2005. **19**(11): p. 2009-10.
76. Schotte, D., et al., *Identification of new microRNA genes and aberrant microRNA profiles in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Leukemia, 2009. **23**(2): p. 313-22.
77. Mi, S., et al., *MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(50): p. 19971-6.
78. Zanette, D.L., et al., *miRNA expression profiles in chronic lymphocytic and acute lymphocytic leukemia*. Braz J Med Biol Res, 2007. **40**(11): p. 1435-40.
79. Kaddar, T., et al., *Prognostic value of miR-16 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia relationships to normal and malignant lymphocyte proliferation*. Leuk Res, 2009. **33**(9): p. 1217-23.
80. Mo, M.H., et al., *Cell-free Circulating miRNA Biomarkers in Cancer*. J Cancer, 2012. **3**: p. 432-48.
81. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
82. Heneghan, H.M., et al., *Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer*. Ann Surg, 2010. **251**(3): p. 499-505.
83. Gilad, S., et al., *Serum microRNAs are promising novel biomarkers*. PLoS One, 2008. **3**(9): p. e3148.
84. Hanke, M., et al., *A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer*. Urol Oncol, 2010. **28**(6): p. 655-61.
85. Gupta, S.K., C. Bang, and T. Thum, *Circulating microRNAs as biomarkers and potential paracrine mediators of cardiovascular disease*. Circ Cardiovasc Genet, 2010. **3**(5): p. 484-8.
86. Zahm, A.M., et al., *Circulating microRNA is a biomarker of pediatric Crohn disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2011. **53**(1): p. 26-33.
87. Siegel, S.R., et al., *Circulating microRNAs involved in multiple sclerosis*. Mol Biol Rep, 2012. **39**(5): p. 6219-25.
88. Tomimaru, Y., et al., *Circulating microRNA-21 as a novel biomarker for hepatocellular carcinoma*. J Hepatol, 2012. **56**(1): p. 167-75.
89. Chin, L.J. and F.J. Slack, *A truth serum for cancer--microRNAs have major potential as cancer biomarkers*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 983-4.
90. Chen, X., et al., *Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases*. Cell Res, 2008. **18**(10): p. 997-1006.
91. Vickers, K.C. and A.T. Remaley, *Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication*. Curr Opin Lipidol, 2012. **23**(2): p. 91-7.
92. Arroyo, J.D., et al., *Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(12): p. 5003-8.
93. Zhang, Y., et al., *Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration*. Mol Cell, 2010. **39**(1): p. 133-44.
94. Muller, G., et al., *Microvesicles released from rat adipocytes and harboring glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins transfer RNA stimulating lipid synthesis*. Cell Signal, 2011. **23**(7): p. 1207-23.
95. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
96. Valadi, H., et al., *Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(6): p. 654-9.
97. Kosaka, N., et al., *Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*. J Biol Chem, 2010. **285**(23): p. 17442-52.

98. Pigati, L., et al., *Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13515.
99. Taylor, D.D. and C. Gercel-Taylor, *MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2008. **110**(1): p. 13-21.
100. Hunter, M.P., et al., *Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles*. PLoS One, 2008. **3**(11): p. e3694.
101. Rabinowits, G., et al., *Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2009. **10**(1): p. 42-6.
102. Brase, J.C., et al., *Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 306.
103. Vickers, K.C., et al., *MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(4): p. 423-33.
104. Rottiers, V. and A.M. Naar, *MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(4): p. 239-50.
105. Montecalvo, A., et al., *Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes*. Blood, 2012. **119**(3): p. 756-66.
106. Turchinovich, A., et al., *Characterization of extracellular circulating microRNA*. Nucleic Acids Res, 2011. **39**(16): p. 7223-33.
107. Russo, F., et al., *miRandola: Extracellular Circulating MicroRNAs Database*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e47786.
108. Zhao, H., et al., *A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer*. PLoS One, 2010. **5**(10): p. e13735.
109. LaConti, J.J., et al., *Tissue and serum microRNAs in the Kras(G12D) transgenic animal model and in patients with pancreatic cancer*. PLoS One, 2011. **6**(6): p. e20687.
110. Komatsu, S., et al., *Circulating microRNAs in plasma of patients with oesophageal squamous cell carcinoma*. Br J Cancer, 2011. **105**(1): p. 104-11.
111. Liu, C.J., et al., *Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer*. Oral Dis, 2010. **16**(4): p. 360-4.
112. Huang, Z., et al., *Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(1): p. 118-26.
113. Tsujiura, M., et al., *Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers*. Br J Cancer, 2010. **102**(7): p. 1174-9.
114. Shigoka, M., et al., *Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development*. Pathol Int, 2010. **60**(5): p. 351-7.
115. Dohner, H., et al., *Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia*. N Engl J Med, 2000. **343**(26): p. 1910-6.
116. Pekarsky, Y., et al., *Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181*. Cancer Res, 2006. **66**(24): p. 11590-3.
117. Calin, G.A. and C.M. Croce, *Chromosomal rearrangements and microRNAs: a new cancer link with clinical implications*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2059-66.
118. Tsuda, N., et al., *Synthetic microRNA designed to target glioma-associated antigen 1 transcription factor inhibits division and induces late apoptosis in pancreatic tumor cells*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(21): p. 6557-64.
119. Weiler, J., J. Hunziker, and J. Hall, *Anti-miRNA oligonucleotides (AMOs): ammunition to target miRNAs implicated in human disease? Gene Ther*, 2006. **13**(6): p. 496-502.
120. Gumireddy, K., et al., *Small-molecule inhibitors of microRNA miR-21 function*. Angew Chem Int Ed Engl, 2008. **47**(39): p. 7482-4.
121. Ebert, M.S., J.R. Neilson, and P.A. Sharp, *MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells*. Nat Methods, 2007. **4**(9): p. 721-6.
122. Choi, W.Y., A.J. Giraldez, and A.F. Schier, *Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430*. Science, 2007. **318**(5848): p. 271-4.

123. Xiao, J., et al., *Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4*. J Cell Physiol, 2007. **212**(2): p. 285-92.
124. Bhardwaj, A., S. Singh, and A.P. Singh, *MicroRNA-based Cancer Therapeutics: Big Hope from Small RNAs*. Mol Cell Pharmacol, 2010. **2**(5): p. 213-219.
125. Melo, S.A. and R. Kalluri, *Molecular pathways: microRNAs as cancer therapeutics*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(16): p. 4234-9.
126. Wurdinger, T. and F.F. Costa, *Molecular therapy in the microRNA era*. Pharmacogenomics J, 2007. **7**(5): p. 297-304.
127. Trang, P., et al., *Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA*. Oncogene, 2010. **29**(11): p. 1580-7.
128. van Rooij, E., et al., *Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA*. Science, 2007. **316**(5824): p. 575-9.
129. Lanford, R.E., et al., *Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection*. Science, 2010. **327**(5962): p. 198-201.
130. Liu, C., et al., *The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 211-5.
131. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. Genome Biol, 2002. **3**(7): p. RESEARCH0034.
132. Mestdagh, P., et al., *A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization*. Genome Biol, 2009. **10**(6): p. R64.
133. Liu, Y., et al., *Cloning of two candidate tumor suppressor genes within a 10 kb region on chromosome 13q14, frequently deleted in chronic lymphocytic leukemia*. Oncogene, 1997. **15**(20): p. 2463-73.
134. Yap, W.H., et al., *STAT4 is a target of the hematopoietic zinc-finger transcription factor Ikaros in T cells*. FEBS Lett, 2005. **579**(20): p. 4470-8.
135. Klein, F., et al., *BCR-ABL1 induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells*. Oncogene, 2006. **25**(7): p. 1118-24.
136. Mullighan, C.G., et al., *BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 110-4.
137. Iacobucci, I., et al., *Identification of different Ikaros cDNA transcripts in Philadelphia-positive adult acute lymphoblastic leukemia by a high-throughput capillary electrophoresis sizing method*. Haematologica, 2008. **93**(12): p. 1814-21.
138. Mullighan, C.G., et al., *Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia*. N Engl J Med, 2009. **360**(5): p. 470-80.
139. Russell, T., et al., *Differential expression of Ikaros isoforms in monozygotic twins with MLL-rearranged precursor-B acute lymphoblastic leukemia*. J Pediatr Hematol Oncol, 2008. **30**(12): p. 941-4.
140. Tonnelle, C., et al., *Stage specific over-expression of the dominant negative Ikaros 6 reveals distinct role of Ikaros throughout human B-cell differentiation*. Mol Immunol, 2009. **46**(8-9): p. 1736-43.
141. Archangelo, L.F., et al., *The CALM and CALM/AF10 interactor CATS is a marker for proliferation*. Mol Oncol, 2008. **2**(4): p. 356-67.
142. Greif, P.A., et al., *The leukemogenic CALM/AF10 fusion protein alters the subcellular localization of the lymphoid regulator Ikaros*. Oncogene, 2008. **27**(20): p. 2886-96.
143. Chang, K.H., et al., *MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 173.
144. Davoren, P.A., et al., *Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer*. BMC Mol Biol, 2008. **9**: p. 76.

145. Peltier, H.J. and G.J. Latham, *Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues*. RNA, 2008. **14**(5): p. 844-52.
146. Akao, Y., et al., *Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies*. Cancer Sci, 2007. **98**(12): p. 1914-20.
147. Roth, C., et al., *Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(6): p. R90.
148. Mears, R., et al., *Proteomic analysis of melanoma-derived exosomes by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry*. Proteomics, 2004. **4**(12): p. 4019-31.
149. Thery, C., et al., *Molecular characterization of dendritic cell-derived exosomes. Selective accumulation of the heat shock protein hsc73*. J Cell Biol, 1999. **147**(3): p. 599-610.
150. Krutzfeldt, J., et al., *Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'*. Nature, 2005. **438**(7068): p. 685-9.

APÉNDICE

Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González"
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Protocolo:

"Determinación del perfil de expresión de microRNAs en Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y su asociación con la evolución de la enfermedad"

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por éste medio y de manera oral, se le invita a usted (o al padre o tutor en el caso de menores de edad) a participar en el protocolo de investigación: "Determinación del perfil de expresión de microRNAs en Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y su asociación con la evolución de la enfermedad", en el cual, de manera sencilla y entendible se describe brevemente a continuación:

Las leucemias agudas, ya sea Mieloide o Linfoide se presentan tanto en niños como en adultos, y una vez diagnosticada, se procede al tratamiento. Actualmente, durante la etapa de tratamiento se monitorea la respuesta a éste cada vez que se le toma una muestra de sangre. Los métodos de monitoreo tradicionales si bien son eficaces, no pueden predecir recaídas ni respuestas al tratamiento por si solos, además de que necesita un incremento dramático en el número de células leucémicas para determinar que el tratamiento no está funcionando, y que es necesario incrementar la intensidad o cambiar el esquema de tratamiento. En la actualidad existe un método para el monitoreo de la respuesta al tratamiento que se utiliza ampliamente en los países de primer mundo, el cual permite predecir recaídas y respuesta al tratamiento de 2 a 4 semanas de anticipación, pero presenta como principal desventaja el costo y tiempo que éste implica. También, existe una variante de éste método que es aplicable en hasta un 40% de los pacientes con Leucemias Agudas, el cual es de un costo mucho menor y con una eficiencia del 100% respecto al monitoreo, sin embargo, no se realiza actualmente en nuestro país. Para el 60% de los pacientes que no son evaluables por ésta metodología es necesario buscar la manera de poder monitorear la respuesta al tratamiento, por lo que en éste estudio se plantea el desarrollo de un método sencillo y de bajo costo, además de eficaz para monitorear al paciente. Entre las ventajas que presentan éste tipo de estudios se encuentran: el diagnóstico con precisión de la Leucemia Aguda, predicción de recaídas y respuesta al tratamiento con anticipación, lo que permite administrar un tratamiento personalizado basado en éstos hallazgos, es decir, administrar un tratamiento más intenso a los pacientes con predisposición a recaídas o que no respondan al tratamiento; o disminución en la intensidad y frecuencia de aplicación del tratamiento en los pacientes que si responden a éste; todo esto con anticipación, de manera que el paciente no llegue a presentar sintoma alguno de recaída. Al paciente de recién diagnóstico se le tomarán por única ocasión tres pequeños tubos de muestra, y para la siguiente toma sucesiva, así como para los pacientes con tratamiento en curso y en seguimiento, un tubo de muestra extra a la que de manera rutinaria se le venía tomando en cada cita. Los resultados que se obtengan de las muestras se irán anexando al expediente, y reportando al médico tratante, para que el tome decisiones con base en ellos, con beneficio para el paciente y la institución tratante, pues tendrá un tratamiento más eficaz y menos prolongado, disminuyendo también costos de tratamiento para la institución tratante y los familiares, junto con todo lo que ello implique.

Una vez enterado de la importancia del proyecto, se le exhorta a leer las siguientes cláusulas:

- Se me ha explicado que padezco un tipo de leucemia aguda y que se me propone participar en un proyecto de investigación que tiene como objetivo monitorear mi enfermedad con nuevas tecnologías.
- Se me ha informado que se tomarán muestras de sangre periférica de manera sucesiva y por el tiempo que dure el estudio. Estas muestras son adicionales al estudio que requiere mi enfermedad, y como cualquier toma de sangre, puede causar moretones y pequeños sangrados que se resolverán rápidamente siguiendo las indicaciones del médico.
- Los resultados de este estudio ayudarán a diagnosticar mejor mi enfermedad y el de otros pacientes a mediano plazo.
- Se me explicó que fui elegido de manera aleatoria y que los estudios no interfieren en el curso de mi enfermedad ni en mi tratamiento.
- Se me aclaró que puedo abandonar el estudio en cualquier momento si yo lo decida, sin que ello afecte mi atención de parte del médico y hospital.



SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION

Página 1/2

- Autorizo la publicación de los resultados de mi estudio a condición de que en todo momento se mantendrá el secreto profesional y que no se publicará mi nombre o revelará mi identidad.
- El estudio me es proporcionado gratuitamente por el Centro Universitario Contra el Cáncer del Hospital Universitario "Dr. José Eleuterio González", de la Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Este estudio y sus procedimientos me han sido explicados a mi entera satisfacción, en mi propio idioma, y se me ha proporcionado una copia de este informe de consentimiento. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y éstas han sido contestadas a mi entera satisfacción. Por lo tanto he decidido participar voluntariamente en el proyecto titulado: "Determinación del perfil de expresión de microRNAs en Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y su asociación con la evolución de la enfermedad"

Datos a llenar por el Investigador

Nombre del Paciente: _____ Edad: _____ Sexo: M F
 Fecha: _____ Primera Muestra Seguimiento (Inicio de Tx: _____)
 Población de Origen: _____ Seguirá todo el Tx en el CUCC: Si No
 Dx: _____ IFT: _____ Código: _____
 Estudio de cariotipo o FISH previo: Si (Resultado: _____) No

Nombre y firma del paciente o responsable legal: _____

Nombre, y firma del testigo 1: _____

Nombre, y firma del testigo 2: _____

Nombre y firma del Investigador Responsable: Dra. Rocío Ortiz López

Para preguntas o comentarios comunicarse con:

Dra. Rocío Ortiz López,
 MC. Idalia Garza Veloz
 MC. Claudia Maribel Luna Aguirre,

Al teléfono 8348 5287 o al 8329 41 74, ext. 2592

O bien escribir un correo electrónico a:
cmari25@hotmail.com, idgarve@gmail.com, rortizlopez@gmail.com

 
 SUB-DIRECCION DE INVESTIGACION