INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

SECRETARIA DE SALUD

"IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES *TLX1* Y *TLX3* IMPLICADOS EN LAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS T Y SU ASOCIACIÓN CON RIESGO DE RECAÍDA"

TRABAJO DE FIN DE CURSO QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA DEL

CURSO AVANZADO DE CITOGENETICA

P R E S E N T A:

BIOL. EUNICE FABIÁN MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. CONSUELO SALAS LABADIA

MÉXICO, D.F. 2014

IDENTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES *TLX1* Y *TLX3* IMPLICADOS EN LAS NEOPLASIAS DE CÉLULAS T Y SU ASOCIACIÓN CON RIESGO DE RECAÍDA

DRA. ROSAURA ROSAS VARGAS
DIRECTORA DE ENSEÑANZA

DR. LUIS MARTIN GARRIDO GARCIA
JEFE DEL DEPARTAMENTO DE PRE Y POSGRADO

DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
PROFESOR TITULAR DEL CURSO AVANZADO DE CITOGENÉTICA

DRA. CONSUELO SALAS LABADIA
TUTOR DE TESIS

Instituto Nacional de Pediatría
INP
DIRECCION DE ENSEÑANZA

El presente trabajo forma parte del proyecto Núm. 06/043 titulado 'Identificación de la expresión diferencial de genes implicados en las neoplasias de células T y su asociación con riesgo de recaída' aprobado por el Instituto Nacional de Pediatría (INP). La realización del mismo, se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Consuelo Salas Labadía en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos a cargo de la Dra. Patricia Pérez Vera perteneciente al Departamento de Investigación en Genética Humana del INP.

Dedicatorias

A mis padres, por el modelo de vida que me han dado. Gracias a ustedes por siempre estar presentes en cada paso que doy apoyandome incondicionalmente. Gracias por enseñarme a ser una persona responsable y trabajadora, por inculcarme esas ganas de vivir y disfrutar la vida. Los quiero mucho.

Con especial dedicatoria a mi hermano y a toda mi familia. Porque ustedes son parte importante de mi vida. Gracias por su apoyo y motivación.

A mis abuelitos, gracias por su amor y por los maravillosos recuerdos que me dejaron.

A todos mis amigos y aquellos que estuvieron en algún momento de mi vida para escucharme, darme aliento y motivarme a seguir adelante.

Agradecimientos

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento no solo a aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, sino también a todos aquellos que gracias a su vocación y experiencia hicieron posible mi formación como citogenetista.

En primer lugar, a la Dra. Consuelo Salas Labadía 'Chelito' mi directora de Tesis. Gracias por haber confiado en mi, por tu paciencia ante mi inconsistencia, por tu valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de Tesis y llegar a la conclusión del mismo.

Quiero agradecer también a la Dra. Patricia Pérez Vera por haberme recibido tan amablemente en su laboratorio, por la orientación, seguimiento y supervisión continua. Pero sobre todo, por su amistad, confianza, motivación y gran apoyo.

A todos los integrantes del laboratorio de Cultivo de Tejidos: Chío, Pili, Adri, Vero, Rob, Juan Carlos y Alex. Más que sólo agradecerles por ser unos buenos compañeros de laboratorio, les agradezco por ser unos excelentes amigos. Gracias por siempre escuchar y brindarme tan valiosos consejos.

Muy especial agradecimiento a la Dra. Sara Frías quien desde el minuto cero confió en mí, brindándome todo su apoyo e incondicional amistad. Gracias por no sólo ser un ejemplo a seguir en el ámbito profesional, sino también como una persona admirable.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a toda la familia INP pertenecientes al Departamento de Genética Humana, quienes contribuyeron de manera invaluable a mi formación. A la Dra. Victoria del Castillo, Dra. Ariadna González del Ángel, Dra. Esther Lieberman, Dra. Emiy Yokoyama, Dr. Miguel Ángel Alcántara, Dr. Camilo Villarroel, gracias por sus enseñanzas, por ayudarme a integrar lo aprendido en clase y acercarme al mundo clínico. Así mismo, agradezco a los integrantes de los laboratorios que forman parte de esta familia: Bertha, Sandra, Chivis, Mary Paz, Armando, Luz, Leda, Oscar, Nancy, Reoth, José, Cesárea. Gracias a todos por compartir su conocimiento y siempre estar dispuestos a resolver dudas y brindar apoyo.

Las rotaciones externas al INP fueron muy valiosas y enriquecedoras. Gracias por aceptarnos y formar parte de este camino, compartiendo sus conocimientos y experiencia. En el 20 de Noviembre, gracias a Cony, Inesita y Cesy no sólo por ser unas excelentes tutoras sino también por su sincera amistad, las admiro y quiero mucho. Las chicas Diagen: Dra. Paty Grether, Bere, Vicky, Tatis, Carol, Bárbara y Karen indudablemente también quedan en mi memoria como grandes tutoras y amigas. Gracias por las lecciones aprendidas con cada una de ustedes.

Nada hubiera sido igual de no ser por mis compañeritos médicos con quienes sufrimos y disfrutamos este camino. Es grato compartir estos recuerdos con ustedes: Alejandro, MaJo, Ximena, Vianney. Lili, Rosa, David, Karla y Alma, de todos aprendí mucho, gracias.

Y qué decir de mis súper nenes, a quienes agradezco especialmente. Nada hubiera sido igual sin ustedes. Julieta, mi compañera y gran amiga con la que viví toda esta experiencia, cada uno de los pasos los sufrimos y disfrutamos juntas y unidas. Fue un placer, mi querida Juls. Conservo gratos recuerdos de esta etapa, fuiste y sigues siendo un gran apoyo, te quiero mucho, amiga. Mi querido (y porcino) amigo Alfredo, sin ti no hubiese descubierto el mundo de la citogenética, gracias por echarnos porras todo el tiempo y no dejarnos retroceder en el camino. Muchas gracias también por el tiempo que nos dedicaste y tus enseñanzas. Eres un gran amigo y aunque me cueste reconocerlo, te quiero mucho. Netzi, Moy, Adri, Marisol, también son parte importante, realmente me divertí mucho aprendiendo con ustedes. Los considero grandes amigos, los admiro mucho y los quiero más, son de lo mejor.

ÍNDICE

RESUMEN **8**

INTRODUCCIÓN **10**

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA 10
LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA DE CÉLULAS T (LAL-T) 11
DESARROLLO DE LINFOCITOS T 11
ALTERACIONES DURANTE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS T 14
ESQUEMAS DE CLASIFICACIÓN DE LAL-T 15
Inmunofenotipo: Clasificación EGIL 16
ALTERACIONES GENÉTICAS EN LA PATOGÉNESIS DE LAL-T 16
ALTERACIONES CROMOSÓMICAS 17
DESREGULACIÓN DE GENES HOMEOBOX 19
Clase I. HOX A, B, C y D 19
Clase II. TLX1, TLX3 20
TLX1 (HOX11) 20
Mecanismo de acción de TLX1 20
Papel pronóstico de TLX1 21
TLX3 (HOX11L2) 21
Mecanismo de acción de TLX3 21
Papel pronóstico de TLX3 22
Estudios de expresión de los genes TLX1 y TLX3 en pacientes con LAL-T 22

JUSTIFICACIÓN **26**

HIPÓTESIS **26**

OBJETIVOS **26**

OBJETIVO GENERAL 26
OBJETIVOS PARTICULARES 27

METODOLOGÍA **27**

POBLACIÓN DE ESTUDIO 27
Población objetivo 27
Población control 27
Criterios de inclusión 27
Criterios de exclusión 27

DISEÑO EXPERIMENTAL 28
Extracción de RNA 28

Cuantificación e integridad 28
Síntesis de cDNA 29
PCR GAPDH 29
PCR en tiempo real 29

ANÁLISIS DE RESULTADOS 31

ANÁLISIS ESTADÍSTICO 34

RESULTADOS 34

POBLACIÓN DE ESTUDIO 34
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *TLX1* 36
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL GEN *TLX3* 37
PRONÓSTICO ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE TLX1 Y TLX3 EN PACIENTES CON LAL-T 38

DISCUSIÓN 42

CONCLUSIÓN 44

REFERENCIAS 45

RESUMEN

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda de células T (LAL-T) representa el 15% de todas las leucemias de linaje linfoide y se asocia con mal pronóstico. Es una neoplasia en la que múltiples alteraciones genéticas cooperan en la transformación maligna de células precursoras de timocitos. Aproximadamente el 7% y 20% de los casos de LAL-T infantil muestran expresión alterada de los genes *TLX1* y *TLX3*, respectivamente. En diversos estudios se ha descrito que la sobre-expresión de *TLX1* se asocia a un pronóstico favorable en estos pacientes; en cuanto al aumento en la expresión de *TLX3*, se ha asociado con un pronóstico desfavorable, aunque los resultados obtenidos son controvertidos. Con base en estas observaciones, es importante analizar la expresión de estos genes para conocer su probable aplicación como marcadores de pronóstico en LAL-T. **Objetivo:** Determinar mediante PCR en tiempo real (qPCR), el perfil de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* y estimar su valor como marcador pronóstico de recaída en pacientes con LAL-T. **Metodología:** Se analizaron 11 pacientes pediátricos diagnosticados con LAL-T, del Instituto Nacional de Pediatría y del Hospital para el Niño Poblano. La expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* fue evaluada mediante la técnica de qPCR en tiempo real. Los pacientes se clasificaron y agruparon de acuerdo a los niveles de expresión de cada gen, en expresión negativa/baja y en expresión alta. Se buscó analizar la supervivencia libre de evento (SLE) y supervivencia global (SG) de cada grupo de expresión, considerando como eventos: recaída o muerte. Las curvas de supervivencia fueron calculadas por el método de Kaplan-Meier y comparadas con la prueba de log-rank. **Resultados:** En el caso de *TLX1* se detectaron 2 pacientes con expresión alta y 9 pacientes con baja/negativa. Para *TLX3*, 3 pacientes presentaron expresión alta y 8 con baja/negativa. Ninguno de los pacientes con expresión alta del gen *TLX1* presentó recaída a 15 meses. La SLE en el grupo de pacientes con expresión baja o negativa, fue de 38.1%±17.2% ($p=0.188$). La SG a 21 meses fue de 44.4%±22.2% (p=0.302); en ningún caso hubo diferencia estadística significativa. Con respecto a la expresión de *TLX3*, el grupo de expresión alta de este gen, no presentó recaídas, mientras que el grupo de expresión baja/negativa, presentó una SLE a 15 meses de 37.5%±17.1% (p=0.169). En cuanto a la SG a 21 meses para el grupo de expresión alta fue de 50%±35.4%, en comparación con el grupo de expresión baja/negativa que tuvo una SG de 66.7%±19.2%, sin diferencia estadística significativa (p=0.964). **Discusión y Conclusiones:** La expresión alta de *TLX1* sugiere asociación con la SLE y SG, sin embargo, es importante considerar que el tamaño de la población de estudio es muy limitado, por lo que se debe incrementar. En el caso de *TLX3* los eventos de

muerte o recaída, no se relacionaron con la sobre-expresión del gen. Estos resultados representan un acercamiento a la relación que existe entre la expresión diferencial de los genes *TLX1* y *TLX3* y el riesgo de recaída en pacientes pediátricos mexicanos con LAL-T.

INTRODUCCIÓN

Leucemia Aguda Linfoblástica

La Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) es una enfermedad neoplásica caracterizada por la expansión clonal de células leucémicas en la medula ósea (MO), nódulos linfáticos, timo o bazo[1]. Representa el 30% de todos los tipos de cáncer infantil, por lo que se considera la patología más común en pacientes pediátricos. En general, la etiología de la enfermedad es prácticamente desconocida, pero se han asociado algunos factores al incremento en el riesgo de LAL, tales como:

- Exposición prenatal a altos niveles de rayos X.
- Exposición a ciertos químicos como benzeno y factores ambientales como la radiación ionizante.
- Algunos síndromes genéticos, sobre todo Síndorme de Down.
- Infecciones con virus de leucemia/linfoma de células T humano (HTLV-1) o virus de Epstein Barr (EBV) [2,3].

La LAL se considera una enfermedad genética debido a que la mayoría de los pacientes acumulan mutaciones en genes supresores de tumor y oncogenes, así como diversas alteraciones cromosómicas que contribuyen al desbalance de funciones celulares importantes como incremento en la proliferación, supervivencia prolongada y diferenciación alterada de progenitores hematopoyéticos linfoides[1].

A nivel molecular, la clonación y caracterización de translocaciones cromosómicas recurrentes en pacientes con LAL, ha permitido la identificación de genes críticos para el proceso leucémico. Además, la presencia de ciertas alteraciones puede tener implicaciones importantes en el pronóstico y en la estratificación de los pacientes que necesiten una terapia más agresiva. Mediante el análisis de expresión génica, se ha podido caracterizar a las leucemias con diferentes alteraciones y se ha consolidado la idea de que éstas pueden determinar un tipo específico de leucemia [4].

Leucemia Aguda Linfoblástica de Células T (LAL-T)

La LAL-T es un desorden neoplásico de timocitos, caracterizado por la presencia de un alto número de blastos en la médula ósea y sangre periférica, agrandamiento de nódulos linfáticos mediastinales y frecuentemente, involucro del sistema nervioso central [5].

Aproximadamente del 15% al 25% de los nuevos casos diagnosticados como LAL en niños y adultos, son clasificados como LAL-T, la cual se asocia con un mal pronóstico [6]. Comparado con las LAL de linaje de células B, que son las más comunes, las LAL-T son definidas por características clínicas y biológicas distintivas que generalmente son desfavorables, como cuentas altas de leucocitos, adenopatías, y como ya se mencionó, involucro del sistema nervioso central [7].

Hasta ahora, el conocimiento biológico de la LAL-T ha sido bastante limitado. El uso de la citometría de flujo ha permitido reconocer el estadio de diferenciación de las clonas leucémicas, que junto con la introducción de nuevas metodologías moleculares además del análisis citogenético, ha permitido el hallazgo de nuevas alteraciones características de los pacientes con LAL-T que se pueden asociar con el pronóstico de la enfermedad [8].

En LAL-T, la transformación leucémica de timocitos inmaduros, es causada por varios pasos que involucran una amplia variedad de eventos genéticos que afectan procesos celulares importantes como proliferación, diferenciación y supervivencia celular [9]. Estos eventos de transformación ocurren durante pasos cruciales del desarrollo de los timocitos, y la expresión de ciertos oncogenes ha sido vinculada al arresto en etapas particulares del desarrollo normal de los timocitos [7].

Desarrollo de linfocitos T

En humanos, las células T progenitoras comienzan a migrar desde los sitios iniciales de la hematopoyesis hacia timo, alrededor de la octava y novena semana de gestación (Fig.1). Cuando los timocitos en desarrollo se encuentran en el timo, expresan proteínas de superficie relacionadas con sus funciones efectoras finales; entre estas proteínas se encuentran las glucoproteínas CD4 y CD8, que son esenciales para la respuesta de las células T a las células que presentan los antígenos [10,11].

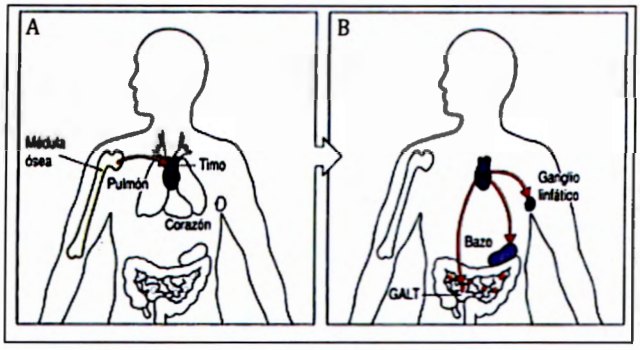

Figura 1. Migración de las células precursoras de los linfocitos T de la MO al timo. Los linfocitos T migran por la sangre desde la MO al timo (A), donde tiene lugar su desarrollo. Los linfocitos T maduros dejan el timo a través de la sangre e ingresan a los tejidos linfoides secundarios (B) y luego vuelven a la sangre por la linfa. En ausencia de activación por el antígeno específico, los linfocitos T maduros continúan recirculando entre la sangre, los tejidos linfoides secundarios y la linfa. **GALT**; tejido linfoide asociado con el intestino. Tomado y modificado de Parham, et al; 2006.

Las células progenitoras que llegan a la región subcapsular de la corteza externa del timo, carecen de CD4 y CD8, las cuales junto con el receptor de las células T (TCR) en la configuración de línea germinal, son características de los linfocitos T maduros. Al interaccionar con las células del estroma del timo, las células progenitoras son marcadas para proliferar. En el curso de una semana, las células T expresan CD2, que es una molécula de adherencia específica de las células T y aún no expresan ningún componente del complejo TCR ni los correceptores de las células T: CD4 y CD8 negativos ($CD4^-CD8^-$) y se denominan "timocitos doblemente negativos (DN)". Durante su maduración, los timocitos DN expresan primero la molécula de adherencia CD44, luego CD25 y al final interleucina 2 (IL-2). En su momento, la expresión de CD44 disminuye y comienzan los reordenamientos de los genes del TCR [10].

Los linfocitos T pueden presentar dos linajes que se diferencian por la expresión de un receptor T α:β o γ:δ. La diferenciación en uno u otro linaje ocurre hasta que los *loci* del TCR empiezan a reordenarse [10]. El TCR es un heterodímero transmembranal compuesto de dos cadenas: ya sea $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$ (Fig. 2). Los *loci* génicos que codifican para las cadenas α y δ (TCRA y TCRD) están agrupados en el cromosoma 14q11 y aquellos que codifican la cadena β (TCRB) y la cadena γ (TCRG) se localizan en 7q34 y 7p15, respectivamente. El locus genómico de la cadena β del receptor de células T, se reordena en primer lugar y contiene diversas agrupaciones de genes correspondientes a: segmentos génicos variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y una región constante (C), mientras que la cadena α no contiene el segmento D y se reordena en segundo lugar [10,12].

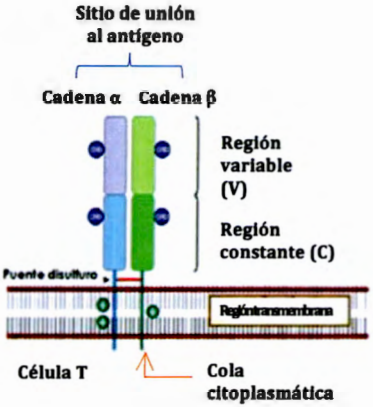

Figura 2. Receptor de células T. El TCR es un heterodímero compuesto por una cadena α de 40-50kDa y una cadena β de 35-46kDa. La porción extracelular de cada cadena consiste de dos dominios de tipo inmunoglobulina: el dominio más cercano a la membrana es una región C y el dominio más alejado es una región V. Tomado y modificado de Parham, et al; 2006.

Si hay un reordenamiento génico productivo de las cadenas γ y δ antes del reordenamiento del gen de la cadena β, se envían señales a la célula para que detenga el reordenamiento de la cadena β y se desarrolle como un linfocito T γδ (Fig. 3). El resultado más frecuente es que el gen de la cadena β se reordene antes de que pueda formarse un receptor funcional γδ y si este es exitoso, se forma un dímero pTα-TCRB (pre-TCR), el cual es necesario para lograr una transición eficiente hacia la siguiente etapa principal del desarrollo, cuando los timocitos expresan tanto CD4 como CD8 y adquieren el nombre de doble positivos (DP) [10]. El rearreglo del gen que codifica TCRα y γδ, tiene lugar durante la etapa de doble positivo. Conforme los timocitos maduran hacia células T, la expresión de TCR aumenta y las células pierden la expresión tanto de CD4 como de CD8 para convertirse en timocitos simples positivos (SP; $CD4^+$ o $CD8^+$). En esta etapa, los timocitos han adquirido el fenotipo de células T periféricas maduras y salen del timo (Figs. 3 y 4) [13,14].

Es importante mencionar que dentro del timo, las células T maduras sufren enormes presiones de selección, con el propósito de permitir solo la supervivencia de aquellas células cuyos TCR estén restringidos por moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) y que no sean autorreactivas. En la segunda fase del desarrollo de la célula T y una vez que un timocito en desarrollo expresa el receptor α:β, CD4 y CD8 en su superficie, sufre dos tipos de selección: positiva, llevada a cabo por las células epiteliales en la corteza del timo, y negativa, por células dendríticas y macrófagos. Dicha selección consiste en conservar aquellos timocitos que funcionen con las moléculas del CMH propias del individuo y que sirven para el reconocimiento de péptidos derivados de agentes patológicos [6,10].

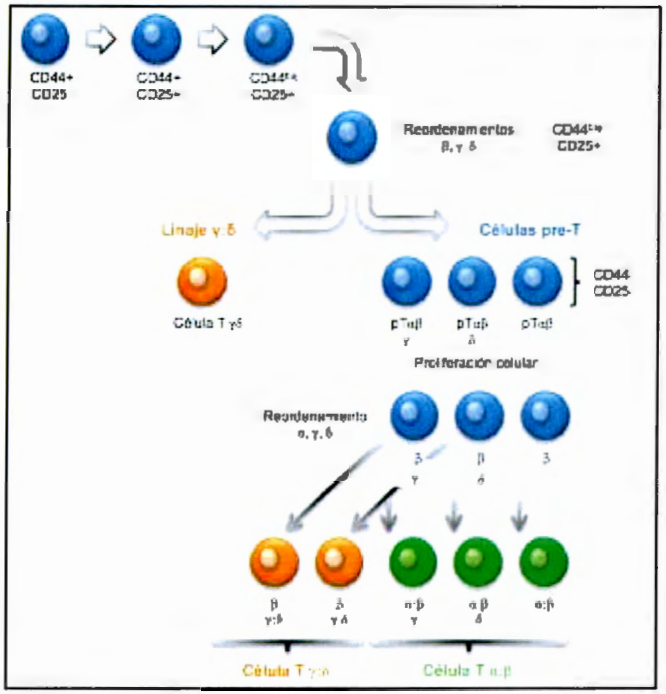

Figura 3. Reordenamiento de los receptores de células T. La diferenciación final en el linaje de células T α:β o γ:δ es resultado del orden en que tengan lugar los reordenamientos génicos exitosos. Las células progenitoras de los linfocitos T, expresan CD44 y CD25 y después comienzan los reordenamientos de los loci de las cadenas β, γ y δ. Si se reordena primero el gen de la cadena β, ésta se expresa en combinación con el pTα para formar el receptor de las células pre-T. La diferenciación en uno u otro linaje depende de que el receptor funcional de las células T que se produzca primero sea α:β o γ:δ. Tomado y modificado de Parham., et al 2006.

Alteraciones durante la diferenciación de las células T

Cada célula T tumoral tiene un equivalente normal y conserva propiedades de la célula a partir de la cual se desarrolló. En general, las LAL derivan de una célula progenitora linfoide y una minoría de estas recuerda a los linfocitos T inmaduros o timocitos, y como se mencionó anteriormente, se denominan LAL-T.

Durante el desarrollo de células T y como resultado de los reordenamientos de DNA que ocurren en este periodo, no es rara la aparición de tumores en estadios definidos del desarrollo, principalmente en etapas tempranas o tardías [10]. Se ha observado también, que durante el desarrollo de timocitos, existen pasos cruciales que pueden estar regulados por una gran variedad de genes que actúan como efectores para vías de señalización involucradas en el desarrollo y regulación hematopoyéticos, proliferación y apoptosis, entre los que se encuentran: *ABL1*, *NOTCH1*, *E2A*, *MYC*; cualquiera de estos puntos críticos durante el desarrollo de células T, puede ser blanco de eventos oncogénicos (Fig. 4) [10].

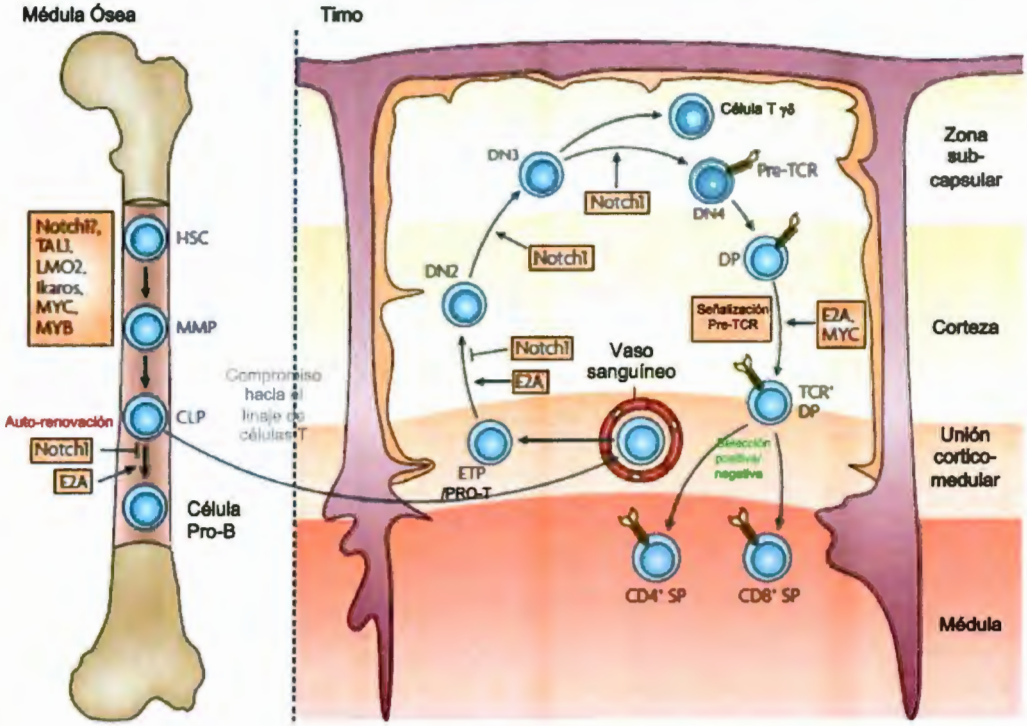

Figura 4. Estadios de hematopoyesis y desarrollo de células T y oncogenes relacionadaos a LAL-T. Los progenitores linfoides comunes (CLPs), entran en el timo y son capaces de diferenciarse en células B, T, NK o dendríticas. El compromiso hacia linaje T, se caracteriza por una regulación secuencial desde el estadio Doble Negativo (DN; $CD4^-CD8^-$), pasando por rearreglos de genes que permiten la formación y expresión del pre-TCR, hasta el estadio doble dositivo (DP; $CD4^+CD8^+$), en el cual las células están sujetas a presiones de selección negativa y positiva. Las células entonces, dejan el timo como simple positivas (SP; $CD4^+$ o $CD8^+$). En la figura se observan algunos oncogenes cuya desregulación, se puede asociar con el desarrollo de LAL-T y que son requeridos por medula ósea y timo en los diferentes estadios de diferenciación, desde la forma de progenitor multipotencial (MPPs) hasta la célula T madura (SP) que abandona el timo. Tomado y Modificado de Aifantis., et al 2008.

Esquemas de Clasificación de LAL-T

La LAL-T es un grupo heterogéneo con respecto a inmunofenotipo, características clínicas y respuesta al tratamiento, así como en cuanto a perfiles citogenéticos y moleculares.

Todos los esquemas de clasificación de LAL-T están basados en una comparación con el desarrollo normal de timocitos. En la práctica clínica, el sistema de clasificación del Grupo Europeo para la caracterización inmunológica de Leucemias (EGIL, por sus siglas en inglés), es la más utilizada.

Inmunofenotipo: Clasificación EGIL

De acuerdo a la clasificación EGIL, la presencia de la expresión citoplasmática o en membrana de los marcadores CD1a, CD2, CD3, Cd4, CD5, Cd7 y CD8 define la LAL-T [6,13]. Se han propuesto cuatro subgrupos:

- (TI) El subgrupo inmaduro o pro-T-ALL, es definido por la expresión de CD7
- (TII) Pre-T-ALL, expresa CD2 y/o CD5 y/o CD8
- (TIII) T-ALL cortical, positivo para CD1a
- (TIV) T-ALL maduro, presencia de CD3 en superficie y CD1a negativo

Dependiendo de la expresión en membrana de los TCR αβ o γδ, las cuales son mutuamente excluyentes, se divide en subgrupos a y b.

Existen clasificaciones basadas en los rearreglos encontrados en TCR, sin embargo, esta clasificación no es utilizada en la práctica clínica [6]. Recientemente, se han propuesto otros esquemas de clasificación, que reflejan mejor el desarrollo normal de los linfocitos T inmaduros, en los que se utiliza la expresión del gen del receptor alfa (α) de la célula pre-T (pTα), la cadena citoplasmática TCRβ y los rearreglos de los loci TCR. Esta clasificación se denomina inmadura (IM) y tampoco es muy utilizada en la práctica clínica [13].

Alteraciones genéticas en la patogénesis de LAL-T

Existen anormalidades cromosómicas específicas asociadas a diferentes tipos de leucemia, las cuales juegan un papel crucial en el desarrollo de la enfermedad. Las alteraciones encontradas en LAL (translocaciones, deleciones e inversiones), son de primordial importancia en la aparición de la leucemia como resultado de dos mecanismos principales:

- Activación de un proto-oncogén producido por la yuxtaposición con un receptor de células T o un gen de inmunoglobulina, lo que origina una desregulación y expresión génica aberrante.
- Rompimiento intragénico seguido por una translocación, que forma genes fusionados que codifican para una proteína quimérica con funciones diferentes [15].

Como resultado del análisis *in vitro e in vivo* de algunos genes desregulados y clonados a partir de casos de LAL-T, se confirmaron sus propiedades oncogénicas y ayudaron a conocer mejor su contribución específica en el desarrollo de LAL-T. La combinación de datos genéticos y funcionales, sugiere que se requiere la alteración de al menos cuatro vías antes de que los timocitos lleguen a ser totalmente malignos, dichas vías se pueden asociar con cuatro diferentes clases de mutaciones: (I) mutaciones que afectan el ciclo celular; (II) mutaciones que afectan la diferenciación; (III) mutaciones que proveen alguna ventaja proliferativa y de supervivencia y (IV) mutaciones que dan capacidad de auto-renovación (Fig. 5) [5].

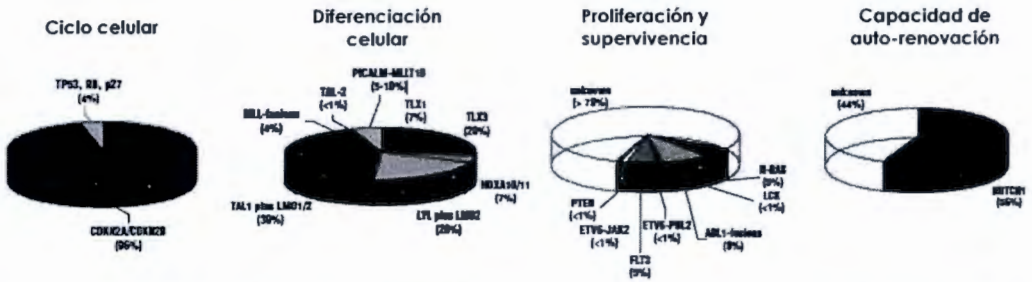

Figura 5. Frecuencia de las mutaciones observadas en LAL-T. El análisis molecular de LAL-T, muestra cuatro principales clases de mutaciones involucradas en su patogénesis. Tomado y modificado de De Keersmaecker K, et al., 2005.

Alteraciones cromosómicas

Mediante análisis citogenético se ha observado que el 50% de los cariotipos de casos con LAL-T presentan anormalidades cromosómicas [7].

Las translocaciones cromosómicas que ocurren frecuentemente en LAL-T, involucran la yuxtaposición con promotores fuertes y elementos potenciadores de los genes de receptores de células T (*TCR*) en el cromosoma 7 (*TCRB* y *TCRG*) y en el cromosoma 14 (*TCRA* y *TCRD*), con genes para factores de transcripción, como *TAL1*(SCL) (Leucemia Linfoblástica 1 de células T), *LYL 1* (secuencia 1 derivada de leucemia linfoblástica), *HOX11* y *HOX11L2* (ambos genes homeobox; también conocidos como *TLX1* y *TLX3*)(Tabla 1). Estas translocaciones cromosómicas pueden ocurrir durante el desarrollo de timocitos, como resultado de recombinación ilegitima de TCR, lo que produciría una expresión génica aberrante dando lugar a células T con anormalidades en el control del ciclo celular, proliferación y diferenciación. Aunque algunos de estos genes se expresan de manera

normal en timocitos y son reguladores esenciales de la ontogenia de células T, en general, no se expresan en el timo normal adulto pero si de forma ectópica en LAL-T [7].

Se han observado translocaciones que generan genes de fusión y que codifican para nuevas proteínas quiméricas con propiedades oncogénicas, como lo son las parejas de genes de fusión: *SIL*(locus de interrupción de SCL)–*TAL1* y *MLL* (leucemia de linaje mixto)(Tabla 1)[7].

Tabla 1. Alteraciones genéticas en LAL-T (

Alteraciones genéticas	Frecuencia	Oncogenes involucrados
Translocaciones con genes TCR en cromosomas 7q34 (TCRB y TCRG), 14q11(TCRA y TCRD) y otros genes	35%	*HOX11, HOX11L2, TAL1, TAL2, LYL1, BHLHB1, LMO1, LMO2, LCK, NOTCH1,* Ciclina D2.
Genes fusionados	10%	Fusión *CALM-AF10*
	9-30%	Fusión *SIL-TAL1*
	4-8%	Fusiones *MLL*
	6%	Fusiones *ABL1*
	Raro	Fusiones *NUP98*
Deleciones en 9p21 y 6q	>65% (9p21)	p15, p16
	20-30% (6q)	Desconocido
Mutaciones	50-60%	*NOTCH1, FLT3, NRAS*
Duplicaciones génicas	~30% en líneas celulares de LAL-T	*MYB*

Aifantis I, et al., 2005.

Las deleciones crípticas en 6q y 9p21 son frecuentes (Tabla 1). La deleción de la región 9p21, provoca la pérdida de los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*, siendo esta última la alteración genética más común en LAL-T. *CDKN2A* codifica para dos proteínas inhibidoras de cinasa dependientes de ciclina: p16 y p14, las cuales son importantes en la regulación del ciclo celular. Las deleciones en 9p pueden variar en tamaño y en algunas ocasiones cubren grandes regiones genómicas. Un alto porcentaje de pacientes con LAL-T, pueden presentar además, deleciones de genes contiguos como CDKN2B, que codifica para la proteína p15 [5,7].

Investigaciones recientes han demostrado que más del 50% de los casos con LAL-T, presentan mutaciones en NOTCH1 (Tabla 1), que además de ser un regulador clave en el destino hacia el linaje de células T, provee un mecanismo homeostático importante para la diferenciación de timocitos DN y para la diferenciación hacia TCRαβ [7].

Existen otros reguladores transcripcionales que participan en puntos clave del desarrollo de timocitos, que al estar alterados pueden provocar el desarrollo de LAL-T. Entre los reguladores del desarrollo encontramos a las proteínas E: HEB y E2A, las cuales pertenecen a la familia de receptores Notch y Homeobox respectivamente. Las proteínas Homeobox son muy importantes en la ontogenia de las células T, así como en el proceso leucémico de las LAL-T [6].

Desregulación de genes Homeobox

Los genes homeobox son reguladores clave en el desarrollo embrionario, que están involucrados en el modelado axial, morfogenésis y diferenciación celular. También participan en el mantenimiento de la homeostasis tisular, influenciando la auto-renovación y diferenciación de las células troncales y sus progenitores [6].

Todos los genes homeobox comparten un motivo de 61 aminoácidos: el homeodominio, un dominio de unión al DNA, que regula la transcripción de genes blanco [6]. Varios estudios han demostrado que los factores de transcripción con homeodominio, regulan múltiples funciones celulares incluyendo: crecimiento celular, proliferación, apoptosis, comunicación entre células, adhesión y migración celular [16]. Por lo tanto, no es de sorprender, que la expresión aberrante de estos genes sea capaz de intervenir de manera directa en los programas de desarrollo celular y contribuir así a la aparición de una neoplasia [6].

Existen dos clases de genes homeobox:

Clase I. *HOX A, B, C y D*: Comprende 39 genes distribuidos en 4 clusters HOX (A, B, C, D), localizados en 7p15, 17q21, 12q13 y 2q31 respectivamente. Durante el desarrollo embrionario de mamíferos, la agrupación de estos clusters, muestra patrones de expresión característicos dependiendo del estadio de desarrollo en que se encuentren, y determinan la forma y la identidad de los elementos de las extremidades del esqueleto [17]. Algunos genes HOX de los clusters A, B y C participan en la hematopoyesis normal, dirigiendo la renovación de células troncales y en el compromiso del linaje [6].

- HOXA (A7, A9, A10, A11) – Expresión en estadios tempranos del desarrollo de células T
- HOXB3 – Expresión en progenitores inmaduros y probable participación en la elección del linaje αβ vs γδ en células pro-T
- HOXC4 – Expresión en todos los estadios del desarrollo de células T

Clase II. TLX1, TLX3: Se encuentran dispersos en todo el genoma y codifican cofactores para proteínas HOX. Su patrón de expresión es más restrictivo y están implicados en organogénesis y en la diferenciación de tipos celulares específicos [6].

TLX1 (HOX11)

TLX1 no se expresa de manera normal en tejidos adultos durante el desarrollo de células T, pero está involucrado en el desarrollo del bazo y participa en ciertas decisiones del destino celular neuronal [9]. Sin embargo, se ha observado que alrededor del 7% de las muestras de LAL-T infantil pueden mostrar expresión de *TLX1* en timocitos [18].

Alrededor del 30% de LAL-T en adultos y aproximadamente el 8% de LAL-T infantil, se asocian con translocaciones cromosómicas que involucran a *TLX1* (10q24)[4,16].

Las translocaciones t(10;14)(q24;q11) y t(7;10)(q34;q24) son las más frecuentes y resultan en la yuxtaposición del gen *TLX1* con los elementos promotores de TCRA y B respectivamente, lo que provoca que el producto proteico se sobre-exprese. En algunas ocasiones, *TLX1* se puede encontrar activo en LAL-T, aún en ausencia de algún rearreglo genético; se han propuesto mecanismos alternativos de activación, como la desmetilación de su promotor o mecanismos de trans-activación, que pueden ser responsables de la expresión aberrante de este gen [9].

<u>Mecanismo de acción de *TLX1*</u>

Se sugiere que *TLX1* modula la red transcripcional de G1/S por su interacción con las subunidades catalíticas de las proteínas fosfatasas serina/treonina PP2A (Fosfoproteína fosfatasa 2A) y PP1 (Fosfoproteína fosfatasa 1), las cuales son enzimas de amplia especificidad y participan en funciones celulares que incluyen la regulación de enzimas metabólicas y de proteínas involucradas en la transducción de señales [6,19].

Papel pronóstico de *TLX1*

Este tipo de leucemias muestra fenotipo cortical temprano y respuesta favorable comparada con otras clases de LAL-T [6]. Existen numerosos reportes donde se relaciona la sobre-expresión de *TLX1* con buen pronóstico [18,20–24]. Por otro lado, en un subgrupo heterogéneo de pacientes con LAL-T se observó, que la baja expresión de *TLX1* no tenía implicaciones en el pronóstico [25].

La respuesta favorable que se asocia con la sobre-expresión de *TLX1*, puede ser explicada por algunas de las características que presentan los linfoblastos con esta alteración, que incluyen, la expresión de genes asociados con el incremento de la actividad proliferativa y la falta de expresión de BCL2 junto con otros genes anti-apoptóticos asociados con el estadio de diferenciación cortical [6,9,20].

***TLX3* (*HOX11L2*)**

Aproximadamente el 20% de LAL-T infantil y 13% de adultos está caracterizado por la expresión ectópica de *TLX3* [6,26]. Así como *TLX1*, *TLX3* no se expresa durante el desarrollo normal de células T. En la mayoría de los casos, la sobre-expresión de *TLX3* es causada por la translocación t(5;14)(q35;q32) que posiciona al gen *TLX3* con la región distal de *BCL11B*, un gen con alta expresión durante la diferenciación de células T. Otras alteraciones cromosómicas que involucran a *TLX3* son:

- t(5;14)que involucra a *NKX2-5* (gen homeobox), en lugar de *TLX3*
- t(5;7)(q35;q21) involucra a *TLX3* y *CDK6*
- t(5;14)(q35;q11) yuxtaposición de *TLX3* con *TCRA/D* [8]

Mecanismo de acción de *TLX3*

TLX3 es un gen involucrado en desarrollo, funciona como regulador transcripcional, relacionado muy cercanamente a *TLX1*, es muy importante para el desarrollo del centro respiratorio medular ventral, y su deficiencia en ratones 'knockout' resulta en un síndrome que asemeja a la hipoventilación central congénita [27].

Papel pronóstico de *TLX3*

En algunos estudios se ha observado que la sobre-expresión de *TLX3* se relaciona con mal pronóstico, sin embargo, esto se ha visto asociado también a los diferentes protocolos de tratamiento utilizados y a la presencia de alteraciones genéticas adicionales, por lo que no se puede asegurar una relación directa [9,18,28]. Para determinar con exactitud el significado pronóstico de la sobre-expresión de *TLX3*, solo o en combinación con otros marcadores genéticos, es necesario realizar estudios con un seguimiento mas prolongado.

Estudios de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* en pacientes con LAL-T

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) es una metodología muy utilizada actualmente y se ha convertido en la elección para la detección de cambios en los niveles de expresión de un gran número de genes, por lo cual constituye una herramienta molecular importante en el área de la salud [29,30].

La qPCR es una combinación de tres pasos: (I) la transcripción reversa que convierte RNA a cDNA, (II) la amplificación, utilizando PCR y (III) la detección y cuantificación simultánea de los productos amplificados en tiempo real. Esta metodología, parte de una PCR convencional en la que el equipo de amplificación (termociclador) lleva incorporado un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro) y basa su tecnología en la utilización de moléculas reporteras específicas denominadas fluoróforos y moléculas que inhiben la fluorescencia, conocidas como "quenchers". Ambos reporteros, nos van a permitir monitorizar en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo de reacción, durante cada ciclo de amplificación por lo que se sustituyen los pasos de amplificación, electroforesis y análisis de imagen de una PCR tradicional. El ensayo por lo tanto, se basa en la medición del aumento de la señal fluorescente, que es proporcional a la cantidad de producto producido durante cada ciclo de PCR [30].

Existen numerosos estudios en los que mediante la tecnología de qPCR se han derivado resultados importantes de análisis de expresión de genes relevantes para cáncer; ejemplo de ello, son los estudios realizados con los genes *TLX1* y *TLX3* cuyos niveles de expresión se han visto relacionados con la respuesta al tratamiento en pacientes diagnosticados con LAL-T (Tabla 2) [18,20–27,31,32].

Tabla 2. Análisis de expresión diferencial y citogenético de los genes *TLX1* y *TLX3* en pacientes con LAL-T.

Gen	Población de estudio	Análisis de expresión*	Análisis Citogenético	Supervivencia	Asociación a factores de riesgo convencionales	Ref.
TLX1	59 niños y adultos jóvenes al Dx tratados de acuerdo a TN	↑ expresión (8/59)	4/8 casos con ↑ TLX1: t(10;14)(q24;q11.2) [2] t(7;10)(q35;q24) [1] del(10)(q24q26) [1]	**Px favorable**, SG a 5 años = 100% *p=0.02*	Indefinido	20
TLX3		↑ expresión (6/59)	No evaluado	**Px adverso**, SG a 5 años = 30%	Indefinido	20
TLX3	15 niños y 8 adultos tratados con protocolos terapéuticos EORTC	↑ expresión (9/15 niños y 0/8 adultos)	3/9 casos con ↑ TLX1 con: ↑ t(5;14)(q35;q32)	Sin implicación en el pronóstico	No	27
TLX1	28 niños tratados con protocolo FRALLE-93	↑ expresión (3/28)	1/3 casos con ↑ TLX1 con: add(22q13)	No evaluada	No	26
TLX3		↑ expresión (6/28)	3/6 casos con ↑ TLX3 con: t(5;14)(q35;q32) [2] 46,XX,add(5q34)/del(9p21-22) [1]	**Px adverso**; SLE=0%	No	26
TLX1	76 niños tratados de acuerdo a los protocolos CCG 1882, 1961, 1901, 1922, 1952, 1953	↑ expresión 37/76: 19.7% [15]alta expresión 28.9% [22] baja expresión	16/76 casos con ↑ TLX1 con: pseudodiploídia [5] hiperdiploídia [5] hipodiploídia [1] 10q24 alterado [2] alteraciones en TCR [4] 9p alterado [2] del(6p) [1]	**Px favorable;** Con CCG-1901: SLE a 7 años=100%, *p=0.01* SG *p=0.03*	No	21
TLX1	127 niños al Dx, tratados de acuerdo al protocolo EORTC	↑ expresión (9/127)	Negativo en casos con ↑ TLX1	**Px favorable**, SG= 100%; SLE a 3 años = 83.3%	No	18
TLX3		↑ expresión (34/127)	21/34 casos con ↑ TLX3 con cariotipo anormal: 16/34 casos con ↑ TLX3 presentaron t(5;14)	Sin implicación en el pronóstico	No	18
TLX1	52 adultos al Dx, tratados con protocolos ECOG y CALGB	↑ expresión (16/52)	2/16 casos con ↑ TLX1 con: t(10;14)(q24;q11)	**Px favorable;** SG a 4.7 años = 88%; *p=0.019*	No	22
TLX1	40 niños tratados con protocolos BFM con modificaciones	↑ expresión (10/40): 7.5% alta expresión	Ninguno presentó t(7;10) o t(10;14)	Sin implicación en el pronóstico	No	25
TLX3		↑ expresión (7/40)	No evaluado	**Px favorable**; SLE a 5 años=100% *p=0.04*	No	25

TLX1	72 niños tratados con protocolo DCOG ALL y 53 con el protocolo COALL-97	↑ expresión (6/72 en protocolo DCOG; no evaluado en protocolo COALL-97)	3/6 casos con ↑ TLX1 con: t(10;14)(q24;q11)[2] t(7;10)(q35;q24) [1]	Sin implicación en el pronóstico	No	31
TLX3		↑ expresión (17/72 protocolo DCOG; 7/53 protocolo COALL-97)	Negativo	**Px adverso** solo en grupo COALL-97; *p=0.014;* Y en cohortes combinadas DCOG ALL – COALL 97; *p=0.01*	No	31
TLX1	171 adultos y 93 niños tratados con protocolo LALA-94 y GRAALL-2003	↑ expresión (92/264): 13.25% [35] alta expresión 21.59% [57] baja expresión	31/35 con expresión alta de TLX1 presentaron diversas alteraciones cromosómicas y de ellos, 11 tuvieron 10q24 alterado	**Px favorable** para el grupo de alta expresión; SG a 3.5 años =64%, SLE a 2 años=54%	No	23
TLX1	92 niños tratados con protocolo FRALLE-93 -	↑ expresión (3/92)	Negativo	**Px favorable**; SG=100% SLE=100%	No	32
TLX3		↑expresión (20/92)	12/20 casos con ↑ TLX3 con: 5q+, monosomía 5 y/o del (5q) [4] Translocación en 5q35 [8]	**Px adverso**; SG=45±11% a 7.9 años *p=0.049*	No	32
TLX1	286 adultos tratados con protocolo GMALL	↑ expresión (118/286): 21% expresión alta 20% expresión baja	No evaluado	**Pronóstico favorable**; SG a 2 años: expresión alta = 76%; expresión baja = 45% *p=0.012* SLE a 2 años: expresión alta = 73%; expresión baja = 41% *p=0.0072*	No	24
TLX3		↑ expresión (27/286)		**Pronóstico adverso**; SG a 2 años = 47% *p=0.07*; SLE a 2 años = 23% *p=0.028*	No	24

* Estudios realizados mediante la metodología de qPCR; **[ ]** Número de pacientes con la alteración; **Dx.** Diagnóstico; ↑ sobre-expresión; **Px.** Pronóstico; **SG.** Supervivencia Global; **SLE.** Supervivencia Libre de Evento; **TN** estudios de terapia total XI-XII del Hospital de Investigación para niños San Judas; **EORTC.** Organización Europea para la Investigación y el Tratamiento de Cáncer; **CCLG.** Grupo de Cáncer y Leucemia en niños; **FRALLE-93.** Grupo Francés de Estudio en Leucemia Linfoblástica Aguda ; **ECOG.** Grupo Cooperativo Oriental de Oncología; **CALGB.** Grupo B de Cáncer y Leucemia; **BFM.** Protocolo Berlin-Frankfurt-Münster; **DCOG.** Grupo Oncológico de Niños Alemanes; **COALL-97.** Grupo de Estudio Cooperativo Alemán para Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil-97; **LALA-94.** Grupo Francés-Belga para la Leucemia Linfoblástica Aguda en Adultos-94; **GRAALL-2003.** Grupo para la Investigación en Leucemia Linfoblástica Aguda en Adultos; **GMALL.** Multicentro Alemán de Leucemia Aguda Linfoblástica.

Diversos grupos han utilizado la metodología de microarreglos de DNA para determinar el perfil de expresión de LAL-T [14,15]. Se han introducido diversas marcas moleculares indicativas de arresto leucémico en estadios específicos del desarrollo normal de timocitos: LYL1+ es indicativo de estadios más inmaduros (DN); *TLX1* (*HOX11*)+ y *TAL1*+, indicativo de CD3- y CD3+ respectivamente; *TLX3*+(*HOX11L2*+) y *MLL*+, el cual ha sido asociado con LAL-T δ [15,16]. En otro estudio realizado por Soulier y colaboradores, se muestra que el grupo completo de genes HOXA se encuentra desregulado en LAL-T, junto con rearreglos en *MLL* y fusión de transcritos *CALM-AF10*[14]. Es evidente que la expresión anormal de genes reguladores de desarrollo, sobre todo factores de transcripción, es muy importante en la oncogénesis de la mayoría de las LAL-T.

JUSTIFICACIÓN

La LAL-T se considera una leucemia de alto riesgo y con mal pronóstico, por lo que resulta indispensable diseñar una estrategia que permita identificar factores relacionados con recaída. Hasta el momento no existe en nuestra población un estudio molecular a partir del cual se hayan obtenido marcadores con valor predictivo de riesgo, que se relacionen con el curso de la enfermedad.

Tomando en cuenta estudios previos de análisis de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3*, en donde se observa relación con el pronóstico de la enfermedad [18,20–27,31,32], se decidió estudiar en un grupo de pacientes, estos mismos genes como marcadores de riesgo y relacionarlos con la respuesta al tratamiento y recaída.

Los hallazgos moleculares obtenidos a partir de este estudio, permitirán hacer una asociación entre el perfil de expresión génica y su valor predictivo de recaída, que puede ser independiente o relacionada a los parámetros convencionales de evaluación de riesgo en pacientes pediátricos con LAL-T. Además, contribuirá al establecimiento de una metodología para valorar el pronóstico del paciente al momento del diagnóstico de la enfermedad.

A futuro, este estudio podría utilizarse para realizar una clasificación de los pacientes en diferentes grupos de riesgo. Esto permitirá ofrecer un tratamiento racionalizado, mejorará las tasas de supervivencia global, y a su vez, disminuirá los efectos adversos.

HIPÓTESIS

La sobre-expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* se relaciona con la respuesta al tratamiento de los pacientes con LAL-T.

OBJETIVOS

Objetivo General

- Determinar mediante PCR en tiempo real, el perfil de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* y estimar su valor como marcador pronóstico de recaída en pacientes con LAL-T.

Objetivos particulares

- Relacionar la expresión diferencial de los genes *TLX1* y *TLX3* con el valor pronóstico de recaída.
- Establecer si existe asociación entre la expresión diferencial de *TLX1* y *TLX3* y los parámetros convencionales de riesgo.
- Plantear una estrategia de evaluación en pacientes diagnosticados con LAL-T, basada en los resultados de expresión obtenidos en este estudio.

METODOLOGÍA

Población de estudio

- **Población objetivo:** Pacientes pediátricos con diagnóstico de LAL-T que acudieron a los servicios de hematología/oncología del Instituto Nacional de Pediatría y del Hospital del niño Poblano.

- **Población control:**

a) Pacientes pediátricos con diagnóstico de LAL-B que acudieron al servicio de hematología/oncología del Instituto Nacional de Pediatría.

b) Individuos sanos

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de LAL-T o LAL-B, basado en criterios clínicos, citomorfológicos e inmunológicos
- Sin tratamiento previo
- Que acepten participar en el estudio

Criterios de exclusión:

- Pacientes que no cuenten con el material suficiente (RNA) para llevar a cabo el estudio.
- Pacientes que posteriormente se diagnostiquen con una enfermedad distinta a LAL-T o LAL-B, según sea el caso.

Diseño Experimental

De cada uno de los pacientes e individuos sanos, se obtuvieron de 3-5 ml de medula ósea o sangre periférica con anticoagulante; las muestras se separaron y se obtuvo el paquete de células blancas por un gradiente de densidad Ficoll-Hypaque.

Se realizó conteo celular mediante cámara de Neubauer y las células se congelaron a -80°C en 1ml de buffer de lisis por cada 5-10 x 10^6 células, para la posterior extracción de RNA.

Extracción de RNA: Se descongelaron las muestras, se agregaron 200µl de cloroformo y se agitaron en vortex durante 15seg, la muestra se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 11000 rpm/15 min a 4°C, se retiró la fase acuosa y se agregaron 500µl de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se incubó a -80°C/1hr o 4°C/24hrs. Se centrifugó a 11000 rpm/30 min y se quitó sobrenadante; se agregó 1ml de etanol frio al 75% y se resuspendió por inversión. Se centrifugó a 10000 rpm/10 min a 4°C, se retiró sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente 5-10 min; el botón de RNA, se disolvió en 50 µl de agua libre de RNAsas.

Cuantificación e Integridad: El RNA se cuantificó (ng/µl) en un espectrofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) y la pureza fue evaluada mediante la relación 260nm/280nm: se utilizaron las muestras con una pureza ≥1.8.

La integridad del RNA fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1x, teñido con bromuro de etidio (Fig. 6).

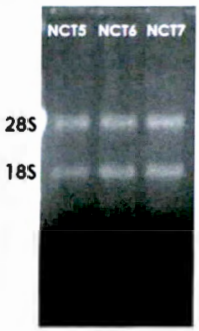

Figura 6. Gel de agarosa al 1% para integridad de RNA.

Síntesis de cDNA: La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1µg de RNA y se utilizó el kit "Transcriptor First Strand cDNA Synthesis" de Roche.

PCR GAPDH: Para conocer la calidad de cDNA y llevar a cabo posteriormente la reacción de qPCR, se realizó una reacción de PCR para GAPDH (Figura 7, banda de 320pb) a partir de 2µl de cDNA. Para cada reacción de 25µl, se utilizaron: 2.5µl de Buffer 10x, 1.5µl de $MgCl_2$ (50mM), 0.5µl de primers (10mM), 0.5µl de dNTPs (10mM) y 0.2µl de Taq DNA pol I (10u/µl). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf) con las siguientes condiciones:

Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% en buffer TBE 1x, teñido con Bromuro de etidio (Fig. 7).

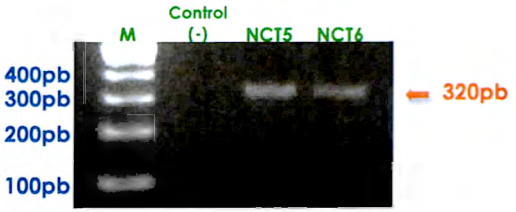

Figura 7. Gel de agarosa al 2% para GAPDH (320pb).

PCR en tiempo real

La detección de la expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* se llevó a cabo por la metodología de PCR en tiempo real (qPCR), utilizando el kit "LightCycler TaqMan Master" (Roche) con el equipo LightCycler 2.0 (Roche).

Los oligonucléotidos y sondas, se obtuvieron a partir del programa "ProbeFinder" versión 2.44 de Roche (Fig. 8):

TLX1

F: 5'- AGAACCGGCGGACAAAGT-3'
R: 5'- GCAACTGCAGGAGGATGC-3'
Sonda #34

ccttggcggtctcaatttc ggatggag cgaagcactttctggcgaa
cggtctccagccttggcggtctcaatttcccctggatggagagcagccgccgcttcgtgaaagaccgcttcacagcggcg
429 508
360

TLX3

F: 5'- CCTTGGCGGTCTCAATTTC-3'
R: 5'- AAGCGGTCTTTCACGAAGC -3'
Sonda #58

agaaccggcggacaaagt agaggcag cgtaggaggacgtcaacg
acctggttccagaaccggcggacaaagtggagacggcagactgcggaggaacgggaggccgagaggcagcaagcgaaccgcatcctcctgcagttgcagcaggaggc
1757 1863
2312

ABL

F: 5'- CAGAGAAGGTCTATGAACTCATGC-3'
R: 5'- GGTGGATTTCAGCAAAGGAG - 3'
Sonda #86

cagagaaggtctatgaactcatgc gcagtgga gaggaaacgactttaggtgg
gaaggctgcccagagaaggtctatgaactcatgcgagcatgttggcagtggaatccctctgaccggccctcctttgctgaaatccaccaagcctttga
1880 1977
1498

Figura 8. En el esquema se muestran los oligonúcleotidos y sondas utilizadas para cada uno de los genes evaluados por qPCR. En los círculos en color, se muestra la posición de la sonda dentro de la región de amplificación empleada en cada gen.

Las reacciones fueron realizadas en capilares independientes y por duplicado. Para un volumen final de reacción de 10µl, se utilizaron: 2µl de Master Mix, 0.2µl de primers (10mM), 0.1µl de sonda (10mM) y 2µl de cDNA de cada una de las muestras.

Para realizar los ensayos de cuantificación se utilizaron controles positivos de expresión para cada uno de los genes que se analizaron, en el caso de *TLX1* se utilizó la línea celular SIL [33] y para *TLX3*, la línea celular HPB [34], así mismo, cada experimento incluyó controles negativos.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

Análisis	Ciclos		Temperatura	Tiempo
		Preincubación		
Ninguno	1		95°C	10 min
		Amplificación		
		Desnaturalización	95°C	10s
Cuantificación	45	Alineamiento	55°C	30s
		Extensión	72°C	1s
		Enfriamiento		
Ninguno	1		4°C	30s

Análisis de resultados

La qPCR se basa en la medición del aumento de señal fluorescente, la cual es proporcional a la cantidad de producto obtenido durante cada ciclo de PCR. Se utilizan sondas tipo TaqMan, que se caracterizan por tener secuencias específicas de oligonucleótidos (sonda), a los cuales se une un fluoróforo al extremo 5' (tradicionalmente FAM) y un "quencher" al extremo 3' (tradicionalmente TAMRA). Cuando la Taq polimerasa empieza a amplificar a partir de uno de los primers específicos unido al DNA blanco, desplaza el extremo 5' de la sonda que es degradado por la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq polimerasa. Este proceso libera al fluoróforo y lo separa del "quencher", lo que ocasiona un aumento irreversible de la fluorescencia detectada (Fig. 9)[35].

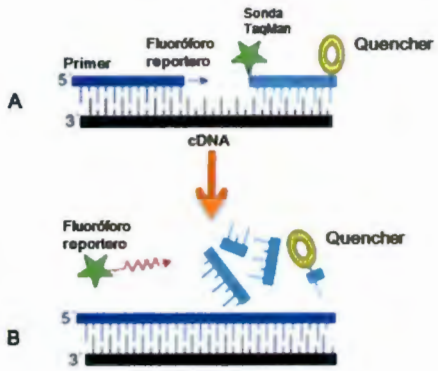

Figura 9. Mecanismo de acción de las Sondas de detección TaqMan. A) El primer y la sonda TaqMan se alinean a la hebra de DNA complementaria tras la desnaturalización. B) Durante la fase de extensión, la actividad exonucleasa 5' de la Taq polimerasa, degrada la sonda, lo cual provoca la separación del reportero y el quencher dando lugar a la detección de fluorescencia. Tomada y modificada de Arya et al., 2005.

Para analizar los resultados obtenidos por qPCR se empleó el método de cuantificación relativa, en el cual se utilizan fórmulas aritméticas para calcular los niveles de expresión de un gen blanco con respecto a un gen de referencia de expresión constitutiva, que en nuestro caso fue el gen *ABL*; este gen se eligió porque se ha demostrado que sus niveles de expresión no difieren entre tejidos y tipos de leucemia, por lo cual se ha empleado en un gran número de estudios de expresión en LAL-T [23,24,32,36,37].

Los niveles de expresión de *ABL* fueron utilizados como control endógeno de reacción y para normalizar la expresión del gen blanco. En la normalización, la cantidad del gen blanco (*TLX1/TLX3*) en cada muestra, es dividida entre la cantidad del gen de referencia (*ABL*), corrigiendo así las diferencias cualitativas y cuantitativas causadas por:

- Las variaciones en la cantidad de muestra inicial
- Posible degradación del RNA
- Las variaciones en la carga de muestra o errores de pipeteo
- Las variaciones en la eficiencia de la síntesis de cDNA

Por lo tanto, la amplificación de secuencias de genes de mantenimiento tiene dos objetivos principales: determinar la disponibilidad del RNA relativamente intacto (cDNA) en la muestra y normalizar la cuantificación del transcrito blanco [37].

Durante el curso de la reacción, los niveles de expresión de los genes blanco y de referencia son detectados por un programa de computadora que calcula la degradación de la fluorescencia, y construye una gráfica de amplificación que contiene la información necesaria para la cuantificación del producto (Fig. 10); las reacciones individuales se caracterizan por el ciclo de amplificación en el que la fluorescencia se eleva por encima de un umbral definido o fluorescencia de fondo, parámetro conocido como ciclo umbral (Ct) o punto de cruce (Cp) así, entre mayor sea la cantidad de moléculas blanco en la muestra, menor será el Ct [30,38].

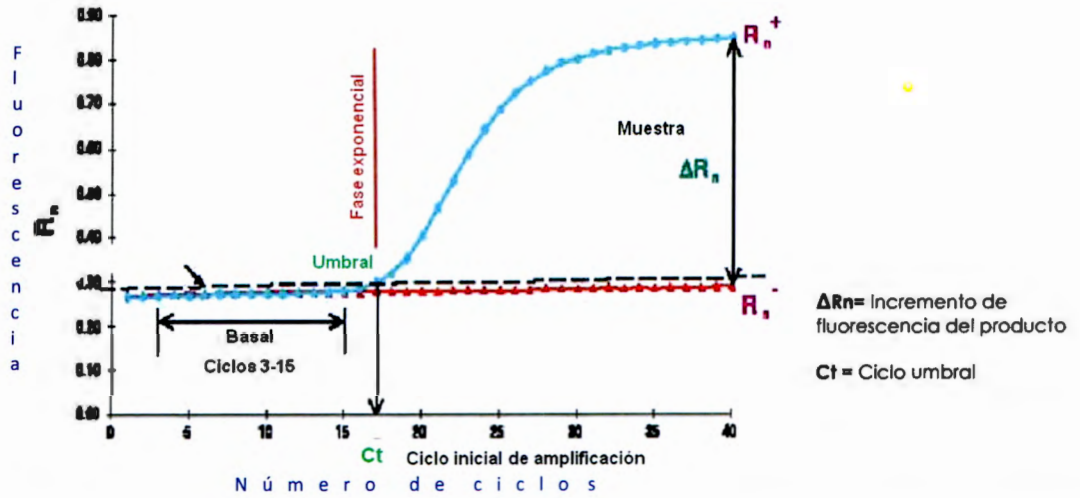

Figura 10. Gráfica de amplificación de PCR en tiempo real. En el eje vertical se representa la cantidad de fluorescencia y en el eje horizontal el número de ciclos. La línea basal, se refiere a los ciclos iniciales en los que no hay cambios detectables en la cantidad de fluorescencia. El ciclo umbral o Ct, es el ciclo en el que se produce un cambio significativo en la fluorescencia y se utiliza durante la fase exponencial de la curva para la cuantificación. Tomada y modificada de Arya et al, 2005.

El método comparativo Ct, fue aplicado para determinar los niveles de expresión relativa de los genes de interés: 1) Se calculó la diferencia en Ct (ΔCt), entre el gen blanco y el gen de referencia, tanto para el paciente como para el calibrador (línea celular positiva). 2) Se calculó la diferencia de ΔCt entre el paciente y el calibrador ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{calibrador}$). 3) Mediante la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se calculó la cantidad normalizada de gen blanco relativo al calibrador [39].

Para determinar la sensibilidad y eficiencia de la reacción, se hicieron diluciones seriadas ($10^{-1} - 10^{-4}$)del calibrador, tanto para cada uno de los genes problema como para el gen constitutivo, y se construyó una curva estándar. Para lo anterior, se graficó el valor logarítmico de la concentración contra el valor Ct [40], lo que nos permitió obtener el error y eficiencia de amplificación relacionado a cada uno de los genes estudiados en este trabajo[38]. Tomando en cuenta los resultados obtenidos de nuestra curva estándar, se trabajó con una dilución de 1:50 para todas las muestras. Los resultados cuantitativos fueron expresados como 100 veces el número de copias normalizadas del gen blanco, contra el número de copias del gen de mantenimiento (*ABL*).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS 16.0 (Chicago, IL, USA). Con la finalidad de obtener parámetros que nos permitieran realizar comparaciones tomando en cuenta los niveles de expresión, los valores ya normalizados de cada uno de los genes (*TLX1* y *TLX3*), se agruparon según los valores medios de expresión en: expresión alta y expresión baja. Para conocer las diferencias entre subgrupos de expresión para cada gen y la clasificación en grupos dependiendo de características clínicas, re realizó la prueba de χ^2. El ánalisis para la supervivencia libre de evento (SLE) tomó en cuenta el tiempo transcurrido entre el diagnóstico y la primera recaída. Para la superviencia global (SG), se consideró el tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte. Las curvas de supervivencia fueron calculadas mediante el método de Kaplan-Meier y comparadas con la prueba de "log-rank". Se realizó análisis multivariado para determinar la influencia de los factores convencionales de riesgo, en combinación con la sobre-expresión de *TLX1* y *TLX3*.

Resultados

Población de estudio

Se estudiaron 12 pacientes diagnosticados con LAL-T con un rango de edad de 2 a 14 años. El grupo control consistió de muestras de MO de 5 pacientes diagnosticados con LAL-B con un rango de edad de 2 a 15 años y de 5 muestras de sangre periférica (SP) de individuos sanos con un rango de edad de 18 a 21 años. Se analizaron los parámetros convencionales de riesgo de recaída como son la edad (<1 año o >10 años), cuenta de leucocitos (>50x10^9/L) y la presencia de alteraciones citogenéticas y/o moleculares (como la fusión *SIL/TAL1* la cual ha sido asociada a una mejor SG y SLE en pacientes pediatricos con LAL-T)[18,41,42]. Las características clínicas de la población de estudio se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Características clínicas y citogenéticas de pacientes con LAL-T y LAL-B

	Clave	Edad	Sexo	Blastos en MO (%)	Cuenta de Leucocitos (n x10⁹/L)	Inmunofenotipo	Alteraciones citogenéticas y/o moleculares	Riesgo Alto (RA)
LAL-T	NCT5	5	F	100	**870**	CD2, CD3, CD3c, CD5,CD7 y CD45 positivos		RA
	NCT6	2	M	ND	14.1	CD3 +/-, CD3c +/-, CD45 +/-, CD5 +/-, CD7 + y CD2 -		RA
	NCT7	9	M	100	**144**	CD2, CD3c y CD34 positivos, CD3 +/-, CD7 +/-, CD13 +/-, CD33 +/-, CD45 +7- y CD15 y CD117 negativos		RA por cuenta alta de leucocitos y MM
	NCT8	8	M	97	**200**	TCD2, CD5, CD7,CD10 positivos y CD3 +/- y CD34 +/-		RA
	NCT9	9	M	100	**115**	CD5+, CD7+, CD3 +/-, CD3c +/-, CD45 +/- y CD34 -		RA
	NCT10	**13**	M	96	3.9	CD2+, CD7+, CD3-, CD3c +/-, CD5-, CD34 +/-, CD45+/-		RA por edad
	NCT14	6	F	100 -	**616**	ND		RA por cuenta alta de leucocitos y MM
	NCT11	3	M	95	**199.8**	CD2-58%, CD5-96%, CD7-87%, CD34-17%, CD3-89%, CD79-9%	del1(p34) SIL/TAL Hipodiploidia	RA
	NCT12	**14**	M	97	30.8	CD3-69%, CD7-98%, CD2-66%, CD5-41%, CD10-18%, CD21-14%		RA por edad
	NCT15	6	M	47	3.1	ND		RA Infiltración a piel
	NCT17	6	F	100	0.5	CD2-1%, CD3-90%, CD5=1%, CD7-84%, CD13- 0%, CD34-0%, CD10-16%		RA
	NCT18	4	M	48	5	CD2-96%,CD3-58%, CD5=89%, CD7-96%, CD13- 11%, CD34-1%, CD10-6%,		RA por MM

Los valores resaltados con negritas, muestran los pacientes que presentan alguno de los factores convencionales de riesgo en leucemia. M Masculino; F Femenino; RA Riesgo alto; ND No disponible ; MM Masa Mediastinal.

Análisis de expresión del gen *TLX1*

El análisis de expresión se realizó en los pacientes diagnosticados con LAL-T, en los pacientes con LAL-B e individuos sanos. Los resultados se expresaron como la proporción *TLX1/ABL* y fueron graficados en escala logarítmica. Los niveles de expresión (E) se determinaron a partir de la media de los valores normalizados y fueron clasificados en grupos: para *TLX1*, el nivel de corte se fijó en E>14,414 para expresión alta y E<14,414 para expresión baja. El valor de corte para expresión negativa se determinó en E<1[23] (Fig. 11) .

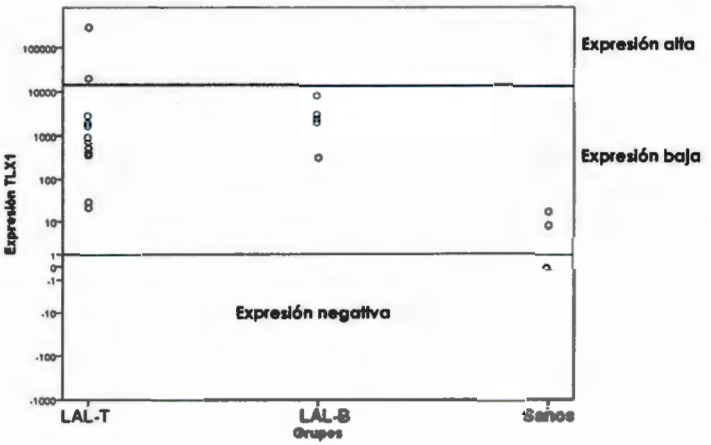

Figura 11. Niveles de expresión de *TLX1/ABL*: 12 pacientes pediátricos diagnosticados con LAL-T, 5 con LAL-B y 5 individuos sanos. En la gráfica se muestra el valor de corte para expresión negativa (E<1) y para expresión alta (E>14,414).

De acuerdo a esta clasificación, se tuvieron 2 pacientes LAL-T con expresión alta de *TLX1* (rango 19,800- 271,000) y 10 pacientes con expresión baja (rango 21-2,840); en cuanto a los pacientes con LAL-B, 5 tuvieron expresión baja (rango 307–8,580) y de las 5 muestras de individuos sanos, 2 fueron clasificados con expresión baja (rango 8-17) y 3 negativas (Fig.11 y Tabla 4).

Tabla 4. Niveles de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* en pacientes con LAL-T, LAL-B e individuos sanos.

	CLAVE	Expresión de *TLX1*		Expresión de *TLX3*	
		Valor de expresión	Nivel de expresión	Valor de expresión	Nivel de expresión
LAL-T	NCT5	959	Bajo	**939**	**Alto**
	NCT6	720	Bajo	5	Bajo
	NCT7	345	Bajo	5	Bajo
	NCT8	1965	Bajo	**148**	**Alto**
	NCT9	510	Bajo	1	Bajo
	NCT10	1695	Bajo	6	Bajo
	NCT14	385	Bajo	1	Bajo
	NCT11	**271000**	**Alto**	**141**	**Alto**
	NCT12	21	Bajo	0.0355	Negativo
	NCT15	29	Bajo	0.06460	Negativo
	NCT17	2840	Bajo	48	Bajo
	NCT18	**19800**	**Alto**	10	Bajo
LAL-B	L9	8580	Bajo	**450**	**Alto**
	L42	2576	Bajo	41	Bajo
	L79	3216	Bajo	87	Bajo
	L98	307	Bajo	21	Bajo
	L101	2143	Bajo	18	Bajo
Individuos sanos	NL8	0	Negativo	9	Bajo
	NL11	8	Bajo	2	Bajo
	NL30	0	Negativo	2	Bajo
	NL32	0	Negativo	0.369	Negativo
	NL34	17	Bajo	0.0238	Negativo

Los números resaltados con negritas, indican los pacientes con niveles altos de expresión para *TLX1* y *TLX3*

Análisis de expresión del gen *TLX3*

El análisis de expresión de *TLX3* se realizó mediante qPCR en el mismo grupo de pacientes e individuos sanos que para el gen *TLX1*. Los resultados obtenidos de la proporción *TLX3/ABL*, se dividieron en 3 grupos, tomando en cuenta la media de los valores de expresión: E>95 fueron considerados como expresión alta, E< 95, expresión baja y E<1, expresión negativa[23] (Fig. 12).

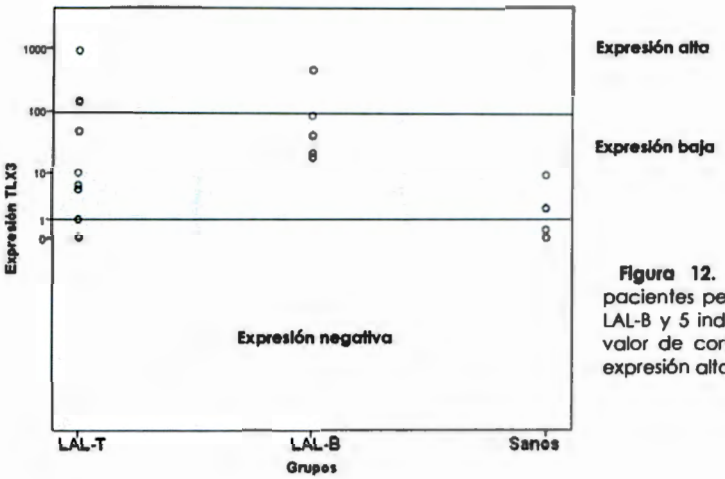

Figura 12. Niveles de expresión de *TLX3/ABL*: 12 pacientes pediátricos diagnosticados con LAL-T, 5 con LAL-B y 5 individuos sanos. En la gráfica se muestra el valor de corte para expresión negativa (E<1) y para expresión alta (E>95).

Tomando en cuenta esta clasificación, 3 pacientes con LAL-T, presentaron expresión alta (rango 141-939), 7 tuvieron expresión baja (rango 1–148) y 2 pacientes fueron clasificados como negativos (0.035-0.064); en el grupo de pacientes diagnosticados con LAL-B, un paciente tuvo expresión alta (450) y 4 con expresión baja (rango 18-87). De las 5 muestras de individuos sanos, 3 tuvieron expresión baja (rango 2-9) y 2 fueron negativas (rango 0.023-0.36) (Fig.11 y Tabla 4).

Pronóstico asociado a la expresión diferencial de *TLX1* y *TLX3* en pacientes con LAL-T

Aunque la muestra estudiada es pequeña, se buscó conocer el significado pronóstico de los resultados de expresión en *TLX1* y *TLX3* a partir del análisis de supervivencia libre de evento (SLE) y la supervivencia global (SG). Se estudiaron 11 de los 12 pacientes debido a que uno de ellos fue excluido dada la inaccesibilidad de los datos de seguimiento necesarios para el presente estudio. Los pacientes se dividieron en dos grupos, de acuerdo a los niveles de expresión de cada uno de los genes: a) pacientes con expresión negativa y baja, y b) pacientes con expresión alta. Dicha expresión fue correlacionada con la condición del paciente, es decir, si presentó recaída y/o muerte durante el seguimiento (Tabla 5).

Tabla 5. Niveles de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* y condición actual de los pacientes diagnosticados con LAL-T.

Paciente	Expresión de *TLX1*	Expresión de *TLX3*	Condición actual
NCT5	Baja/Negativa	**Alta**	Vivo
NCT6	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Recaída/Vivo
NCT7	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Recaída/Defunción
NCT8	Baja/Negativa	**Alta**	Defunción
NCT9	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Recaída/Vivo
NCT10	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Vivo
NCT14	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Recaída/Defunción
NCT11	**Alta**	**Alta**	Vivo
NCT12	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Vivo
NCT15	Baja/Negativa	Baja/Negativa	Recaída/Vivo
NCT18	**Alta**	Baja/Negativa	Vivo

Los números resaltados con negritas, indican los pacientes con niveles altos de expresión para *TLX1* y *TLX3*

Para el gen *TLX1*, se observó que al tiempo de seguimiento (31 meses), ninguno de los dos pacientes con expresión alta (>14400) presentó recaída. De los 9 pacientes con expresión baja o negativa de *TLX1*, 3 casos permanecían vivos sin haber presentado recaída, uno falleció sin previa recaída y 5 presentaron recaída, de los cuales dos fallecieron. La SLE a 15 meses de este grupo de pacientes fue de 38.1%±17.2% ($p=0.188$)(Fig.13A).

Para el análisis de SG, se observó que 3 de los casos con expresión baja o negativa de *TLX1* fallecieron durante el seguimiento y tuvieron una SG a 21 meses de 44.4%±22.2% ($p=0.302$); en ningún caso hubo diferencia estadística significativa entre grupos de expresión (Fig. 13B).

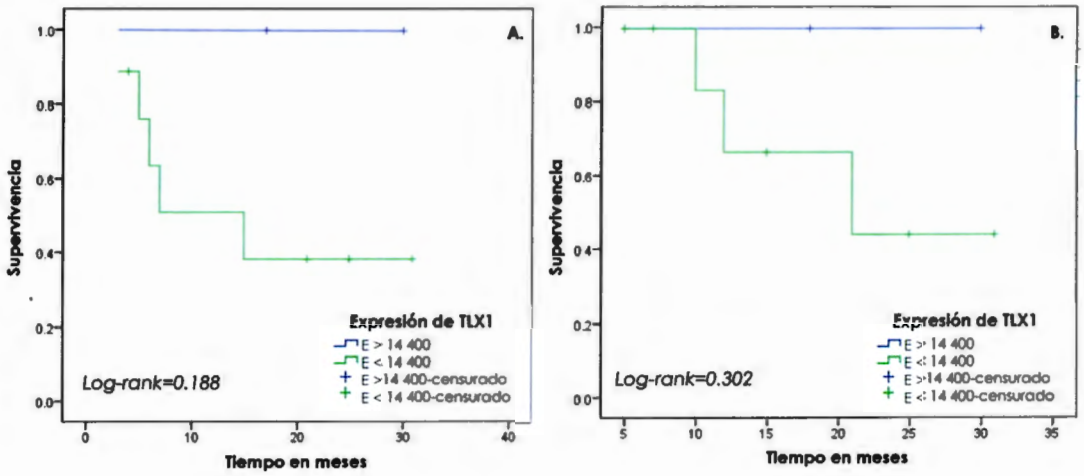

Figura 13. Curvas de Supervivencia en pacientes con LAL-T comparando expresión alta de *TLX1* vs expresión baja o negativa de *TLX1*. **A.** Supervivencia Libre de Evento (SLE) y **B.** Supervivencia Global.

Con respecto a la expresión de *TLX3*, se encontró que de los tres pacientes que presentaron expresión alta, dos permanecían vivos al momento del estudio y uno falleció sin haber presentado recaída. En este grupo, ninguno de los pacientes tuvo recaída. De los 8 pacientes con expresión baja/negativa, 5 recayeron, de los cuales 2 fallecieron. En estos 8 pacientes, la SLE a 15 meses fue de 37.5%±17.1%, sin diferencia estadística significativa entre grupos (*p=0.169*)(Fig.14A).

Para el análisis de supervivencia global, 3/11 pacientes fallecieron: uno del grupo con expresión alta de *TLX3* y dos del grupo de expresión baja/negativa. La SG a 21 meses fue de 50%±35.4%, en comparación con el grupo de expresión baja/negativa que a 12 meses tuvo una SG de 66.7%±19.2%, sin diferencia estadística significativa (*p=0.964)*(Fig. 14B).

Cabe resaltar que la mayoría de los pacientes con expresión baja o negativa de los genes *TLX1* y *TLX3*, tuvieron recaída o muerte secundaria a recaída (6 y 5 pacientes respectivamente).

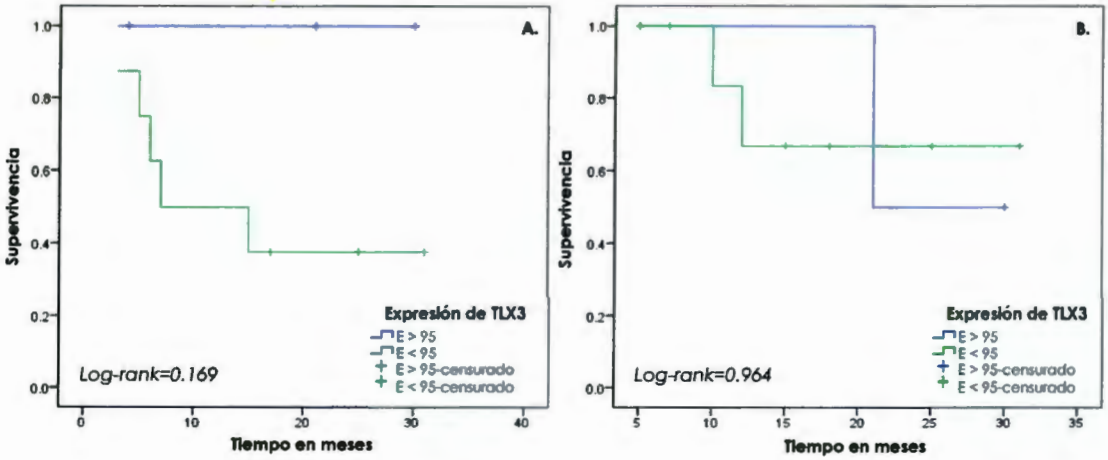

Figura 14. Curvas de Supervivencia en pacientes con LAL-T comparando expresión alta de *TLX3* vs expresión baja o negativa de *TLX3*. **A.** Supervivencia Libre de Evento (SLE) y **B.** Supervivencia Global (SG).

En la tabla 6, se muestra la clasificación de cada uno de los pacientes de acuerdo a los niveles de expresión de los genes *TLX1* y *TLX3*, en asociación con los factores convencionales de riesgo para leucemia. Los factores de riesgo para LAL-T que se tomaron en cuenta para el análisis multivariado fueron edad y cuenta de leucocitos, de los cuales para ninguno se encontró asociación significativa con la expresión diferencial de alguno de los genes (*p=0.103* para *TLX1* y *p=0.302* para *TLX3*).

Tabla 6. Características clínicas, niveles de expresión de *TLX1* y *TLX3* y supervivencia de pacientes con LAL-T

Características clínicas		Total Pacientes	Expresión *TLX1* EB o EN n=9	Expresión *TLX1* EA n=2	Expresión *TLX3* EB o EN n=8	Expresión *TLX3* EA n=3
Género	Masculino	9	7	2	7	2
	Femenino	2	2	0	1	1
Edad	<1 año	0	0	0	0	0
	1-10 años	9	9	2	6	3
	>10 años	2	0	0	2	0
Cuenta de leucocitos	>50 x10⁹/L	6	5	1	3	3
	<50 x10⁹/L	5	4	1	5	0
Evento	Vivos	5	3	2	3	2
	Muerte o Recaída	6	6	0	5	1

EN Expresión negativa; EB Expresión baja; EA Expresión alta

Discusión

Los estudios moleculares en pacientes con LAL-T, han revelado la presencia de diversas alteraciones en genes relacionados con la patogénesis de este tipo de leucemia y han permitido la clasificación de los pacientes en subgrupos de acuerdo a diferencias en su expresión [5,20]. Varios de estos genes son factores de transcripción que incluyen a *TAL1* (*SCL*), *LYL1*, *TLX1* (*HOX11*) y *TLX3* (*HOX11L2*) de los cuales, principalmente los dos últimos han sido asociados con el pronóstico de la enfermedad en estos pacientes[18,20–27,31,32]. Existe controversia en cuanto a la expresión de TLX1 y TLX3 y su relación con pronóstico favorable o desfavorable. A excepción de un estudio realizado por Gottardo, et al., en el 2005, en donde no se encontraron implicaciones pronósticas relacionadas a la sobre-expresión de *TLX1*[25], en la mayoría de los reportes se observa asociación con un pronóstico favorable[18,20–24,32]. Por otro lado, la expresión ectópica de *TLX3* ha sido asociada con un pronóstico desfavorable en pacientes con LAL-T [20,24,26,31,32], resultado que no ha sido corroborado por otros estudios, en donde incluso se ha asociado con buen pronóstico[25] o no se ha encontrado ninguna relación[18]. Considerando la importancia que parecen tener estos marcadores en la evolución de la enfermedad, se buscó determinar el valor pronóstico de la sobre-expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* en pacientes pediátricos con LAL-T atendidos en Instituciones de nuestro país.

Con los resultados obtenidos en nuestro estudio, se pudo observar que para *TLX1*, todas las muestras de LAL-B fueron clasificadas dentro del grupo de expresión baja, y de las muestras de individuos sanos 2 fueron clasificadas como expresión baja y 3 como negativa; estos resultados concuerdan con datos reportados en estudios previos, en los cuales se observa que tanto pacientes con LAL-B como algunas líneas celulares de esta estirpe (RS, RAJI, REH), presentan baja expresión de *TLX1*[23]. En cuanto a las muestras de individuos sanos, se ha reportado expresión baja o negativa de *TLX1* tanto en muestras de sangre periférica como en MO normal [21,23].

En relación a *TLX3* obtuvimos resultados muy parecidos con respecto a las muestras de individuos sanos, 3 muestras fueron clasificadas con expresión baja y 2 como negativas. En cuanto a la expresión de *TLX3* en pacientes con LAL-B, encontramos un dato relevante ya que aunque solo uno de los pacientes presentó expresión alta del gen, lo cual no está reportado en estudios previos, en los que se refiere como negativa[25,29], resultaría interesante saber si se relaciona con características individuales del paciente, sin tener necesariamente importancia para el pronóstico de este tipo de leucemia. Sin embargo, para obtener resultados relevantes, sería necesario realizar

el estudio en un mayor número de pacientes y conocer si la expresión diferencial de este gen tiene alguna implicación en la biología y pronóstico de LAL-B [25].

Con respecto a *TLX1*, se encontró que los 5 pacientes que presentaron recaída (con una media de seguimiento de 31 meses), pertenecían al grupo de expresión baja o negativa. Ninguno de los pacientes con expresión alta tuvo recaída o muerte. Esto sugiere tendencia hacia un mejor pronóstico, comparado con aquellos casos que presentan expresión negativa o baja de este gen, datos que concuerdan con lo reportado en la literatura [18,20–24,26].

En el caso de *TLX3*, solo un paciente del grupo de expresión alta falleció sin previa recaída. En los pacientes estudiados en este trabajo, los eventos de muerte o recaída no se relacionaron con la sobre-expresión del gen, como está reportado en estudios previos [18,26]. Dado que para nuestra población no existen datos relacionados con la expresión diferencial de este gen, el resultado obtenido podría resultar interesante en cuanto a su comportamiento, ya que no se encontró relación de sobre-expresión de *TLX3* y pronóstico desfavorable. Es importante reconocer que para poder obtener una relación confiable, es necesario realizar el estudio en un mayor número de pacientes y con un período mayor de seguimiento.

Nuestros resultados mostraron individuos que cumplen con criterios clínicos y moleculares de mal pronóstico, como altas cuentas de leucocitos y expresión baja de ambos genes, que como es esperado, presentaron algún evento (muerte o recaída) durante el seguimiento (3/6 pacientes). Y por otro lado, observamos pacientes (NCT11) con expresión alta de *TLX1* (asociada a buen pronóstico) y *TLX3*, positivo para la fusión *SIL-TAL1* y con cuentas de leucocitos mayores a $50x10^9$/L (asociados a mal pronóstico). En estudios previos se sugiere que la sobre-expresión de *TLX1*, *TLX3* y la fusión *SIL-TAL1* en combinación, pueden ser mutuamente excluyentes, lo cual se cumple en el caso del paciente NCT11, que hasta el momento del estudio, no había presentado evento[18,43,44].

La fusión de *SIL-TAL1*(9-30%)[18,46,47] y la expresión ectópica de *TLX3* se han reportado como una anormalidad común en LAL-T. Existen pocos reportes sobre la implicación pronóstica de la fusión *SIL-TAL1* en LAL-T, pero en al menos tres estudios, se presenta una tendencia a mejorar la tasa de SLE y SG [18,47,48]. Las dos alteraciones en conjunto, no han sido utilizadas como factor pronóstico en este tipo de enfermedad[45].

A pesar de que con el análisis de regresión no se encontró que alguno de los factores de riesgo como edad y cuenta de leucocitos en combinación con la sobre-expresión de *TLX1* y *TLX3*, tuvieran un riesgo incrementado relacionado a recaída, la combinación de los diferentes

parámetros clínicos, citogenéticos y moleculares, revela la importancia de conjuntar la información de los diversos factores asociados a riesgo, para poder obtener un resultado global aplicable al pronóstico del paciente. Así mismo, es primordial tomar en cuenta que existen rasgos biológicos propios de la población, variabilidad genética, así como diferencias en los protocolos de tratamiento que pueden influir en su asociación con riesgo a recaída. Todo ello es importante para poder establecer si los marcadores moleculares que estamos evaluando(*TLX1* y *TLX3*) están asociados al pronóstico de LAL-T en nuestra población.

Es necesario señalar además, que a pesar de que en nuestro estudio, el tamaño de muestra fue muy limitado, lo cual representa una importante restricción para obtener datos concluyentes, es el primero en analizar la expresión de los genes *TLX1* y *TLX3* y su relación con la respuesta a tratamiento en pacientes pediátricos mexicanos diagnosticados con LAL-T.

Conclusiones

La evaluación de marcadores moleculares puede ayudar en la identificación de individuos con mal pronóstico, que pueden ser útiles como una herramienta que permita en conjunto con otros marcadores clínicos, conocer la respuesta de los pacientes al tratamiento. A su vez, podría ser utilizada para crear perfiles moleculares de LAL-T, mediante los cuales se puedan proporcionar terapias individualizadas a cada uno de los pacientes.

El presente estudio es un acercamiento de la relación que existe entre la expresión diferencial de los genes *TLX1* y *TLX3* y la supervivencia en pacientes pediátricos con LAL-T. Es importante resaltar que la metodología utilizada permitió de manera eficiente, detectar diferencias en la expresión de estos genes en nuestra población, lo que da pauta a analizar un mayor número de pacientes y realizar asociaciones de los hallazgos de expresión con riesgo a recaída.

Nuestro estudio arroja datos importantes asociados al perfil de expresión de estos genes en población mexicana, que podría a futuro dar información relevante en cuanto al significado funcional de estos genes en el desarrollo y pronóstico de la LAL-T. Por último, es necesario tomar en cuenta la importancia de combinar los perfiles moleculares de expresión, junto con los parámetros clínicos y citogenéticos ya establecidos como factores de riesgo, para obtener un comportamiento global del paciente que permita asociarlos con riesgo de recaída.

REFERENCIAS

1. Mrózek, K., Harper, D. P. & Aplan, P. D. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am* **23,** 991–1010, v (2009).

2. Han, S. *et al.* Genome-wide association study of childhood acute lymphoblastic leukemia in Korea. *Leuk. Res* **34,** 1271–1274 (2010).

3. Whitlock, J. A. Down syndrome and acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **135,** 595–602 (2006).

4. Armstrong, S. A. Molecular Genetics of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **23,** 6306–6315 (2005).

5. De Keersmaecker, K., Marynen, P. & Cools, J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **90,** 1116–1127 (2005).

6. Graux, C., Cools, J., Michaux, L., Vandenberghe, P. & Hagemeijer, A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* **20,** 1496–1510 (2006).

7. Aifantis, I., Raetz, E. & Buonamici, S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat. Rev. Immunol* **8,** 380–390 (2008).

8. Chiaretti, S. & Foà, R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **94,** 160–162 (2009).

9. Van Vlierberghe, P., Pieters, R., Beverloo, H. B. & Meijerink, J. P. P. Molecular-genetic insights in paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol* **143,** 153–168 (2008).

10. Parham, P. *Inmunologia/ Immunology*. (Ed. Médica Panamericana, 2006).

11. Kindt, T. J., Goldsby, R. A., Osborne, B. A. & Kuby, J. *Kuby immunology*. (W.H. Freeman, 2007).

12. Garcia, K. C., Teyton, L. & Wilson, I. A. Structural basis of T cell recognition. *Annu. Rev. Immunol* **17,** 369–397 (1999).

13. Staal, F. J. T., van Dongen, J. J. M. & Langerak, A. W. Novel insights into the development of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Curr Hematol Malig Rep* **2,** 176–182 (2007).

14. Parslow, T. G., Stites, D. P., Terr, A. I. & Imboden, J. B. *Medical Immunology*. (McGraw-Hill/Appleton & Lange, 2001).

15. Rooney, D. E. & Czepulkowski, B. H. *Human Cytogenetics: Malignancy and Acquired Abnormalities: A Practical Approach*. (Oxford University Press, 2001).

16. Riz, I., Hawley, T. S., Luu, T. V., Lee, N. H. & Hawley, R. G. TLX1 and NOTCH coregulate transcription in T cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Mol. Cancer* **9,** 181 (2010).

17. Speicher, M., Antonarakis, S. E. & Motulsky, A. G. *Vogel and Motulsky's Human Genetics: Problems and Approaches (HUMAN GENETICS: PROBLEMS & APPROACHES*. (Springer, 2010).

18. Cavé, H. *et al.* Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* **103,** 442–450 (2004).

19. Cohen, P. T. W. Protein phosphatase 1--targeted in many directions. *J. Cell. Sci* **115**, 241–256 (2002).

20. Ferrando, A. A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75–87 (2002).

21. Kees, U. R. *et al.* Expression of HOX11 in childhood T-lineage acute lymphoblastic leukaemia can occur in the absence of cytogenetic aberration at 10q24: a study from the Children's Cancer Group (CCG). *Leukemia* **17**, 887–893 (2003).

22. Ferrando, A. A. *et al.* Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **363**, 535–536 (2004).

23. Bergeron, J. *et al.* Prognostic and oncogenic relevance of TLX1/HOX11 expression level in T-ALLs. *Blood* **110**, 2324–2330 (2007).

24. Baak, U. *et al.* Thymic adult T-cell acute lymphoblastic leukemia stratified in standard- and high-risk group by aberrant HOX11L2 expression: experience of the German multicenter ALL study group. *Leukemia* **22**, 1154–1160 (2008).

25. Gottardo, N. G. *et al.* Significance of HOX11L2/TLX3 expression in children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on Children's Cancer Group protocols. *Leukemia* **19**, 1705–1708 (2005).

26. Ballerini, P. *et al.* HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood* **100**, 991–997 (2002).

27. Mauvieux, L. *et al.* High incidence of Hox11L2 expression in children with T-ALL. *Leukemia* **16**, 2417–2422 (2002).

28. Ferrando, A. A. *et al.* Gene expression signatures in MLL-rearranged T-lineage and B-precursor acute leukemias: dominance of HOX dysregulation. *Blood* **102**, 262–268 (2003).

29. Bustin, S. A., Benes, V., Nolan, T. & Pfaffl, M. W. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J. Mol. Endocrinol* **34**, 597–601 (2005).

30. Nolan, T., Hands, R. E. & Bustin, S. A. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nat Protoc* **1**, 1559–1582 (2006).

31. Van Grotel, M. *et al.* The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. *Haematologica* **91**, 1212–1221 (2006).

32. Ballerini, P. *et al.* Impact of genotype on survival of children with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the French protocol FRALLE-93: the effect of TLX3/HOX11L2 gene expression on outcome. *Haematologica* **93**, 1658–1665 (2008).

33. Drexler, H. G., Matsuo, A. Y. & MacLeod, R. A. Continuous hematopoietic cell lines as model systems for leukemia-lymphoma research. *Leuk. Res* **24**, 881–911 (2000).

34. Morikawa, S., Tatsumi, E., Baba, M., Harada, T. & Yasuhira, K. Two E-rosette-forming lymphoid cell lines. *Int. J. Cancer* **21**, 166–170 (1978).

35. Arya, M. *et al.* Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev. Mol. Diagn* **5,** 209–219 (2005).

36. Beillard, E. *et al.* Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia* **17,** 2474–2486 (2003).

37. Dorak, M. T. *Real-time PCR.* (Taylor & Francis, 2006).

38. Giulietti, A. *et al.* An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25,** 386–401 (2001).

39. Van der Velden, V. H. J. *et al.* Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* **17,** 1013–1034 (2003).

40. Larionov, A., Krause, A. & Miller, W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing. *BMC Bioinformatics* **6,** 62 (2005).

41. Pui, C.-H., Robison, L. L. & Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **371,** 1030–1043 (2008).

42. Bassan, R. & Hoelzer, D. Modern therapy of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol* **29,** 532–543 (2011).

43. Gottardo, N. G. *et al.* Identification of novel molecular prognostic markers for paediatric T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **137,** 319–328 (2007).

44. Pui, C.-H., Relling, M. V. & Downing, J. R. Acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **350,** 1535–1548 (2004).

45. Mansur, M. B. *et al.* SIL-TAL1 fusion gene negative impact in T-cell acute lymphoblastic leukemia outcome. *Leuk. Lymphoma* **50,** 1318–1325 (2009).

46. Carlotti, E. *et al.* Molecular characterization of a new recombination of the SIL/TAL-1 locus in a child with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **118,** 1011–1018 (2002).

47. Bash, R. O. *et al.* Clinical features and outcome of T-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood with respect to alterations at the TAL1 locus: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* **81,** 2110–2117 (1993).

48. Kikuchi, A. *et al.* Clinical significance of TAL1 gene alteration in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia and lymphoma. *Leukemia* **7,** 933–938 (1993).