



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

**ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO
NUCLEÓTIDO EN LOS GENES *ARID5B*, *ASS1*,
PIP4K2A Y *miR146a* EN NIÑOS CON LEUCEMIA
AGUDA LINFOBLÁSTICA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICOFARMACOBIOLOGO**

P R E S E N T A :

ENRIQUE ALVAREZ OLMOS



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES**

MORELIA Mich. FEBRERO DE 2018

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Silvia Jiménez Morales en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, perteneciente al Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Dedicatoria

A mis amigos y familia que en las buenas y en las malas me brindaron su apoyo.

Mi más sincero agradecimiento

A la Dra. Silvia Jiménez M. Por aceptar ser su estudiante y permitir que yo crezca profesionalmente y quien me aportó valiosos conocimientos en su campo de investigación. También por su comprensión y amistad y su gran valor como persona.

A mis compañeros del laboratorio del Instituto Nacional de Medicina Genómica: Dra. Lupita, Dra. Yola, QB. Juan Luis, Mireya, Carlos y Flor por apoyo y comprensión durante mi estancia en el Laboratorio. Al INMEGEN por darme la oportunidad de aprender cosas nuevas y ampliar mi formación profesional.

A la Facultad de Químicofarmacobiología por la superación que pude lograr en la institución y por los profesores que nos impulsan a seguir con nuestras metas.

Al comité sinodal el Dr. Rosalio Mercado, Dr. Rafael Ortiz, M.C. Lucia Mathilde Nava, Prof. Alma Rosa García y Prof. Liliana Bibriesca por su tiempo y compromiso en la revisión para que este trabajo fuera finalizado.

MUCHAS GRACIAS

INDICE

Abreviaturas	I
Índice de tablas	II
Índice de figuras	III
Resumen	1
Abstract	3
Introducción	5
Antecedentes históricos	5
Fundamento Teórico	6
Manifestaciones clínicas	6
Clasificación	7
Leucemia Aguda Linfoblástica	10
Epidemiología de la LAL en el grupo étnico Maya y en niños de la Ciudad de México	10
Citogenética y Biología Molecular de la LAL	11
Leucemia Aguda Linfoblástica: una entidad compleja	14
Estudios de asociación	15
Polimorfismos	15
Genes asociados a leucemia aguda linfoblástica	16
<i>ARID5B</i>	18
<i>ASS1</i>	19
<i>PIP4K2A</i>	20
<i>miR146a</i>	21
Justificación	22
Objetivos	23
General	23
Particulares	23
Metodología	24
Estrategia general	24
Población de estudio	25

Población Objetivo	25
Análisis molecular	26
Obtención de muestras	26
Extracción de DNA	26
Cuantificación y evaluación de la integridad de ADN	27
Genotipificación	27
Análisis de secuenciación automática	30
Análisis estadístico	31
Resultados	32
Población analizada	32
Gen <i>ARID5B</i>	33
Gen <i>ASS1</i> y <i>PIP4K2A</i>	35
Gen <i>miR146a</i>	36
Discusión	38
Conclusiones	41
Referencias	42

ABREVIATURAS

ATP	Adenosín Trifosfato
CD	Marcador de superficie de los blastos leucémicos (Cluster of Differentiation, en inglés)
CIg	Inmunoglobulinas Citoplasmáticas
DO	Densidad óptica
dNTP	Deoxidonucleotidos Trifosfato
del	Delección
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAB	Sociedad Franco-Americana-Británica
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
Kb	Kilobases
Kd	Kilodaltones
LAL	Leucemia Aguda Linfoblástica
LAM	Leucemia Aguda Mieloblástica
LCM	Leucemia Crónica Mieloide
nm	Nanómetros
Pb	pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
rpm	Revoluciones por minuto
sIg	Inmuglobulinas de Superficie
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Polimorfismos de un solo Nucleótido
t	Translocación
TBE	Buffer de Tris-Borato
UV	Luz Ultravioleta
VLTH-I, II	Virus Linfocitotrópico T humano tipo I y II
OR	Odds Ratio (Medida Estadística)
P	P-value (Probabilidad Calculada o Estimada)

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación morfológica de la LAL de acuerdo a la FAB.
- Tabla 2.** Clasificación inmunológica de la LAL Infantil.
- Tabla 3.** Condiciones de reacción de Taqman
- Tabla 4.** Población de estudio analizada.
- Tabla 5.** Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ARID5B* y leucemia aguda linfoblástica en población maya.
- Tabla 6.** Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ARID5B* y leucemia aguda linfoblástica en población mestiza.
- Tabla 7.** Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ASS1*, *PIP4K2A* y leucemia aguda linfoblástica en población maya.
- Tabla 8.** Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ASS1*, *PIP4K2A* y leucemia aguda linfoblástica en población mestiza.
- Tabla 9.** Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *miR146a* y leucemia aguda linfoblástica en población maya.
- Tabla 10.** Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *miR146a* y leucemia aguda linfoblástica en población mestiza.

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1** Alteraciones cromosómicas en leucemia.
- Fig. 2** Gen *ARID5B*.
- Fig. 3** Gen *ASS1*.
- Fig. 4** Gen *PIP4K2A*.
- Fig. 5** Gen *miR146a*.
- Fig. 6** Condiciones de termociclador para PCR punto final.
- Fig. 7** Mecanismo de discriminación alélica por sondas Taqman.
- Fig. 8** Grafica de discriminación alélica.
- Fig. 9** Secuenciación automática del DNA.

RESUMEN

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es la neoplasia maligna más común en la población infantil; representa del 30 al 40% de todos los casos de cáncer pediátrico. En México, esta patología no sólo es la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en los niños de 15 años; además, estudios que se han realizado muestran que a partir del segundo año de vida es el principal cáncer y esto se mantiene hasta la adolescencia. El grupo etario más afectado es el de 10 a 14 años, con el 51.5% de todos los casos de leucemia, seguido por el grupo de 5 a 9 años con el 18.4%. Por su etiología es una entidad multifactorial, donde los eventos patogénicos precisos que conducen a su desarrollo se desconocen en la mayoría de los casos. De hecho, menos de un 5% de ellos se asocian a casos hereditarios o como resultado de síndromes genéticos. A la fecha, diversos estudios señalan que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en genes involucrados en la proliferación, diferenciación y apoptosis de células hematopoyéticas confieren riesgo para desarrollar LAL y otras neoplasias hematológicas. En un estudio caso-control analizamos niños con LAL provenientes de Mérida Yucatán y de la Ciudad de México para conocer si SNPs en los genes *ARID5B*, *PIP4K2A*, *ASS1* y *miR146a* se asocian a esta enfermedad. Como casos se incluyeron 111 niños de Mérida Yucatán y 93 niños de la Ciudad de México y como controles, 204 adultos de Yucatán, 115 niños y 343 adultos de la Ciudad de México. Mediante sondas TaqMan genotificamos cinco SNPs distribuidos en *ARID5B* (rs10821936 y rs7089424), *PIP4K2A* (rs7088318), *ASS1* (rs928518) y *miR146a* (rs2910164). Al comparar las frecuencias genotípicas y alélicas entre casos y controles encontramos que la distribución de los alelos para los dos SNPs de *ARID5B* mostraron significancia estadística. El rs10821936 se observó en 127 (56.1%) controles pediátricos (OR= 2.59; IC 95%:1.69-3.96, p=0.0000052) y en 288 (47.3%) adultos sanos (OR = 2.24; IC 95%: 1.56-3.21, p=0.0000054). Mientras tanto, el rs7089424 se observó en 319 (50.1%) de los controles pediátricos (OR = 2.28; IC 95%: 1.50-3.48, p=0.000067) y en 317 (49.9%) adultos sanos (OR=1.96; IC 95%: 1.38-2.80, p= 0.00012). El análisis evidenció que el genotipo CC (rs10821936), confiere un mayor riesgo de LAL (OR= 5.35; IC 95%: 2.40-11.95, p= 0.00002) cuando se comparó con los controles pediátricos; y se obtuvo un OR de 4.10 (IC 95%=2.06-8.18, p= 0.00003) cuando se comparó con adultos sanos. Además, el rs7089424 CC se asoció con un OR de 4.49 (IC 95%: 2.00-10.08, p=0.00018) para LAL.

infantil cuando se comparó con controles pediátricos; mientras que, al compararlo con adultos sanos el OR fue de 3.34 (IC 95%: 1.67-6.67, $p= 0.00040$). Por otra parte, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre casos y controles para los alelos de *ASS1*, *PIP4K2A* y *miR146a* en ninguna de las poblaciones evaluadas. En conclusión, los datos sugieren que SNPs en *ASS1*, *PIP4K2A* y *miR146a* no parecen jugar un papel en la susceptibilidad a LAL, mientras que los alelos de *ARID5B* están asociados con la susceptibilidad a LAL entre los grupos étnicos de México que fueron evaluados. Sin embargo, se requieren más estudios que incluyan un mayor número de casos y controles, así como estudios en donde se detalle la etnicidad para investigar si las asociaciones observadas son válidas.

Palabras clave: leucemia, polimorfismos, niños, *ARID5B*, etiología.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in children representing 30 to 40% of all cases approximately. In Mexico, this disease is the second cause of death in population aged less than 15 years. The etiology seems to be multicausal, and precise pathogenic events that lead to its development are unknown in most cases. In fact, less than 5% of causes are associated with some genetic syndromes. To date, several studies indicate that single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes involved in the proliferation, differentiation and apoptosis of hematopoietic cells confer a high risk to develop ALL. In the present case-control study, we analyzed children with ALL from Merida Yucatan and Mexico City to know if SNPs in the *ARID5B*, *PIP4K2A*, *ASS1* and *miR146a* genes are associated with the development of this disease. The cases included were 111 children from Mérida Yucatán and 93 children from Mexico City. Controls were 204 healthy adults from Yucatán, and 115 children and 343 healthy adults from Mexico City. Using TaqMan probes we genotyped five SNPs distributed in *ARID5B* (rs10821936 and rs7089424), *PIP4K2A* (rs7088318), *ASS1* (rs928518) and *miR146a* (rs2910164). When comparing the genotypic and allelic frequencies between cases and controls we found that the distribution of the alleles for the two SNPs of *ARID5B* showed statistical significance. The rs10821936 was observed in 127 (56.1%) pediatric controls (OR = 2.59, 95% CI: 1.69-3.96, $p = 0.0000052$) and in 288 (47.3%) healthy adults (OR = 2.24, 95% CI: 1.56-3.21, $p = 0.0000054$). Meanwhile, rs7089424 was observed in 319 (50.1%) of the pediatric controls (OR = 2.28, 95% CI: 1.50-3.48, $p = 0.000067$) and in 317 (49.9%) healthy adults (OR = 1.96, 95% CI: 1.38-2.80, $p = 0.00012$). The analysis showed that the CC genotype (rs10821936), confers a higher risk of ALL (OR = 5.35, 95% CI: 2.40-11.95, $p = 0.00002$) when compared with pediatric controls; and an OR of 4.10 (95% CI: 2.06-8.18, $p = 0.00003$) was obtained when compared with healthy adults. In addition, rs7089424 CC was associated with an OR of 4.49 (95% CI: 2.00-10.08, $p = 0.00018$) for childhood ALL when compared with pediatric controls; whereas, when compared with healthy adults, the OR was 3.34 (95% CI: 1.67-6.67, $p = 0.00040$). On the other hand, no statistically significant differences were observed between cases and controls for *ASS1*, *PIP4K2A* and *miR146a* alleles in any of the evaluated populations. In conclusion, present study results suggest that

SNPs in *ASS1*, *PIP4K2A* and *miR146a* do not seem to play a role in ALL susceptibility, whereas alleles of *ARID5B* are associated with ALL susceptibility among the ethnic Mexican groups that were assessed in present research. However, more studies are required that include a greater number of cases and controls, as well as detailed studies of ethnicity in order to investigate whether the associations observed are valid.

INTRODUCCIÓN

Se estima que en el mundo existen 12 millones de personas diagnosticadas con cáncer, de los cuales el 3% (360 000) son niños. Así mismo, el cáncer es la segunda causa de muerte en menores de 20 años a nivel mundial. Cada año, más de 160 000 menores de 20 años son diagnosticados con cáncer en países desarrollados. Aún más, tres de cada cuatro niños sobreviven al menos 5 años después de iniciar su tratamiento, a diferencia de los países en vías de desarrollo en los cuales más de la mitad (60%) mueren. En México aproximadamente cada año, 7 000 niños adquieren la enfermedad.¹

En México, del 2007 a 2008, se observó que los cánceres más frecuentes fueron la leucemia, el linfoma, los tumores del sistema nervioso central (SCN) y los sarcomas de partes blandas como el rabdimiosarcoma.² En cuanto a la clasificación de las leucemias, el tipo más común fue la linfoide con el 81.3% de los casos. Por grupo etario, el de 10 a 14 años fue el más afectado con el 51.5% de los casos de leucemia, seguido del grupo de 5 a 9 años con el 18.4%, todos ellos pertenecientes al de tipo Linfoide.³

ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El primer informe de leucemia se atribuye a Velpeau en 1827, quien describió a la enfermedad como una proliferación de células blancas en la sangre. Sin embargo, el término Leucemia fue acuñado por Virchow en 1847 definiéndolo como dos afecciones: “esplénica y linfática”. En 1891 Ehrlich introdujo métodos para su distinción como tinción citoquímica y conteo de células blancas. En 1913 las leucemias se clasificaron en agudas y crónicas, mieloides y linfoides. En 1917 se reconoció el aumento de su prevalencia entre niños de uno a cinco años de edad y en ese mismo periodo se inició el intento médico para tratarla de forma paliativa con químicos. El primer antineoplásico en emplearse fue la aminopterina, antimetabolito del ácido fólico que podía acelerar el crecimiento de las células leucémicas con buenos resultados, incluso remisión de los síntomas de hasta siete

meses. En 1949 se sintetizaron antimetabolitos que intervienen con la síntesis de purina y pirimidina, y se introdujeron la 6-mercaptopurina y alopurinol a la práctica clínica.^{4,5}

FUNDAMENTO TEÓRICO

La Leucemia es el término que se utiliza para definir a un grupo de enfermedades malignas de la sangre. Se caracteriza por tener una proliferación clonal, autónoma y anormal de las células que dan origen a las células normales de la sangre (comportamiento tumoral en general). Lo anterior implica que una célula temprana sufre un cambio genético que hace que se produzca sin control una clona anormal de sí misma. Esta replicación es desordenada y ocupan paulatinamente el espacio de la médula ósea normal, provocando anemia progresiva, sangrado anormal y predisposición a las infecciones. Por otro lado, cuando las células anormales invaden otros tejidos, se produce falla del funcionamiento del órgano que se ocupa.⁶

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

En términos biológicos y clínicos la leucemia es un cáncer muy diverso, por lo que las manifestaciones clínicas son variables. Los síntomas pueden aparecer de manera insidiosa o aguda, los cuales son un reflejo de la insuficiencia de la médula ósea y del grado de afectación extramedular. Algunos pacientes sufren infecciones potencialmente letales o epistaxis durante el curso de la enfermedad o al diagnóstico. En otros casos, la leucemia es asintomática y se detecta durante un examen físico de rutina. Sin embargo, la mayor parte de los pacientes presentan síntomas de pocos días de evolución o de algunos meses como palidez, fatiga y letargia. Las principales manifestaciones de la leucemia en los niños 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 piel y también las

mucosas son petequias y esquimosis, el hígado, el bazo y los ganglios linfáticos son los sitios extramedulares más afectados y el grado de organomegalia (17% con hepatomegalia; 44% con esplenomegalia y 15% con linfadenopatía.^{4,7}

Generalmente al momento del diagnóstico se detecta anemia, trombocitopenia y anormalidades en el recuento leucocitario, las cuales oscilan entre 0.1 a $1,600 \times 10^9/L$ y en algunos casos se observa granulocitopenia absoluta. Aproximadamente dos terceras partes de los pacientes tienen recuentos leucocitarios de $<25 \times 10^9/L$. Casi todas las células de la sangre se identifican como blastos. Los niveles de hemoglobina oscilan entre 1 y 2 g/dL y los recuentos plaquetarios suelen ser bajos con una mediana de $50 \times 10^9/L$. Otras complicaciones clínicas incluyen la insuficiencia renal aguda secundaria a infiltración leucémica, una alteración que eleva las concentraciones séricas de creatinina, ácido úrico, urea y fosfatos. La insuficiencia hepática por infiltración leucémica ocurre en 10% a 20% de los casos, pero es leve y tienen manifestación clínica, lo que modifica el pronóstico.⁸

CLASIFICACIÓN

La leucemia es una enfermedad heterogénea con subtipos que difieren notablemente en sus características celulares y moleculares, así como su respuesta a la terapia y posterior riesgo de recaída. La clasificación de la leucemia desempeña un papel importante en la determinación de las opciones de tratamiento y en el pronóstico (perspectiva) de un niño.⁹

Se siguen identificando dos grupos principales de acuerdo a la célula progenitora que las origina, linfoblasticas y mieloblasticas y con base a su evolución en crónicas y agudas, siendo mucho más frecuentes las linfoblasticas agudas. Estas últimas, a su vez tienen dos variantes determinadas por la línea celular que predomina; así la leucemia aguda linfoblástica (LAL) es de células B (80% de los casos) y de células T (20%). Desde el punto de vista de la morfología de las células, se han realizado múltiples clasificaciones, pero sólo la del grupo de trabajo Franco-Británico-Americano (FAB) tiene una aceptación universal (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación morfológica de la LAL de acuerdo con la FAB.

Característica	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grande	Grande
Cromatina nuclear	Fina	Fina	Fina
Forma del núcleo	Regular puede tener hendiduras	Irregular puede tener hendiduras	Regular, oval o redondo
Núcleo	Indistinguible	Grande, prominente	Grande prominente
Citoplasma	Escaso	Abundante	Abundante

La expresión de los antígenos de superficie de membrana o de los componentes citoplasmáticos también han permitido identificar y clasificar a las enfermedades linfoproliferativas según su origen celular y su estadio de diferenciación (Tabla 2): así en general, las LAL se pueden clasificar en:

- I. Pre-B: Linfoblastos con morfología L1, según la FAB. Estas células son positivas tanto para las inmunoglobulinas citoplasmáticas (cIg) como para CD19, CD22, HLA-DR, CD10. Aproximadamente el 80% de casos pediátricos con LAL tienen este inmunofenotipo: pre-B temprana, pre-B común y pre-B tardía.
- II. Células B: Los linfoblastos con este fenotipo tienen una morfología característica, designada por la FAB como L3 y son positivas para las inmuglobulinas de superficie (sIg). Este subtipo de leucemia está presente en el 3% de los casos de LAL infantil. En estos pacientes, pueden observarse tumores extramedulares y más del 90% de los casos presentan cadenas pesadas μ de las inmuglobulinas (Igs) en la superficie celular. Alrededor de las dos terceras partes de ellos, también expresan cadena ligera κ y el resto cadena ligera λ . Las LAL de células B parecen representar linfomas de Burkitt avanzados en fase leucémica.

III. Células T: Este subtipo de LAL, se identifica por la expresión de antígenos de superficie asociados a las células T. Generalmente se presentan en los varones y en grupos de edad avanzada y se caracterizan por la gran masa de células leucémicas asociado al desarrollo de infiltración al mediastino.

IV. Pre-B transicionales: Los linfoblastos expresan tanto cadenas pesadas de Igs citoplásmicas como de superficie y proteínas de cadena ligera.¹⁰

Tabla 2. Clasificación inmunológica de la LAL Infantil

Tipo de LAL	CD19	CD10	CD2	Igc	Igs	CD5
Pre-B Temprana	+	-	-	-	-	-
“Común”	+	+	-	-	-	-
Pre-B tardía	+	+	-	+	-	-
Cel-B	+	+	-	+/-	+	-
Cel-T	-	+/-	+	-	-	+
Pre-B transicionales	+	+	-	+	+	-

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA

La LAL aparece predominante durante la infancia y representa cerca de 77% de todas las leucemias en niños. Mientras que en la población adulta la LAL sólo representa el 15%. En México los estudios que se han realizado muestran que, a partir del segundo año de vida, la LAL es el principal cáncer y esto se mantiene hasta la adolescencia. Además, la LAL tiene un impacto importante sobre la mortalidad en niños mexicanos, ya que es la principal causa de muerte infantil por padecimientos oncológicos.

La LAL se ha venido incrementando durante los últimos años, así mientras que para 1982 en la Ciudad de México se reportaba una incidencia de 7 casos por millón, para el año 2000 la incidencia reportada fue de 44 casos por millón. La incidencia de la LAL en la Ciudad de México es una de las más altas a nivel mundial, situación que es consistente con las poblaciones hispanas que viven en Estados Unidos de América, donde los niños hispanos de los Ángeles, La Florida y Texas tienen una mayor incidencia de LAL que sus otros grupos étnicos.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA LAL EN EL GRUPO ÉTNICO MAYA Y EN NIÑOS DE LA CIUDAD DE MÉXICO

En población Maya, la incidencia de LAL se ha reportado en 35.8 casos por millón de niños menores de 15 años para el periodo de 1998–2000.¹¹ Lo anterior, es concordante con la incidencia reportada para este subtipo de LAL en países desarrollados. No así, en la Ciudad de México, en donde no sólo se ha reportado una mayor frecuencia de LAL sino además la relación de niños clasificados clínicamente como “alto riesgo” se encuentran en una relación de uno a uno con los niños clasificados como de riesgo estándar. En la población que atiende los EUA la proporción es de 1 a 4. El inmunofenotipo pre B, está presente en alrededor del 70% de todas las LAL en niños mexicanos, con una frecuencia elevada del inmunofenotipo T, con cerca del 23%. El pico de edad de aparición de las LAL pre B, temprana está entre los 2 y 4 años, pero vuelve a tener un pico entre los 6 y 8 años, eso reportado en otras poblaciones.³

Por otro lado, aunque no existen datos de supervivencia o del pronóstico de la enfermedad en niños del grupo étnico Maya, si se cuenta con datos del pronóstico de niños con LAL atendidos en hospitales públicos de la Ciudad de México. Se ha reportado que la mortalidad temprana durante el primer mes del tratamiento es elevada (5-15%) en comparación con la reportada para países desarrollados que es de menos del 1%. Además, durante el primer año de tratamiento, fallecen el 13% y recaen el 17% de los niños de la Ciudad de México, lo cual es tres veces mayor a lo reportado para países desarrollados para el mismo tiempo de seguimiento. Por lo que es imprescindible identificar aquellos factores de riesgo para desarrollar la enfermedad, así como para identificar los factores asociados a un peor pronóstico en dicha población.¹²

A nivel mundial, la frecuencia, la distribución por edades, y los subtipos de LAL muestran diferencias geográficas notables que podrían reflejar la variabilidad en la susceptibilidad genética, los factores ambientales o ambos. Numerosos defectos genéticos constitucionales (por ejemplo, la trisomía 21, inmunodeficiencia congénita y ataxia telangiectasia) se han relacionado con un mayor riesgo de LAL en niños; sin embargo, en la mayoría de los casos de LAL carecen de una explicación causal plausible. Una hipótesis es que las leucemias infantiles con la consecuencia de la respuesta inmunológica anormal ante una infección común, tal vez precedido por un evento mutacional iniciado en el útero. Por último, los hermanos de los niños con LAL tienen de dos a cuatro veces más de riesgo para padecer LAL que los niños en la población general, y el riesgo es mucho mayor entre los gemelos monocigóticos, especialmente durante los primeros años de vida.¹³

CITOGENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA LAL

Una comprensión limitada de la leucemia y el fenotipo neoplásico de progenitores linfoides transformados ha sido un gran obstáculo para el desarrollo de la terapia segura para los niños con LAL. Los estudios de isoenzimas, marcadores inmunológicos y otras expresiones del fenotipo celular proporcionan pistas valiosas a la etiología de la LAL, pero no son tan útiles para entender los mecanismos de transformación o de mantenimiento del estado maligno leucémico.¹⁴

Los análisis genéticos han revelado que algunas alteraciones cromosómicas de tipo estructural, numérico o una combinación de ambos están asociados a la transformación maligna (Fig. 1). En más del 90% de los niños con LAL se han identificado anormalidades citogenéticas clonales, que pueden ser de dos tipos:

I.- Cambios numéricos:

Los cambios numéricos involucran ganancia (Hiperdiploidía baja con 47-50 cromosomas o hiperdiploidía alta mayor a 50 cromosomas) o pérdida de cromosomas (hipodiploidía o cariotipos cercanos al número haploide). En LAL cerca del 25% al 30% de los casos presentan hiperdiploidía alta; es decir más de 50 cromosomas por célula leucémica.

II.- Cambios estructurales:

Los cambios estructurales incluyen translocaciones (t) (ruptura y fusión de segmentos, deleciones (del) (se pierde una parte de un brazo de un cromosoma), o inserciones (un segmento de un cromosoma se intercala dentro del mismo cromosoma). En más del 75% de los pacientes con LAL se observan translocaciones cromosómicas.¹⁰

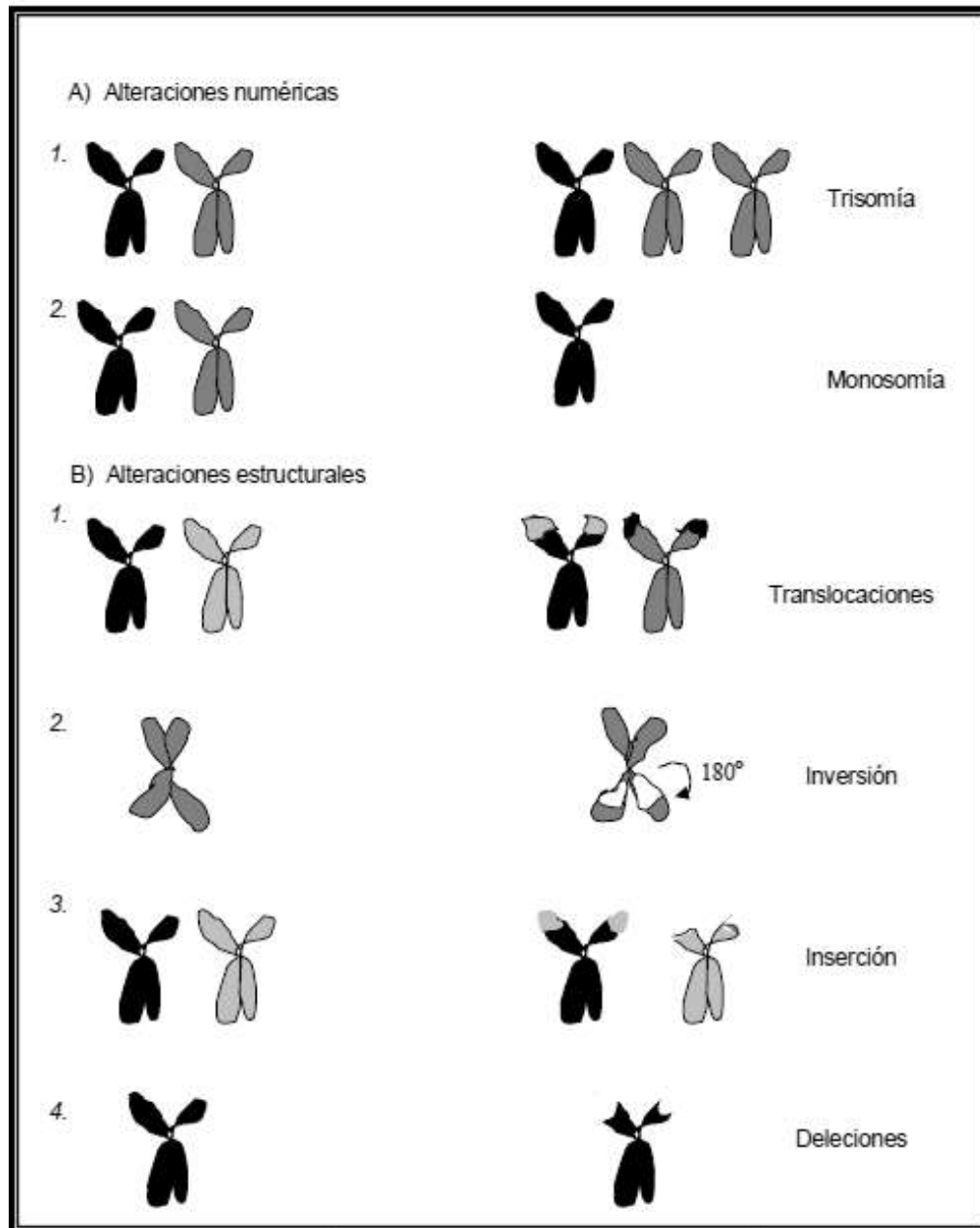


Figura.1 Alteraciones cromosómicas en leucemia. A) Alteraciones numéricas: ganancia (1) o pérdida (2) de cromosomas, B) Alteraciones estructurales: rearrreglos y pérdida de material genético de un cromosoma (1-4) (Jiménez, 2002).

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA: UNA ENTIDAD COMPLEJA

La LAL es una entidad compleja porque en su desarrollo participan múltiples factores ambientales y factores genéticos de riesgo.

Dentro de los factores ambientales la exposición a radiaciones ionizantes o a fármacos quimioterapéuticos específicos han sido los más estudiados. Sin embargo, factores como el peso al nacer, la ocupación de los padres, la historia reproductiva materna, el uso de vitamina prenatal, la exposición a los pesticidas o disolventes, y la exposición a los niveles altos de campos magnéticos residenciales, de frecuencia industrial también son considerados como importantes factores de riesgo para la LAL infantil.¹³ Por otro lado, se ha dado importancia al papel de los virus la etiología de las leucemias debido a que la mayoría de los casos se producen en un periodo de la vida en el cual el sistema inmune está en desarrollo y podría ser más susceptible a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales. Hasta el momento, el virus de Ebstein-Barr, en la LAL-L3, y los HTLV I y II, en algunos casos de leucemias del adulto, han sido los únicos con una clara asociación.⁷

Dentro de los factores genéticos descritos como elementos que confieren riesgo a LAL, se encuentran los genes que tienen una participación relevante en la hematopoyesis, el sistema inmune, la proliferación, diferenciación celular y apoptosis. Estos genes se conocen como genes candidato y su estudio ha contribuido enormemente para incrementar el entendimiento de los procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de ésta y otras neoplasias hematológicas. Actualmente se sabe que variaciones en la secuencia de estos y otros genes, denominados polimorfismos, confieren riesgo para padecer la enfermedad o se asocian a la respuesta al tratamiento. Existen varios tipos de polimorfismos, pero los más comunes son las variaciones en la secuencia del DNA de un solo nucleótido o SNP (del Inglés: Single Nucleotide Polymorphism) y son los principales blanco de estudio en proyectos dirigidos a conocer las bases genéticas de las enfermedades complejas como la LAL.

En el estudio de las bases genéticas de la LAL existen diferentes abordajes, entre los cuales se incluyen los análisis de ligamiento y los estudios de asociación, estos últimos de elección para el análisis de las entidades comunes.

ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN

Los estudios de asociación evalúan la co-ocurrencia de un marcador con la enfermedad en individuos no relacionados. Estos estudios son utilizados ampliamente en el abordaje de las entidades complejas porque son menos costosos, es más fácil obtener muestras de individuos no relacionados y se pueden detectar genes con un efecto pequeño en la enfermedad. En los estudios de asociación existen dos principales tipos de diseño: a) casos y controles y b) estudios basados en familias (tríos: padres y paciente).

a) Los estudios de casos y controles comparan las frecuencias de una variante alélica o polimorfismo específico entre el grupo de pacientes y la población de controles sanos. La predominancia o disminución del alelo en alguna de las poblaciones de estudio sugiere que esta variante es causal, se encuentra cercana al alelo involucrado con la enfermedad, se asocia a la gravedad o a la respuesta al tratamiento.

b) El análisis de la asociación basada en familias (TDT), se realiza en tríos, con el objeto de obtener tanto casos como controles dentro de la misma familia. Sin embargo, la principal limitante de esta estrategia es la disponibilidad del número de tríos que permita obtener un poder estadístico adecuado (>80%).¹⁵

POLIMORFISMOS

Los estudios de asociación son la estrategia de elección para la identificación de factores genéticos asociados al desarrollo de entidades complejas como la LAL.

Estos estudios analizan principalmente polimorfismos. A diferencia de las mutaciones, los polimorfismos se encuentran en una frecuencia mayor al 1% en la población general. Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Los polimorfismos son la base de la evolución y los que se consolidan, bien pueden ser silentes o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades (mutación). Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de “alta penetrancia” ya que los portadores de la variante suelen manifestar

las enfermedades con una alta probabilidad. Estas variantes suelen ser de baja frecuencia (<1%) en la población general.¹⁶ En la actualidad muchos investigadores centran sus trabajos en identificar genes con polimorfismos frecuentes en una población y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad (son los llamados “polimorfismos de baja penetrancia”). También se les denomina variantes que confieren susceptibilidad genética a la enfermedad, pero no es determinante en el desarrollo de ésta. Los polimorfismos más frecuentes son los SNP. Otros polimorfismos son repeticiones en un número variable de una secuencia corta (en tándem). En otras ocasiones, los polimorfismos se deben a deleciones o inserciones de secuencias cortas de nucleótidos. Los polimorfismos pueden provocar un cambio de aminoácido en la proteína y con ello modificar su actividad o función. También pueden ocurrir en zonas del promotor (modulan el proceso de transcripción del ADN en ARN) de un gen y modificar su expresión.

Los SNPs, son los polimorfismos más abundantes de variación en el genoma humano, se estima que hay una por cada 300 pares de bases, constituyendo más del 90% de todos los polimorfismos humanos. La mayoría de los SNPs solo tienen dos alternativas (bialélicos) y ocurren en el DNA no codificante. Dado que son muy abundantes, los SNPs son los polimorfismos más utilizados en los estudios de asociación genética, para conocer a los genes relacionados con el desarrollo de enfermedades en las que están implicados múltiples genes, como es el caso de la LAL.¹⁷

GENES ASOCIADOS A LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA

Los diversos estudios de asociación realizados en diferentes poblaciones han mostrado que más de un centenar de genes podrían estar asociados a LAL. De hecho se ha demostrado que los polimorfismos de baja penetrancia en genes que participan en la reparación del DNA, en la respuesta a xenobióticos, en el sistema inmune, genes reguladores, etc., predisponen al desarrollo de la enfermedad.^{18,19} Otros estudios apuntan a que los genes que participan el metabolismo de los hidrocarburos o con un papel potencial en la respuesta inmune e innata y adaptativa del hospedero pueden tener relevancia en la etiología del LAL.^{8,20,21} En el primer grupo se encuentran los citocromos *CYP1A1*,

CYP2D6, *CYP2E1* y *CYP3A5*, así como *XRCC1*, *GSTP1*, *GSTT1*, *CYP2E1*, *NAT2* y *NQO1*, los cuales también se han asociado a riesgo alto de recaídas tempranas, toxicidad a la quimioterapia, menor resistencia a agentes antineoplásicos y menor sobrevida.^{22,21,23} En el segundo grupo están *IL12A*, *HLA-DP*, *HLA-DOA*, *IL12A*, *CD28*, *FCGR2*, *GATA3*, *STAT4* y *STAT6*, entre otros.²⁴ Por otro lado, Yang JJ y colaboradores realizaron un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) en dos ensayos clínicos prospectivos de niños con LAL tratados con regímenes de (MP). Observaron dos loci del genoma asociados a respuesta a MP, *TPMT* y *NUDT15*. *TPMT* es una enzima citosólica responsable de la metilación (inactivación) de MP y *NUDT15* es un mecanismo de salvaguardia en células de mamífero para minimizar el daño del ADN y evitar la posterior reparación y la apoptosis. Yang JJ y colaboradores observaron que la variante rs1142345 en *TPMT* correlaciona con toxicidad hematológica y la variante rs116855232 en *NUDT15* se describe como otro locus asociado con la intolerancia a MP y toxicidad excesiva.²⁵

Cabe mencionar que algunos de los genes que han sido más replicados como asociados al riesgo a LAL, incluyen a los genes *ARID5B* (del inglés: AT rich interactive domain 5B (MRF1-like), *ASS1* (Del inglés: Argininosuccinate synthase 1), *PIP4K2A* (del inglés: Phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha) y *miR146a* (del inglés: microRNA 146a).

ARID5B

El gen *ARID5B* se localiza en el brazo largo del cromosoma 10, en la región q21.2, tienen una longitud de 195.70 kb, está constituido por 10 exones y genera 2 transcritos (Fig. 2).²⁶ Codifica para un miembro de la familia de proteínas con un dominio de rico en AT de unión a ADN. La proteína codificada forma un complejo de desmetilasas de histonas H3K9me2 y regula la transcripción de genes diana implicados en la adipogénesis y desarrollo de hígado. Este gen también juega un papel en el crecimiento celular y la diferenciación de progenitores de linfocitos B. Diversas evidencias indican que *ARID5B* tiene un papel en el desarrollo de linfocitos B, y se ha observado una sobreexpresión de este gen en neoplasias hematológicas, como leucemia promielocítica aguda y la leucemia aguda megacarioblástica. Sin embargo, el papel de *ARID5B* en la LAL infantil sigue siendo desconocido. Este gen tiene 5,439 variantes de las cuales 4,509 están localizadas en intrones destacando el hecho de que todos los SNPs situados en el intrón 3 que exhiben un alto desequilibrio de ligamiento (LD) se asocia al riesgo de LAL. Los más ampliamente estudiados son rs10821936, rs7089424.^{27,28}

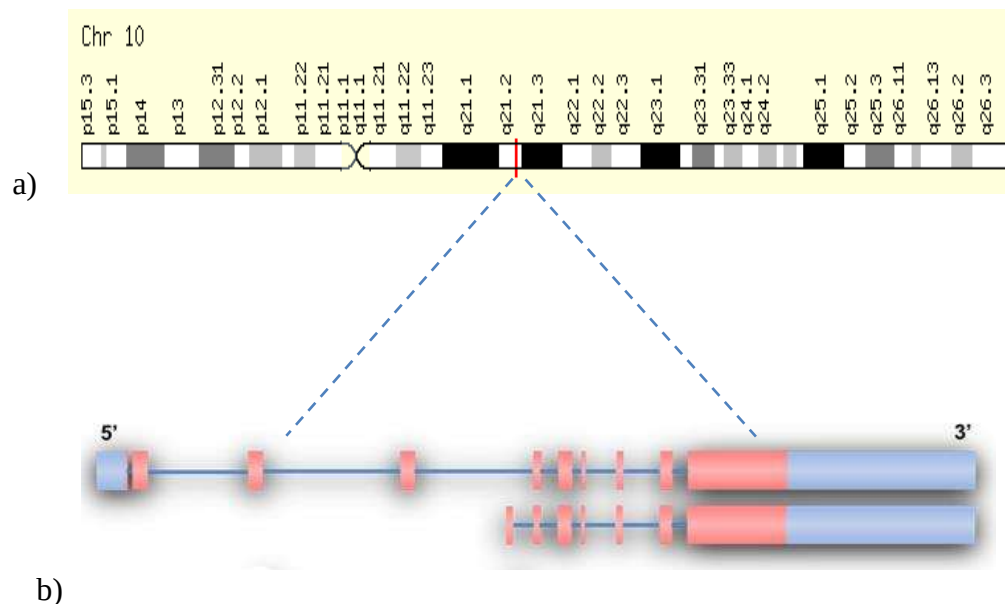


Figura 2. Gen *ARID5B*: a) Localización cromosómica; b) Estructura del gen. El color azul representa regiones no traducibles y en rojo las regiones traducibles.

ASS1

El gen *ASS1* se encuentra en el brazo largo del cromosoma 9, dentro de la banda 9q.34.11-9q34.12 y alberga 16 exones (Fig. 3). Para este gen se ha descrito entre 10 y 14 copias homólogas que se pueden considerar como pseudogenes dispersos por todo el genoma humano. Sin embargo, la secuencia en el cromosoma 9 parece ser la única base para una proteína funcional. Dos transcritos diferentes resultan de corte y empalme alternativo en el exón 2, dependiendo del órgano de expresión. El gen se extiende por 63 kb y tiene un marco de lectura abierto de 1259 kb. Produce una proteína homotetramérica compuesta de monómeros de 45 kD. La enzima se describe generalmente como una molécula de tres dominios: un dominio de unión a nucleótidos que contiene una secuencia de consenso pirofosfatasa ATP, el dominio sintetasa y un dominio de oligomerización C-terminal.²⁹

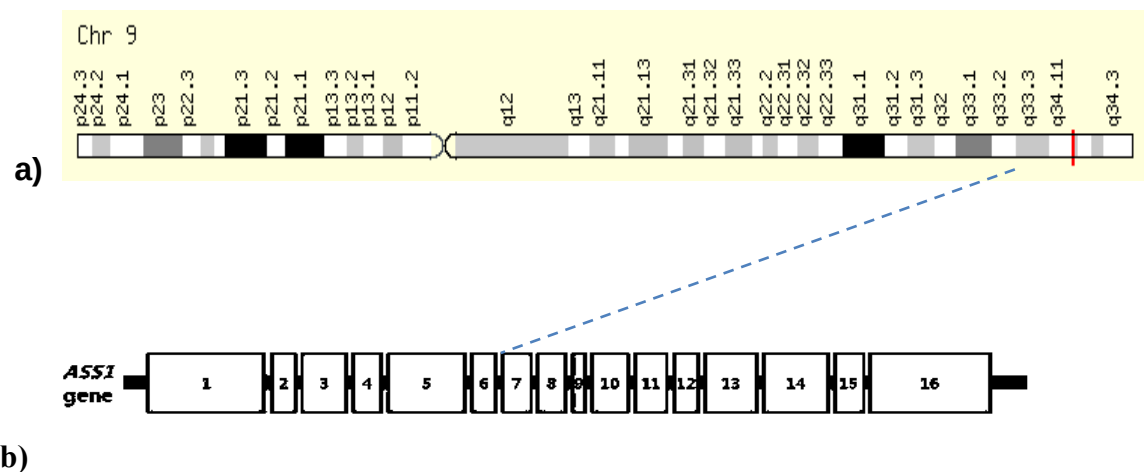


Figura 3. Gen *ASS1*: a) Localización cromosómica; b) Estructura del gen.

PIP4K2A

PIP4K2A se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 10 en la región p12.2, tiene una longitud de 179.00 kb, alberga 10 exones y genera 8 transcritos.³⁰ Este gen es precursor de segundos mensajeros de las vías de transducción de señal fosoinositol, se cree que está implicado en la regulación de la secreción, la proliferación celular, la diferenciación, y la motilidad celular. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de enzimas capaces de catalizar la fosforilación de la fosfatidilinositol-5-fosfato en el cuarto hidroxilo del anillo de myo-inositol para formar -fosfatidilinositol 5,4-bifosfato. La secuencia de aminoácidos de esta enzima no muestra homología con otras quinasas, pero la proteína recombinante sugiere que tiene actividad quinasas.³¹

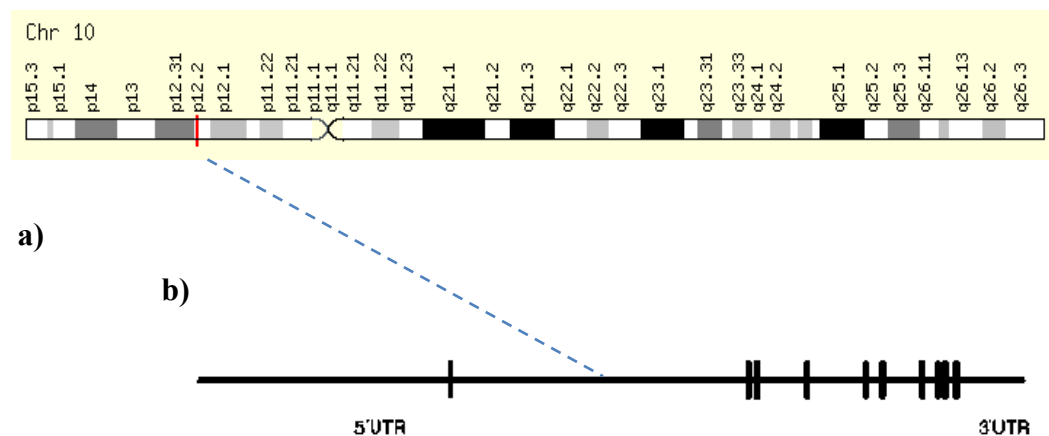
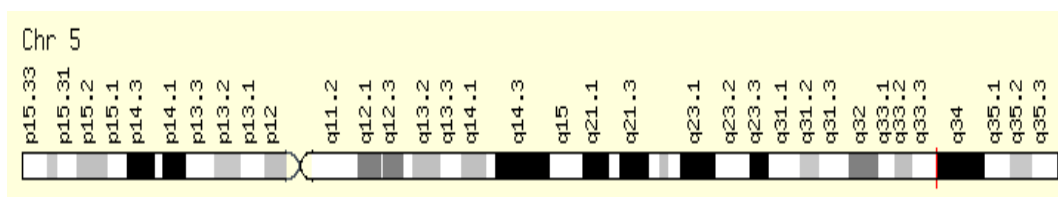


Figura 4. Gen *PIP4K2A*: a) Localización Cromosómica; b) Estructura del Gen.

miR146a

El gen del microRNA 146a (*miR-146a*) se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 5 en la región q34.³² Se ha propuesto que este miRNA tiene un papel oncogénico ya que se sobreexpresa en LAL pediátrica, leucemia mieloide aguda (LMA) y cánceres solidos como mama, páncreas y próstata.^{33,34}

Figura 5. Gen *miR146a*. Localización cromosómica



JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes avances en el conocimiento y tratamiento de las leucemias, todavía un porcentaje considerable de niños muere por esta enfermedad o por los efectos secundarios de la terapia. Por lo tanto, la leucemia sigue siendo la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en pediatría y aún más se reporta una tendencia ascendente en la incidencia y en la tasa de mortalidad de esta neoplasia en niños mexicanos de 0 a 14 años.

En la Ciudad de México no sólo se ha reportado una mayor frecuencia de LAL sino además la relación de niños clasificados clínicamente como de alto riesgo es de uno a uno con los niños clasificados como de riesgo estándar a diferencia de lo que se observa en otras poblaciones, donde existe una relación de 1 paciente de alto riesgo por 3 de riesgo estándar.

Se ha reportado que el componente característico de una población puede explicar porque existen diferencias en la prevalencia, gravedad y respuesta al tratamiento entre las poblaciones. Por lo tanto, se propone que su conocimiento no sólo puede llevar al entendimiento de los mecanismos etiopatogénicos de la enfermedad; sino que además puede sentar las bases para el desarrollo de estrategias de diagnósticos más oportunos y de medicamentos más específicos y con menos efectos colaterales. Así esta tesis pretende conocer si polimorfismos en genes candidato son factores de riesgo para padecer LAL en niños mexicanos.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL

Conocer si SNPs en los genes *ARID5B*, *ASS1*, *PIP4K2A* y *miR146a* se asocian a la susceptibilidad para padecer leucemia aguda linfoblástica en niños mexicanos.

OBJETIVOS PARTICULARES

Conocer las frecuencias de SNPs en *ARID5B*, *ASS1*, *PIP4K2A* y *miR146a* en dos grupos étnicos de México.

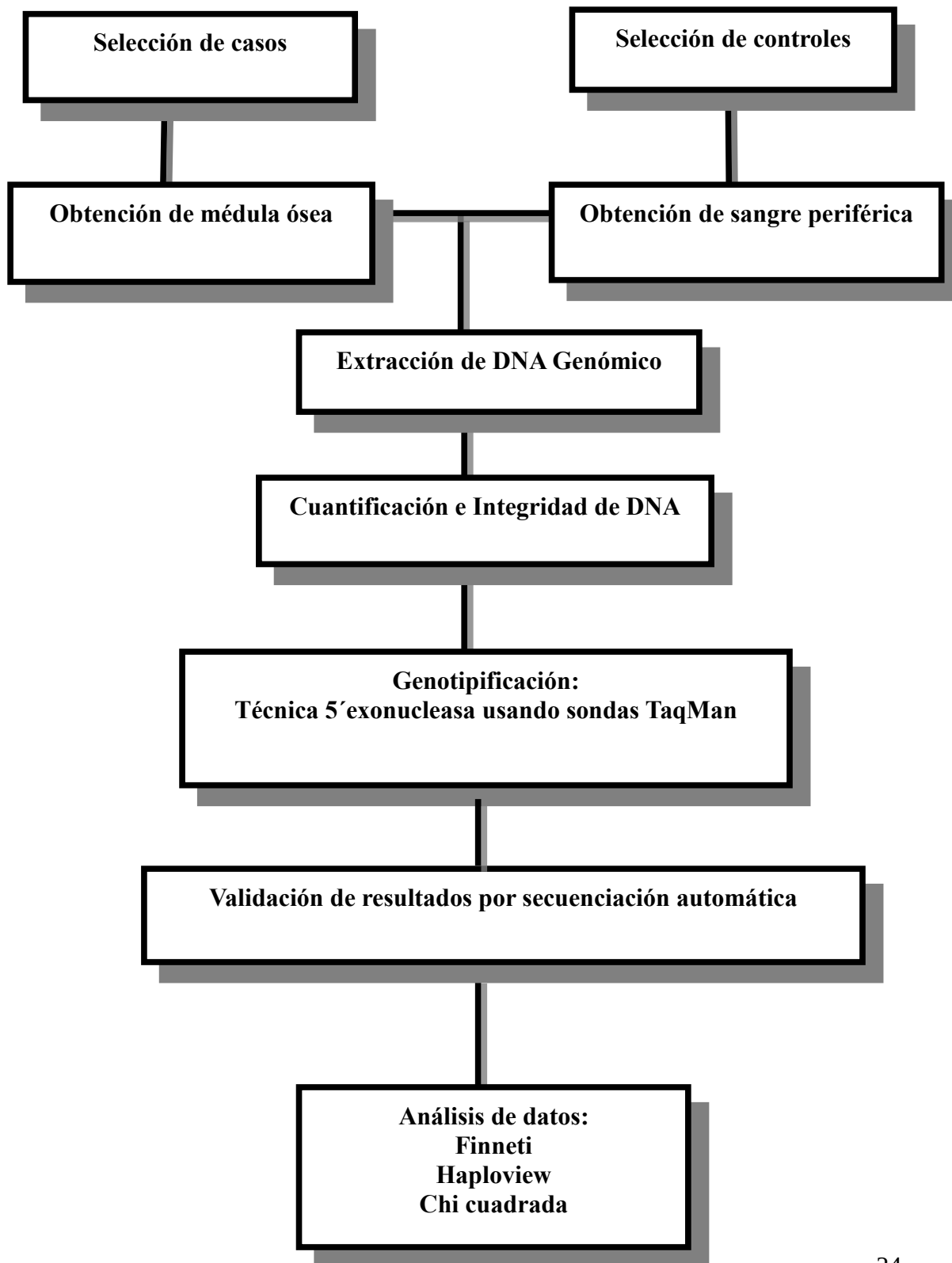
Determinar si SNPs en los genes evaluados confieren riesgo o protección para LAL en niños mayas y mestizos.

Determinar si existen diferencias inter-étnicas en la asociación de los SNPs estudiados y LAL.

METODOLOGIA.

ESTRATEGIA GENERAL

Estudio de asociación caso-control, prospectivo, observacional, descriptivo y comparativo.



POBLACIÓN DE ESTUDIO

En un estudio de asociación de casos y controles se incluyeron 866 individuos no vinculados, de los cuales 204 pacientes pediátricos con diagnóstico LAL, 111 fueron incluidos en la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) -IMSS, Mérida, Yucatán (hospital de tercer nivel), 93 reclutados de varias instituciones de la Ciudad de México. Se incluyeron 662 individuos sanos no relacionados del banco de ADN del Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, (INMEGEN).

POBLACIÓN OBJETIVO.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ⤴ **Casos:** Individuos de 1 a 17 años con diagnóstico clínico de LAL sin tratamiento antileucémico.
- ⤴ **Controles:** Individuos sanos, sin antecedentes de LAL y otras enfermedades crónicas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ⤴ **Casos:** Pacientes con trasplante de médula ósea por otra causa y aquellos con diagnóstico de cualquier otra enfermedad crónica concomitante.
- ⤴ **Controles:** Individuos que presentaban diabetes, enfermedades autoinmunes o inflamatorias.

ANALISIS MOLECULAR

Obtención de muestras

En el grupo de los controles, se tomó muestra de sangre periférica (5 ml), previa obtención de consentimiento bajo información del padre o tutor del niño. Las muestras fueron tomadas por los investigadores participantes del grupo de laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas, (INMEGEN).

En el grupo de los casos (niños con leucemia), las muestras correspondieron a médula ósea tomada al momento de la confirmación diagnóstica por hematólogos/oncólogos pediatras previo consentimiento informado de los padres y asentimiento informado en los niños mayores a 8 años. Los datos clínicos fueron proporcionados por el Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia Infantil quienes llevan a cabo estudios multicéntricos de genómica y supervivencia en niños atendidos en Hospitales Públicos de México.

Las muestras fueron colocadas en tubos Falcón de 15 ml y se centrifugaron a 3500 rpm durante 15 minutos para separar a los linfocitos.

Extracción de ADN

Para la extracción de ADN, se utilizó el Kit QIAgen Blood (QIAGEN, GmbH d-40724, Hilden). Se hizo la separación de los leucocitos centrifugando los tubos vacutainer a 3,000 rpm durante 15 min, posteriormente se separó la capa de leucocitos y se transfirió a un tubo Falcón de 15 ml. Las células fueron lavadas con 12 ml de solución de lisis de eritrocitos y centrifugadas a 3,000 rpm por 10 min para obtener el botón de leucocitos. A partir de los leucocitos se realizó la extracción de ADN genómico, para lo cual se adicionaron 3 ml de solución de lisis celular al tubo que contenía el botón de células blancas y se agitaron vigorosamente en el vortex durante 1 min hasta eliminar los agregados celulares. Posteriormente, a este mismo tubo se le agregó 1 ml de solución para precipitar proteínas, se agitó vigorosamente en el vortex durante 1 min y se transfirió cuidadosamente a un tubo limpio, al cual se agregaron 5 ml de isopropanol para precipitar el ADN. Las hebras de ADN se hicieron evidentes después de agitar el tubo por inversión

por lo menos 6 veces. Finalmente con una pipeta Pasteur se extrajo el ADN y se diluyó en 500 ul de Buffer TE (TEKNOVA).

Cuantificación y evaluación de la integridad de ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un espectrofotómetro (nanodrop) a una longitud de onda de 260 nm. El sistema arrojó la concentración en ng/ul, tomando en cuenta el valor de DO260 (densidad óptica a 260 nm) y la constante para ADN (0.05). La evaluación de integridad del ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. En el gel se cargaron 5 ul de ADN con 5 ul de mix (Biotium-Acarreador). La electroforesis se corrió a 100 volts durante 30 minutos en Buffer de TBE al 1X y finalmente se observó en un transiluminador con luz UV la integridad del ADN se consideró adecuada cuando se observó una banda de alto peso molecular.

Genotipificación

Se incluyeron cinco SNPs distribuidos en los genes *ARID5B* (rs928518, rs10821936), *ASS1* (rs928518), *PIP4K2A* (rs70883118) y *miRNA146a* (rs2910164).

La genotipificación de los polimorfismos se realizó empleando la metodología 5' exonucleasa usando sondas Taqman (Applied Biosystem Foster City, CA, USA). Para la preparación de las placas se realizaron diluciones de las muestras de ADN a 6µg/µl. En placas de 96 pozos se adicionaron 5µl de cada dilución, por lo que cada pozo tuvo una concentración final de 30ng por muestra. Las placas se dejaron liofilizar a temperatura ambiente por un día.

Las reacciones de PCR punto final se utilizaron 2.5µl de Master mix establecido por el proveedor Applied Biosystems, 0.08µl de sonda y 2.4µl de agua para cada muestra. Se realizó el mix de reacción para 96 muestras con las muestras que se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Mezcla de la reacción para PCR punto final.

Reactivos	Volumen	
	1x	96x
H ₂ O grado molecular	2.42µl	232.3µl
Universal PCR Master Mix	2.50µl	240.0µl
Sonda	0.08µl	7.7µl
Volumen final	5µl	480µl

Posteriormente con ayuda de una pipeta multicanal se dispensaran 5µl de la mezcla reacción en cada pozo de una placa previamente etiquetada, la placa fue sellada con una cubierta óptica y se centrifugar por unos segundos. Finalmente se colocó un pad sobre la placa y se lleva a un termociclador GeneAmp PCR System 9700. Cuyas condiciones se observan en la Figura 6.

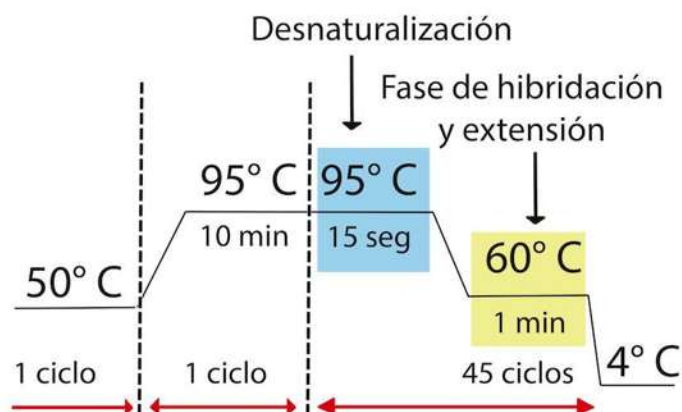


Figura 6. Condiciones de termociclador para PCR punto final.

Para cada ensayo de discriminación alélica se diseñaron 2 sondas específicas marcadas en el extremo 5' con fluorocromos diferentes, VIC para el alelo 1 y FAM para el alelo 2. Además, ambas sondas contenían en el extremo 3' un "quencher" (TAMRA) el cual mientras la sonda permanecía intacta, inhibía la emisión de fluorescencia. Durante la reacción de PCR, los primers hibridan con una secuencia específica del templado de ADN. Si este contiene la secuencia polimórfica, la sonda Taqman también híbrida con su

secuencia homologa. Durante la PCR, la AmpliTaq Gold, que tiene actividad tanto de ADN polimerasa como de exonucleasa 5'-3', es capaz de digerir la sonda marcada durante la amplificación y liberar el colorante fluorescente de la acción del “quencher”, de tal manera que dadas las condiciones de astringencia utilizadas durante la reacción, sólo la sonda específica para el polimorfismo presente es capaz de hibridar.^{35,36} Esto nos permite diferenciar un alelo del otro con base en el tipo de fluorescencia emitida (Fig. 7).

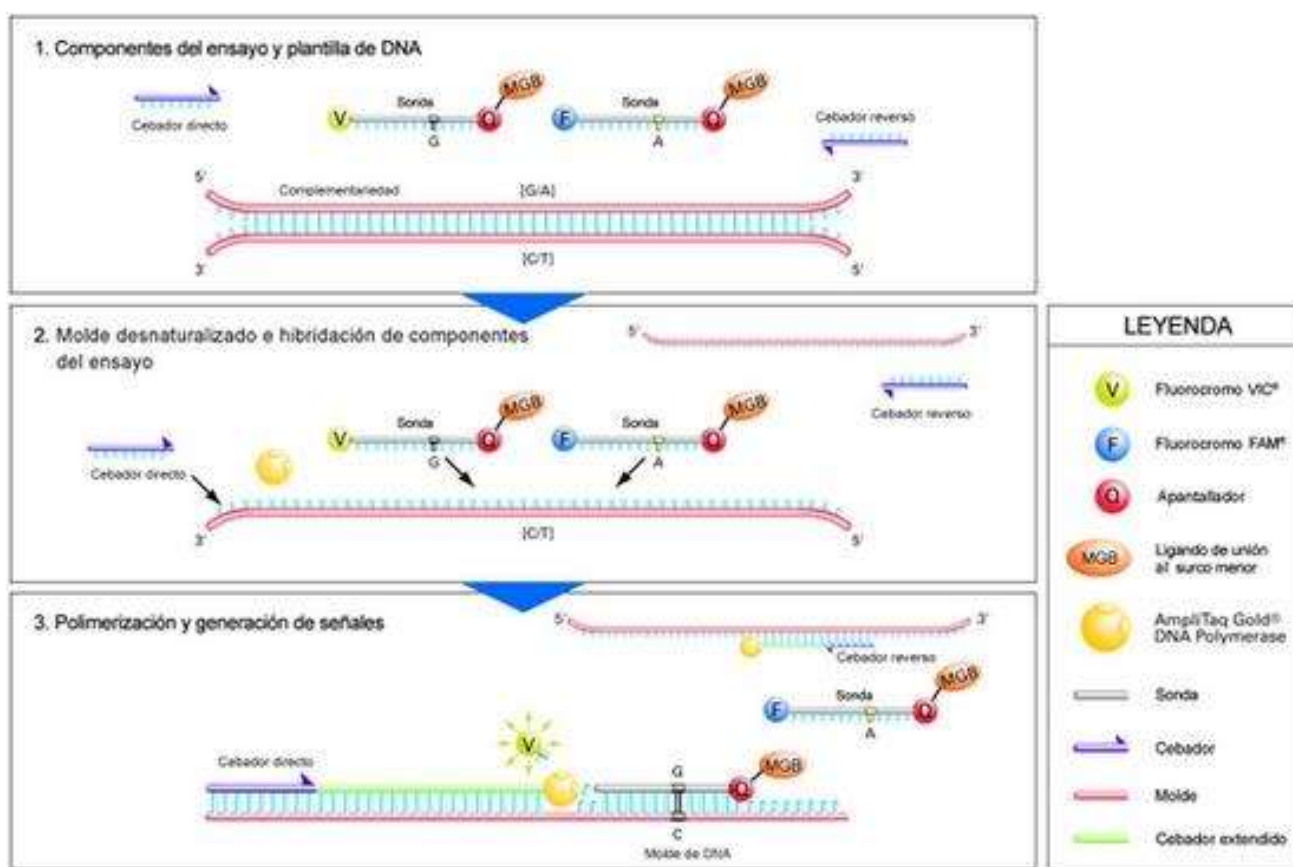


Figura 7. Mecanismo de discriminación alélica por sondas Taqman.

Al concluir la reacción de PCR se cuantifica la fluorescencia obtenida (Fig. 8). La lectura de fluorescencia para la determinación de los genotipos se llevó a cabo en el equipo de tiempo real 7900HT Fast Real-Time PCR System.

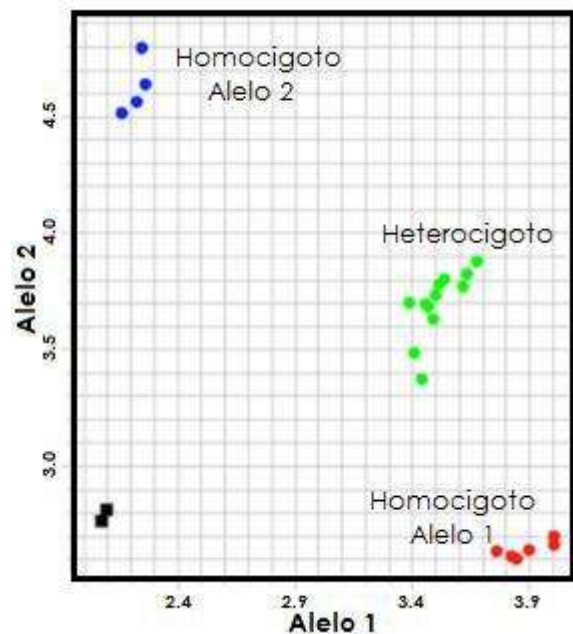


Figura 8.- Gráfica de discriminación alélica.

ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN AUTOMÁTICA

La validación de los genotipos fue realizada mediante secuenciación automática. En la secuenciación de los SNP se utilizó el kit Bit Dye Terminator v3. Las condiciones de amplificación fueron: 50 ng de ADN genómico, 2.5 pmoles de cada primer, 2 Mb de cada dNTP, 1 U de AmpliTaq Gold ADN Polimerasa, 1.5 mM de MgCl₂ y 1X de buffer (Applied Biosystem Foster City, CA USA).

Los métodos de secuenciación de DNA se desarrollaron a finales de los años 1970 y revolucionaron de forma significativa el mundo de la Genética Molecular. El método de Sanger y cols (1977), está basado en una secuencia que incluye la muestra de DNA a secuenciar, un cebador (sentido o antisentido), DNA polimerasa, deoxinucleótidos (dNTPs) y terminadores dideoxinucleótidos (ddNTPs) acoplados cada uno de ellos a un fluorocromo característico. Aunque los terminadores se incorporan a la nueva cadena de la misma forma que se incorporan los nucleótidos convencionales, los terminadores carecen del grupo 3'-OH necesario para la elongación de la cadena. Por esta razón, cuando se incorpora un terminador a la nueva cadena creciente de DNA, la ausencia del grupo hidroxilo evita la formación del puente fosfodiéster con el siguiente nucleótido y la elongación de la cadena

se termina en ese punto, generando fragmentos de tamaño variable marcados cada uno de ellos con un fluorocromo distinto.³⁷ Estos fragmentos se separan en un gel de poliacrilamida y la señal emitida se traduce en un pico característico en el electroferograma. (Fig. 9).

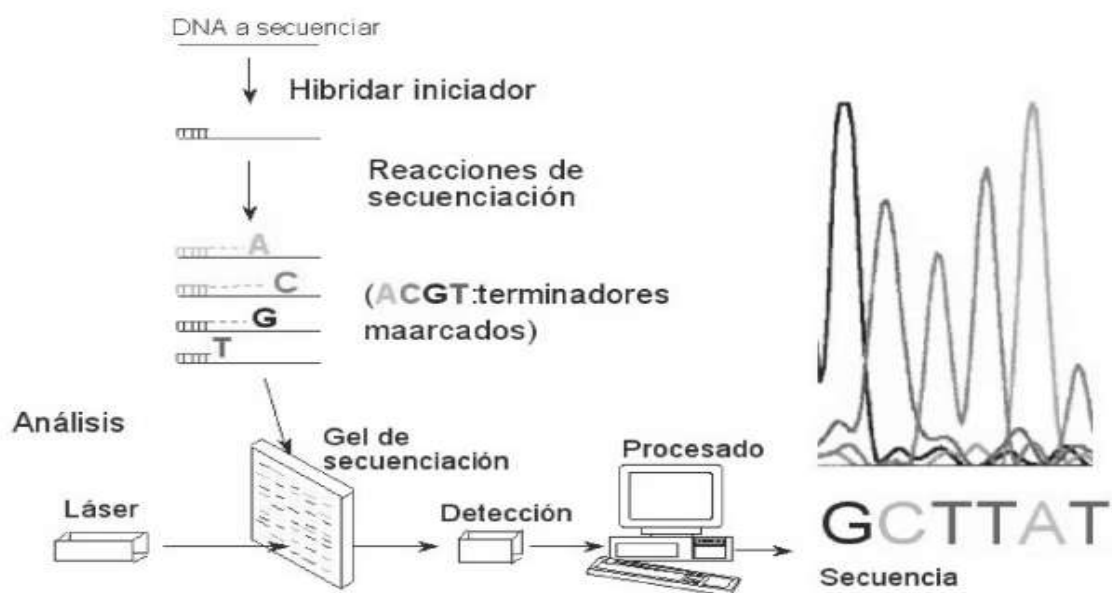


Figura 9. Secuenciación automática del DNA.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significancia estadística de las diferencias en la distribución de alelos y genotipos fue evaluada mediante la prueba de X^2 incluida en el programa Epi Info v.6.02 (CDC Atlanta USA). Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados como significativos. La evaluación de equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE por sus siglas en inglés) se realizó a través del programa FINNETI (<http://ihg2.helmholtz-muechen.de/cgi-bin/hw/hwa1>).

Así mismo, el programa Haploview 3.32 permitió la generación y análisis de haplotipos (<http://www.broad.mit.edu/mpg/haploview/contact.php>) y solo se tomaron en cuenta los haplotipos que se presentaron en $<1\%$.

RESULTADOS

POBLACIÓN ANALIZADA

En este trabajo de investigación se incluyeron un total de 866 individuos no relacionados: 204 pacientes con diagnóstico clínico LAL. De estos 113 (55.4%) fueron del género masculino y 91 (44.6%) femeninos. La población control estuvo conformada por 662 individuos sanos: 276 (41.7%) masculinos y 386 (58.3%) femeninos. Ciento once casos y 204 controles procedieron de Mérida Yucatán, por su parte 93 casos (LAL) y 458 controles (niños y adultos) fueron reclutados de la Ciudad de México. Todos los pacientes eran <16 años de edad en el inicio de la enfermedad, con una media ($\pm$ DE) de $5,7 \pm 2,8$, (maya: $5,7 \pm 2,8$ y mestiza: $8,7 \pm 2,46$ años (Tabla 4).

Tabla 4. Población analizada.

MAYAS			MESTIZOS		
Género	Casos	Controles	Casos	Controles	
	n (%)	n (%)		Niños n (%)	Adultos n (%)
Masculino	62 (56)	45 (22)	51 (55)	60 (52)	171 (50)
Femenino	49 (44)	159 (77)	42 (45)	55 (48)	172 (50)
Total	111 (100)	204 (100)	93 (100)	115 (100)	343 (100)

*Creación propia

GEN *ARID5B*

La distribución de los genotipos de los rs10821936 (T/C) y rs7089424 (T/G) de *ARID5B* se encontraron en HWE. El análisis comparativo en las frecuencias alélicas y genotípicas entre casos y controles en población maya, no se observaron diferencias estadísticamente significativas para ninguna de las dos variantes analizadas (rs10821936: $p = 0.73$) y (rs7089424: $p = 0.77$) (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ARID5B* y leucemia aguda linfoblástica en población maya.

ID SNP	Genotipos/ Alelos	Mayas		P
		Casos n%	Controles n%	
rs10821936	TT	18 (16.6)	24 (12.3)	0.11
	CT	37 (33.9)	90 (45.9)	
	CC	54 (49.5)	82 (41.8)	
rs7089424	T	73 (33.5)	138 (35,2)	0.73
	C	145 (66.5)	254 (64,8)	
rs7089424	TT	17 (15.4)	23 (11.7)	0.19
	GT	39 (35.4)	90 (45.9)	
	GG	54 (49.2)	83 (42.3)	
	T	73 (33.2)	136 (34.7)	0.77
	G	147 (66.8)	256 (65.3)	

En población mestiza, comparando las frecuencias alélicas y genotípicas de ambas variantes entre niños LAL vs niños sanos se encontró que el MAF fue mayor en casos que en controles (rs10821936 127(56.1%) vs 61(33.2%), rs70899424 124(53.9%) vs 63(33.8%)), respectivamente. Así para el rs10821936 se observó un OR= 2.59 (IC= 1.69-3.96, $P = 0.0000052$) y el rs70899424 fue de OR= 2.28 (IC= 1.50-3.48, $P = 0.000067$). El análisis comparativo entre niños afectados vs adultos sanos mostró un OR=2.24 (IC=1.56-

3.21), $P= 0.0000054$ para rs10821936 y $OR= 1.96$ ($IC=1.38-2.80$), $P= 0.00012$ para la variante rs7089424, respectivamente.

El análisis evidenció que el genotipo CC (rs10821936), confiere un mayor riesgo de LAL ($OR= 5.35$; $IC\ 95\%: 2.40-11.95$, $p= 0.00002$) cuando se comparó con los controles pediátricos; y se obtuvo un OR de 4.10 ($IC=2.06-8.18$, $p= 0.00003$) cuando se comparó con adultos sanos. Mientras tanto, para el GG del rs7089424 OR fue de $= 4.49$ [$2.00-10.08$], $P= 0.00018$ y de $OR= 3.34$ [$1.67-6.67$], $P= 0.00040$, comparando niños LAL vs niños sanos o adultos sanos, respectivamente. Es decir, observamos que si presentan el genotipo homocigoto para el alelo menor, el riesgo para desarrollar LAL es mayor (Tabla 6).

Tabla 6. Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ARID5B* y leucemia aguda linfoblástica en población mestiza.

ID SNP	Genotipos/ Alelos	Casos n%	Mestizos			
			Controles		OR [IC 95%], P valué	
			Niños	Adultos	vs Niños	vs Adultos
rs10821936	TT	13 (14.1)	38 (33.6)	91 (29.9)	0.000068	0.000041
	CT	35 (3.0)	51 (45.1)	138 (45.4)		
	CC	44 (47.9)	24 (21.3)	75 (24.7)		
	T	61 (33.2)	127 (56.1)	320 (52.7)	2.59[1.69-	2.24[1.56-
	C	123 (66.8)	99 (43.9)	288 (47.3)	3.96]0.0000052	3.21]0.0000054
	CC vs TT				5.35[2.40-11.95]0.00002	4.10[2.06-8.18]0.00003
rs7089424	TT	13 (13.9)	34 (29.5)	84 (26.4)	0.00035	0.00050
	GT	37 (39.7)	56 (48.6)	151 (47.5)		
	GG	43 (46.4)	25 (21.7)	83 (26.1)		
	T	63 (33.8)	124 (53.9)	319 (50.1)	2.28[1.50-	1.96[1.38-
	G	123 (66.2)	106 (46.1)	317 (49.9)	3.48]0.000067	2.80]0.00012
	TT vs GG				4.49[2.00-10.08]0.00018	3.34[1.67-6.67]0.00040

GEN *ASS1* Y *PIP4K2A*

Al comparar la frecuencias alélicas y genotípicas de casos vs los controles para la variante rs928518 (G/T) del gen *ASS1* en población maya no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P= 0.78$), (tabla 7). Después de analizar a la población mestiza comparando niños afectados vs niños sanos ($P=0.22$) y adultos sanos ($P=0.99$), para la variante rs928518, observamos que no hay asociación con LAL (Tabla 8). De la misma forma el SNP rs7088318 de *PIP4K2A* no observo diferencias estadísticamente significativas en su distribución entre casos y controles mayas ($P= 0.99$), (Tabla 7). El comportamiento fue similar en la población mestiza: niños afectados vs niños sanos ($P=0.13$) y niños afectados vs adultos sanos ($P=0.41$), (Tabla 8).

Tabla 7. Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ASS1*, *PIP4K2A* y leucemia aguda linfoblástica en población maya.

ID SNP	Genotipos/ Alelos	Mayas		P
		Casos n%	Controles n%	
rs928518	TT	39 (35.8)	85 (42.9)	0.13
	TG	62 (56.8)	90 (45.5)	
	GG	8 (7.4)	23 (11.6)	
rs7088318	T	140 (64.3)	260 (65.7)	0.78
	G	78 (35.7)	136 (34.3)	
				0.99
	AA	83 (76.8)	147 (77.3)	
	AC	22 (20.4)	38 (20)	
	CC	3 (2.8)	5 (2.7)	
	A	188 (87.1)	332 (87.3)	0.99
	C	28 (12.9)	48 (12.7)	

Tabla 8. Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *ASS1*, *PIP4K2A* y leucemia aguda linfoblástica en población mestiza.

ID SNP	Genotipos/ Alelos	Casos n%	Mestizos			
			Controles n%		P	
			Niños	Adultos	vs Niños	vs Adultos
rs928518	TT	32 (34.7)	34 (29.8)	114 (35.9)	0.36	0.85
	TG	44 (47.9)	51 (44.7)	142 (44.7)		
	GG	16 (17.4)	29 (25.5)	61 (19.4)		
	T	108 (58.7)	119 (52.2)	370 (58.3)	0.22	0.99
	G	76 (41.3)	109 (47.8)	264 (41.7)		
rs7088318	AA	68 (73.1)	69 (62.1)	209 (68.2)	0.24	0.64
	AC	23 (24.7)	38 (34.2)	89 (28.9)		
	CC	2 (2.2)	4 (3.7)	9 (2.9)		
	A	159 (85.4)	176 (79.2)	507 (82.6)	0.13	0.41
	C	27 (14.6)	46 (20.8)	107 (17.4)		

GEN *miR146a*

Al comparar la frecuencias alélicas y genotípicas de casos vs controles para la variante rs2910164 (G/C) del gen *miR146a* en población maya no se observa un valor estadísticamente significativo ($P=0.70$), (Tabla 9). Después analizamos las frecuencias de la población mestiza de niños afectados vs niños sanos ($P=0.97$) y adultos sanos ($P=0.38$), observamos que no hay asociación con LAL del SNP rs2910164 (G/C) estudiado en ninguna de las poblaciones estudiadas maya o mestizos (Tabla 10).

Tabla 9. Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *miR146a* y leucemia aguda linfoblástica en población maya.

ID SNP	Genotipos/ Alelos	Mayas		
		Casos n%	Controles n%	P
rs2910164	CC	40 (36.3)	81 (43.3)	0.22
	GC	60 (54.5)	83 (44.4)	
	GG	10 (9.2)	23 (12.3)	
	C	140 (63.6)	245 (65.5)	0.70
	G	80 (36.4)	129 (34.5)	

Tabla 10. Análisis de asociación entre polimorfismos en el gen *miR146A* y leucemia aguda linfoblástica en población mestiza.

ID SNP	Genotipos/ Alelos	Casos n%	Mestizos			
			Controles n%		P	
			Niños	Adultos	vs Niños	vs Adultos
rs2910164	CC	45 (48.3)	59 (53.1)	154 (47.5)	0.17	0.20
	GC	41 (44.1)	37 (33.3)	124 (38.3)		
	GG	7 (7.6)	15 (13.6)	46 (14.2)		
	C	131 (70.4)	155 (69.8)	432 (66.7)	0.97	0.38
	G	55 (29.6)	67 (30.2)	216 (33.3)		

DISCUSIÓN

La leucemia es una neoplasia maligna del sistema hematopoyético y es el tipo de cáncer más común en la población infantil, dado que representa más de una tercera parte de todos los casos de cáncer en los niños.³⁸ A pesar de que esta patología es una de las enfermedades malignas en donde se han logrado grandes avances en el diseño de nuevas estrategias de tratamiento, sigue siendo la principal causa de mortalidad en los niños menores de 15 años, particularmente en los países de desarrollo.^{2, 39} Además; en México hay un aumento en la incidencia de este tipo de cáncer y en la tasa de mortalidad de los niños con leucemia.⁴⁰ Estos datos son realmente preocupantes y más aún cuando se sabe que los tratamientos antileucémicos aumentan las probabilidades de desarrollar neoplasias secundarias y con ello la incidencia del cáncer en general. Por lo tanto, es necesario el uso de metodologías más sensibles, eficientes y de bajo costo, que permitan establecer un diagnóstico más certero y oportuno con la finalidad de diseñar mejores esquemas de tratamiento.

Por décadas la morfología, la tinción citoquímica y los marcadores intracitoplásmicos y de superficie han mostrado ser estándares muy valiosos para definir a la leucemia de acuerdo con la clasificación FAB y el inmunofenotipo; la genética molecular ha aportado una gran cantidad de información que no sólo ha permitido conocer más acerca de la fisiopatología de esta neoplasia, sino que ha arrojado una cascada de información con considerables implicaciones terapéuticas. Los eventos patogénicos precisos que conducen al desarrollo de la leucemia aguda linfoblástica se desconoce.^{10, 41} Solo un (<5%) de los casos se asocian a herencia, predisponente síndromes genéticos, a factores ambientales. Desafortunadamente, incluso cuando todos los factores de riesgo conocidos y potenciales para la leucemia aguda en la infancia son considerados, una explicación etiológica plausible para más del 90% de los casos de leucemia infantil sigue sin conocerse.¹⁵

Con base en los estudios anteriores, en este trabajo se evaluó la asociación de SNPs de varios genes que se han reportado con asociación al desarrollo de LAL infantil en dos grupos étnicos de México, mayas de Mérida Yucatán y mestizos de la Ciudad de México. Se evaluó la asociación entre SNPs en los genes *ARID5B* (rs928518, rs10821936), *ASS1* (rs928518), *PIP4K2A* (rs70883118) y *miRNA146a* (rs2910164) y LAL. Se compararon niños con LAL y sujetos sanos provenientes de Mérida Yucatán y de la Ciudad de México.

Nuestros resultados mostraron que los SNPs *ARID5B* (rs928518, rs10821936) confieren riesgo para LAL en población mestiza pero no en población Maya. Cabe mencionar que *ARID5B*, es el gen más altamente replicado en los estudios de asociación con LAL para un dominio de interacción rico en AT y juega un papel relevante en el crecimiento celular y la diferenciación de progenitores de linfocitos B. Además, se ha sugerido que podría tener un papel en la regulación transcripcional. A la fecha se ha descrito que los SNPs en este gen que están asociados con LAL, están situados en el intrón 3 y exhiben un alto desequilibrio de ligamiento, pero hasta el momento se desconoce su función. Las evidencias que apoyan la participación de *ARID5B* en la definición de linaje de células B se ha observado en ratones Knockout, quienes muestran un retraso en su crecimiento, disminución de la celularidad de la médula ósea y el número de progenitores de células B. El análisis comparativo entre niños afectados con controles también mostró que los homocigotos para los genotipos de riesgo de las variantes rs10821936 y rs7089424 tienen un mayor riesgo para LAL. Así, nuestros resultados confirman que el polimorfismo rs10821936 y rs7089424 situado en el intrón de *ARID5B* juega un papel importante en el desarrollo de la LAL infantil. Teniendo en cuenta que los intrones pueden regular la expresión génica mediante la regulación de la tasa de transcripción o afectando a la longitud del producto, es necesario determinar cómo este polimorfismo contribuye al desarrollo de LAL.^{26,27}

Por otra parte también comparamos las frecuencias de los genes *ASS1*, *PIP4K2A* y *miR146a* en casos y controles tanto de la población maya como mestiza, sin embargo, estos polimorfismos no se asociaron al riesgo para LAL en ninguna de las poblaciones analizadas. La expresión de *PIP4K2A* se ha vinculado a la metástasis en el cáncer de mama y es necesario para la proliferación o la supervivencia de células de cáncer colorrectal positivo a mutaciones en -KRAS, y el crecimiento tumoral en ratones nulos TP53.

Por otro lado, varios estudios han sugerido el papel de *miR146a* en el riesgo de cáncer, incluyendo susceptibilidad a LAL. De hecho, se ha informado que el gen *miR146a* se sobreexpresa en neoplasias hematológicas como LAL pediátrica y la leucemia mieloide aguda. Este polimorfismo afecta la cantidad de pre y madura expresión *miR146a* y la especificidad de madura hsa-miR-146a en la unión a sus objetivos. Aunque otros estudios han mostrado que polimorfismos en este gen se asocian al desarrollo de LAL, en nuestros datos indican que este gen no confiere riesgo a LAL en niños mexicanos.

Las diferencias en la frecuencia de las mutaciones o polimorfismos, así como el efecto diferencial en el riesgo a padecer LAL entre los distintos grupos étnicos pueden ser el reflejo de la heterogeneidad genética en los factores de susceptibilidad entre los distintos grupos étnicos. Sin embargo, se requiere del análisis de una muestra más grande, otras poblaciones, otros genes y otros SNPs para el estudio y entendimiento de las enfermedades complejas, como la leucemia. Además, nuestros hallazgos reflejan la necesidad de realizar estudios que permitan detectar las combinaciones genéticas que constituyen factores de riesgo para ésta y otras patologías comunes.

En conclusión, sugerimos que *ASS1*, *PIPK42A* y *miR146a* analizamos SNPs que no parecen jugar un papel en la susceptibilidad a LAL en los niños de México, mientras que polimorfismos en *ARID5B* parecen tener un efecto diferencial en la susceptibilidad a LAL entre los grupos étnicos de México. Sin embargo se requieren más estudios de asociación con grandes muestras de casos y controles y estudios detallados etnicidad para investigar si las asociaciones son válidas.

CONCLUSIONES

Los polimorfismos en el gen *ARID5B* confieren riesgo para desarrollar LAL en población mestiza pero no en población maya.

Los polimorfismos en los genes *ASS1*, *PIP4K2A* y *miR146a* no se asociaron con el desarrollo de LAL.

Se observaron diferencias significativas entre población Maya y Mestiza en la distribución de polimorfismos en los genes *ASS1*, *ARID5B* y *PIP4K2A*, pero no para el SNPs en *miR146a*.

Este estudio contribuye al conocimiento de los factores genéticos asociados con el riesgo para padecer LAL en niños mexicanos.

REFERENCIAS

- 1.- Secretaria de Salud. Subsecretaria de Prevención y Promoción de la Salud Dirección General de Epidemiología 2011. Perfil Epidemiológico de Cáncer en Niños y Adolescentes. Ss. México DF. 2011. 155p.
- 2.- Abdullaev FI, Rivera-Luna R, Roitenburd-Belacortu V, Espinosa-Aguirre J. Pattern of childhood cancer mortality in México. Arch Med Res. 2000;31(5):526-31.
- 3.- Mejia-Arangur  JM. Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil. Revista de Hematología. Vol.11,:2010; p. 35-36.
- 4.- Ortega-Sánchez MA, Osnaya-Ortega ML, Rosas-Barrientos JV. Leucemia linfoblastica aguda. Med Int Mex 2007; 23:26-33.
- 5.- Ortiz-Hidalgo C. Notas sobre la Historia de la Leucemia. Patología Revista latinoamericana: Patología 2013;51:58-69.
- 6.- Hurtado-Monroya R, Solano-Estrada B, Vargas Viverosc P. Leucemia para el médico general. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM, México DF. 2012.
- 7.- Lassaletta-Atienza A. Leucemia linfoblástica aguda. Departamento de Hemato-Oncología Pediátrica. Hospital Universitario Niño Jesús. Madrid. Pediatría Integral 2004; VIII: 435-442.
- 8.- Chan KW. Acute lymphoblastic leukemia. Curr Probl Pediatr, Adolesc Health Care. 2002; 32(2):40-9.
- 9.- Ross ME, Zhou X, Song G, Shurtleff SA, Girtman K, Williams WK, Liu HC, Mahfouz R, Raimondi SC, Lenny N, Patel A, Downing JR. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. Blood. 2003; 102(8):2951.
- 10.- Jiménez-Morales S. "Caracterización molecular de la leucemia aguda linfoblastica infantil", 11 diciembre 2002.
- 11.- Fajardo-Gutiérrez A, Juárez-Oca a S, González-Miranda G, Palma-Padilla V, Carre n-Cruz R, Ortega-Alv rez MC, Mej a-Arangure JM. Incidence of cancer in children residing in ten jurisdictions of the Mexican Republic: importance of the Cancer registry (a population-based study). BMC Cancer. 2007;19;7:68.
- 12.- Aguilar-Hernández M, Fernández-Castillo G, Núñez-Villegas NN, Pérez-Casillas RX, Núñez-Enríquez JC. [Leading causes of death during the induction therapy in pediatric

patients with acute lymphoblastic leukemia]. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2017; 55(3):286-291.

13.- Ching-Hon pui, MD Acute Lymphoblastic Leukemia. Pediatric Clinics of North America, Volume 44. Number 4. 1997.

14.- Raimondi SC. Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1993; 81: 2237-2251.

15.- Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. Lancet. 2008 Mar.

16.- Sevilla Sergio D. Metodología de los estudios de asociación genética. Insuf. card., Ciudad Autónoma de Buenos Aires. 111-114, sept. 2007.

17.- Checa-Caratachea MA polimorfismos genéticos: importancia y aplicaciones. Rev inst nal enf resp mex 2007.

18.- Iniesta R, Guinó E, Moreno V. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Gac Sanit v19 n4. Barcelona jul.ago.2005.

19.- Infante-Rivard C, Krajcinovic M, Labuda D, Sinnett D. Childhood acute lymphoblastic leukemia associated with parental alcohol consumption and polymorphisms of carcinogen-metabolizing genes. Epidemiology. 2002 May.

20.- Brisson GD, Alves LR, Pombo-de-Oliveira MS. Genetic susceptibility in childhood acute leukaemias: a systematic review. Ecancermedicalscience. 2015 May.

21.- Infante-Rivard C, Amre D, Sinnett D. GSTT1 and CYP2E1 polymorphisms and trihalomethanes in drinking water: effect on childhood leukemia. Environ Health Perspect. 2002 Jun.

22.- Han F, Tan Y, Cui W, Dong L, Li W. Novel insights into etiologies of leukemia: a HuGE review and meta-analysis of CYP1A1 polymorphisms and leukemia risk. Am J Epidemiol. 2013 Aug.

23.- Da Silva Silveira V, Canalle R, Scrideli CA, Queiroz RG, Bettiol H, Valera ET, Tone LG. Polymorphisms of xenobiotic metabolizing enzymes and DNA repair genes and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Res. 2009;33(7):898-901.

24.- Zhang H, Liu H, Jiang G. Genetic polymorphisms of XRCC1 and leukemia risk: a meta-analysis of 19 case-control studies. PLoS One. 2013.

25.- Chang JS, Wiemels JL, Chokkalingam AP, Metayer C, Barcellos LF, Hansen HM, Aldrich MC, Guha N, Urayama KY, Scélo G, Green J, May SL, Kiley VA, Wiencke JK,

- Buffler PA. Genetic polymorphisms in adaptive immunity genes and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010.
- 26.- Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, Pei D, Chen Y, Crews KR, Kornegay N, Wong FL, Evans WE, Pui CH, Bhatia S, Relling MV. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2015.
- 27.- *ARID5B* AT-rich interaction domain 5B [*Homo sapiens* (human)], www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84159. provided by RefSeq, 2011.
- 28.- Gutiérrez-Camino Á, López-López E, Martín-Guerrero I, Sánchez-Toledo J, García de Andoin N, Carboné Bañeres A, García-Miguel P, Navajas A, García-Orad Á. Intron 3 of the *ARID5B* gene: a hot spot for acute lymphoblastic leukemia susceptibility. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013.
- 29.- Guo LM, Xi JS, Ma Y, Shao L, Nie CL, Wang GJ. *ARID5B* gene rs10821936 polymorphism is associated with childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis based on 39,116 subjects. *Tumour Biol*. 2014.
- 30.- Engel K, Höhne W, Häberle J. Mutations and polymorphisms in the human argininosuccinate synthetase (*ASS1*) gene. *Hum Mutat*. 2009.
- 31.- PIP4K2A Official Symbol: PIP4K2A and Name: phosphatidylinositol-5-phosphate 4-kinase, type II, alpha [*Homo sapiens* (human)], <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5305>.
- 32.- Liao F, Yin D, Zhang Y, Hou Q, Zheng Z, Yang L, Shu Y, Xu H, Li Y. Association Between PIP4K2A Polymorphisms and Acute Lymphoblastic Leukemia Susceptibility. *Medicine (Baltimore)*. 2016.
- 33.- *MIR146A* microRNA 146a [*Homo sapiens* (human)], www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406938. provided by RefSeq;2015.
- 34.- Chansing K, Pakakasama S, Hongeng S, Thongmee A, Pongstaporn W. Lack of Association between the MiR146a Polymorphism and Susceptibility to Thai Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016.
- 35.- Hasani SS, Hashemi M, Eskandari-Nasab E, Naderi M, Omrani M, Sheybani-Nasab M. A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a preliminary report. *Tumour Biol*. 2014.

- 36.- Lejona S, Benetti MS, Fay F, Fay O. Avances en el Diagnóstico Molecular: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Fundación Dr. J. R. Villavicencio 2006.
- 37.- Costa J. Reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. Servicio de Microbiologia. Hospital Clinici Provincial. Barcelona. España. Enferm Infecc Microbiol Clin 2004.
- 38.- Greif G. Métodos de Secuenciación de Ácidos Nucleicos. Unidad de Biologia Molecular. Insitut Pasteur Montevideo.
- 39.- Pérez-Vera P, Mújica-Sánchez M, Carnevale A, Rivera-Luna R, Paredes R, Martínez A, Frías S. Cytogenetics in acute lymphoblastic leukemia in Mexican children: an institutional experience. Arch Med Res. 2001.
- 39.- Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, Sánchez-Zubieta F, Cárdenas-Cardós R, Escamilla-Asian G, Olaya-Vargas A, Bautista-Marquez A, Aguilar-Romo M. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. Int J Cancer. 2013.
- 40.- Escamilla-Santiago RA, Narro-Robles J, Fajardo-Gutiérrez A, Rascón-Pacheco RA, López-Cervantes M. [Trends of cancer mortality rates in children and adolescents by level of marginalization in Mexico (1990-2009)]. Salud Publica Mex. 2012;54(6):587-94.
- 41.- Dorantes-Acosta E, Medina-Sanson A, Dávila-Ornelas K, López-Martínez B. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). Gaceta Mexicana de Oncología. 2013.
- 42.- Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos RM, Martínez-Avalos A, Medina-Sanson A, Espinosa-Hernández L, et al. Childhood acute leukemias are frequent i Mexico City: descriptive epidemiology. BMC Cancer 2011.
- 43.- Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. Semin Hematol 2013.
- 44.- Hunger SP, Lu X, Devidas M, Camitta BM, Gaynon PS, Winick NJ,et al. Improved survival for children and adoles- cents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol 2012.

- 45.- Schultz KR, Carroll A, Heerema NA, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, et al. Long-term follow-up of imatinib in pediatric Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Children's Oncology Group study AALL0031. *Leukemia* 2014.
- 46.- Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015.
- 47.- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001.
- 48.- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001.
- 49.- Biondi A, Cimino G, Pieters R, Pui CH. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 2000.
- 50.- Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012.
- 51.- Pérez-Vera P, Montero-Ruiz O, Frías S, Ulloa-Avilés V, Cárdenas-Cardós R, Paredes-Aguilera R, et al. Detection of ETV6 and RUNX1 gene rearrangements using fluorescence in situ hybridization in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genet Cytogenet* 2005.
- 52.- Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldaña-Alvarez Y, Perez-Vera P, Paredes-Aguilera R, Rivera-Luna R, et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk Res* 2008.
- 53.- Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC, Olarte-Carrillo I, Guerra-Castillo FX, Pompa-Mera EN, et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study-report from the Mexican Interinstitutional Group for the identification of the causes of childhood leukemia. *Biomed Res Int* 2014.
- 54.- Daniel-Cravioto A, Gonzalez-Bonilla CR, Mejia-Arangure JM, Perez-Saldivar ML, Fajardo-Gutierrez A, Jimenez-Hernandez E, et al. Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City. *Leuk Lymphoma* 2009.

- 55.- Rizzo JM, Buck MJ. Key principles and clinical applications of "next-generation" DNA sequencing. *Cancer Prev Res (Phila)* 2012.
- 56.- Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* 2015.
- 57.- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol* 2011.
- 58.- Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol* 2013.
- 59.- Pei J, Robu V, Feder M, Cheung M, Neumann-Domer E, Talarchek J, et al. Copy neutral loss of heterozygosity in 20q in chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. *Cancer Genet* 2014.
- 60.- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002.
- 61.- Watson DE, Li B. TaqMan applications in genetic and molecular toxicology. *Int J Toxicol* 2005.
- 62.- Korf BR. Integration of genomics into medical practice. *Discov Med*. 2013.
- 63.- Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet* 2013.
- 64.- Walsh KM, de Smith AJ, Welch TC, Smirnov I, Cunningham MJ, Ma X, et al. Genomic ancestry and somatic alterations correlate with age at diagnosis in Hispanic children with B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Am J Hematol* 2014.
- 65.- Perez-Andreu V, Roberts KG, Xu H, Smith C, Zhang H, Yang W, et al. A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Blood* 2015.
- 66.- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008.

67.- Garza-Veloz I, Martinez-Fierro ML, Jaime-Perez JC, Carrillo-Sanchez K, Ramos-Del Hoyo MG, et al. Identification of differentially expressed genes associated with prognosis of B acute lymphoblastic leukemia. Dis Markers 2015.