



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
“DR. IGNACIO CHÁVEZ”  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**Tesis:**

**eIF3f como posible marcador pronóstico de Leucemia  
Linfoblástica Aguda de células B (LLA-B)**

Que para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud

**P R E S E N T A:**

Q.F.B. Jéssica Aneth Vergara Hernández

**Directora de tesis:**

D. en C.B. Ana Edith Higareda Mendoza



Morelia, Michoacán, México

Julio 2020

El comité tutorial designado por la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Aprobó la tesis presentada por:

Química farmacobióloga  
JÉSSICA ANETH VERGARA HERNÁNDEZ

Doctora en Ciencias  
Ma. Soledad Vázquez Garcidueñas

Doctora en Ciencias  
Ana Edith Higareda Mendoza

Doctor en Ciencias  
Sergio Gutiérrez Castellanos

Doctor en Ciencias  
Marco Aurelio Pardo Galván

Doctor en Ciencias  
Carlos Cortés Penagos

La Maestría en Ciencias de la Salud de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Pertenece al Padrón de Posgrado de Excelencia de Excelencia  
del CONACyT

La estudiante de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
“Dr. Ignacio Chávez” de la  
Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
agradece al CONACYT la beca que le fue otorgada  
durante la realización de su tesis  
Núm de becario CONACYT: 702764

Se agradece también el apoyo brindado por el  
Hospital Infantil de Morelia “Eva Samano de López Mateos”,  
al:

Departamento de Oncohematología Pediátrica, Laboratorio de análisis clínicos y al  
personal involucrado agradeciendo de manera especial las atenciones y  
orientación del Doctor Misael Herrejón Carmona.

La presente investigación se realizó en:

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas

“Dr. Ignacio Chávez”

División de Estudios de Posgrados

Laboratorio de Biología Celular Humana

**Dirección de Tesis:**

Doctora en Ciencias Biológicas

Ana Edith Higareda Mendoza

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

**Contribuciones:**

Hemato Oncólogo Pediatra

Misael Herrejón Carmona

Hospital Infantil de Morelia "Eva Samano de López Mateos"

## **Dedicatoria**

**A mis padres:** Margarita Hernández Aburto y Abelardo Vergara  
Soperanez

**A mis tíos:** Ma. Mercedes Hernández Aburto y Carlos Soria

**A mi hermano y a mis primos:** Daniel, César, Alejandro y Carlos

**A mi novio:** Hugo Iván Rosas Esquivel

**A todos los pacientes y personal del Hospital Infantil de Morelia  
que participaron en este proyecto.**

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por la oportunidad de trabajar en este proyecto y que gracias a él pudimos avanzar y superar todas las malas rachas.

A mis papás Margarita y Abelardo, sin ustedes no sería nada, gracias por creer en cada paso que doy e iluminar mi camino en cada ocasión con su amor incondicional, los amo mucho.

A mis tíos Meche y Carlos, muchas gracias por todo su amor y hospitalidad, les debo gran parte de mis logres académicos.

A mi hermano Daniel, por ser el mejor hermano del mundo, a mis primos Charli, Alex (Kb) y César, los quiero mucho y siempre es un placer estar con ustedes.

Agradezco de manera especial a la doctora Ana Edith H.M y al doctor Marco Aurelio P.G por todas sus enseñanzas, consejos y ánimos, agradezco a la vida haberlos conocido y que me aceptaran para trabajar en este maravilloso grupo de investigación.

Al doctor Misael Herrejón Carmona, muchas gracias por creer y apoyar el proyecto y darnos la oportunidad de trabajar con el Hospital Infantil. También agradezco a la doctora Silvia Chávez y a las enfermeras del área de oncología por sus atenciones y amabilidad.

A mis compañeros de laboratorio: Dr. Carlos Torres, muchas gracias por apoyo, comentarios y consejos, a Lesly, gracias por alegrar el laboratorio con tu forma de ser y por tus ánimos, a Karina J. Tenorio y A. Areli Bautista, muchas gracias por hacer un espacio en sus agendas para ayudarme con mis dudas. A Héctor, sensei gracias por tu amistad, enseñanzas y consejos, te aprecio mucho. A mi amigo Irving, el posgrado no hubiera sido lo mismo sin ti, subimos de peso por tanta garnacha pero valió la pena.

A mi novio Hugo Iván que me sigue en todas mis locuras y me brinda todo su apoyo y amor, me conoces como pocos y la vida no sería lo mismo sin ti, te amo mi cielo.

A mis amigos Karla, Arturo, Sofía, Elidee y Arlette, nuestra amistad inició en la facultad y espero que nunca termine mis químicos, los

quiero montones. Dios los bendiga en cada paso, gracias por su amistad

Un especial agradecimiento a familiares y a los pacientes del Hospital Infantil de Morelia que aceptaron participar en el proyecto.

## Abreviaturas

BCR	Receptor de células B
BH	Biometría hemática
BSA	Albúmina de suero bovino
BrdU	Bromodesoxiuridina
CD	Cúmulo de diferenciación
CDK	Cinasa dependiente de ciclina
CG	Cáncer gástrico
CMF	Citometría de flujo
DAPI	(4',6-diamino-2- fenilindol)
EBF	Factor temprano de células B
eIF	Factor eucariótico de iniciación de la traducción
FAB	Clasificación Franco-Americana- Británica
FC	Factor de crecimiento
FSC	Frontal scatter
HER2/neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano, también conocido como ErbB2
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores

	del Estado
IT	Intratecal
kDa	Kilodalton
LB	Linfocitos B
LDH	Lactato deshidrogenasa
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mioloblástica Aguda
LT	Linfocitos T
MTX	Metotrexato
NK	Natural killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PFH	Pruebas de función hepática
PHA	Fitohemaglutinina
pRb	Proteína de Retinoblastoma fosforilada
SCF	Factor estimulante de células madre
SSC	Side scatter
TA	Temperatura ambiente
TCR	Receptor de células T
UFC	Unidad formadora de colonias
UFC- GEMM	Unidad formadora de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y macrófagos
UFC-L	Unidad formadora de colonias de linfocitos
MO	Médula ósea

# Índice general

<b>1. Introducción</b>	10
<b>2. Marco teórico</b>	13
2.1 Desarrollo de las células sanguíneas	13
2.2 Desarrollo de linfocitos B	15
2.3 Leucemia	17
2.3.1 Diagnóstico de la leucemia	18
2.3.2 Inmunotipificación	24
2.3.3 Esquemas de tratamiento	29
2.4 Ciclo celular	33
2.5 Ki-67	37
2.6 eIF3f	39
2.4.1 Regulación de la expresión de eIF3f	44
<b>3. Justificación</b>	47
<b>4. Hipótesis</b>	48
<b>5. Objetivos</b>	48
5.1 Objetivo general	48
5.2 Objetivos específicos	48
<b>6. Estrategia experimental</b>	49
<b>7. Materiales y métodos</b>	50
7.1 Muestreo	50
7.1.1 Diseño experimental	51
7.2 Criterios de inclusión	51

7.3 Criterios de exclusión	51
7.4 Criterios de eliminación	51
7.5 Identificación de blastos	51
7.6 Determinación del inmunofenotipo	52
7.7 Cultivo de linfocitos	54
7.8 Aplicación del panel de ciclo celular y detección de eIF3f	55
7.8.1 Estandarización del panel de ciclo celular y detección de eIF3f	56
7.8.2 Análisis de respuesta de superficie para la optimización de la preparación de muestras de origen hemático para estudios por citometría de flujo	59
<b>8. Resultados y discusión</b>	<b>60</b>
8.1 Descripción de la población de estudio y sus controles	60
8.2 Desarrollo de un panel de detección ciclo celular fase dependiente	64
8.3 Estandarización del panel de detección de ciclo celular fase dependiente	75
8.4 Estandarización metodológica de la preparación de muestras de origen hemático por ARS	83
8.5 Establecimiento del cultivo de linfocitos para los controles	96
8.6 Estrategia de selección de la población para el análisis de la expresión de eIF3f en las muestras de MO y sus controles	99
8.7 Expresión de eIF3f en las fases del ciclo celular de muestras de médula ósea de pacientes de novo y sus controles	104
8.7.1 Muestras analizadas con FITC para la determinación de la expresión de eIF3f	105
8.7.2 Muestras analizadas con AlexFluor-647 para la determinación de la expresión de eIF3f	114
8.8 Determinación de la correlación de la expresión de eIF3f y los marcadores considerados de mal pronóstico para LLA-B	112
8.8.1 Análisis de correlación Spearman de las muestras procesadas con FITC	125

8.8.2 Análisis de correlación Spearman de las muestras procesadas con AlexaFluor-647	127
<b>9. Conclusiones</b>	130
<b>9. Referencias</b>	131
<b>11. ANEXOS:</b>	
1. Carta de aprobación del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”	139
2. Carta de aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo	140
3. Carta de consentimiento informado para pacientes del Hospital Infantil de Morelia	141
4. Formato de recopilación de datos	142

## Índice de cuadros

<b>Num.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pag.</b>
1	Clasificación de las leucemias de acuerdo a la FAB	20
2	Clasificación de las leucemias linfoblásticas de acuerdo a la OMS	21
3	Factores de riesgo a considerar para establecer el esquema de tratamiento	30
4	Ciclinas y CDK necesarias en cada fase del ciclo celular	35
5	Familia de inhibidores de CDK y de los complejos Ciclina/CDK	36
6	Panel para la inmunotipificación	53
7	Panel de ciclo celular	55

8	Factores pronóstico	63
9	Descripción del panel de ciclo celular	71
10	Matriz de variables para el análisis de respuesta de superficie	85

## Índice de figuras

<b>Num.</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pag.</b>
1.	Hematopoyesis medular	14
2.	Desarrollo primario de los linfocitos B	16
3.	Maduración esplénica de linfocitos B	17
4.	Componentes principales del citómetro de flujo	26
5.	Ciclo celular	34
6.	Estructura de eIF3	40
7.	Perfil de expresión de eIF3f durante las diferentes fases del ciclo celular de A549	42
8.	Expresión de eIF3f en linfocitos de voluntarios sanos inducidos a proliferación	43
9.	Expresión de eIF3f en linfocitos de pacientes con LLA	43
10.	Perfil de ARNm de eIF3f durante las diferentes fases del ciclo celular	44
11.	Actividad transcripcional de eIF3f por ensayo de luciferasa	45
12.	Técnica de tinción de Wright	52
13.	Distribución de los diagnósticos de pacientes de novo del área de oncología del Hospital Infantil de Morelia.	62
14.	Frotis y tinción Wright de muestras procesadas.	62
15.	Diagrama de flujo del diseño de paneles de detección de anticuerpos con el programa FluoroFinder 2.0	66
16.	Excitación y detección de fluorocromos con el láser de 405 nm	69
17.	Excitación y detección de fluorocromos con el láser de 488 nm	70
18.	Excitación y detección de fluorocromos con el láser de 638 nm	70
19.	Selección de la población linfocítica	72

20.	Selección de la población celular CD19+, CD45+	72
21.	Diagrama de flujo para el proceso de análisis del ciclo celular de linfoblastos	74
22.	Enriquecimiento de células A549 en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular	76
23.	Selección de población para el análisis individual de los marcadores del panel de ciclo celular	77
24.	Señal de pRb(Ser608) y KI67 en cultivos sincronizados para las fases G0-G1 de la línea A-549	78
25.	Análisis de la detección de pRb(Ser608) y KI67 en linfocitos de un voluntario sano	79
26.	Análisis de la detección de la fase S por medio de BrdU en cultivos sincronizados de la línea celular A549	81
27.	Análisis de la detección de la fase M por medio de pHH3 en cultivos sincronizados de la línea celular A549	83
28.	Distribución representativa de la distribución celular tras la lisis eritrocitaria	86
29.	Análisis ANOVA para la eficiencia de lisis con el uso de reactivos comerciales	86
30.	Análisis ANOVA para la eficiencia de lisis con el uso de reactivos preparados en el laboratorio	87
31.	ARS para lisis eritrocitaria: valores influyentes en el proceso	88
32.	Diagrama de interacciones de los factores para la lisis eritrocitaria	88
33.	ARS para la fijación celular: valores influyentes en el proceso	89
34.	Diagrama de interacciones de los factores para la fijación celular	89
35.	ARS para la permeabilización celular: valores influyentes en el proceso	90
36.	Diagrama de interacciones de los factores para la permeabilización celular	91
37.	ARS para la recuperación celular por lavados: valores influyentes en el proceso	92
38.	Diagrama de interacciones de los factores para la recuperación celular por lavados	93
39.	ARS de todos los factores influyentes en el proceso	93

40.	Interferencia en la señal de DAPI observada con el uso de PERM2	95
41.	Diagrama de flujo basado en el ARS para el procesamiento de muestras hemáticas	95
42.	Selección de la población libre de dupletes en cultivos de linfocitos inducidos con PHA	97
43.	Selección de la población de células vivas libre de dupletes en cultivos de linfocitos inducidos con PHA	97
44.	Selección de la población de linfocitos y detección de la fluorescencia para la determinación de la expresión de eIF3f en cultivos de linfocitos inducidos a proliferar con PHA	97
45.	Histograma de la señal de DAPI para el análisis de ciclo celular	98
46.	Selección inicial de la población celular en muestras de MO y controles	99
47.	Estandarización de la selección de la población linfocítica	101
48.	Establecimiento de los puntos de corte para las señales de FITC y AlexaFluor-647	102
49.	Señales de DAPI en los programas CytExpert y FlowJo	102
50.	Estrategia de selección de la población celular para la determinación de la expresión de eIF3f	103
51.	Comparación de la expresión de eIF3f detectado por FITC en linfocitos quiescentes vs. linfocitos en proliferación	106
52.	Determinación de la expresión de eIF3f con FITC en las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos proliferativos	107
53.	Detección de la expresión de eIF3f con FITC en muestras de MO de pacientes con LLA-B	108
54.	Detección de la expresión de eIF3f con FITC en muestras de MO de pacientes con LMA	109
55.	Detección de la expresión de eIF3f con FITC de MO de pacientes con diagnóstico diferente a leucemia	110
56.	Determinación de la expresión de eIF3f con FITC en muestras de MO de pacientes con probable leucemia	111
57.	Expresión de eIF3f en las muestras de MO procesadas con FITC	112
58.	Comparación de la expresión de eIF3f de linfocitos en proliferación vs el valor global de las muestras de MO procesadas con FITC	112
59.	Expresión comparativa de eIF3f en los controles y subgrupos de las	113

	muestras de MO procesadas con FITC	
60.	Comparación de la expresión de eIF3f detectada por AlexaFluor-647 de linfocitos en quiescencia vs. linfocitos en proliferación	115
61.	Determinación de la expresión de eIF3f con AlexaFluor-647 en las fases del ciclo celular de linfocitos proliferativos	115
62.	Detección de la expresión de eIF3f con AlexaFluor-647 en muestras de MO de pacientes con LLA-B	116
63.	Detección de la expresión de eIF3f con AlexaFluor-647 en muestras de MO de pacientes con LMA	117
64.	. Determinación de la expresión de eIF3f con AlexaFluor-647 en muestras de MO de pacientes con diagnóstico diferente a leucemia	118
65.	Comparación de la expresión e eIF3f en los controles y las muestras de MO analizadas con AlexaFluor-647	120
66.	Tabla de los valores críticos para el coeficiente de correlación de Spearman para los niveles de significancia en pruebas de una o dos colas	124
67.	Comparación de la expresión relativa de eIF3f en muestras de MO de pacientes con una buena respuesta al tratamiento vs pacientes con defunción	128

## RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un problema de salud pública que representa el 50% de los casos de neoplasias diagnosticadas en menores de 18 años, siendo la más común la LLA-B. El tratamiento actual está dirigido a células en las fases S y M del ciclo celular. eIF3f ha sido descrito como posible marcador pronóstico en otras neoplasias y se correlaciona con otros marcadores pronósticos. Se propone evaluar la utilidad de eIF3f como marcador pronóstico y su posible correlación con otros marcadores para LLA-B. **Objetivo general:** Determinar si la expresión de eIF3f representa la actividad proliferativa y si tiene valor como marcador pronóstico en LLA-B y/o en otras patologías hemáticas. **Materiales y métodos:** Estudio descriptivo, correlacional, analítico y longitudinal. Desarrollo bioinformático de un panel de detección de ciclo celular fase dependiente y su estandarización en la línea A549 y linfocitos de voluntarios sanos. Estandarización del protocolo de procesamiento de muestras de origen hemático con un análisis de respuesta de superficie (ARS). Se realizó un análisis de la expresión de eIF3f por citometría de flujo en muestras de médula ósea de pacientes con diagnóstico *de novo* de LLA del área de oncología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”, así como en linfocitos en quiescencia y proliferativos por la adición de un mitógeno (PHA) en voluntarios sin alteraciones eritrocitarias y menores de 18 años, con la finalidad de obtener muestras pareadas. **Resultados:** Se analizaron 40 muestras que se dividieron en 2 grupos en base al fluorocromo utilizado para la detección de eIF3f (AlexaFluor-647 o FITC) y en subgrupos en base al diagnóstico (LLA, LMA, diagnóstico diferente a leucemia y pacientes con probable leucemia); cada grupo fue analizado con sus controles correspondientes. En todas las muestras (40) se observa un perfil de expresión de eIF3f con una expresión inicial en G0-G1 que aumenta en S y tiene un máximo de expresión en G2-M; al realizar un análisis estadístico por medio de una prueba de t de student se obtuvo una  $p < 0.05$  y se observó una disminución de la expresión global de eIF3f en las muestras procesadas con FITC (34). En adición, se realizó un análisis de correlación de Spearman para determinar si existe una correlación entre la disminución de la expresión de eIF3f y el pronóstico de los pacientes; debido a que se analizaron muestras de pacientes con diagnóstico reciente, no se obtuvieron valores significativos. Sin embargo, se analizó la expresión global de la proteína en el caso de 3 pacientes con defunción y se comparó con la expresión de 3 pacientes que tuvieron una buena respuesta al tratamiento, observando que la expresión de eIF3f es mucho menor en 2 de los 3 casos de defunción. **Conclusión:** La expresión de eIF3f oscila en el ciclo celular independientemente de la patología hemática, presentando un aumento de expresión en la fase S y con un máximo de expresión en la fase G2-M coincidiendo con el estudio de la expresión de eIF3f en diferentes líneas celulares humanas (A549, Hep G2, Ramos, HeLa, entre otras) así como en linfocitos cultivados de rata (Martínez-Medina, 2016) lo que permite proponer que el perfil de expresión de eIF3f está conservado y que su expresión global depende de la actividad proliferativa celular.

**Palabras clave:** eIF3f, ciclo celular, citometría de flujo, linfocitos, leucemia, proliferación.

## ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a public health problem that represents 50% of malignancies cases diagnosed in children under 18 years, the most common being B-ALL. Current treatments target cells in the S and M phases of the cell cycle. eIF3f has been described as a possible prognostic marker in other malignancies and correlates with some prognostic markers. We propose to evaluate the utility of eIF3f as a prognostic marker and its possible correlation with other markers for B-ALL. **Overall objective:** To determine if the expression of eIF3f represents the proliferative activity and if it has value as a prognostic marker in B-ALL and / or in other blood diseases. **Materials and methods:** Descriptive, correlational, analytical, and longitudinal study. Bioinformatic phase dependent cell cycle detection panel development and its standardization in cell line A549 and lymphocytes from healthy volunteers. Standardization of the protocol for processing blood origin samples with a surface response analysis (ARS). The analysis of eIF3f expression was performed by flow cytometry in bone marrow samples from patients from the oncology area of the Children's Hospital of Morelia "Eva Sámano de López Mateos" with *de novo* diagnosis of ALL, as well as in quiescent and proliferative lymphocytes, by the addition of a mitogen (PHA), from volunteers without erythrocyte abnormalities and under 18 years of age, in order to obtain paired samples. **Results:** Forty samples were analyzed, which were divided into 2 groups based on the fluorochrome used for the detection of eIF3f (AlexaFluor-647 or FITC) and in subgroups based on the diagnosis (ALL, AML, diagnosis other than leukemia and patients with probable leukemia); each group was analyzed with its corresponding control. The same eIF3f expression profile was observed in all the samples (40), with an initial expression in the G0-G1 cell cycle phase that increased in the S phase and has a maximum expression in G2-M phase; a  $p < 0.05$  was obtained with the Student's t test, and a decrease in the overall expression of eIF3f was observed in the samples processed with FITC (34). In addition, to determine if there was a correlation between the decrease in eIF3f expression and the prognosis of the patients, a Spearman correlation analysis was performed. Because samples were from newly diagnosed patient, no significant values were obtained. However, the overall expression of the protein was analyzed in the case of 3 patients with death and compared with the expression of 3 patients who had a good response to treatment, observing that the expression of eIF3f was much lower in 2 of the 3 death cases. **Conclusion:** The expression of eIF3f oscillates in the cell cycle regardless of the blood pathology, presenting an increase in expression in the S phase and a maximum expression in the G2-M phase, coinciding with the study of the expression of eIF3f in different human cell lines (A549, Hep G2, Ramos, HeLa, among others), as well as in cultured rat lymphocytes (Martínez-Medina, 2016), which allows us to propose that the expression profile of eIF3f is conserved and that its global expression depends on the cell proliferative activity.

**Key words:** eIF3f, cell cycle, flow cytometry, lymphocytes, leukemia, proliferation.

## 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer infantil es la principal causa de muerte por enfermedad en mexicanos de entre 5 y 14 años de edad conforme a las cifras reportadas en el Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (Secretaría de Salud, 2015). Tan solo en el año 2000 se informaron 1,926 casos nuevos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (Sánchez-Ortega *et al.*, 2007). En un estudio más reciente, realizado de 2007 a 2012 en 55 instituciones afiliadas al Seguro Popular, se registraron 14,178 pacientes con cáncer y de éstos el 49.8% correspondieron a diagnóstico de LLA (Rivera-Luna *et al.*, 2015). En otro estudio comprendido de 2007 al 2015 se reportaron ante el Seguro Popular 24,039 pacientes nuevos con cáncer en edad pediátrica y de éstos el 50% fueron leucemia (Shalkow, 2017).

La LLA es una neoplasia que se da predominantemente en la infancia y se caracteriza por la presencia de células linfoides inmaduras que producen signos y síntomas como palidez, organomegalia, dolores óseos, petequias y púrpura. Esta enfermedad se clasifica como aguda o crónica dependiendo en el tiempo en el que se desarrolle, además del origen celular de la leucemia (mieloblástica, linfoblástica T, linfoblástica B), siendo más común la Leucemia Linfoblástica de células B. (Romero y Jiménez, 2002; Sánchez-Ortega *et al.*, 2007; Medina-Medina, 2010)

En el diagnóstico de las neoplasias se utilizan diferentes marcadores llamados grupos o cúmulos de diferenciación (CD, por sus siglas en inglés: *Clusters of Differentiation*). Estos marcadores se expresan tanto en las células normales como en las células neoplásicas pero pueden ser indicativas de la transformación neoplásica debido a que se expresan de manera irregular, ya sea por la cantidad de expresión, asincronía o promiscuidad. La determinación de los CD en la práctica clínica es por medio de la inmunotipificación, estudio que forma parte de algoritmo de diagnóstico utilizado por los sistemas de salud mexicanos y que permite definir el origen celular de la leucemia y el estado de diferenciación celular. (Medina-Medina, 2010; Guía de diagnóstico IMSS, 2018)

Durante el proceso de transformación de las células normales a células neoplásicas ocurren varias alteraciones genéticas. En este proceso se presenta la

pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN, así como la segregación de material genético y pérdida de funciones de los puntos de control de las transiciones de las fases del ciclo celular (G1/S, S/G2, G2/M y durante M). (Peralta-Zaragoza *et al.*, 1997)

La síntesis de proteínas o traducción es uno de los procesos de mayor consumo de energía, por lo que se encuentra altamente regulada y acoplada al estado metabólico de la célula. El inicio de la traducción de ARNm en organismos eucariontes, es un proceso complejo y constituye un paso limitante en la síntesis de proteínas. Para el inicio de la traducción son necesarios los factores de iniciación de la traducción, conocidos como eIF (por sus siglas en inglés: *eukaryotic Initiation Factor*). Dentro de estos factores se encuentra eIF3 que es el mayor de los factores de iniciación, con una masa de aproximadamente 800 kDa. eIF3 se une a la subunidad menor 40S en la formación del complejo de preiniciación, iniciando así el proceso de traducción. El complejo eIF3 en humanos cuenta con hasta 13 subunidades no idénticas, denominadas de eIF3a a eIF3m. La subunidad eIF3f se ha descrito primordialmente en su función como participante en el inicio de la síntesis proteica, pero también se le ha asociado a procesos de síntesis de lípidos y se ha demostrado que interactúa con otras proteínas no relacionadas a los eIF. (Cuesta *et al.*, 2009; Querol-Audi *et al.*, 2013; Herráez, 2012)

Se ha reportado en diferentes neoplasias la disminución de la expresión de eIF3f (Doldan *et al.*, 2008a; Doldan *et al.*, 2008b; Cheng *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2014; Cheng *et al.*, 2015) y, de nuestro grupo de trabajo, Bautista-Tejeda (2017) reportó como resultado de una prueba piloto que la disminución de la expresión de eIF3f en pacientes con LLA en comparación a la expresión en linfocitos de voluntarios sanos sometidos a un estímulo mitogénico.

A través de los últimos años se han realizado esfuerzos intensivos para identificar marcadores que puedan atribuirse como pronósticos de malignidad, ya que la descripción de nuevos marcadores es de importancia para mejorar los métodos de diagnóstico y/o la estrategia terapéutica; además, de desarrollar

nuevos blancos terapéuticos y mejorar la supervivencia de los pacientes. (Cheng *et al.*, 2014)

Las estrategias terapéuticas actuales están dirigidas a células proliferativas, siendo blancos del tratamiento las que se encuentran en las fases S y M del ciclo celular (Takimoto y Calvo, 2005). Por lo mismo, resulta interesante la descripción del eIF3f en las células neoplásicas de pacientes con LLA, ya que Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) reportaron que la expresión de esta subunidad del factor de inicio de la traducción 3 es altamente regulada: posee una expresión bifásica con máximos en las fases M y S temprana.

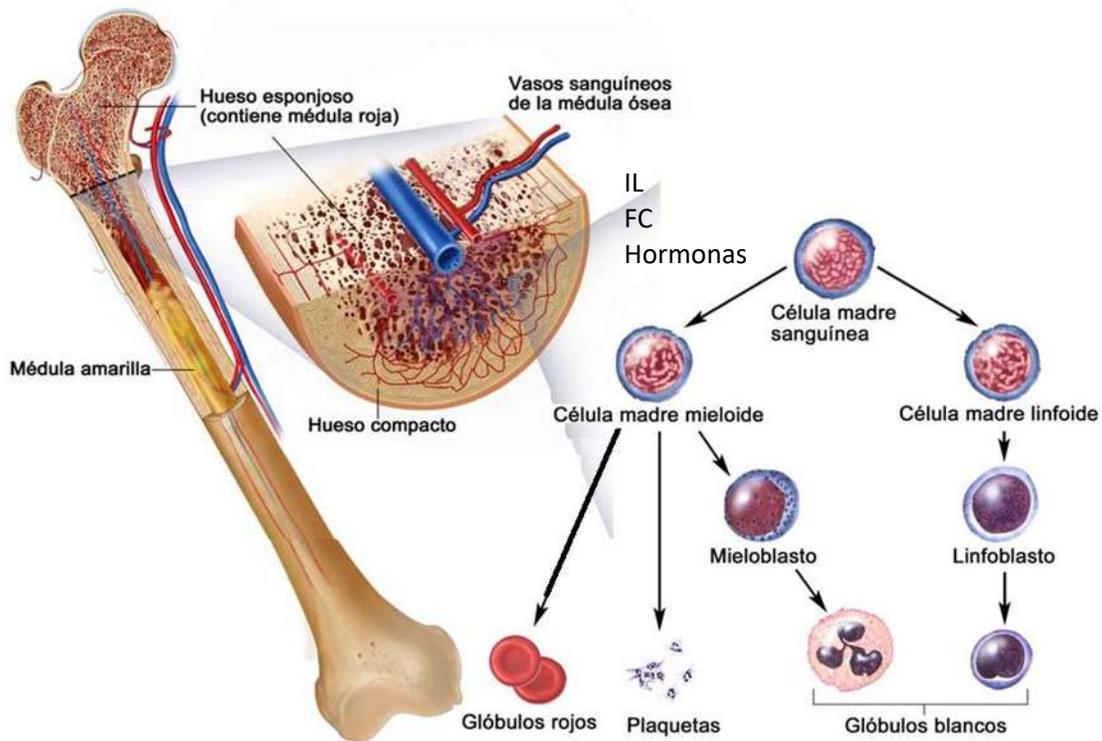
Con el desarrollo y establecimiento de un protocolo que permita detectar y analizar de manera individual a las fases del ciclo celular se producen nuevas oportunidades, tanto para la orientación diagnóstica en base al estado proliferativo de las células neoplásicas como para el entendimiento de la enfermedad. La validación de este protocolo para determinar la expresión dependiente a la fase de ciclo celular de eIF3f y su posterior aplicación en muestras de pacientes con diagnóstico *de novo* de LLA. En el área hematooncológica tienen el potencial de complementar el perfil diagnóstico necesario para la elección adecuada de un tratamiento caso-dependiente.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Desarrollo de las células sanguíneas

El proceso por el cual se producen todas las células sanguíneas del organismo es conocido como hematopoyesis. Este proceso comprende la formación, desarrollo y especialización de las células sanguíneas (Fig. 1). Tras la etapa fetal, la hematopoyesis tiene lugar en la médula ósea roja que está conformada por cordones extravasculares compuestos por todas las líneas celulares en desarrollo, células troncales, células de la adventicia y macrófagos. (Hoffman *et al.*, 2009; Rodak, 2005). Las líneas celulares en desarrollo son territoriales en la médula ósea roja, teniendo por ejemplo a los eritrocitos en desarrollo en forma de grupos pequeños contra las superficies externas de los senos vasculares o a los megacariocitos que se encuentran fuera de las paredes vasculares. Todas las células sanguíneas maduras y funcionales abandonan la médula ósea para entrar a la circulación sanguínea (Rodak, 2005; McKenzie, 2000).

Para que la hematopoyesis sea exitosa es necesaria la presencia de factores o sustancias semejantes a las hormonas que de manera ordenada estimulan o inhiben los diversos linajes hematopoyéticos. Entre los factores estimulantes se encuentran las interleucinas (citocinas) y los factores estimulantes de colonias; estos factores son secretados por células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y linfocitos T. Además de factores estimulantes de colonias e interleucinas, se encuentran también hormonas y otros componentes que constituyen el llamado microambiente hematopoyético. Estas sustancias influyen sinérgicamente en forma compleja y en combinaciones variadas que tienen efectos estimulantes en la proliferación y diferenciación de los linajes hematopoyéticos de manera que existe una combinación de factores especiales para cada uno de ellos (Welsch, 2008; Wu *et al.*, 2018).



**Figura 1. Hematopoyesis medular** (Adaptado de <http://labosammy.blogspot.com/2015/11/hematopoyesis.html>)

No sólo existen factores estimulantes, sino también factores inhibidores como los interferones, factor de necrosis tumoral y proteínas de macrófagos. Otro motivo de inhibición es la inhibición por contacto en donde, al aumentar la proliferación de una línea celular hematopoyética e invadir los espacios de desarrollo de otras líneas, inhibirá el desarrollo de éstas dando prioridad a su renovación; estas situaciones son modificables de acuerdo a los requerimientos del organismo (Rodak, 2005; Welsch, 2008; McKenzie, 2000).

El microambiente hematopoyético es susceptible a cambios en base a los requerimientos del organismo por lo que se considera un sistema dinámico. Las interacciones de las células madre con este microambiente tendrán como resultado la proliferación y maduración celular. Durante este proceso la célula progenitora se verá comprometida hacia un linaje hematopoyético específico y

dará origen a células funcionales a través de un proceso de maduración celular que puede ser clasificado en diferentes etapas durante las cuales la célula adquirirá características morfológicas y funcionales específicas para cada estirpe. A medida que las células maduran pierden la capacidad proliferativa, de manera que las células más inmaduras poseen una gran capacidad proliferativa pero no poseen funciones especializadas, y las células maduras poseen capacidades funcionales de la estirpe, pero no proliferativas (Abbas *et al.*, 2015).

El balance entre las señales del microambiente hematopoyético es esencial para el desarrollo de las células sanguíneas especializadas, entre las que encontramos a los eritrocitos, plaquetas y leucocitos comprendidos por linfocitos T, linfocitos B, monocitos, granulocitos y células NK (Wu *et al.*, 2018).

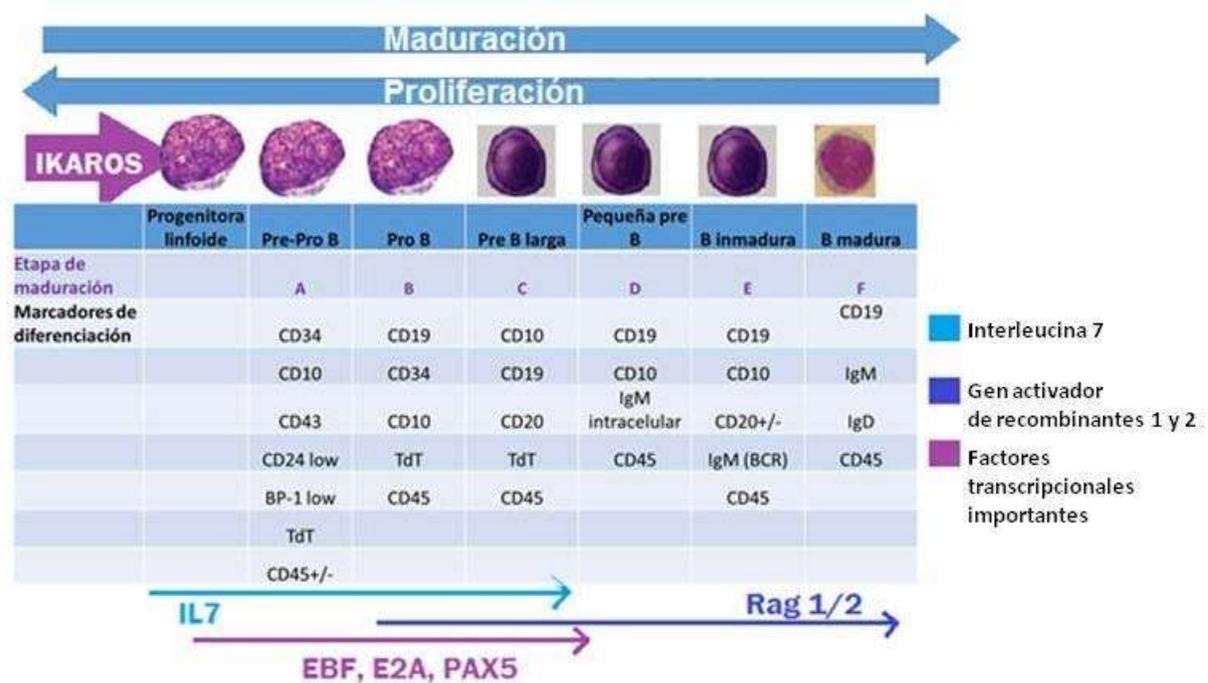
## **2.2 Desarrollo de linfocitos B**

En los mamíferos, el desarrollo de las células B inicia durante la vida fetal en varios tejidos, incluyendo el hígado; sin embargo, en la etapa adulta se generan en la médula ósea, el órgano primario de la hematopoyesis (Rodak, 2005; Welsch, 2008). La producción de linfocitos B en la médula ósea es llamada producción primaria de células B. En esta producción, los linfocitos B proliferan y se diferencian a través de un proceso de maduración altamente regulado que culmina con la producción de linfocitos inmaduros que expresan inmunoglobulinas (Ig). Tras el proceso linfopoyético en la médula ósea, los linfocitos B migran a órganos linfoides secundarios, como el bazo y los ganglios linfáticos, y en éstos culmina la maduración celular (Hoffman *et al.*, 2009).

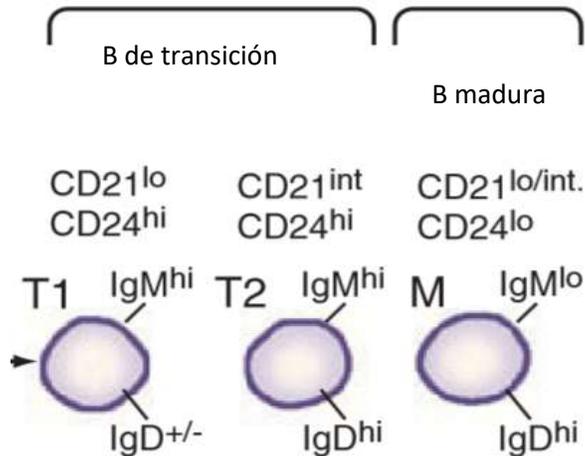
En la producción primaria, los linfocitos B atraviesan siete estados de maduración, partiendo del progenitor linfoide común que interactúa con factores del microambiente. Al recibir estímulos del microambiente se expresan diferentes factores de transcripción; un punto de inflexión hacia el linaje B es la expresión del factor transcripcional Ikaros, que actúa como represor de genes involucrados en la diferenciación hacia otros linajes hematopoyéticos. La especificación adicional del

linaje B depende de la expresión de otros factores de transcripción, como el factor temprano de células B (EBF por sus siglas en inglés: *Early B-cell Factor*), E2A, E12 y E47, los cuales pertenecen a la familia de Hélice-Bucle-Hélice y su unión al ADN regula la expresión de genes diana del linaje B. La ausencia de estos factores produce un estancamiento en etapas tempranas de la diferenciación de linfocitos B (Fainboim y Geffner, 2005; Buchner *et al.*, 2015; Hoffman *et al.*, 2009).

La expresión génica se traduce en la expresión de moléculas y receptores propios del linaje celular (CD). En las figuras 2 y 3 se observan algunos de los CD característicos para el linaje de linfocitos B. Los siete estados de maduración de linfocitos B en la médula ósea se representan con letras, de la A-F (Fig. 2). El proceso de maduración de linfocitos B se completa en órganos linfopoyéticos secundarios como el bazo (Fig. 3) (Buchner *et al.*, 2015; Hoffman *et al.*, 2009).



**Figura 2. Desarrollo primario de los linfocitos B.** Etapas de maduración de linfocitos B a partir de la célula progenitora linfoide y marcadores propios de cada etapa de maduración. (Adaptado de Buchner *et al.*, 2015; Hoffman *et al.*, 2009)



**Figura 3. Maduración esplénica de linfocitos B.** Maduración final de linfocitos B en bazo. Expresión de moléculas y receptores: lo, baja; int, intermedia; hi, alta. (Adaptada de Hoffman *et al.*, 2009)

Cualquier desequilibrio entre la diferenciación, proliferación y maduración pueden culminar en desórdenes del desarrollo hematopoyético, produciendo un estancamiento en el proceso de maduración sin la pérdida de la capacidad proliferativa. Esto puede producir enfermedades como la leucemia u otros desórdenes hematopoyéticos (Buchner *et al.*, 2015).

### 2.3 Leucemia

La leucemia es un grupo heterogéneo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada de células indiferenciadas que dan origen a las diferentes células sanguíneas, las cuales generalmente reemplazan el tejido hematopoyético y se infiltran en la sangre y otros órganos. Se clasifican como agudas o crónicas de acuerdo al tiempo en el que se desarrollan y como mieloides o linfoideas según la estirpe celular de procedencia (Rodak, 2005; Sánchez-Ortega *et al.*, 2007; Medina-Medina, 2010).

La leucemia representa un problema de salud pública ya que de las neoplasias diagnosticadas en menores de 18 años el 50% corresponde a leucemia, de éstas el 67.2% son de estirpe B, el 3.2% de estirpe T, el 27.2%

mieloblásticas y el 2.4% pertenece a leucemias agudas y crónicas poco frecuentes, incluyendo las bifenotípicas (Shalkow, 2017; Medina-Medina, 2010).

Los diferentes esfuerzos por lograr una identificación precisa de esta neoplasia evidencian la dificultad de su comprensión y clasificación. El incremento en la información disponible supone nuevos planteamientos para su diagnóstico, pronóstico y tratamiento (Medina-Medina, 2010).

### **2.3.1 Diagnóstico de la leucemia**

El diagnóstico de la leucemia se puede dar a partir de la sospecha clínica de signos y síntomas en los que se incluyen palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, adenomegalia, dolor óseo debido a la expansión de la médula ósea, petequias y cansancio extremo. Estos síntomas son reflejo de la insuficiencia de la médula ósea y la infiltración extra medular (Sánchez-Ortega *et al.*, 2007; Madrigal-Vargas, 2003; Hurtado-Monroy *et al.*, 2012).

En el caso de la leucemia aguda suele sospecharse desde la auscultación médica, pero en las leucemias crónicas la sintomatología resulta indolente hasta en un 50% de los casos, por lo que suele diagnosticarse en exámenes clínicos de rutina (Hurtado-Monroy *et al.*, 2012)

De acuerdo a la guía española para pacientes con LLA y sus familiares (De la Fuente Burguera, 2017) se toman en cuenta síntomas como pérdida de apetito, pérdida de peso, infecciones de repetición o problemas hemorrágicos, sobre todo aquellos de aparición brusca como síntomas cuya etiología podría ser de leucemia. La guía también menciona que el diagnóstico de la LLA debe ser realizado por un hematólogo y que es importante que éste se produzca de manera temprana y completa, determinando el tipo de LLA para orientar adecuadamente el tratamiento. En esta guía se menciona que la presencia de LLA se confirma a través de distintas pruebas de sangre y de médula ósea, además de otros procedimientos diagnósticos que incluyen un examen físico, un examen de analítica de sangre en donde se busca el aumento de leucocitos en sangre y el

análisis de una muestra de médula ósea en la que se busca una población linfoblástica superior al 30%. A la muestra de médula ósea se le realizan pruebas citogenéticas y bioquímicas que permitan determinar el subtipo de LLA. Pruebas de imagen como ecografías, resonancia magnética o tomografía axial permiten valorar la afección a otros órganos. A través del análisis citogenético se buscan diferentes alteraciones cromosómicas recurrentes y que se consideran primordiales para la clasificación de los pacientes en diferentes líneas de tratamiento, así como una prueba de hibridación FISH para la búsqueda cambios cromosómicos y una prueba de PCR o RTPCR para la búsqueda de cambios genéticos particulares que no son detectados por otros métodos, siendo factible el uso muestras de sangre periférica o médula ósea para el análisis citogenético. En adición, se debe realizar una prueba de inmunotipificación a la muestra de médula ósea para determinar el origen celular de la leucemia. (De la Fuente Burguera, 2017)

En el caso de las instituciones de salud mexicanas, para la determinación del diagnóstico de leucemia se utiliza con mayor frecuencia la clasificación de la FAB (Clasificación Franco-Americana-Británica, Cuadro 1). Esta clasificación está basada en el aspecto morfológico, línea celular afectada, grado de maduración, comportamiento citoquímico y porcentaje de blastos medulares que debe ser mayor al 30%. Sin embargo, debido a la constante actualización de información, la OMS determinó en el 2000 que el porcentaje de células anormales debe ser mayor al 20%. (Ferrero-Díaz, 2010; IMSS, 2018; Hurtado-Monroy *et al.*, 2012)

Cabe resaltar que la clasificación de la FAB no es la única, ni mucho menos la más actualizada, pero debido a su método de clasificación se sigue utilizando en los sistemas de salud mexicanos. Existen clasificaciones como la de la OMS que se encuentra en constante actualización y que toman en cuenta criterios clínicos, morfológicos y genéticos (Cuadro 2). Dentro de esta clasificación existen leucemias no clasificables de otro modo (NOS), mismas que se categorizan de acuerdo a estándares parecidos a los de la FAB por lo que ésta, aunque antigua,

no se encuentra en desuso (IMSS, 2018, Hurtado-Monroy *et al.*, 2012; Ferrero-Díaz, 2010).

**Cuadro 1. Clasificación de las leucemias de acuerdo a la FAB.**

<b>Leucemias Linfoblásticas</b>	
<b>L1</b>	Leucemia linfoblástica típica
<b>L2</b>	Leucemia linfoblástica atípica
<b>L3</b>	Leucemia similar al linfoma de Burkitt
<b>Leucemias Mieloblásticas</b>	
<b>M0</b>	Leucemia aguda mieloblástica con diferenciación mínima
<b>M1</b>	Leucemia aguda mieloblástica sin maduración
<b>M2</b>	Leucemia aguda mieloblástica con maduración
<b>M3</b>	Leucemia aguda promielocítica
<b>M4</b>	Leucemia aguda mielomonoblástica
<b>M4Eo</b>	Leucemia aguda mielomonoblástica con eosinófilos anormales
<b>M5</b>	Leucemia aguda monoblástica pura
<b>M6</b>	Eritroleucemia
<b>M7</b>	Leucemia aguda megacarioblástica

(Modificado de Hurtado-Monroy *et al.*, 2012)

La clasificación en base a las anomalías citogenéticas poseen importancia clínica ya que, dependiendo de la anomalía, se subclasifica y valora la leucemia. Esta información debe ser complementada con el inmunofenotipo y la descripción de la morfológica celular. Realizar un diagnóstico a partir de la morfología celular resulta muy complicado ya que, a pesar de que es posible clasificar las leucemias mieloides (M1, M2, M3, M4) y diferenciar en algunos casos una leucemia mieloide de una linfoide, no es posible distinguir una leucemia linfoblástica de células T de una de células B, por lo que la determinación del fenotipo y genética son imprescindibles.

**Cuadro 2. Clasificación de las leucemias linfoblásticas de acuerdo a la OMS.**

<b>Leucemias Linfoblásticas</b>	
<b>Clasificación</b>	<b>Impacto clínico</b>
Leucemia de células B, NOS	Sin patrón específico (NOS)
Leucemia de células B con t(9:22)(q34;q11.2); BCR-ABL1	t(9:22)(q34;q11.2); BCR-ABL: La proteína de fusión BCR-ABL, conocida como cromosoma Filadelfia, es una tirosina quinasa constitutivamente activa que impulsa la supervivencia y la proliferación a través de la señalización río abajo de múltiples vías de señalización, incluyendo MAPK, PI3K y mTOR. Esta proteína de fusión posee una región N terminal que facilita la dimerización y la autotransfosforilación, culminando en señalizaciones de proliferación y supervivencia, a pesar de las señales apoptóticas. Con el desarrollo de tratamientos como imatinib y fármacos de tercera generación los pacientes obtienen un mejor pronóstico ante esta translocación, en caso de no contar con esta estrategia terapéutica es considerada de mal pronóstico. (O'Hare, 2011; Agarwal <i>et al.</i> , 2012)
Leucemia de células B con t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)	t(12;21)(p13;q22); TEL-AML1 (ETV6-RUNX1): El producto de fusión TV6/RUNX1 (también conocido como TEL/AML) activa la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR teniendo impacto en la proliferación y supervivencia. Se encuentra en leucemias L1 y L2 con inmunofenotipo CD10+ con una frecuencia del 35% de los casos de LLA-B pediátrico y es generalmente asociada al buen pronóstico. La importancia como valor pronóstico sigue en discusión ya que los pacientes con esta translocación responden muy bien al tratamiento pero existe un alto porcentaje de recaídas tardías después de la remisión. (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2019; Sun <i>et al.</i> , 2017; Silva-Cruz <i>et al.</i> , 2016)
Leucemia de células B con hiperdiploidía	Se entiende por hiperploidía la presencia de 47 a 65 cromosomas en el cariotipo de las células leucémicas, y alta hiperdiploidía definida por 51 a 65 cromosomas. La hiperploidía es considerada de buen pronóstico y la explicación más aceptable es que los blastos leucémicos tienen una mayor tendencia a sufrir apoptosis ya que son más susceptibles a la quimioterapia. (Pérez, 2004)
Leucemia de células B con t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH	t(5;14)(q31;q32); IL3-IGH : En la leucemia con esta translocación se presenta una eosinofilia variable debido a la sobre expresión de IL3. Para su detección

	definitiva es necesaria una biopsia de MO, análisis citogenético e inmunotipificación, siendo blastos de morfología típica CD10+, CD19+. Presenta una incidencia de menos del 1% en leucemias tanto de niños como de adultos. Su presencia o ausencia no modifica el pronóstico. (National Cancer Institute, 2019; Emadi y Karp, 2017)
Leucemia de células B con t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)	t(1;19)(q23;p13.3); E2A-PBX1 (TCF3-PBX1): Es de las translocaciones más comunes con una incidencia del 20% en células con inmunofenotipo pre-B. El producto quimérico proteico produce la detención de la diferenciación celular, entre otros procesos celulares, y se le ha asociado con la infiltración a SNC. E2A- PBX1 inicialmente causa un bloqueo de la diferenciación celular normal de progenitores mieloides e induce apoptosis en las líneas celulares Pre-B. En la proteína de fusión resultante (TCF3-PBX1) el dominio de unión al ADN de E2A es reemplazado por el dominio de unión al ADN de TCF3, transformando las células por medio de la activación constitutiva de la transcripción de genes regulados por PBX1 o por otros miembros de la familia de proteínas PBX. Su expresión junto con hiperploidía se considera de pobre pronóstico. (Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology, 2019, Tirado <i>et al.</i> , 2015; Núñez y Aranguré, 2015)
Leucemia linfoblástica, NOS	Sin patrón específico
Leucemia linfática, NOS	Sin patrón específico
Leucemia linfocítica, NOS	Sin patrón específico
Leucemia linfoide alucémica	
Leucemia de células linfoide	
Leucemia de células linfoide subaguda	
Leucemia linfocítica crónica de células B/leucemia linfocítica pequeña	
Leucemia de células de Burkitt	
Leucemia de células T en adultos (HTLV-1 positivo)	

Leucemia linfocítica granular de células T grandes	
Trastorno linfoproliferativo crónico de las células NK	
Leucemia proliferocítica, NOS	Sin patrón específico
Leucemia proliferocítica, tipo de células B	
Leucemia proliferocítica, tipo de células T	
Leucemia linfoblástica de células precursoras, NOS	Sin patrón específico
Leucemia linfoblástica de células B precursoras	
Leucemia linfoblástica de células T precursoras	
Leucemia linfoblástica T	

Actualización del 04/2019, recuperado 19/05/2019.

Dentro del sistema de salud mexicano, en instituciones como el IMSS, Seguro Popular, ISSSTE y en servicios particulares suele usarse un algoritmo de diagnóstico en el que, a partir de la sospecha clínica, se solicitan estudios de laboratorio que incluyen: química sanguínea, biometría hemática (BH), pruebas de función hepática (PFH), lactato deshidrogenasa (LDH), frotis de sangre periférica para la observación de las células sanguíneas además de estudios de gabinete como radiografía de tórax para la observación del tamaño del timo, ultrasonografía para la valoración del hígado, resonancia magnética para la evaluación de los nódulos linfáticos, entre otros estudios que el médico considere necesarios. Si los resultados son presuntivos de leucemia se solicitará un aspirado de médula ósea, esta muestra será utilizada para la realización de 3 pruebas: determinación del inmunofenotipo, frotis de médula ósea y pruebas genéticas. De acuerdo a los resultados de estas pruebas se establecerá el diagnóstico, tratamiento y se tendrá

un pronóstico del desarrollo de la leucemia (IMSS, 2018; Medina-Medina 2010; Seguro Popular, 2005).

En adición a los estudios mencionados, es importante que a los pacientes diagnosticados con leucemia, sobre todo de estirpe B, se les realice una punción lumbar para estudiar el líquido cefalorraquídeo en búsqueda de células blásticas, debido a que se reporta infiltración en más de la tercera parte de los pacientes con síntomas neurológicos (Sánchez-Ortega *et al.*, 2007; Madrigal-Vargas, 2003).

Los estudios citogenéticos y la descripción del inmunofenotipo en conjunto con la descripción de la morfología celular permiten una mejor clasificación del tipo de leucemia por lo que estos estudios deben ser imprescindibles y complementarios.

### **2.3.2 Inmunotipificación**

A final de la década de 1980, la identificación de los antígenos de superficie de pacientes con leucemia y linfomas empezó a cobrar fuerza con el empleo inicial de la inmunohistoquímica y la microscopía de fluorescencia. Más tarde, con el empleo de la citometría de flujo fue posible la identificación de epítopes membranales con los que se pudo determinar el linaje de las células neoplásicas; el estudio se denominó inmunotipificación y se promovió su práctica debido a la correlación observada entre las estirpes celulares y el comportamiento clínico (Ruiz-Argüelles y Pérez-Romano, 2010).

La citometría de flujo es una técnica que permite el análisis multiparamétrico de poblaciones heterogéneas en suspensión. Esta técnica analiza miles de eventos por segundo y permite determinar las subpoblaciones celulares en base a las características individuales de cada célula analizada en la muestra, posibilitando así determinaciones con datos significativos (Martín-Muñoz, 2018; Leach *et al.*, 2015). El fundamento del análisis por citometría de flujo se basa en la estructura de sus tres sistemas, los cuales son:

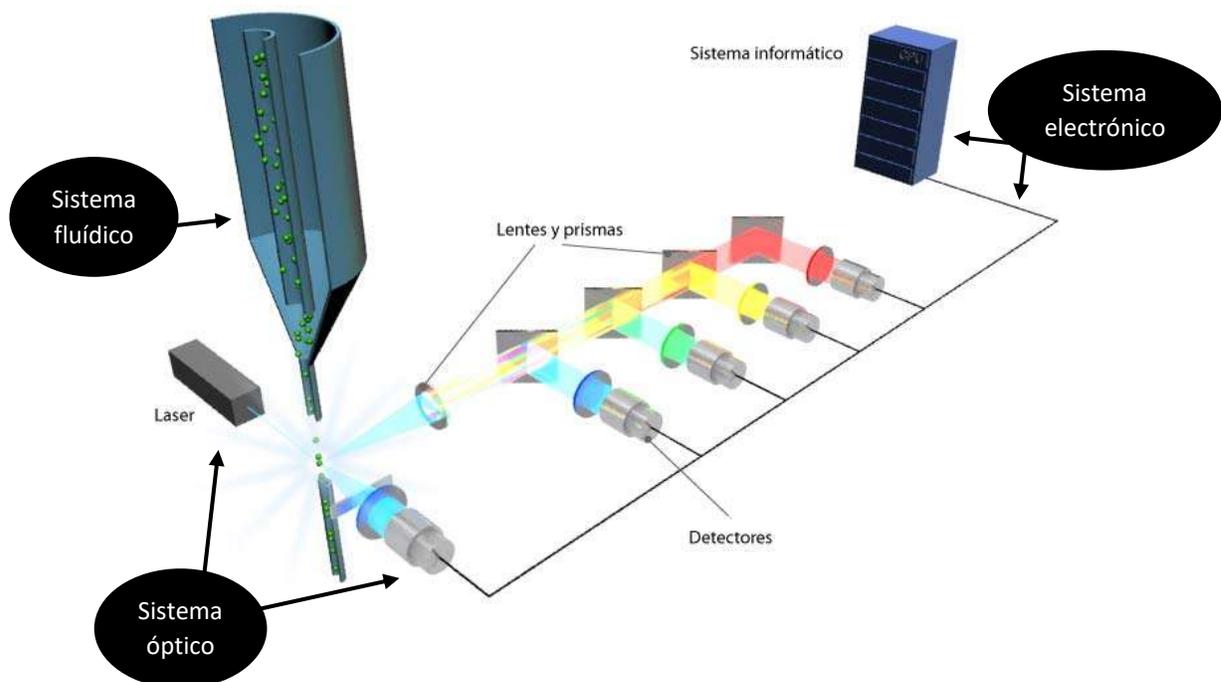
**1) El sistema fluídico.** El objetivo de este sistema es presentar a los eventos de una muestra (que pueden ser células o partículas) de manera individual al láser en el punto de interrogación (el punto donde atraviesan las células el haz de luz). El paso individual de los eventos se consigue por medio de la focalización hidrodinámica. La muestra en suspensión es inyectada en la cámara de flujo dentro de un fluido de mayor velocidad, conocido como fluido/solución envolvente que generalmente es una solución buffer de fosfato salino, de manera que las diferencias de densidad y velocidad de ambos fluidos impiden que éstos se mezclen. Debido a la diferencia de presión entre los dos fluidos, se produce un flujo coaxial más estrecho forzando a las células a colocarse en unifila antes de pasar por el punto de interrogación (Fig. 4). (Leach *et al.*, 2015, Resino-García, 2011)

**2) El sistema óptico.** La función del sistema óptico es la recolección de información a partir de la dispersión de la luz en el punto de interrogación. El sistema se conforma por la óptica de estimulación, compuesta por el láser con lentes de enfoque y prismas, y la óptica de recolección compuesta por lentes, espejos y filtros que colectan la luz y la dirigen a los sensores (detectores) ópticos específicos (Resino-García, 2011; Leach *et al.*, 2015). Los filtros ópticos (o canales) seleccionan longitudes de onda específicas que dejan pasar hacia el detector correspondiente. Es posible detectar la fluorescencia de dos, tres, cuatro o actualmente hasta 13 fluorocromos de diferentes longitudes de onda, dependiendo del equipo empleado para la determinación (dependiendo también del número de detectores que éste posea) (Fig. 4) (Resino-García, 2011).

**3) Sistema informático.** Se encarga de la cuantificación de los destellos de fluorescencia y de la luz dispersada. En el ordenador se traducen los datos obtenidos en los detectores y se almacenan los datos de miles de células por muestra, presentando los resultados gráficamente para su interpretación (Fig. 4) (Resino-García, 2011). Los datos pueden ser presentados en diferentes gráficos, entre los cuales encontramos: A) Histograma: utilizado para mostrar un sólo parámetro en relación al número de eventos, de tal manera que en el eje de las

ordenadas se encuentran el número de eventos contados y en el eje de las abscisas la intensidad de fluorescencia; B) Gráfico de puntos: utilizado para mostrar dos parámetros en los que cada punto representa una célula o molécula en donde la dispersión frontal corresponde al tamaño (abscisas) y la dispersión lateral a la complejidad o granularidad (ordenadas), permitiendo la identificación de las subpoblaciones celulares de acuerdo a tamaño y granularidad. Además de los gráficos de puntos (Dot Plot) se puede representar a los datos por medio de gráficos de densidad y contorno (Leach *et al.*, 2015).

Los parámetros típicamente medidos por citometría de flujo de manera simultánea para cada célula son (1) la dispersión frontal de la luz a 45° (Forward Scatter), valor proporcional al tamaño celular; (2) la dispersión de la luz ortogonal (Side Scatter), proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula; y (3) las intensidades de fluorescencia para diferentes longitudes de onda, dependientes del sistema óptico del equipo, proporcionales a la concentración de los fluorocromos y/o anticuerpos conjugados con fluorocromos seleccionados para cada determinación (Resino-García, 2011).



**Figura 4. Componentes principales del citómetro de flujo.**  
([https://biotechspain.com/es/tecnicacfm?iid=1104a\\_tecnica\\_citometra](https://biotechspain.com/es/tecnicacfm?iid=1104a_tecnica_citometra))

La clasificación de las células por medio de inmunotipificación se basa en la detección de marcadores, generalmente de superficie, que expresan las diferentes líneas celulares a través de los estados de diferenciación y maduración nombrados con las siglas CD seguido de un número ordinal (Ruiz-Argüelles y Pérez-Romano, 2010; Pui *et al.*, 1993). Además de los CD, existen otras tres proteínas con funciones inmunológicas importantes: el receptor de células B (BCR), el receptor de células T (TCR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) (Medina-Medina, 2010; Ruiz-Argüelles y Pérez-Romano, 2010; Pui *et al.*, 1993).

A pesar de las ventajas que supone la inmunodetección en el diagnóstico de leucemia, cabe destacar que:

- 1) No existe un antígeno (CD) específico de una enfermedad.
- 2) Todos los antígenos utilizados para la determinación de una neoplasia se expresan en células normales.
- 3) El cambio en la expresión de estos CD permite distinguir entre células neoplásicas y células no neoplásicas, ya sea por la intensidad de expresión (diferencias cuantitativas), expresión de marcadores de linajes diferentes (promiscuidad), expresión asincrónica de los marcadores (diferencias cronológicas), expresión de marcadores ajenos a un determinado espacio anatómico o por la abundancia/sobre expresión del marcador.
- 4) En algunas ocasiones, las células neoplásicas no presentan aberraciones en la expresión de CD, lo que dificulta su identificación. En estos casos es necesaria la realización de otras pruebas de diagnóstico como la citogenética.

Con ayuda de la inmunotipificación es posible realizar diagnósticos diferenciales y clasificaciones de las neoplasias hematológicas, aumentando la precisión del diagnóstico de neoplasias (Ruiz-Argüelles y Pérez-Romano, 2010; Pui *et al.*, 1993).

Al igual que las clasificaciones, no existe un sólo panel de anticuerpos (CD) que deba utilizarse para el diagnóstico. Ante esta problemática se establecieron

consensos, como el europeo que emplean un número elevado de CD para la determinación. En Latinoamérica, sin embargo, la aplicación de estos paneles resulta insostenible como método de detección en organismos públicos de salud, debido a los costos implicados en la adquisición de los anticuerpos necesarios para estos paneles, pues pueden superar los presupuestos destinados a esta área del sector salud. Ante esta problemática, se realizó la Primera Conferencia Latinoamericana de Consenso para la Inmunofenotipificación de Leucemia por Citometría de Flujo, que se celebró en la ciudad de Puebla, México y cuyas recomendaciones fueron publicadas en el año de 1998. En el año 2005 se realizó la segunda conferencia, implementando la idea de incluir los anticuerpos de manera que “no sea menos de lo necesario ni más de lo suficiente”. Este tipo de consensos se encuentran en constante actualización para el desarrollo y estandarización de técnicas de diagnóstico y la elaboración de paneles de detección apropiados, realizando tamizajes de detección (Ruiz-Argüelles y Pérez-Romano, 2010).

Se han descrito más de 20 proteínas pertenecientes al linaje de células B y su expresión a través de las etapas de maduración ha sido sujeto de estudio, determinada como específica la expresión de CD19 desde etapas tempranas de diferenciación así como CD22. En la leucemia, las clonas leucémicas pierden la capacidad de diferenciarse y por lo tanto no son funcionales, sin embargo, conservan la capacidad proliferativa; en la mayoría de las leucemias no hay una expresión controlada de marcadores (productos de la expresión génica selectiva) por lo que se pueden identificar las aberraciones antes mencionadas en la expresión de CD (Ruiz-Argüelles y Pérez-Romano, 2010; Hoffman, 2009).

Así, la determinación del inmunofenotipo resulta imprescindible para la clasificación y seguimiento; además, puede proveer información pronóstica del desarrollo de la enfermedad. En el caso de CD10, las LLA CD10- son más resistentes a glucocorticoides, asparaginasa, tiopurinas, antraciclinas e ifosfamida, pero más sensibles a citarabina comparado a LLA pre-B. Estos valores pronósticos deben correlacionarse con la información proporcionada por los

análisis genéticos, ya que en el 80% de las leucemias se pueden identificar aberraciones en ploidía. Como ejemplo, en los casos de hiperploidía se tiene un mejor pronóstico que se relaciona con una susceptibilidad mayor a antimetabolitos como metotrexato, 6-mercaptopurina y asparaginasa; además, pueden ser identificadas modificaciones como translocaciones (Cuadro 2), por lo que es necesaria la realización de un cariotipo y análisis con mayor sensibilidad como FISH o PCR para su identificación (Medina-Medina, 2010, De la Fuente Burguera, 2017).

Con base en la clasificación dada por la descripción de los estudios citogenéticos, al inmunofenotipo y a la clasificación morfológica, el médico determinará el tratamiento más pertinente para cada paciente.

### **2.3.3 Esquemas de tratamiento**

Las asignaciones de tratamiento en base al riesgo es la principal estrategia terapéutica que se utiliza en los niños con LLA. Los pacientes se estratifican en grupos de factores de riesgo, en base a las características biológicas y clínicas, que incluyen los resultados citogenéticos y el resultado del inmunotipificado al momento de su diagnóstico (Cuadro 3). Una favorable respuesta inicial al tratamiento se considera como factor de buen pronóstico, así como la presencia de productos de fusión como en el caso de ETV6-RUNX1 o hiperploidía (Seguro Popular, 2005; Secretaría de Salud, 2009; IMSS, 2018, Silva-Cruz *et al.*, 2016, Pérez, 2004). Con la finalidad de aumentar las probabilidades de curación, se utilizan los antecedentes de tratamiento de diversos casos para determinar la conveniencia de aplicar tratamientos más o menos agresivos.

Las tasas de supervivencia entre niños que tienen riesgo favorable son aproximadamente del 80%, mientras que los niños con criterio de "alto riesgo" son menores al 70%. En base a la información obtenida de los estudios citogenéticos y de inmunotipificación, los porcentajes se modifican en rangos de menores al 40% a mayores del 85%.

**Cuadro 3. Factores de riesgo a considerar para establecer el esquema de tratamiento.**

<b>Factor</b>	<b>Pronóstico/Riesgo</b>
<b>Edad</b>	Los pacientes menores de un año y mayores de 10 años tienen peor pronóstico.
<b>Sexo</b>	Las niñas tienen mejor pronóstico que los niños ya que las células blásticas tienden a almacenarse en los testículos y producen recaídas.
<b>Raza</b>	Se ha observado una menor respuesta al tratamiento en niños de raza negra e hispanos
<b>Conteo de glóbulos blancos</b>	Los pacientes con hiperleucocitosis (conteos mayores a 400,000) son de alto riesgo para complicaciones graves como hemorragia a SNC y leucostasis.
<b>Cifra de leucocitos al momento del diagnóstico</b>	Esta determinación es variable, las cuentas mayores a $10 \times 10^9$ de L-B y mayores a 10,000 en L-T se asocian a mayor porcentaje de recaída a SNC.
<b>Inmunofenotipo</b>	Las células con menor grado de diferenciación responden de mejor manera al tratamiento.
<b>Ploidía</b>	Los pacientes con hiperploidía son más sensibles a la quimioterapia, en cambio los pacientes con hipoploidía presentan menor respuesta a ella.
<b>Citogenética</b>	El aumento de cromosomas (hiperploidía), sobre todo de los cromosomas 4, 10, 17 y 18 tiene una mejor respuesta al tratamiento. Las translocación t(12;21) es de buen pronóstico; en cambio, las translocaciones t(9;22) (cromosoma Filadelfia), t(1;19), translocaciones del cromosoma 4 y todas las translocaciones 11q23 son de mal pronóstico.
<b>Respuesta a la ventana de prednisona</b>	Valor pronóstico al tratamiento
<b>Remisión completa de la enfermedad</b>	Valor pronóstico al tratamiento
<b>Enfermedad mínima residual</b>	Valor pronóstico al tratamiento

(Seguro Popular, 2005; Secretaría de Salud, 2009; IMSS, 2018)

El éxito en el tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda infantil (LLA) requiere del control de la enfermedad sistémica (de la médula, el hígado, el bazo, los nódulos linfáticos, etc.), así como del tratamiento (o prevención) de la enfermedad extramedular, particularmente en el sistema nervioso central (SNC). Si existe infiltración a SNC y no se diagnostica, los pacientes tarde o temprano presentarán manifestaciones de LLA en SNC; en estos casos debe administrarse una terapia dirigida específicamente al SNC (administración intratecal de medicamentos, irradiación craneal, quimioterapia sistémica de dosis elevada con metotrexato o citarabina) (Seguro Popular, 2005; Secretaría de Salud, 2009; IMSS, 2018).

El tratamiento de los niños con LLA se divide en etapas: 1) inducción a la remisión, 2) tratamiento post-remisión o consolidación, y 3) terapia de mantenimiento o continuación (Seguro Popular, 2005).

En todos los pacientes se lleva a cabo una fase de intensificación de la terapia después de una inducción a la remisión. La duración media de la terapia de mantenimiento en los niños con LLA varía entre 2 y 3 años, y en algunos casos es necesario un trasplante de médula ósea (Seguro Popular, 2005; IMSS, 2018). \*(Para consultar el tratamiento completo, consultar las tablas 7 y 8 de la Guía de Diagnóstico, IMSS, 2018)

En la guía de la OMS de aplicación de los conocimientos en el control del cáncer para diagnóstico y tratamiento se menciona que más del 70% de todas las muertes por cáncer se producen en países con ingresos económicos bajos y medios, ya que en estos países los recursos disponibles para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento del cáncer son limitados o inexistentes. Sin embargo, la OMS recomienda implementar cuatro componentes básicos del control del cáncer: la prevención, la detección temprana y/o diagnóstico, el tratamiento y los cuidados paliativos, procurando evitar o curar muchos cánceres, así como controlar el sufrimiento que provocan.

En esta estrategia, la prevención hace referencia sobre todo a enfermedades crónicas y a otros problemas relacionados con el desarrollo de

neoplasias como hepatitis B, VIH/SIDA, salud laboral y medio ambiental, entre muchas otras

La detección temprana permite diagnosticar la enfermedad en etapas en las cuales existe un alto potencial de curación, como en el caso de cáncer de mama o de cuello de útero, y para ello existen dos estrategias:

- 1) Diagnóstico temprano: Implica que el paciente sea consciente de los primeros signos y síntomas permitiendo así el diagnóstico oportuno.
- 2) Tamizaje nacional o regional: Implica la detección de lesiones precancerosas o en fases tempranas de cáncer en individuos aparentemente sanos y asintomáticos que participan en jornadas de prevención.

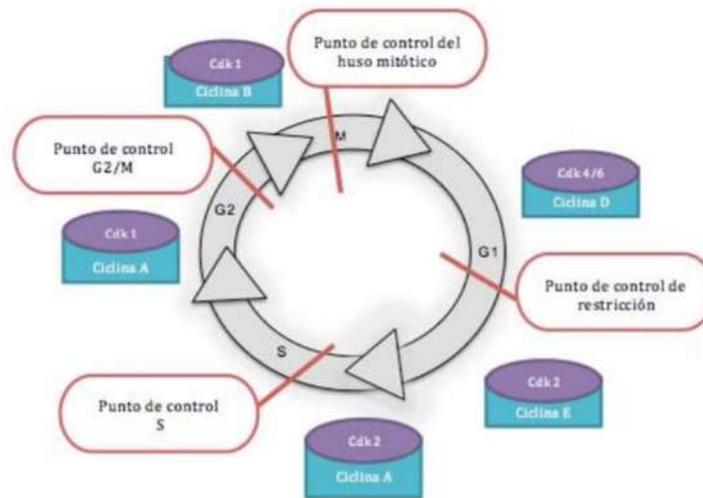
El tratamiento pretende curar la enfermedad, así como prolongar y mejorar la calidad de vida; incluye las diversas técnicas y procedimientos utilizados para detectar o confirmar la presencia de cáncer. Finalmente, los cuidados paliativos son aquellos que satisfacen las necesidades de todos los pacientes que requieran alivio de los síntomas, necesidades de atención psicosocial y de sus familias, en particular, cuando los pacientes se encuentran en fases avanzadas y tienen muy pocas probabilidades de curación o cuando se enfrentan a la fase terminal de la enfermedad (OMS, 2017).

Considerando que los tratamientos actuales contra el cáncer se encuentran mayormente dirigidos a células proliferativamente activas, incluso los de leucemias, resulta importante determinar el estado proliferativo de la población celular de la neoplasia. Una forma de conocer el estado proliferativo es a través de marcadores específicos para distinguir entre quiescencia-proliferación o entre fases específicas del ciclo celular.

## 2.4 Ciclo celular

La célula es considerada la unidad básica de la vida, procede de otra célula preexistente y se origina por la división de esta última. La célula se divide a través de una serie ordenada de procesos denominado ciclo celular; en él la célula aumenta su tamaño, duplica su material genético y, al final del proceso, se divide en dos células hijas. El ciclo celular es un proceso que está controlado por una serie de proteínas y moléculas de tipo interno como las ciclinas, las proteínas cinasas y los inhibidores de ciclinas, o de tipo externo como los factores de crecimiento y hormonas. Los procesos coordinados por estas moléculas son el crecimiento celular, la replicación del ADN y la correcta división celular, entre otros (Valdespino-Gómez *et al.*, 2015). La progresión secuencial de las fases del ciclo celular está coordinada mediante la actividad de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), que a su vez están reguladas a través de la unión a ciclinas. Las ciclinas son una familia de proteínas cuyos miembros son sintetizados y degradados de manera específica en cada fase del ciclo celular (Fig. 5) (Spoerri *et al.*, 2005, Poon 2016). El término de “punto de control” se refiere al mecanismo mediante el cual una célula activa detiene la progresión del ciclo celular hasta asegurar que el proceso previo se haya completado de manera adecuada (Kastan *et al.*, 2004). Si las células progresan a la próxima fase del ciclo celular, antes de que la fase anterior se complete de manera adecuada, puede producirse daño genético y/o celular. Para reducir al mínimo este tipo de errores durante los acontecimientos del ciclo celular, el progreso de una célula a través del ciclo se supervisa en al menos cuatro puntos de control bien definidos (Fig.5) (Spoerri *et al.*, 2015, Poon 2016).

El ciclo celular fue definido por Howard y Pelc en 1953 como un proceso compuesto por dos fases: la interfase (subdividida en las fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub> y G<sub>2</sub>) y la mitosis (subdividida en profase, prometafase, metafase, anafase y telofase). La interfase es un proceso altamente regulado que posee 3 de los puntos de control durante el ciclo y que se encuentran en las transiciones entre cada fase (Eberhard, 2007; Rhind y Russel, 20016; Vermeulen *et al.*, 2003).



**Figura 5. Ciclo celular.** Las CDKs y las ciclinas permiten la progresión del ciclo celular a través de sus cuatro puntos de control.

Dichos puntos son los siguientes:

El primer punto de control regula la transición de fase G1/S. En la fase G1 se reciben las señales mitogénicas del medio extracelular. Adicionalmente, en esta fase la célula sintetiza proteínas y duplica los organelos celulares, teniendo como consecuencia un crecimiento en su masa celular. El punto de control de esta fase es conocido como el punto de restricción en mamíferos o punto R; se encuentra en G1 tardía, antes de la transición a la fase S, y es el punto de no retorno. En este punto se verifica el tamaño celular y para superarlo es necesaria la hiperfosforilación de Rb (que posee 16 sitios de fosforilación) mediada por las ciclinas D y E, permitiendo así la liberación del factor transcripcional E2F. Se ha reportado que la fosforilación de los sitios Ser608 y Ser612 es suficiente para la liberación de E2F, ya que éstos son los sitios de interacción entre Rb y E2F. (Rhind y Russell, 2016; Vermeulen *et al.*, 2003; Burke *et al.*, 2010; Alberts *et al.*, 2006)

En la fase S del ciclo celular se duplica el material genético y en el punto de control de esta fase se verifica la integridad del material génico con ayuda de moléculas como p53, el llamado guardián del genoma y cuya alteración ha sido

reportada en varios tipos de cáncer. En caso de que la integridad del material genético se vea comprometida por modificaciones, daño o errores no corregibles, la célula entrará en apoptosis. (Rhind y Russell, 2016; Vermeulen *et al.*, 2003)

En la fase G2 se generan las proteínas necesarias para la mitosis. El punto de control de esta fase se encuentra en G2 tardía y M temprana. La detención del ciclo celular en este punto de control es poco común y está controlado por Wee1 y Cdc25. (Rhind y Russell, 2016)

Las proteínas maestras de la regulación del ciclo celular son las cinasas dependientes de ciclinas (CDK por sus siglas en inglés cyclin-dependent kinases). Pertenecen a una familia de cinasas de serin/treonina que son activadas en diferentes puntos del ciclo celular. Se han identificado 9 CDK, de las cuales 5 se activan durante el ciclo celular (Cuadro 4). En la fase G1 ocurre la activación de CDK4 y CDK6, en S de CDK2, y en G2 y M la activación de CDK1. Las concentraciones de las CDK permanecen estables durante el ciclo celular; pero para activarlas es necesario formen un complejo activo con las ciclinas, cuya concentración varía a través de las diferentes fases del ciclo celular, permitiendo así el control de la activación de las CDK (Vermeulen *et al.*, 2003). Asimismo, se han identificado 16 ciclinas (Cuadro 4), pero no todas participan en el ciclo celular (Vermeulen *et al.*, 2003).

**Cuadro 4. Ciclinas y CDK necesarias en cada fase del ciclo celular.**

CDK	Ciclina	Fase del ciclo celular en la que se encuentra activa
<b>CDK4</b>	Ciclina D1,D2,D3	Fase G1
<b>CDK6</b>	Ciclina D1,D2,D3	Fase G1
<b>CDK2</b>	Ciclina E	Transición G1/S
<b>CDK2</b>	Ciclina A	Fase S
<b>CDK1</b>	Ciclina A	Transición G2/M
<b>CDK1</b>	Ciclina B	Mitosis
<b>CDK7</b>	Ciclina H	CAK, activa en todas las fases

Además del control del ciclo celular por medio de la actividad de los complejos ciclina/CDK, se tienen a los inhibidores de ciclinas (CKI por sus siglas en inglés Cyclin dependent kinases inhibitors) que pueden unirse a las CDK o al complejo ciclina/CDK (Cuadro 5). (Vermeulen *et al.*, 2003)

**Cuadro 5. Familia de inhibidores de CDK y de los complejos Ciclina/CDK.**

CKI	Función	Miembros de la familia	También conocidos como
<b>Familia INK4</b>	Inactivación de los CDK de G1 (CDK4 y 6)	p15 p16 p18 p19	INK4b INK4a INK4c INK4d
<b>Familia Cip/Kip</b>	Inactivación de los complejos Ciclina/CDK de G1 y la ciclina B/CDK1	p21 p27 p57	Waf1, Cip1 Cip2 Kip2

La pérdida del control durante las diferentes fases del ciclo celular tiene repercusiones tanto para las células hijas como para el organismo entero. Debido a que la función central del ciclo celular es duplicar a las células de forma fidedigna, un fallo en este proceso puede tener consecuencias graves, como la modificación del material genético o la pérdida misma del control proliferativo, teniendo como resultado patologías como la leucemia. (Passarge, 2007; Alberts *et al.*, 2006)

Gookin *et al.*, en 2017, realizaron un estudio para describir el perfil dinámico de diferentes proteínas asociadas al ciclo celular. Realizaron un mapeo de perfiles proteicos utilizando una sincronización digital del ciclo celular con ayuda de la identificación individual de cada fase del ciclo celular a través de marcadores expresados en fase. En este estudio mencionan la problemática de que células en quiescencia espontánea aparecen en proporciones variables en las muestras biológicas y como no se pueden distinguir de las células en proliferación, se conduce a una mayor variación aparente de célula a célula y a una menor

precisión en la cuantificación del comportamiento de las proteínas. Por lo mismo, la distinción de las células proliferativamente activas de las células no proliferativas o en quiescencia resulta indispensable. Con la utilización de un panel multiparamétrico de citometría de flujo pudieron seleccionar y distinguir las poblaciones que se encontraban en cada fase del ciclo celular (G1, S, G2 y M), pudiendo discernir además las células proliferativamente inactivas (G0). Esto les permitió realizar la cuantificación y el mapeo del comportamiento de expresión de las proteínas de interés a través de las distintas fases del ciclo celular.

La identificación individual de las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular tiene un valor importante ya que, para el caso del estudio de LLA, la combinación de la identificación particular de las poblaciones en cada fase y la expresión de una proteína de interés puede brindar información valiosa para el diagnóstico y/o tratamiento de cada caso. En neoplasias distintas a la leucemia se toman en cuenta marcadores representativos de la actividad celular proliferativa, como en el caso de Ki-67 utilizado en cáncer de mama como indicador pronóstico.

## **2.5 Ki-67**

Ki-67 es una proteína nuclear cuya expresión está estrictamente asociada con la proliferación celular. La expresión de esta proteína se da exclusivamente durante las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2 y M). La detección de Ki-67 con anticuerpos específicos indican que la intensidad de su concentración incrementa gradualmente al pasar de G1 hasta la metafase de la mitosis y que disminuye durante la anafase y telofase de la mitosis. Durante la interfase puede detectarse dentro del núcleo (principalmente en el nucléolo) y durante la mitosis la mayor parte de la proteína se relocaliza a la superficie de los cromosomas individuales; no está presente las células en reposo (G0). Debido a esto, se utiliza como indicador de la actividad proliferativa en neoplasias como el cáncer de mama. Se reporta su expresión como la fracción de células tumorales positivas para Ki-67 (índice de marcación Ki-67) y a menudo se correlaciona con el curso

clínico de la enfermedad, además de que permite determinar el índice de crecimiento tumoral (Scholzen y Gerdes, 2000).

Este marcador ha sido evaluado en neoplasias no sólidas, incluyendo a LLA. Drach *et al.* (1989) determinaron la expresión de Ki-67 en pacientes con linfoma no Hodgkin, LLA, LMA, LMC y LMC con crisis blástica; evaluaron la expresión en muestras de sangre periférica y de médula ósea. En este estudio encontraron que la expresión difiere entre los tipos de muestras, con una diferencia de expresión notable: mayor expresión en las muestras de médula ósea. Los autores señalan que la expresión de Ki-67 es diferente para cada neoplasia determinada en el estudio y que se debe tener cuidado al comparar los valores de Ki-67 de diferentes tejidos, ya que existe una heterogeneidad marcada dependiendo del tejido neoplásico, además de la diferencia encontrada entre las muestras de sangre periférica y de médula ósea.

En otro estudio, Jaroslav *et al.* (2005) evaluaron la expresión de ciclina D1 y de Ki-67 en pacientes con LMA, LMC, LLC, LLA y con linfoma mieloide de manto. Estos autores reportaron una correlación inversa entre ciclina D1 y Ki-67: las muestras con alta expresión de ciclina D1 presentaban baja expresión de Ki-67, mientras que las muestras con baja expresión de ciclina D1 mostraban alta expresión de Ki-67. Cabe resaltar que en este estudio también se observa gran heterogeneidad en la expresión de Ki-67 entre las muestras de las distintas neoplasias estudiadas y que ciclina D1 no es considerado un buen marcador proliferativo, ya que sus niveles varían incluso en células en reposo (Gookin *et al.*, 2017).

En ambos estudios, la expresión de Ki-67 varía ampliamente entre cada tipo de neoplasia. Adicionalmente, la dispersión entre las mismas muestras de LLA es evidente en el trabajo de Drach *et al.* (1989). Por lo anterior, es importante continuar con la búsqueda y/o validación de marcadores que representen la actividad proliferativa celular en muestras de tejido neoplásico. En base a las estrategias terapéuticas actuales, la descripción de nuevos marcadores proliferativos puede brindar información pronóstica y/o coadyuvar en la elección

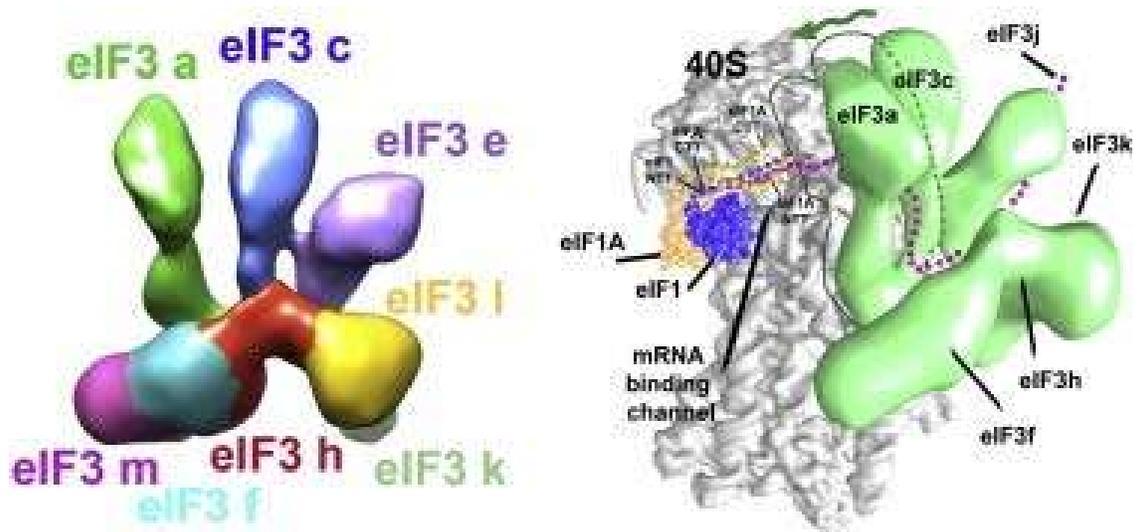
del esquema de tratamiento. Un marcador proliferativo candidato pudiera ser la proteína eIF3f.

## 2.6 eIF3f

La expresión de la proteína eIF3f también está asociada con la proliferación celular. Las concentraciones de eIF3f fluctúan en las fases activas del ciclo celular (teniendo un máximo de expresión en la fase M y un segundo pico en la fase S temprana); en estado quiescente eIF3f se encuentra en concentraciones basales (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010). Asimismo, la expresión de eIF3f está sumamente regulada y es esencial para la viabilidad celular: al sobre expresar la concentración de eIF3f o al silenciarla, la célula entra en apoptosis (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).

La proteína de eIF3f está codificada por un gen antiguo y monogénico en la mayoría de las especies eucariotas; en humanos está organizado en 8 exones distribuidos en aproximadamente 9 kb. Pertenece a la familia génica Mov34, que relaciona a sus miembros por contener un dominio Mpr1p, Pad1p N-terminal (MPN por sus siglas en inglés) en el extremo amino terminal de la proteína. Se sugiere que este dominio está relacionado a la capacidad de la proteína de asociarse a complejos multiproteicos, involucrados en procesos tan diversos como la iniciación de la traducción, la regulación del proteosoma y la transcripción. De allí que la función más descrita para eIF3f sea en relación a su participación en el complejo multiproteico conocido como eIF3 (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).

El factor eucariótico de iniciación de la traducción 3 (eIF3) tiene una función central en la síntesis de proteínas debido a su participación en la formación del complejo de preiniciación 43S. eIF3 es el mayor de los factores traduccionales de iniciación, con un peso de aproximadamente 800 kDa y, en humanos, se encuentra conformado por 13 subunidades no idénticas nombradas de eIF3a a eIF3m (Fig. 6) (Querol-Audi *et al.*, 2016; Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010).



**Figura 6. Estructura de eIF3.** Modelo tridimensional de eIF3 con sus subunidades y acoplado a la subunidad menor 40S. (Obtenido y adaptado de Querol-Audi *et al.*, 2016)

En el proceso de la síntesis de proteínas, el paso limitante es la iniciación y los factores de inicio de la traducción de eucariotas (eIF por sus siglas en inglés: *eukaryotic Initiation Factor*) tienen una función primordial en regular el inicio de la traducción. En el inicio de la traducción se unen eIF3 y eIF4C a la subunidad 40S ribosómica, y eIF6 se une a la subunidad mayor (60S). La subunidad menor interacciona con el ARNt que se encuentra unido al aminoácido iniciador (metionina) y éstos a su vez se encuentran unidos a eIF2. Los factores de eIF4 interaccionan con el ARNm y ayudan a localizar el codón de inicio AUG deslizándose a través de ARNm por el extremo 5', formando así el complejo de preiniciación 43S. Tras la detección del codón de inicio se une la subunidad ribosomal 60S y se hidroliza el GTP de eIF2, separando todos los factores de iniciación, teniendo como consecuencia la unión de las subunidades ribosomales y la formación del ribosoma funcional 80S, dando inicio al proceso de traducción (Herráez, 2012; Querol-Audi *et al.*, 2016).

Dentro de las subunidades que conforman a eIF3 se encuentra la subunidad eIF3f, cuya disminución en la expresión se ha reportado en cánceres

gástricos, pancreáticos y melanomas; sin embargo, las causas del decrecimiento no han sido esclarecidas aún.

En 2008 Doldan *et al.* evaluaron 24 especímenes de melanoma, reportando un cambio de C por T en 2 de los 8 exones de eIF3f. Este cambio no tuvo efecto en los aminoácidos sintetizados y concluyeron que las mutaciones no son la causa del descenso de la expresión de eIF3f en muestras de melanoma (Doldan *et al.*, 2008a). En otro estudio, también del 2008, Doldan *et al.* analizaron 32 muestras de tejidos de pacientes con cáncer pancreático (Doldan *et al.*, 2008b); utilizaron 3 marcadores de microsatélites próximos a eIF3f, encontrando una pérdida alélica que no parece explicar la causa de la disminución en la concentración de eIF3f, descartando una posibilidad más.

En 2014, Li *et al.* realizaron un estudio de 195 casos de pacientes diagnosticados con cáncer gástrico (CG) sin quimioterapia. Evaluaron la concentración de eIF3f del tejido de CG y la compararon con las concentraciones del tejido adyacente libre de cáncer. Determinaron que la disminución de eIF3f se asocia con estadios tumorales más avanzados. La disminución en la concentración de eIF3f no mostró correlación con el sexo, la edad, ni el tamaño del tumor, pero sí con un mal pronóstico y con el estado diferencial de las células.

En otro estudio del 2014, Cheng *et al.* analizaron 195 casos de CG y reportaron que la expresión de eIF3f se encuentra disminuida: la expresión relativa de eIF3f fue del 33.8% en tejido con CG y del 59.5% en tejido adyacente sano. Adicionalmente, correlacionaron la expresión de eIF3f con la expresión de dos marcadores pronósticos de CG: CEA y CEA19-9, encontrando una correlación negativa entre la expresión de eIF3f y CEA; esta relación, a su vez, se asoció con estados tumorales más avanzados. No encontraron correlación alguna entre las concentraciones de eIF3f y CEA19-9.

En el año 2015 Cheng *et al.* evaluaron 195 casos de CG y determinaron que en el tejido canceroso hay una expresión disminuida de eIF3f, al ser comparada con tejido adyacente libre de cáncer. En adición, compararon la expresión de eIF3f con la expresión del marcador pronóstico de CG, HER2/neu

(receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano). Encontraron que la concentración de HER2/neu era mayor en los tejidos con bajas concentraciones de eIF3f; los pacientes con esta relación cursaron un mal pronóstico con una menor supervivencia.

Dentro de nuestro grupo de trabajo, Bautista-Tejeda (2017) realizó una prueba piloto del análisis de la concentración de eIF3f en linfocitos de pacientes con LLA, en comparación con la de linfocitos inducidos a proliferación de voluntarios sanos. Esta prueba describe el mismo patrón de expresión descrito en los estudios antes mencionados: una disminución de la expresión de eIF3f en muestras de pacientes con LLA. Además, al determinar la concentración de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular, se observó el mismo comportamiento descrito por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010), teniendo una expresión máxima en la fase G2/M, seguida por una menor expresión en la fase S y, finalmente, un mínimo en G0-G1 (Fig. 7, 8 y 9).

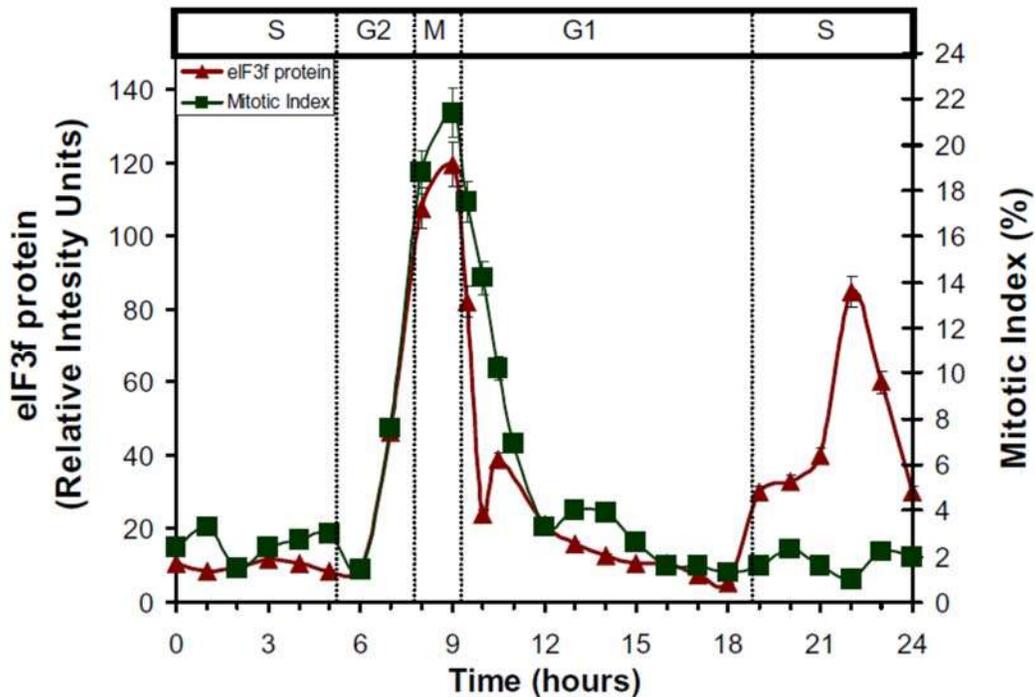
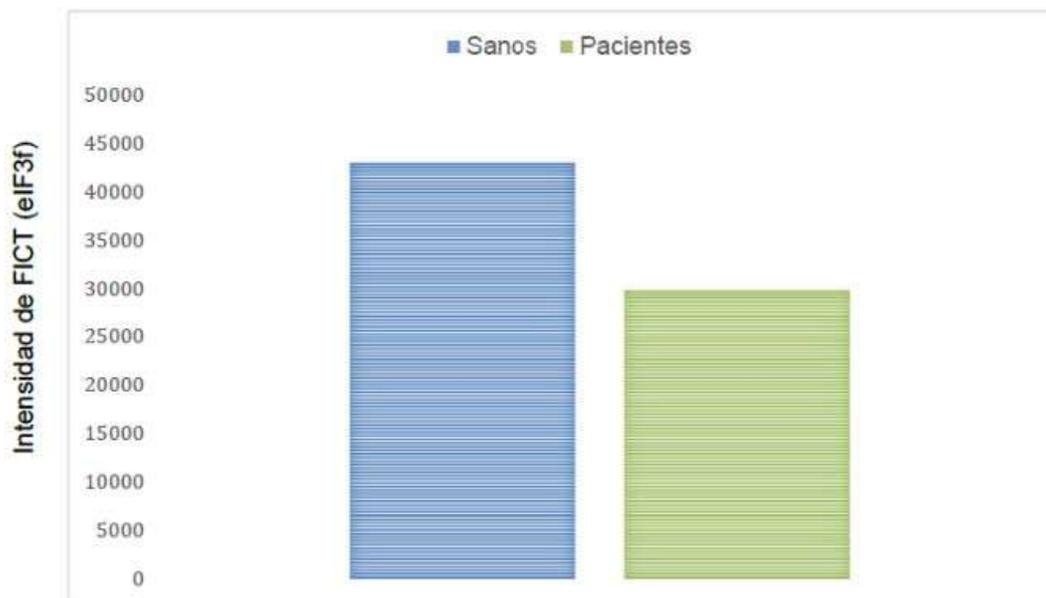


Figura 7. Perfil de expresión de eIF3f durante las diferentes fases del ciclo celular de A549. (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010)



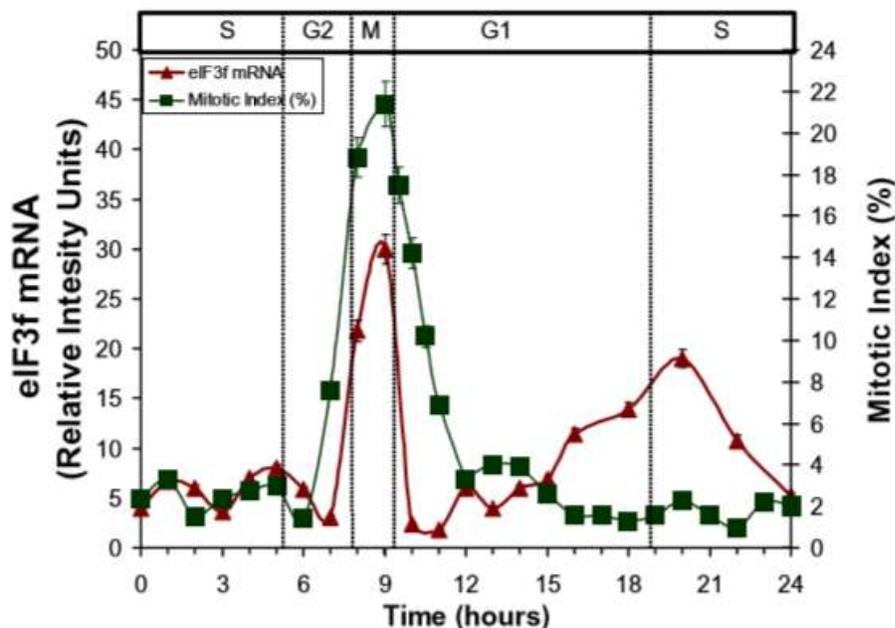
**Figura 8. Expresión de eIF3f en linfocitos de voluntarios sanos inducidos a proliferación.** (Bautista-Tejeda, 2017): Comparación de la expresión de eIF3f en linfocitos en quiescencia vs. linfocitos en proliferación (t de Student de muestras apareadas,  $p < 0.05$ ).



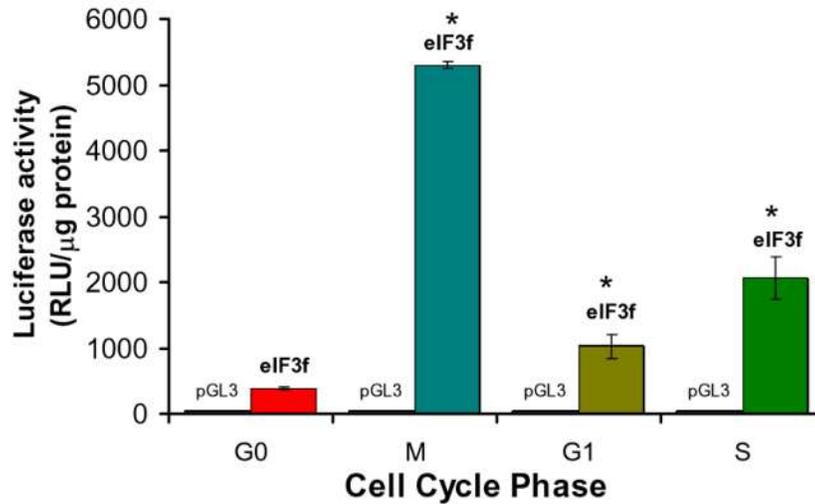
**Figura 9. Expresión de eIF3f en linfocitos de pacientes con LLA.** (Bautista-Tejeda, 2017): Comparación de la expresión de eIF3f en linfocitos sanos en proliferación (activados) vs. linfocitos de pacientes con LLA.

### 2.6.1 Regulación de la expresión de eIF3f

La expresión de eIF3f es finamente regulada debido a sus funciones, ya que tanto la sobre expresión como el silenciamiento tienen como consecuencia la apoptosis celular. Esta regulación se da a nivel transcripcional (el primer nivel de regulación en la expresión de proteínas) como demostraron Higareda-Mendoza y Pardo-Galván en 2010 al determinar las concentraciones de eIF3f por Western blotting y del ARNm por Northern blotting. En ambas determinaciones encontraron que la concentración de eIF3f oscila a través de las fases activas del ciclo celular, teniendo dos picos máximos de expresión: uno en S temprana y el segundo en M. En adición, corroboraron la actividad transcripcional por medio de una transfección de la primer kilobase del promotor del gen eIF3f unido al gen reportero luciferasa, utilizando como control las construcciones del plásmido para el promotor sin el reportero. La actividad transcripcional se determinó en cada fase del ciclo celular en cultivos celulares sincronizados, con enriquecimientos de células en G0 por inanición de suero, en S por adición de hidroxurea (HU) y en M por adición nocodazol: encontrando el mismo perfil de expresión antes descrito (Fig. 10, 11).



**Figura 10. Perfil de ARNm de eIF3f durante las diferentes fases del ciclo celular.** El perfil transcripcional de ARNm para eIF3f es el mismo que para el perfil de expresión de proteínas en células A549 (ver Fig. 7) (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010)



**Figura 11. Actividad transcripcional de eIF3f por ensayo de luciferasa.** Al determinar la actividad transcripcional por medio del gen reportero luciferasa se observa el mismo perfil de expresión de ARNm y proteína de eIF3f (ver Fig. 7, 10) (Higareda-Mendoza y Pardo-Galván, 2010)

La expresión de un gen puede ser regulada a múltiples niveles: a nivel transcripcional, a nivel del procesamiento del ARNm así como la estabilidad de este, a nivel traduccional y postraduccional con modificaciones como miristilaciones, acetilaciones, metilaciones, glicosilaciones y, la mas común, fosforilación. Dentro del grupo de trabajo se tienen varios trabajos relacionados a eIF3f que aportan información sobre las posibles funciones de eIF3f. Por ejemplo, Bolaños-Cornejo (2009) reportó que los elementos de regulación transcripcional para eIF3f se encuentran en la primer kilobase de la región promotora. Hernández-Soto (2005) reportó que eIF3f posee sitios de miristilación y glicosilación, además de reportar que el retropseudogen en el cromosoma 2 (secuencia que no posee regiones intrónicas) se encuentra presente en chimpancés, por lo que éste no es exclusivo de humanos. Mendoza-Pineda (2008) identificó por métodos bioinformáticos las regiones de mayor probabilidad de silenciamiento por ARNi y, por medio de ensayos con éstos, determinó que el silenciamiento de eIF3f por ARNi tiene una gran similitud sobre el efecto apoptótico en comparación con el uso de secuencias antisentido. Gómez-Correa (2013) realizó un análisis bioinformático para definir los posibles sitios de fosforilación de eIF3f, encontrando

y demostrando experimentalmente la fosforilación del sitio Ser258 por medio de la actividad de Ciclina B/CDK1.

Ya que no existen reportes fuera del grupo de trabajo de la expresión de eIF3f en la LLA, aunado a que esta proteína posee una expresión bifásica, con máximos en las fases que son blanco para el tratamiento quimioterapéutico, su uso en un panel multiparamétrico de citometría de flujo en muestras de médula ósea de pacientes con LLA-B permitirá tener un antecedente sobre el estado proliferativo celular y su relación con la expresión relativa de eIF3f en las poblaciones celulares de cada fase del ciclo celular.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es un problema de salud pública ya que representa el 50% de las neoplasias diagnosticadas en menores de 18 años, siendo la mayoría procedentes de células B. Los tratamientos actuales están dirigidos a células proliferativas, por lo que las leucemias con bajos índices proliferativos son de peor pronóstico.

Se acepta que la determinación del índice proliferativo representa una valiosa información diagnóstica. Existen marcadores utilizados para determinar la actividad proliferativa, como Ki-67. Sin embargo, la expresión de este marcador depende del tejido en el que es determinado, suponiendo una amplia heterogeneidad y dificultando su utilidad como marcador proliferativo.

Se sabe que la expresión de eIF3f aumenta y fluctúa en las fases del ciclo celular y que su expresión está altamente regulada. Se ha reportado en varios estudios una disminución en la expresión de eIF3f en diferentes neoplasias, sin embargo, no existen antecedentes de estudios en neoplasias no sólidas: como el caso de LLA-B. Aunque dentro del grupo de trabajo se determinó que la expresión de eIF3f se encuentra disminuida en muestras de pacientes con leucemia, el dato no representa una diferencia significativa por el tamaño de muestra; en este estudio sólo fue posible validar estadísticamente los valores de los linfocitos de pacientes sanos inducidos a proliferación.

El desarrollo y establecimiento de un panel multiparamétrico de citometría de flujo para la identificación de las poblaciones celulares individuales para cada fase del ciclo celular, en combinación con el estudio de una proteína de interés cuya expresión fluctúa a través de las fases del ciclo celular, puede permitir su descripción como indicador de la actividad proliferativa. Así, el presente proyecto permitirá validar estadísticamente los resultados preliminares, mostrando que la expresión de eIF3f es indicativa del estado proliferativo y que proporciona un valor pronóstico en LLA-B.

## **4. HIPÓTESIS**

La disminución en la expresión de eIF3f correlaciona negativamente con la expresión de marcadores de mal pronóstico para LLA-B y positivamente con el índice proliferativo.

## **5. OBJETIVOS**

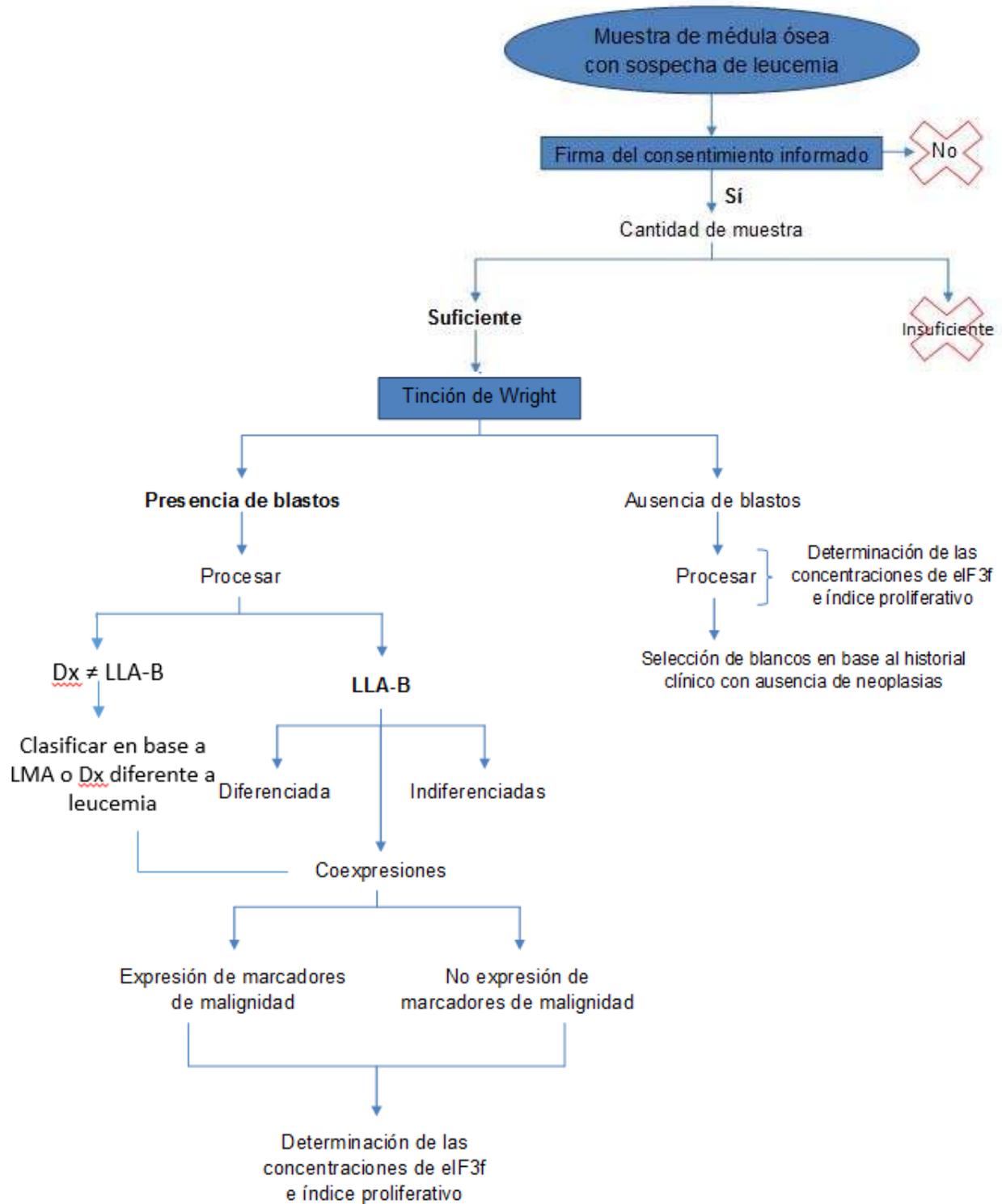
### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar si la expresión de eIF3f representa la actividad proliferativa y tiene valor como marcador pronóstico en LLA-B y/o en otras patologías hemáticas.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Desarrollar un panel de detección de ciclo celular fase dependiente.
2. Determinar el índice de proliferación y la concentración de eIF3f en cada fase del ciclo celular en las muestras de médula ósea de pacientes con LLA-B.
3. Determinar si existen correlaciones entre la expresión de eIF3f, el índice proliferativo y los marcadores considerados de mal pronóstico para LLA-B.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Muestreo

Se realiza el muestreo bajo las consideraciones éticas de la Declaración de Helsinki, el reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la NOM-012-SSA3-2012 que establece los criterios para la ejecución de proyectos de investigación para salud en seres humanos y la NOM-004-SSA3-2012 que establece los lineamientos de uso del expediente clínico. Se informa de los objetivos del proyecto por medio de un consentimiento informado a los tutores legales de pacientes con sospecha de leucemia que tengan indicado un aspirado de médula ósea. El consentimiento informado debe ser firmado por el tutor legal como signo de aceptación de la participación del proyecto de investigación. Una vez obtenida la firma se piden las muestras de aspirados de médula ósea y se solicita la revisión del expediente clínico. La recolección de muestras se lleva a cabo en el Hospital Infantil "Eva Sámano de López Mateos".

Los aspirados son realizados por los médicos especialistas y entregados para la investigación una vez que se hayan realizado las pruebas para las cuáles fueron solicitados. Las muestras recibidas se trasladan inmediatamente al laboratorio para realizar un extendido en laminilla que es teñido por tinción de Wright con el objetivo de describir las características morfológicas de las células de cada muestra. Posteriormente son procesadas con el protocolo de inmunotipificación y el protocolo del panel de ciclo celular para su análisis por citometría de flujo con un equipo CytoFLEX®.

### **7.1.1 Diseño experimental**

Se utilizó el programa FluorFinder 2.0 para el diseño de un panel de detección de las fases específicas del ciclo celular y se desarrolló un protocolo para la implementación de éste, minimizando la interacción entre los fluorocromos utilizados.

Con ayuda del programa Minitab® se realizó un análisis de respuesta de superficie para definir las variables que pueden influir en el protocolo diseñado para la detección del ciclo celular. Con ayuda de este análisis es posible optimizar el proceso en base al establecimiento teórico de las condiciones experimentales más favorables.

### **7.2 Criterios de inclusión**

Pacientes de nuevo ingreso con indicación de aspirado de médula ósea, que cuenten con la aprobación y firma del consentimiento informado.

### **7.3 Criterios de exclusión**

Pacientes cuyo tutor no acepte participar en el estudio.

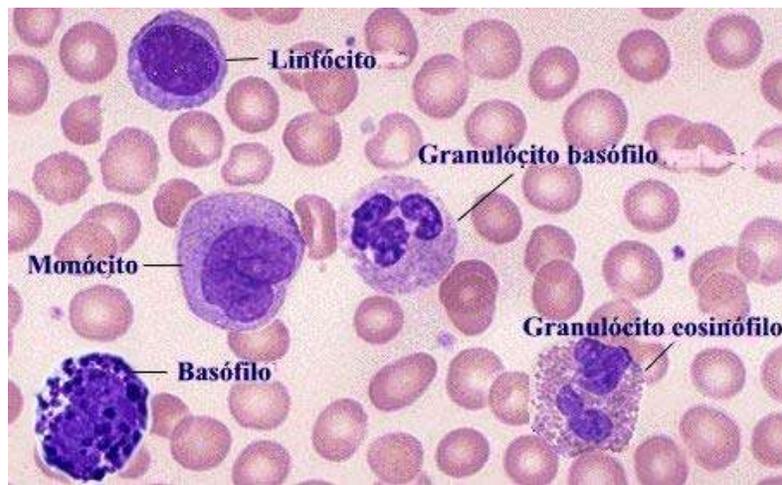
### **7.4 Criterios de eliminación**

- Cantidad de muestra insuficiente.
- Muestra coagulada o con filamentos de fibrina abundantes.
- Células con poca o nula viabilidad celular.

### **7.5 Identificación de blastos**

Se lleva a cabo mediante un kit de tinción Wright (HYCEL reactivos químicos ®), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. De manera general, se realiza un frotis en un portaobjetos marcado para su identificación, mismo que se deja secar

a temperatura ambiente (TA). Una vez secos los frotis, se colocan las muestras sobre un puente de tinción que se encuentra en una charola y se agrega 1 mL de azul de metileno (o el suficiente para cubrir el porta objetos), dejando actuar durante 3 min. Pasado este tiempo, se añade un volumen igual, gota a gota, de agua tamponada a pH 6.8, soplando ligeramente con la pipeta para conseguir una muestra homogénea. Después de 3 min se retira el colorante, se lava con agua tamponada (pH 6.8) y se deja secar al aire libre sobre papel absorbente. Finalmente, se observan las muestras en el microscopio a 40X para la realización del conteo y a 100X para la identificación de leucocitos (Fig. 12).



**Figura 12. Técnica de tinción de Wright.**

(<http://explorandolabiohematologia.blogspot.com/2011/04/recuento-diferencial.html>)

## 7.6 Determinación del inmunofenotipo

Con base en los estudios realizados en instituciones de salud pública y a los estados de maduración de células linfocíticas B, se diseñó un panel de anticuerpos para la identificación de éstas. Se incluyeron además marcadores de coexpresión con LMA, cuya presencia es considerada de mal pronóstico (Cuadro 6).

Para la realización del inmunofenotipo, la muestra debe ser tratada con 1 mL de solución de lisis 1X (BD FACS™ Lysing Solution) por cada 100 µL de sangre total durante 10 minutos a TA. Posterior a la incubación, la muestra se lava: se centrifuga a 200 g durante 5 min, se retira el sobrenadante, se resuspende en 1 mL de solución de lavado (PBS 1X, BSA 0.2%, EDTA 5 mM) y se vuelve a centrifugar para retirar el sobrenadante. Después de lavar la muestra, se le agregan 500 µL de solución fijadora (paraformaldehído al 2%) y se incuba durante 15 min a TA. A continuación se realiza la permeabilización celular con Tritón X-100 al 0.2% incubando durante 10 minutos a TA. Terminada la permeabilización, la muestra se lava dos veces y se añaden los anticuerpos de superficie (CD45, CD10, CD19, CD11b, CD33, CD13, BD FACS®) a una dilución 1:100 en solución de lavado con un volumen final de 100 µL. Se incuba durante 1 h en agitación leve y con protección de la luz. Posteriormente, la muestra se lava para luego incubar 1 h con los anticuerpos intracelulares (TdT, IgM, BD FACS®), en las mismas condiciones antes mencionadas. Finalmente, la muestra se lava, resuspende en 100 µL de solución de lavado y es analizada por citometría de flujo.

**Cuadro 6. Panel para la inmunotipificación.**

Marcador	Utilidad
<b>CD45</b>	Permite realizar un mapeo celular para la identificación de células de origen hematopoyético.
<b>CD19</b>	Marcador diferencial de la estirpe linfocítica B.
<b>CD10</b>	Presente en las etapas tempranas de maduración de células linfocíticas B, su ausencia se ha reportado como indicador de mal pronóstico.
<b>CD11b</b>	Marcador de coexpresión de LLA B con LMA, indicador de mal pronóstico.
<b>CD13</b>	Marcador de coexpresión de LLA B con LMA, indicador de mal pronóstico.
<b>CD33</b>	Marcador de coexpresión de LLA B con LMA, indicador de mal pronóstico.
<b>TdT</b>	Permite identificar las etapas más inmaduras del desarrollo de linfocitos B.

<b>IgM</b>	Permite diferenciar las etapas más cercanas a la madurez de linfocitos B.
<b>MOP</b>	Permite diferenciar a las células granulares de origen mieloide

### 7.7 Cultivo de linfocitos

Para la obtención de muestras control en estado proliferativo se optó por realizar un cultivo de linfocitos de muestras de niños a quienes se les hubiera indicado toma de muestra de sangre periférica y que no presentaran alteraciones leucocitarias. Para ello, se solicita al padre o tutor legal que firme el consentimiento informado, a continuación el químico designado al área toma una muestra de sangre por venopunción en un tubo con heparina y se homogeniza por inversión delicada 5 veces. En condiciones de esterilidad se añaden 10 mL de medio esencial mínimo (MEM, SIGMA-ALDRICH) suplementado con 10% SFB, estreptomicina (0.1 mg/mL), penicilina (100 U/ml) y 1.5% v/v de fitohemaglutinina (PHA) en un tubo cónico de 45 mL; el medio debe estar precalentado a 37°C en baño María. Al tubo con el medio se le añaden 8 gotas de sangre heparinizada con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio, se cierra perfectamente y se sella con parafilm. El tubo se incuba a 37°C durante 72h. Posteriormente, se centrifuga a 200 g durante 5 min, se retira el sobrenadante y se resuspende el paquete celular en 8 mL de solución de lisis eritrocitaria. Se incuba durante 15 min a TA, se centrifuga a 200 g y se resuspende en 1 mL de solución de lavado (PBS 1X, BSA 0.2% y EDTA 5 mM). Se procesa de acuerdo a los protocolos de inmunotipificación y ciclo celular.

## 7.8 Aplicación de panel de ciclo celular y detección de eIF3f

Con base en la bibliografía, específicamente en lo reportado por Burke *et al.* (2010), se seleccionaron marcadores específicos para identificar cada fase del ciclo celular; además de utilizar los marcadores CD19 y CD45 para la selección de la población linfocítica B (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Panel de ciclo celular.**

Marcador	Utilidad
<b>CD45</b>	CD presente en las células hematopoyéticas (excepto plaquetas y eritrocitos) expresado mayormente en células maduras, lo que permite realizar un mapeo celular.
<b>CD19</b>	Marcador específico de células B.
<b>BrdU</b>	Análogo de timidina que se incorpora hasta en un 95% al ADN de células en fase S.
<b>Anti BrdU</b>	Anticuerpo para la detección del BrdU incorporado.
<b>eIF3f</b>	Proteína de interés y posible marcador pronóstico.
<b>pHH3 (Ser28)</b>	La fosforilación de la histona H3 es clave en la compactación del ADN, necesario para la fase M.
<b>pRb (Ser608)</b>	La fosforilación de RB en la serina 608 permite la liberación de E2F en G1 tardía.
<b>DAPI</b>	Intercalante estequiométrico de ADN, que permite su cuantificación.

Para el procesamiento del panel de ciclo celular, la muestra se resuspende en 1 mL de medio de cultivo MEM atemperado a 37°C, sin sobrepasar una densidad celular de  $2 \times 10^6$  células/mL. Se le añade BrdU (BioLegend®) a una concentración de 3.3 µg/mL y se incuba durante 120 min a 37°C. Una vez terminada la incubación, la muestra se lava: se centrifuga durante 5 min a 200 g, se retira el sobrenadante, se resuspende en 1 mL de solución de lavado (PBS 1X, BSA 0.2%, EDTA 5 mM) y se vuelve a centrifugar para retirar el sobrenadante. La muestra se resuspende en 100 µL de solución de lavado y se le añaden los anticuerpos superficiales CD19 (BioLegend®) y CD45 (BeckmanCoulter) a una dilución 1:100. Se incuba en agitación ligera y con protección de la luz durante 30

min. Terminada la incubación, la muestra se lava y se resuspende en 500  $\mu$ L de solución fijadora (paraformaldehído al 2%); se incuba durante 15 min a TA. Posteriormente, la muestra se lava, se resuspende en 980  $\mu$ L de solución de lavado y se le añade Tritón X-100 al 10% para obtener una concentración final de 0.2%, por efecto de dilución; se homogeniza cuidadosamente y se incuba durante 15 min a TA. Una vez terminada la incubación, la muestra se lava dos veces, se resuspende en 50  $\mu$ L de DPBS (Dubecco's Phosphate Buffered Saline con  $MgCl_2$  y  $CaCl_2$ , SIGMA), se le añaden 20  $\mu$ g de DNAsa I (Stratagene®) y se incuba durante 1 h a 37°C. La muestra se lava, se resuspende en 100  $\mu$ L de solución de lavado y se le añade el anti BrdU (BioLegend®), anti eIF3f (BioLegend®) previamente conjugado con FITC por medio del kit Mix-n-Stain™ (Biotium) de acuerdo con las especificaciones del proveedor, anti pHH3(Ser608) (BioLegend®) y anti pRB(Ser608) (SAB Biotech®) a una dilución 1:100; se incuba en agitación ligera durante 30 min a TA, protegiendo de la luz. Finalizada la incubación, la muestra se lava, se resuspende en 100 $\mu$ L de solución de lavado y se le añade el anticuerpo secundario anti conejo (SAB Biotech®) para la detección del anti pRB(Ser608); se incuba durante 30 min a TA con agitación ligera y protegida de la luz. La muestra se lava, se resuspende en 1 mL de solución de lavado con RNasa (4  $\mu$ g/mL) y se incuba 15 min a 37°C y protegida de la luz. Finalmente, la muestra se lava, se resuspende en 100  $\mu$ L de PBS 1X con DAPI (1  $\mu$ g/ $\mu$ L) y se incuba a 4°C durante 30 min para ser analizada por citometría de flujo.

### **7.8.1 Estandarización del panel de ciclo celular y detección de eIF3f**

Previo a la aplicación del panel de ciclo celular y detección de eIF3f a muestras de médula ósea, se validó el panel de ciclo celular en la línea celular A549. Esta línea celular (nivel de bioseguridad es 1) se propaga en Medio Mínimo Esencial (MEM, por sus siglas en inglés) de Sigma-Aldrich®, suplementado con 18 mM  $NaHCO_3$  (Sigma-Aldrich®), 2 mM L-glutamina (Sigma-Aldrich®), y suero fetal bovino (SFB) al 10% (Invitrogen™); los cultivos se mantienen en la fase log de crecimiento a 37°C y en una atmósfera de  $CO_2$  al 6%, realizando resiembras y cambio de medio

tres veces por semana en una cabina de seguridad biológica Clase II A2 (ThermoForma™). Una vez validado el panel de ciclo celular, la estandarización se realizará con cultivos de linfocitos de muestras de sangre periférica de voluntarios sanos, en las condiciones de cultivo antes descritas.

Para la validación se optó por retar el panel en muestras de cultivo de células A549 con distintas distribuciones celulares al momento de su colecta. Así, para enriquecer la población celular en la fase G0 se sincroniza cambiando el medio de cultivo por MEM suplementado con sólo 1% de SFB (en lugar de 10%), para enriquecer a la población en la fase S del ciclo celular se adiciona al medio de cultivo 0.8 mM de hidroxurea (HU) y para enriquecer a la población en la fase M del ciclo celular se adiciona al medio de cultivo 0.4 µg/mL nocodazol. De manera general, se resiembró la línea celular A549 en un frasco T25 dejando adherir las células por 24 h. Posteriormente se lavan las células con PBS 1X tres veces y se procede a añadir el agente sincronizante. Para obtener una mayor distribución de células en las distintas fases del ciclo celular, se utilizaron células colectadas a las 24 h de haber resembrado un cultivo no sincronizado a una confluencia aproximada del 30%.

Para la validación de la detección de las poblaciones en G0 y G1 se realiza una sincronización celular por medio de la privación de suero (MEM con 1% SFB) dejando incubar 72 h a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo las células se cosechan y se procesan de acuerdo al protocolo descrito en anteriormente, con la única diferencia que sólo se añaden los componentes para detectar el contenido de ADN (DAPI) y pRB(Ser608). Lo mismo se realiza con células de un cultivo no sincronizado y con linfocitos quiescentes de un voluntario sano (ya que estas células se encuentran en G0 naturalmente). Finalizado el protocolo se adquieren los datos por medio de un citómetro de flujo CytoFlex y se comparan los perfiles resultantes para validar al marcador que diferencia a las células G0 de las de G1.

Para la validación de la detección de las poblaciones en la fase S se agrega medio con HU 0.8 mM y se deja incubar 24 h a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo las células se liberan realizando lavados múltiples con PBS1X y se le

añade medio con BrdU, se incuban durante una hora a 27°C con 6% de CO<sub>2</sub>, cosechan y se procesan de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, adicionando sólo anti BrdU y DAPI. Lo mismo se realiza con células de un cultivo no sincronizado. Finalizado el protocolo se adquirieren los datos por medio de un citómetro de flujo CytoFlex y se comparan los perfiles resultantes para validar al marcador de células en la fase S.

Para la validación de la detección de las poblaciones en la fase M se agrega medio con nocodazol y se deja incubar por 24 h a 37°C con 6% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo las células se cosechan y se procesan de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos, con la única diferencia que sólo se les añade DAPI y anti pHH3(Ser608). Lo mismo se realiza con células de un cultivo no sincronizado. Finalizado el protocolo se adquirieren los datos por medio de un citómetro de flujo CytoFlex y se comparan los perfiles resultantes para validar al marcador que diferencia a las células G2 de las de M.

Por último, para finalizar esta validación y asegurar que el panel diseñado detecta correctamente cada fase del ciclo celular, es necesario utilizar todos los marcadores de ciclo celular juntos, en al menos un cultivo sincronizado y uno no sincronizado. Para la estandarización del panel de ciclo celular, debe utilizarse todo el panel de ciclo celular (incluyendo CD45 y CD19) con linfocitos obtenidos de sangre periférica de voluntarios sanos, cultivados (activados) y no cultivados. Por motivos de la contingencia sanitaria actual este experimento no pudo realizarse, por lo que queda pendiente para futuros trabajos.

### **7.8.2 Análisis de respuesta de superficie para la optimización de la preparación de muestras de origen hemático para estudios por citometría de flujo**

Un diseño de análisis de respuesta de superficie es un conjunto de técnicas avanzadas de diseño de experimentos (DOE) que ayudan a entender mejor y a optimizar la respuesta. Se utiliza para modelar y analizar problemas en los que una variable de interés es influenciada por otras variables. Con frecuencia se emplea para refinar los modelos después de haber determinado los factores que influyen de forma importante, utilizando diseños de cribado o diseños factoriales, especialmente si se sospecha que existe curvatura en la superficie de respuesta (Soporte técnico de Minitab, 2019). Se realizó un análisis de respuesta de superficie con el programa Minitab después de generar una matriz de variables y factores. Se identificaron todas aquellas variables que pudieran interferir en el análisis por citometría de flujo de muestras hemáticas, así como todos los factores que interfieren en cada una de las variables identificadas. Estas variables y factores se establecieron en base a la experiencia de experimentación y a lo reportado en la bibliografía.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Descripción de la población de estudio y sus controles

El objetivo inicial de este trabajo era determinar el perfil de expresión de eIF3f en linfocitos de pacientes con LLA-B; sin embargo, debido a la cantidad de muestras recibidas con un diagnóstico diferente a LLA-B, se decidió incluir todas las muestras analizadas en el trabajo. Para poder comparar los perfiles de expresión de eIF3f utilizamos linfocitos de individuos sanos menores de 18 años y las muestras de MO.

Para la recolección de muestras de médula ósea (MO) se incluyeron a los pacientes menores de 18 años que acudieran al servicio de oncología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos” bajo sospecha de leucemia y que no estuvieran bajo ningún tratamiento quimioterapéutico, es decir, los pacientes con diagnóstico *de novo* invitando al padre o tutor a participar en el proyecto por medio de la firma del consentimiento informado. Posteriormente se solicitó al médico encargado de la toma de muestra de MO un tubo adicional que, de acuerdo a las recomendaciones del manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico del 2015, fue etiquetado con el nombre del paciente y fecha de la toma de muestra. Para su embalaje se utilizó un recipiente hermético y térmico que contiene una gradilla rodeada de bloques de hielo. La muestra fue trasladada, tras ser obtenida y embalada, al laboratorio de Biología Celular Humana para su procesamiento inmediato.

Para la recolección de los controles se solicitaron muestras de pacientes que acudieran a realizarse un análisis de rutina, tal como biometría hemática, grupo sanguíneo o química sanguínea, y que resultaran sin alteraciones leucocitarias. Se obtuvieron en total 11 controles, los cuáles se trataron de igual manera que las muestras con la única excepción de que a éstos se les realizó un cultivo linfocítico para su enriquecimiento en las diferentes fases del ciclo celular.

En total se recolectaron 40 muestras de las cuales 6 se procesaron con el fluorocromo AlexaFluor-647 para la detección de la expresión de eIF3f, debido a

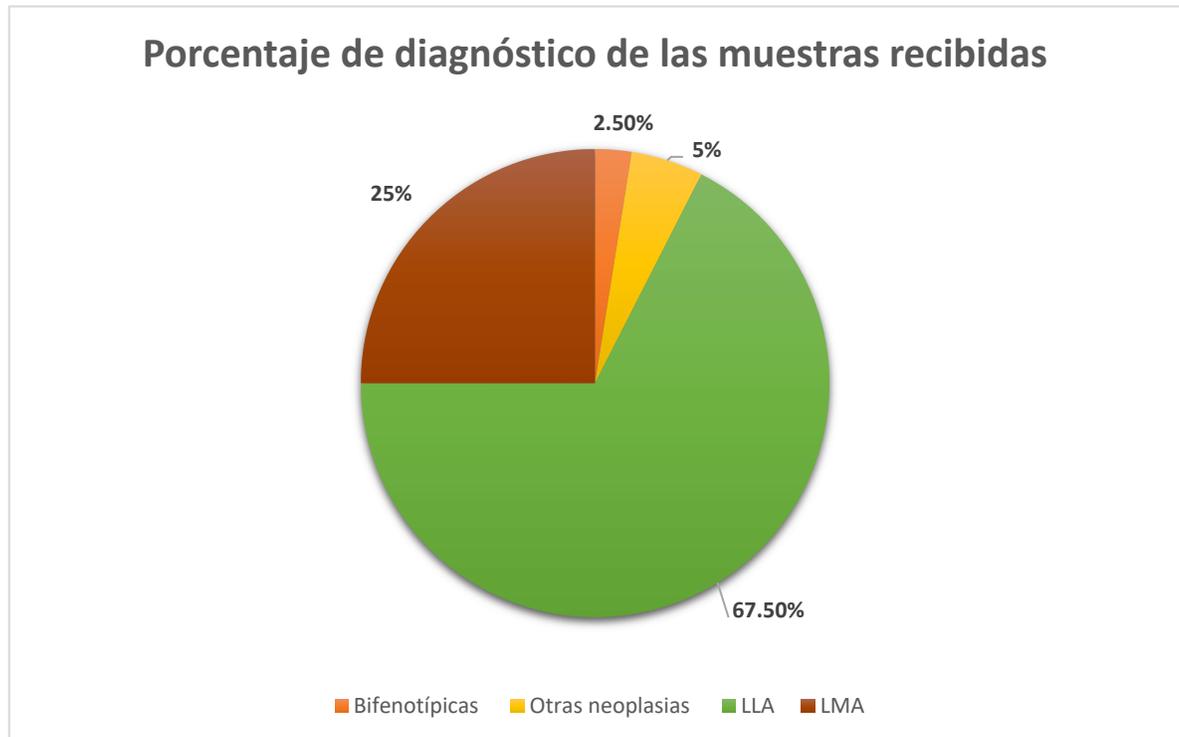
que éste fluorocromo puede ser utilizado en conjunto con FITC conjugado al anti CD19 y con PerCP-Cy5.5 conjugado a CD45, sin que éstos tengan interferencias entre sí, lo que permitiría la correcta detección de las subpoblaciones celulares incluyendo a los linfocitos y linfoblastos. Sin embargo, este fluorocromo resulto tener una fluorescencia excesiva, lo que evitó la correcta detección de la expresión de eIF3f siendo indistinguibles las diferencias de expresión entre las fases del ciclo celular, por lo que se optó por trabajar con la fluorescencia de FITC para la detección de eIF3f en las 34 muestras restantes. Para el análisis de resultados se dividieron las muestras en 2 grupos generales de acuerdo al fluorocromo utilizado y a su vez se realizaron subdivisiones de acuerdo al diagnóstico. Para el caso de las muestras procesadas con AlexaFluor-647 se analizaron 10 controles con sus cultivos correspondientes.

Para fines estadísticos poblacionales se tomaron en cuenta las 40 muestras en conjunto teniendo que el 65% de los pacientes fueron de sexo masculino y el 35% femenino. Esto concuerda con lo descrito en la bibliografía en la que se describe que el 50% de los casos *de novo* corresponden a leucemia; de éstas el 67.2% son de estirpe B, el 3.2% de estirpe T, el 27.2% mieloblásticas y el 2.4% pertenece a leucemias agudas y crónicas poco frecuentes, incluyendo las bifenotípicas (Shalkow, 2017; Medina-Medina, 2010)

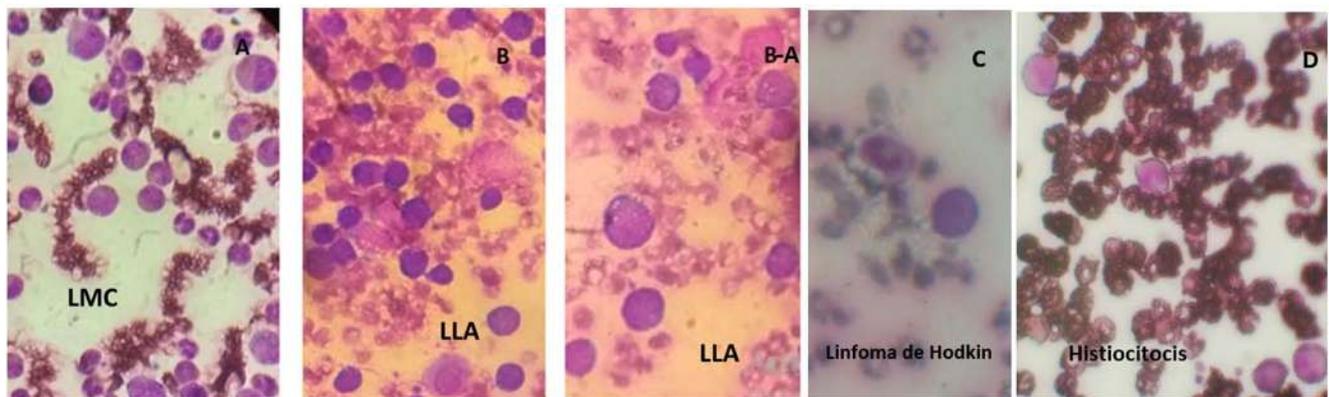
En cuanto a edades, el 7.5% fueron menores de un año, 52.5% se encontraban en un rango de edad de 1 a 10 años, el 22.5% corresponden a pacientes mayores a 10 años y del 17.5% se desconoce la edad ya que no hay expedientes clínicos ni estudios de estos pacientes en el hospital, éstos datos también concuerdan con lo descrito por Shalkow (2017) y Medina-Medina (2010).

De las 40 muestras colectadas, el 25% de las muestras tuvieron diagnóstico de LMA (Fig.13, Fig.14-A), el 67.5% tuvo un diagnóstico de LLA-B de las cuales de acuerdo a la clasificación morfológica de la FAB el 96.2% fueron L1 (Fig.13, Fig.14.B-A) y el 3.7% L3 (Fig.13, Fig.14-B-B). El 7.5% obtuvo un diagnóstico diferente a leucemia, entre los que se encuentran Linfoma de Hodgkin (Fig.13, Fig.14-C) e Histiocitocis (Fig.13, Fig.14-D). Cabe mencionar que de los pacientes

diagnosticados con leucemia solo uno presentó leucemia bifenotípica, lo que representa el 2.5% de la población de estudio. Estos porcentajes concuerdan con lo descrito por Shalkow (2017) y Medina-Medina (2010).



**Figura 13: Distribución de los diagnósticos de pacientes *de novo* del área de oncología del Hospital Infantil de Morelia.**



**Figura 14: Frotis y tinción Wright de muestras procesadas. A)** Frotis de una muestra con diagnóstico con LMC, **B-A)** Frotis de una muestra con diagnóstico con LLA-L1, **B)** Frotis de una muestra con diagnóstico con LLA-L3, **C)** Frotis de una muestra con diagnóstico con Linfoma de Hodgkin, **D)** Frotis de una muestra con diagnóstico con diagnóstico de Histiocitosis.

Del total de las muestras, el 45% de los casos presentaron anomalías eritrocitarias, siendo la más común la hipocromía, así como alteraciones morfológicas tales como dianocitosis, poiquilicitosis, microcitosis y la presencia de fragmentocitos. Se procesaron todas las muestras y para el análisis del pronóstico de los pacientes con diagnóstico diferente a LLA-B se analizó el expediente clínico.

Para la determinación de los factores pronósticos se utilizó el formato del cuadro 8. Para su llenado fue necesario revisar el expediente clínico de cada paciente, así como los análisis de inmunofenotipo, cariotipo y la determinación de la ploidia. Para el presente estudio se tomaron en cuenta las determinaciones de expresión fenotípica descritas en el cuadro 6, la ploidia y la descripción morfológica de cada muestra.

De manera general, el 45% de los pacientes presentó un pronóstico mayormente positivo, del 55% restante, falleció el 7.5% y el resto se encuentra en tratamiento con diagnóstico reservado a evolución.

Del 7.5% con defunción, el 66.7% de los pacientes fue descrito con un pronóstico mayormente negativo y el 33.3% con un pronóstico mayormente positivo de acuerdo a los parámetros considerados en el cuadro 8.

**Cuadro 8. Factores pronóstico**

	Favorable	Desfavorable	Pronóstico
<b>Edad</b>	1-10 años	<1 año ó >10 años	
<b>Conteo inicial de células blancas</b>	<50,000 céls/mm <sup>3</sup>	= ó > 50,000 céls/mm <sup>3</sup>	
<b>Subtipo de LLA</b>	-Células B inmaduras	Células B maduras y células T	
<b>Diseminación a órganos</b>	Ausente	Presente en cualquier órgano	
<b>Índice de DNA</b>	>1.16	<1	
<b>Translocación cromosómica</b>	12:21	9:22, 1:19, 4:11, 8:14, 11:14	
<b>Respuesta al tratamiento</b>	Disminución de células	Sin disminución células cancerígenas	

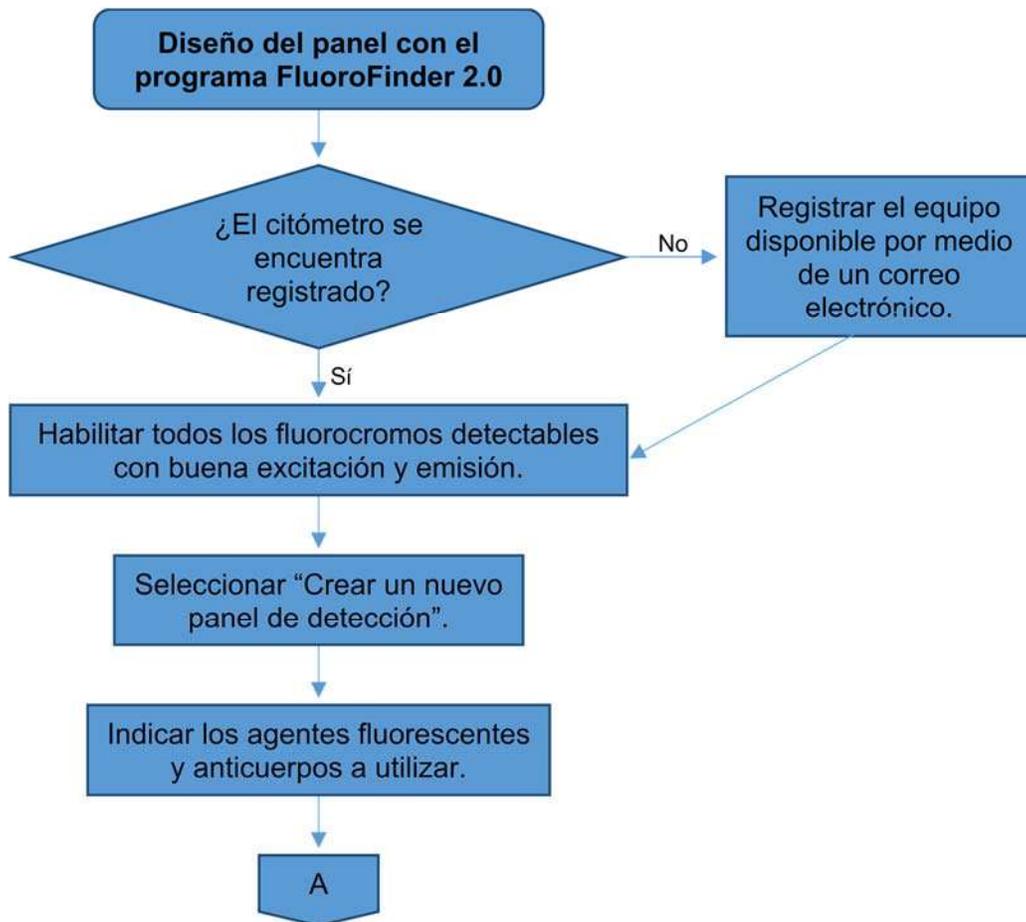
	cancerígenas dentro de las primeras dos semana	dentro de las primeras dos semana	
<b>Clasificación morfológica FAB</b>	L1	L2, L3	

(National Cancer Institute. s.f.; Bautista-Tejeda, 2017)

Los casos que no tienen registro de diagnóstico (17.5%) fueron incluidos en esta descripción general de la población de estudio basándose en la descripción morfológica observada en los frotis, la cual fue asesorada por el doctor Misael Herrejón Carmona, especialista en Hemato Oncología Pediátrica, pero éstas fueron analizadas como un subgrupo de muestras con sospecha de leucemia para la descripción de la expresión de eIF3f y ciclo celular.

## 8.2 Desarrollo de un panel de detección ciclo celular fase dependiente

Para el cumplimiento del objetivo número uno se registró a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo en el programa de acceso libre para el diseño de paneles de detección de anticuerpos, FluoroFinder 2.0, enviando por correo electrónico las especificaciones del citómetro de flujo disponible en las instalaciones del edificio del posgrado (láseres, filtros y fluorocromos recomendados por el fabricante). Una vez finalizado el registro, se configuró en línea el citómetro (Fig. 15) de manera que se visualizaran todos los fluorocromos no incluidos en el manual del fabricante, pero que son detectables óptimamente: de acuerdo con las especificaciones del equipo con base en las características de los láseres (excitación) y detectores (emisión) que contiene.



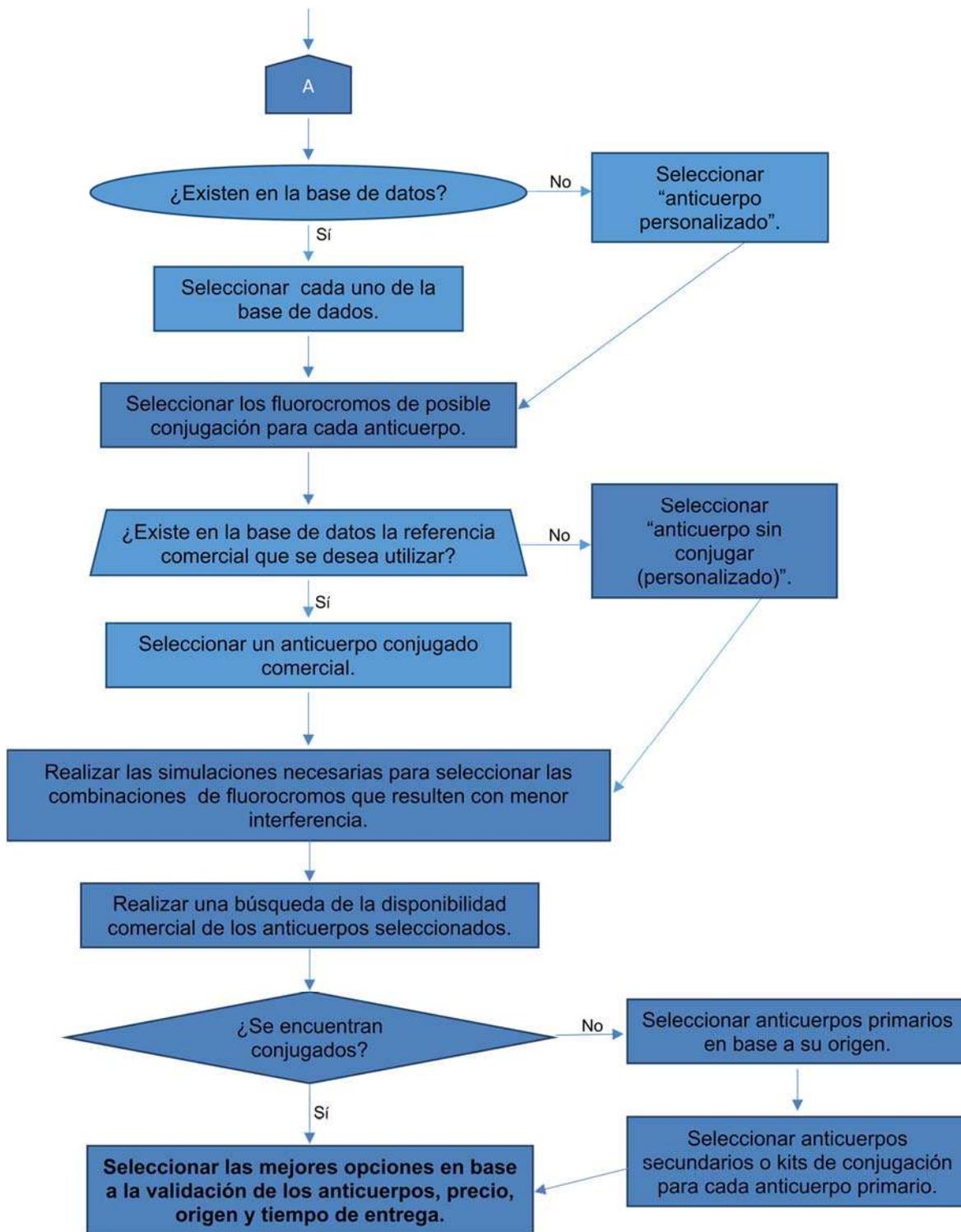


Figura 15. Diagrama de flujo del diseño de paneles de detección de anticuerpos con el programa FluoroFinder 2.0.

El panel de detección para identificar las poblaciones celulares en las diferentes fases del ciclo celular se diseñó tomando en consideración las siguientes características:

- Fluorocromos: deben tener la menor interferencia posible entre sí, de manera que la compensación sea mínima.
- Origen: debido al uso de anticuerpos secundarios, el origen de los anticuerpos primarios no debe ser el mismo, para evitar la reactividad cruzada, y los anticuerpos secundarios no deben reconocer regiones de los demás anticuerpos utilizados en el panel.
- Disponibilidad en el mercado: deben estar validados y ser de un precio accesible de manera que sea factible su adquisición en un tiempo razonable.

Se buscaron los mejores marcadores de detección para cada fase del ciclo celular con base a lo reportado en la literatura. Se seleccionaron pRb(Ser608) para G1, BrdU para S, pHH3(Ser28) para M y DAPI para el contenido de ADN (2N a 4N), que por contraste con los marcadores anteriores permite la distinción de la población celular en G0 y G2. Para una mayor certeza de la correcta distinción entre las fases del ciclo celular, los perfiles de ciclo celular que se obtuvieron se compararon con el perfil ya preestablecido en el grupo de trabajo, mismo que está basado en el uso exclusivo de DAPI y que se puede apreciar en los trabajos de Bautista-Tejeda de 2017, Tenorio-Martínez de 2018 y en el presente trabajo. Este perfil fue ajustado por medio del análisis de ciclo celular con el programa FlowJo®. Cabe aclarar que ambos parámetros solo permiten la distinción de las fases G0/G1, S y G2/M.

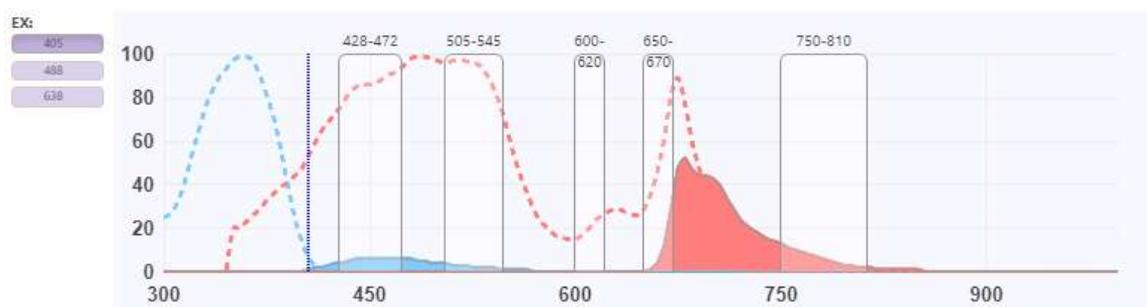
La selección de los marcadores para la distinción de cada una de las fases del ciclo celular se hizo con base al análisis general que se detalla a continuación. Gookin *et al.* (2017) utilizaron a Rb fosforilada en Ser807/811 como marcador de la fase G1. De acuerdo a lo reportado por Lees *et al.*, en 1991, estos sitios son de los primeros en ser fosforilados en G1 temprana; sin embargo, Schmitz *et al.* (2001) reportaron que la fosforilación de Rb en Ser807/811 varía entre las

diferentes muestras de LLA y que para la fosforilación de Rb en Ser608 no se observa variación alguna. Por otro lado, la Ser608 se encuentra en el sitio S (de espaciamiento) ubicado en el dominio pocket de la proteína, siendo éste el sitio de interacción con E2F, de manera que al ser fosforilado por ciclina D1 pierde afinidad por éste, liberándolo y permitiendo así el paso a través del punto de restricción en G1 tardía (Burke *et al.*, 2010). De acuerdo a lo anterior, en relación a la estructura y fosforilación de Rb, se seleccionó la fosforilación de la Ser608 de Rb como marcador de detección para distinguir entre las fases G0 y G1 (contenido 2N de ADN) del ciclo celular.

Para el caso de la detección de las células en la fase M del ciclo celular, se decidió utilizar a pHH3 (Ser28) tal y como lo describen Gookin *et al.* (2017), ya que al fosforilarse este sitio, permite la hipercompactación del ADN, evento correspondiente a dicha fase. Así, este marcador de detección permite distinguir entre las fases G2 y M (contenido 4N de ADN) del ciclo celular.

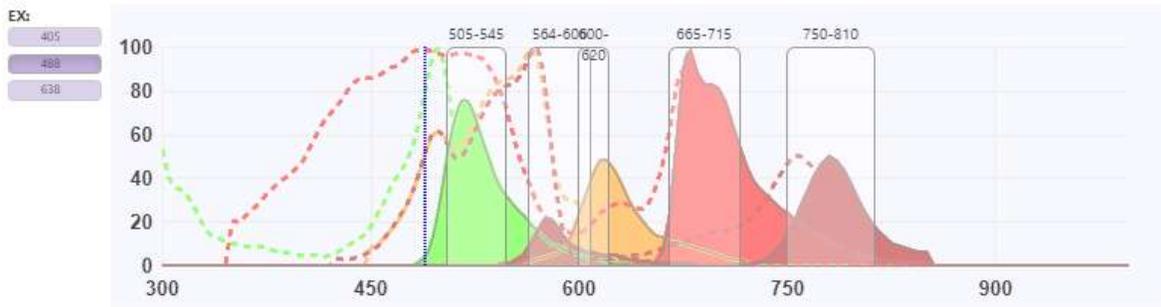
En el caso de la detección de la fase S del ciclo celular, Gookin *et al.* (2017) utilizaron EdU, ya es un análogo de timidina y se incorpora al ADN de las células que se encuentran en el proceso de replicación. Sin embargo, en el presente trabajo se optó por la utilización de BrdU, el cual también es un análogo de timidina. Se seleccionó BrdU debido a que su detección es por medio de un anticuerpo conjugado que no interfiere con la fluorescencia de los demás componentes del panel; en cambio, para la detección de EdU por citometría de flujo es necesaria una reacción de activación llamada “click reaction” que puede afectar la fluorescencia de algunos de los fluorocromos utilizados en el panel de anticuerpos, lo cual implica una modificación al protocolo donde la adición de estos anticuerpos se realiza después de la reacción y se influye en la integridad de la muestra. Así, la incorporación de BrdU y su detección permite la distinción de la fase S del ciclo celular (contenido  $2 < N < 4$  de ADN). Además, BrdU en conjunto con DAPI permiten la distinción entre las poblaciones celulares en G0/G1 (2N), G2/M (4N) y S ( $2 < N < 4$ ), pudiendo también distinguir tres subpoblaciones en la fase S: S temprana, tardía y media.

Una vez seleccionados los marcadores para la identificación de las distintas fases del ciclo celular, se buscaron los anticuerpos comerciales correspondientes y la disponibilidad de fluorocromos conjugados a los mismos. Con el programa FluoroFinder 2.0 se determinaron los valores de excitación y emisión de los fluorocromos seleccionados para cada anticuerpo, así como la posible interferencia entre ellos. Los fluorocromos elegidos fueron PerCP-Cy5.5, PE-Cy7, FITC, ECD y AlexaFluor-647. En la selección se consideró la excitación de DAPI con el láser de 405 nm (láser violeta) y su detección en el canal de fluorescencia 450/45; Este láser también excita a PerCP-Cy5.5 (BrdU), pero la señal de emisión se detecta en el filtro 660/20, por lo que no existe interferencia en la detección de DAPI (Fig. 16).



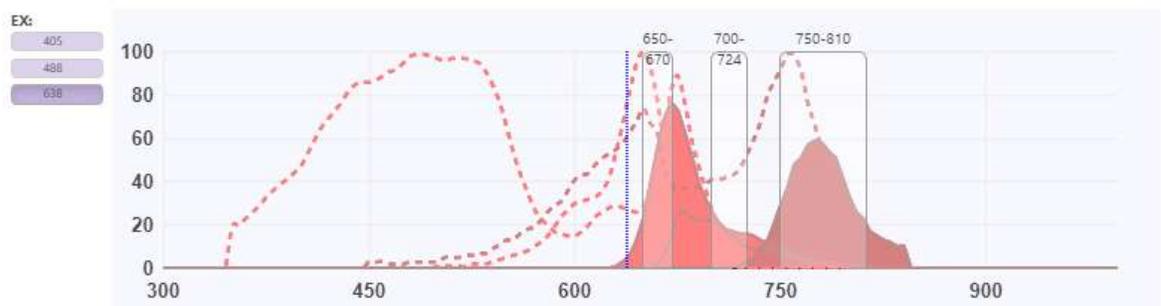
**Figura 16. Excitación y detección de fluorocromos con el láser de 405 nm.**

En el láser de 488 nm (láser azul) se detectan las señales de FITC (eIF3f) en el canal 525/40, ECD (CD45) en el canal de 610/50 y PE-Cy7 (pHH3) en el canal de 780/60 (Fig. 15). Además, se detecta la señal de PerCP-Cy5.5 (BrdU) en el canal de 690/50, sin que esta señal cause interferencia en las otras señales (Fig. 15). Debido a la alta interferencia que se observa en el canal 585/42 (564 a 660 nm en la imagen de la figura 17), se decidió no utilizar fluorocromos con emisión en este canal.



**Figura 17. Excitación y detección de fluorocromos con el láser de 488 nm.**

En el láser de 638 nm (láser rojo) se detectan las señales de Alexa Fluor® 647 (pRB(Ser608)) en el canal 660/20 y APC-Cy7 (CD19) en el canal de 780/60 (Fig. 18). En esta simulación se detecta una interferencia en la señal de Alexa Fluor® 647 (pRB(Ser608)) con PerCP-Cy5.5 (BrdU); sin embargo, será posible distinguir entre ambas señales sin necesidad de una compensación. En resumen, a través de un gráfico BrdU vs. DAPI se obtiene una primera distribución celular: G0/G1 (DAPI 2N, BrdU-), G2/M (DAPI 4N, BrdU-) y S (DAPI 2<N<4, BrdU+). Con la población celular G0/G1 de este primer gráfico (contenido 2N de ADN y señal negativa para la incorporación de BrdU) se genera un gráfico pRb(Ser608) vs. DAPI que permite discriminar entre las poblaciones 2N: una señal positiva de pRb(Ser608) corresponde a las células en G1 y una señal negativa a las células en G0.



**Figura 18. Excitación y detección de fluorocromos con el láser de 638 nm.**

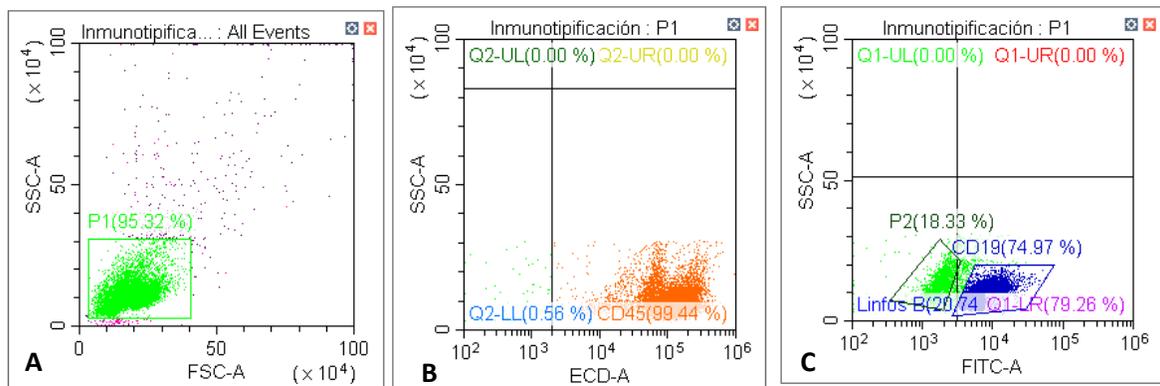
En el Cuadro 9 se presenta la descripción del panel de ciclo celular obtenida del análisis anterior. Este cuadro resume los marcadores y fluorocromos

seleccionados con ayuda del programa FluoroFinder 2.0. Para el diseño experimental se buscaron anticuerpos conjugados, empero, no se encontró disponibilidad de los anticuerpos validados y conjugados a los fluorocromos seleccionados para eIF3f y pRb(Ser608). Para eIF3f con FITC se optó por la alternativa de utilizar un kit de marcaje, evitando la utilización de anticuerpos secundarios. Sin embargo, para pRb(Ser608) fue necesario optar por la detección de anti pRb(Ser608) con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor® 647 (Cuadro 9).

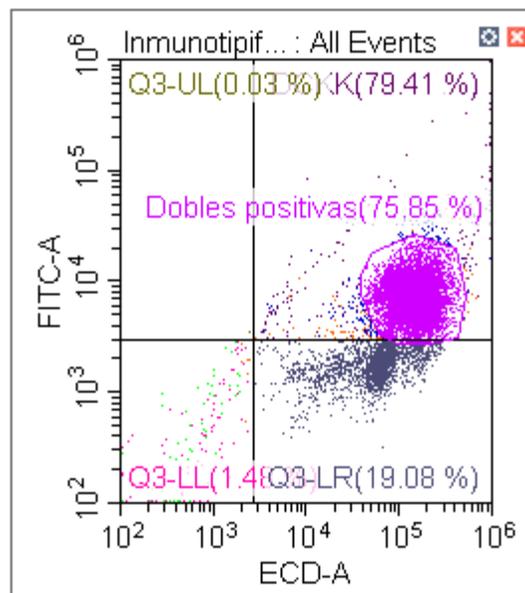
**Cuadro 9. Descripción del panel de ciclo celular.**

Marcador	Utilidad	Origen	Fluorocromo
<b>CD45</b>	Presente en células hematopoyéticas (excepto plaquetas y eritrocitos) y expresado mayormente en células maduras, lo que permite realizar un mapeo celular.	Ratón	Anticuerpo conjugado con ECD
<b>CD19</b>	Marcador específico de células B.	Ratón	Anticuerpo conjugado con APC-Cy7
<b>BrdU</b>	Análogo de timidina que se incorpora hasta en un 95% en el ADN de células en fase S.	-----	Intercalarte sin conjugar
<b>Anti BrdU</b>	Anticuerpo para la detección del BrdU incorporado.	Ratón	Anticuerpo conjugado con PerCP-Cy5.5
<b>eIF3f</b>	Proteína de interés y posible marcador pronóstico.	Conejo	Anticuerpo conjugado mediante kit con FITC
<b>pHH3 (Ser28)</b>	La fosforilación de la histona H3 es clave en la compactación del ADN necesario para la fase M.	Rata	Anticuerpo conjugado con PE-Cy7
<b>pRb (Ser608)</b>	La fosforilación de RB en la serina 608 permite la liberación de E2F G1 tardía.	Conejo	Anticuerpo primario
<b>Anti IgG de conejo</b>	Detección de anti pRb(Ser608).	Cabra	Anticuerpo conjugado con Alexa Fluor® 647
<b>DAPI</b>	Intercalante estequiométrico de ADN que permite su cuantificación.	-----	Posee fluorescencia propia

Las figuras 19 y 20 muestran un ejemplo de los diagramas de la citometría de flujo que resultan en la selección de la población celular de interés: células de origen linfocítico B definidas como CD19+, CD45+. Para esta selección se toma la población celular correspondiente a linfocitos en base a sus características de tamaño y complejidad (FSC vs. SSC) (Fig. 19A). Posteriormente se determina el porcentaje de células CD45+ (Fig. 19B) y el porcentaje de células CD19+ (Fig. 19C). Finalmente se selecciona la población doble positiva (Fig. 20) para ser analizada con el panel de ciclo celular.



**Figura 19. Selección de la población linfocítica B.** A) Selección de la población de interés (color verde) en base a tamaño y complejidad (FSC vs. SSC). B) Población positiva para CD45 (color naranja). C) Población positiva para CD19 (color azul).



**Figura 20. Selección de la población celular CD19+, CD45+.** La población doble positiva (morada) corresponde a la población de origen linfocítico B.

Una vez seleccionada la población CD19+ y CD45+, ésta se analiza con los marcadores seleccionados para la identificación de las distintas fases del ciclo celular y anti eIF3f, o bien, con DAPI y anti eIF3f. La figura 21 resume el proceso en un diagrama de flujo.

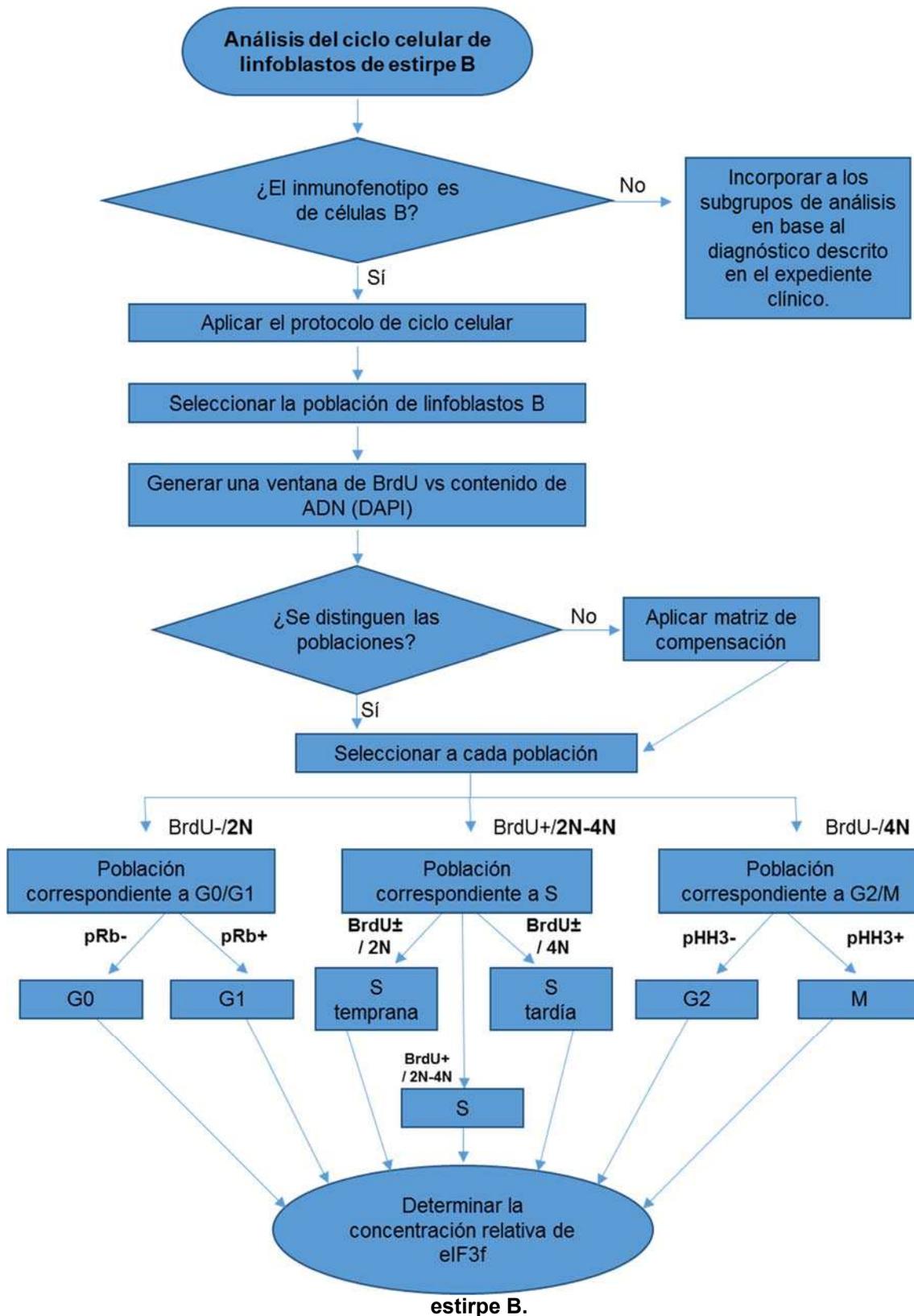


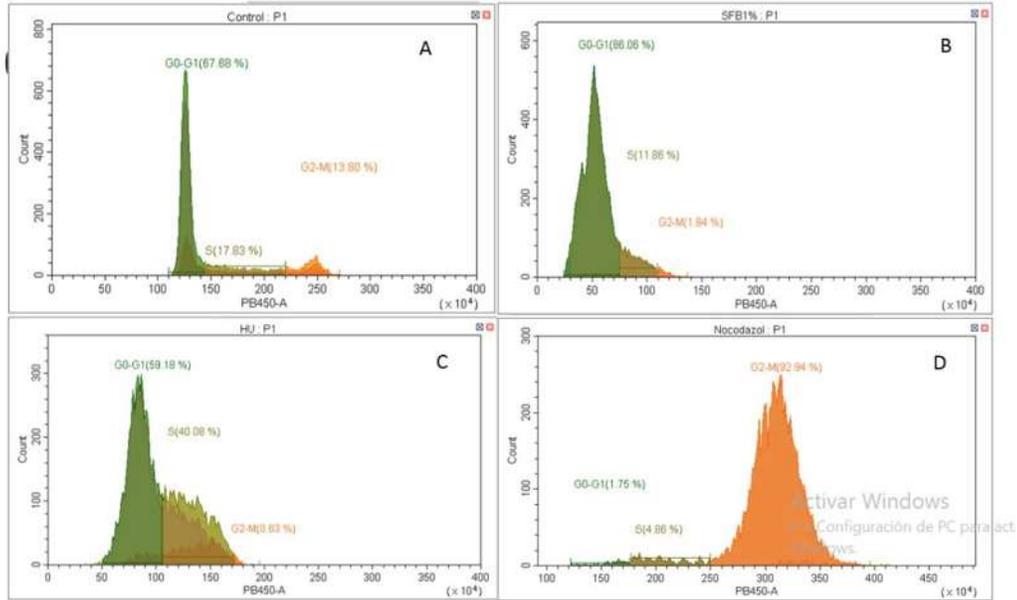
Figura 21. Diagrama de flujo para el proceso de análisis del ciclo celular de linfoblastos

La ventaja que ofrece la utilización de este panel en comparación a la determinación con DAPI es que se puede estimar el porcentaje de las células en S y M, las cuales son las fases blanco para la quimioterapia fase dirigida. Además, se puede determinar la expresión de eIF3f en cada fase de manera que se pueda obtener un perfil que aporte datos para la validación de este gen como marcador de LLA-B, ventaja por la cual se obtuvo la aprobación de la participación del Hospital Infantil “Eva Sámano de López Mateos” que facilita las muestras de médula ósea de pacientes pediátricos con diagnóstico *de novo* de LLA-B y sin quimioterapia.

### **8.3 Estandarización del panel de detección de ciclo celular fase dependiente**

El panel de ciclo celular propuesto es importante para el correcto discernimiento entre células proliferativas y células no proliferativas. Para poder aplicarlo de manera eficiente es necesario validar y estandarizar su efectividad por medio del uso de líneas celulares que permitan analizar las diferentes fases del ciclo celular, así como en muestras hematopoyéticas, ya que las muestras de interés son de origen hematopoyético. Por lo anterior, se decidió trabajar con la línea celular A-549 y con linfocitos de voluntarios sanos.

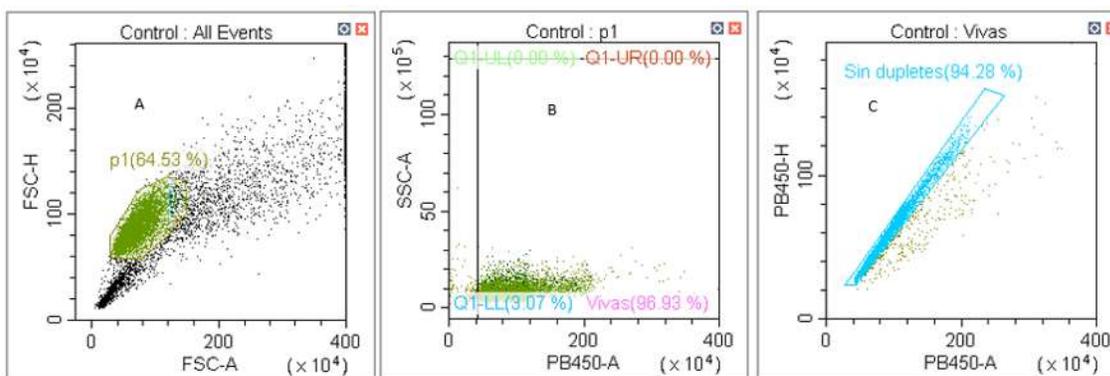
En el caso de la línea celular A549 se probaron de manera individual los marcadores del panel de ciclo celular en cultivos sincronizados y no sincronizados con alta actividad proliferativa. Las sincronizaciones se realizaron con éxito obteniendo poblaciones enriquecidas en las fases G0/G1 por medio de la privación de SFB, S por medio de la adición de HU 0.8 mM y G2/M con la adición de nocodazol 0.4 µg/mL, (Fig. 22).



**Figura 22. Enriquecimiento de células A549 en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular.**  
 Distribución por citometría de flujo de células A549 en las distintas fases del ciclo celular, por contenido de ADN (DAPI) en cultivos asincrónicos (A) y cultivos sincronizados por limitación de SFB (B), adición de hidroxurea (C) o nocodazol (D) para el enriquecimiento de las fases G0/G1 (B), S (C) y G2/M (D) del ciclo celular.

Una vez que se lograron las condiciones de sincronización se probaron los marcadores, iniciando por pRb (Ser608). El cultivo fue tratado como se describe en la sección de materiales y métodos para el enriquecimiento y distinción de la fase G0 y G1. Debido a que no se sabía cómo se comportaría este marcador se decidió utilizar a Ki67 como control interno ya que está ampliamente descrito que este marcador solo se presenta en las fases activas del ciclo celular (S, G2 y M).

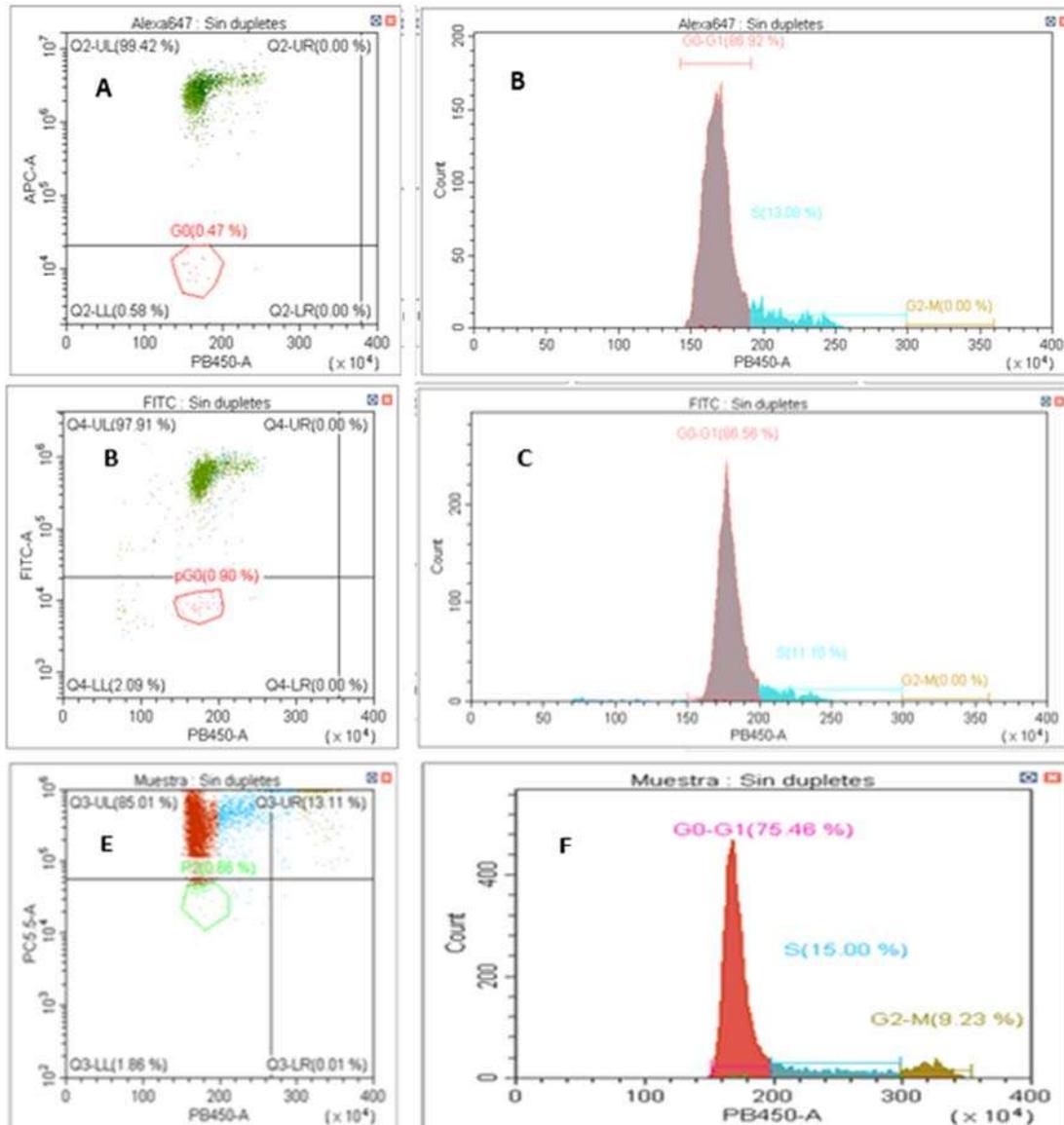
Para la selección de las poblaciones celulares se eliminaron los dupletes por medio de un gráfico de FSC-A vs FSC-H (Fig. 23-A) seguido de la selección de las células vivas definidas por una señal de DAPI mayor a 50 URF (Fig. 23-B) y, finalmente, se limpiaron los dupletes remanentes por medio de un gráfico de PB450-A vs PB450-H (Fig. 23-C).



**Figura 23. Selección de población para el análisis individual de los marcadores del panel de ciclo celular. A)** Selección de la población libre de células muertas y dupletes (p1 en color verde), **B)** Selección de la población de células vivas, **C)** Eliminación de dupletes remanentes (sin dupletes en color azul, PB450-A corresponde al canal de fluorescencia para la detección de DAPI señal de DAPI).

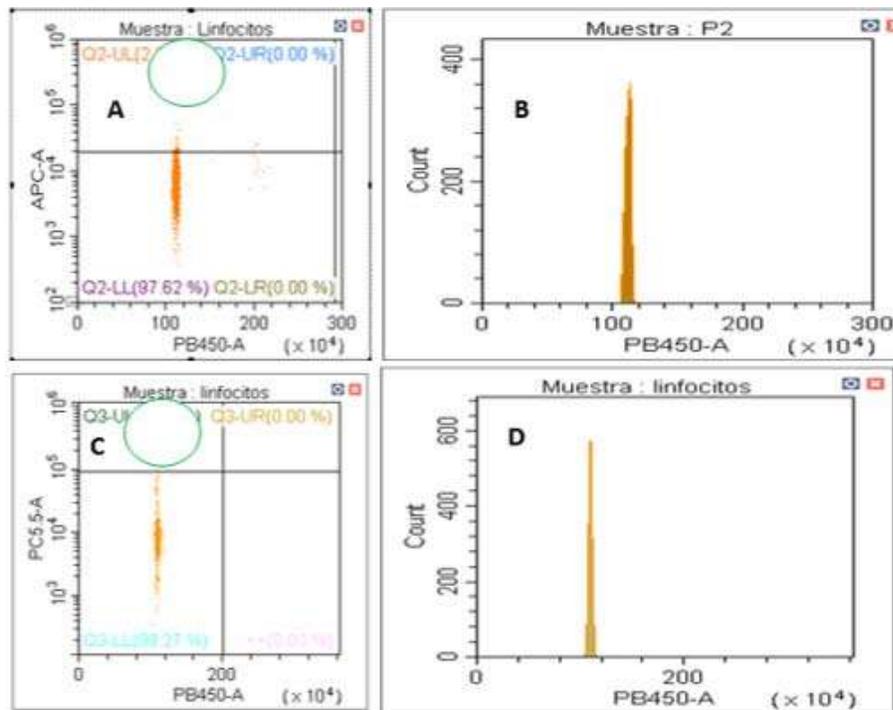
Una vez realizada la selección poblacional se establecieron los puntos de corte en base a la autofluorescencia de los controles. En ambas determinaciones (pRb(Ser608) y Ki67) se observa una población francamente negativa correspondiente a las células en G0, señaladas en un círculo en color coral para pRb(Ser608) y en un círculo verde para Ki67, además de una población francamente positiva correspondiente a células en fases diferentes a G0 (en color verde para pRb(Ser608) y en rojo con azul para Ki67). Estas poblaciones concuerdan con el perfil de la señal de DAPI para las fases G0-G1, S y G2-M, obsérvese como la población francamente negativa (encerrada en un círculo) concuerda con el perfil de DAPI para las fases G0-G1 por lo que nos aseguramos que de seleccionar a la población correcta (Fig. 24). Cabe mencionar que se probaron 2 fluorocromos diferentes para pRb(Ser 608) (FITC y AlexaFluor-647) con el fin de descartar que lo observado fuera un efecto de intensidad de fluorescencia y que, aunque la privación de suero enriquece a la población celular de G0-G1 esto no garantiza el enriquecimiento de la fase G0, tal como menciona Cooper en 1998 quien dice que las células reanudan su crecimiento después de la detención del ciclo y que, aunque la privación de suero sea uniforme a todas las células esto no significa que estén sincronizadas. Cooper menciona además que tras un periodo de inanición de suero es posible observar un solo pico de señal de

ADN (el pico correspondiente a las fases G0-G1) y debido a que la cantidad de ADN entre G0 y G1 es similar se asume que el arresto/ enriquecimiento es de la fase G1.



**Figura 24. Señal de pRb(Ser608) y Ki67 en cultivos sincronizados para las fases G0-G1 de la línea A-549. A)** Señal de pRb(Ser608) con AlexaFlour-645, población positiva en verde, población G0 señalada con un círculo en color coral, **B)** Fases del ciclo celular definidas por la señal de DAPI. **C)** Señal de pRb(Ser608) con FITC, población positiva en verde población negativa correspondiente a G0 señalada con un círculo en color coral, **D)** Fases del ciclo celular definidas por la señal de DAPI. **E)** Señal de Ki67 con PC5.5, población positiva en rojo y azul, población G0 señalada con un círculo en color verde, **F)** Fases del ciclo celular definidas por la señal de DAPI .

Debido a esto se decidió probar con linfocitos sin inducción a proliferación, ya que éstos se encuentran naturalmente en quiescencia (G0). Se comprobó la ausencia de la señal de pRb(Ser608) y de Ki67, observando la ausencia de la señal correspondiente a las células proliferativamente activas que será en el área remarcada con un círculo verde en la imagen de la figura 25.



**Figura 25. Análisis de la detección de pRb(Ser608) y Ki67 en linfocitos de un voluntario sano.** **A)** Señal ausente de pRb(Ser608) con AlexaFlour-647, se esperaría la señal positiva en el área delimitada en el círculo verde. **B)** Señal de DAPI correspondiente a las fases G0-G1 en linfocitos. **C)** Señal ausente de Ki67 con PC5, se esperaría la señal positiva en el área delimitada el círculo verde. **D)** Señal de DAPI correspondiente a las fases G0-G1 en linfocitos.

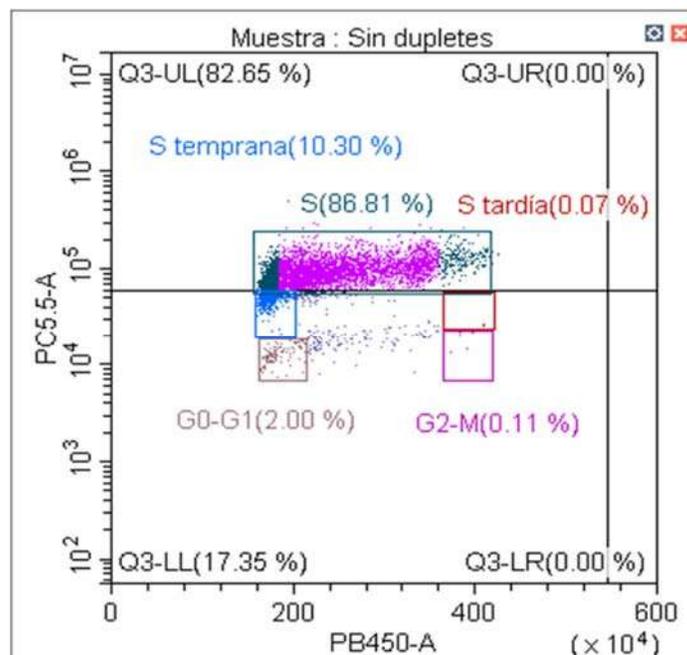
Estos resultados concuerdan con lo reportado por Gookin *et al.* en el artículo de 2007, quienes utilizaron un anticuerpo anti pRb(Ser708) y anti pRb(Ser807/811) para la detección de G1. El objetivo en su trabajo era la diferenciación entre G0 y G1, por lo que el sitio de fosforilación de Rb fue decidido sin pensar en la secuencia de hiperfosforilación de Rb, que en nuestro caso fue estudiado y debatido para seleccionar el sitio de fosforilación más temprano que

presentara las menores interferencias posibles, razón por la que se seleccionó a pRb(Ser608), siendo el sitio de interacción para la liberación de E2F (Burke *et al.*, 2010). Debido a que Rb debe permanecer fosforilado para pasar el punto R y permanece así hasta el final del ciclo celular sería complicado utilizar a esta proteína para la distinción de las fases S y G2-M, aunque resulta conveniente para la distinción de las fases G0 y G1 temprana. Esto también se apoya con en el experimento para la comparación de la señal de pRB(Ser608) y la de Ki67 realizado en linfocitos quiescentes y en los cultivos sincronizados; como se observó, se comporta de la misma manera y, ya que Ki67 solo se expresa en las fases activas del ciclo celular, es utilizado como un marcador de las células proliferativamente activas (Joyce, *et al.*, 1996), por lo que pRb tendría una expresión similar. Por los resultados obtenidos y en concordancia por lo descrito por Gookin *et al.* (2007) se puede determinar que el uso de pRB(Ser608) es apto para la distinción de las fases G0 y G1, pero no es posible distinguir las fases G1 de S o M con el uso exclusivo de este marcador.

La segunda prueba realizada fue con BrdU. Para ello se sincronizó un cultivo en la fase S del ciclo celular como se describe en la sección de materiales y métodos. El cultivo fue liberado y se le añadió medio con BrdU, realizando los ajustes que menciona el proveedor para el trabajo con cultivos con respecto a volúmenes, y se procesó como se menciona en materiales y métodos en la detección de la fase S.

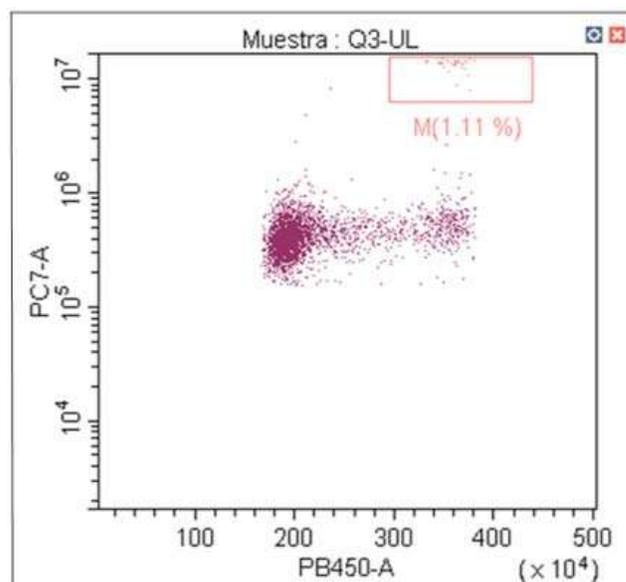
Para el análisis de la muestra se siguió la misma estrategia de selección poblacional descrita en el análisis de pRb(SER608) ilustrado en la figura 23 y, posteriormente se seleccionó a las células en S en el gráfico de Dot-Plot de la incorporación de BrdU (PC5.5) vs la señal de DAPI (Fig. 26). En base a lo reportado por el proveedor, se esperaban gráficos parecidos a los de Gookin *et al.* (2007) quién utilizó EdU (otro análogo de timidina): se esperaba observar una población en forma de arco (efecto de la incorporación del análogo de timidina) en la cuál fuera posible distinguir G0-G1, S temprana, S, S tardía y G2-M de manera franca en un gráfico de señal de fluorescencia vs la señal de DAPI. En la muestra

analizada es posible distinguir diferentes poblaciones celulares, siendo las más evidentes la población negativa y la población positiva; éstas parecen mostrar la tendencia a formar un arco (Fig. 26) y debido a esta tendencia podemos distinguir entre las fases anteriormente mencionadas y comparar los resultados obtenidos por Gookin *et al.* con nuestros resultados, recordando que en el protocolo descrito por Gookin *et al.* al utilizar EdU es necesario un paso de “activación” que podría modificar las fluorescencias de los demás componentes del panel al ser usados en conjunto y, por lo cual se optó por trabajar con un análogo de timidina que pudiera ser identificado por medio de un anticuerpo. Es posible que las diferencias en los resultados obtenidos y lo descrito por el proveedor y Gookin *et al.* sea por la DNAsa que se utilizó en el experimento ya que, si bien ambas son de tipo I, la DNAsa con la que se realizó el ensayo no es la recomendada por el proveedor. Se decidió comprar la DNAsa que menciona el protocolo del proveedor (Sigma-Aldrich, Cat. No. D4513) la cual tiene un periodo de actividad de 10 días tras haber sido hidratada, ya que pierde efectividad por cada 24 horas de almacenamiento a -20°C, razón por la que se decidió dejar la repetición de este experimento pendiente. De manera general, podría decirse que con el uso de BrdU es posible distinguir a la fase S, pero que con la DNAsa recomendada podría aumentar la eficiencia de detección de esta fase.



**Figura 26. Análisis de la detección de la fase S por medio de BrdU en cultivos sincronizados de la línea celular A549.** Gráfico de Dot-Plot de la incorporación y detección de BrdU por la señal de PC5.5 vs la señal de DAPI (PB450) en células A-549 sincronizadas en la fase S.

Finalmente se realizó la prueba del anticuerpo pHH3 que permite la distinción entre las fases S y M. Para ello se sincronizaron células con el enriquecimiento de la fase M de la línea celular A-549 y se procesaron como se describe en el apartado de materiales y métodos para la estandarización de pHH3. Una vez adquirida la muestra en el citómetro de flujo se siguió la estrategia descrita para el análisis con pRb(Ser608) e ilustrada en la figura 23, posterior a la selección de la población inicial se utilizó un gráfico de Dot-Plot de la señal de fluorescencia de pHH3 (PC7) contra la señal de DAPI (Fig. 27) es posible distinguir a las células francamente negativas (en morado) de las células francamente positivas (en rosa). Gookin *et al.* (2007) reportan sus resultados en base a un gráfico de Dot-Plot de señal de fluorescencia de PHH3 vs ploidia, gráfico en el cuál la mayoría de la población es negativa para este marcador y la población positiva se encuentra en la señal correspondiente a células  $>2N \leq 4N$ . En el caso de nuestros resultados es posible observar que la mayoría de las células también son negativas para este marcador y que las células positivas se encuentran en la región de señal de DAPI para células G2-M, es decir,  $>2N \leq 4N$  (población en rosa), por lo que nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Gookin *et al.*, determinando que pHH3 es óptimo para la distinción de la fase M.



**Figura 27. Análisis de la detección de la fase M por medio de pHH3 en cultivos sincronizados de la línea celular A549.** Gráfico de Dot-Plot de la expresión de pHH3 detectada por la señal de PC7 vs la señal de DAPI (PB450).

Para la última prueba de la estandarización del panel es necesario utilizar un cultivo celular de la línea A-549 que contenga todas las fases del ciclo celular, así como linfocitos de voluntarios sanos y cultivos activados de éstos para poder probar el panel completo; sin embargo, debido a las condiciones de contingencia sanitaria que se suscitaron durante la conclusión de este proyecto no fue posible realizar estos experimentos, por lo que se decidió dejarlos pendientes ya que pueden ser realizados en protocolos de investigación futuros.

#### **8.4 Estandarización metodológica de la preparación de muestras de origen hemático por ARS**

Además de la estandarización del protocolo de ciclo celular se estandarizaron las condiciones para el procesamiento de la muestra con el fin de perder la menor cantidad de células y optimizar los recursos. Esta estandarización incluyó un Análisis de Respuesta de Superficie (ARS) que se describe a continuación y se resumen en tres puntos:

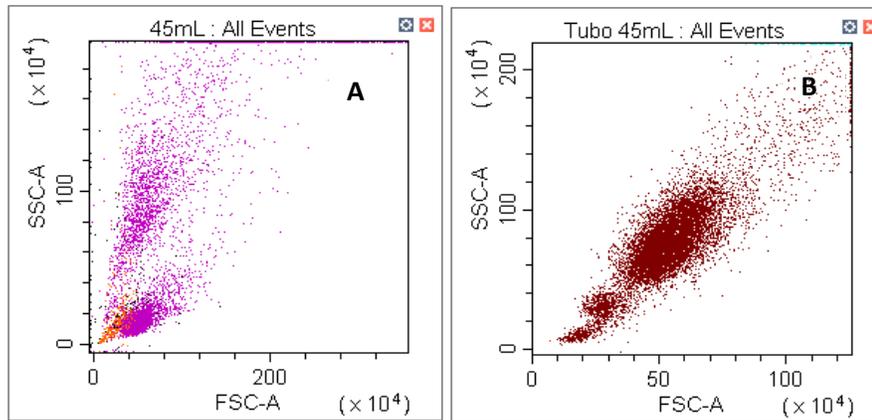
- 1) La comparación de reactivos de casas comerciales vs. reactivos preparados en el laboratorio para la lisis eritrocitaria y la permeabilización celular, de acuerdo a los protocolos empleados cotidianamente en laboratorios del posgrado. Al utilizar agua tridestilada para la preparación de soluciones de trabajo en ambos protocolos, se obtiene un mayor número de células y una mejor permeabilización con los reactivos preparados en el laboratorio. Asimismo, se determinó que el volumen adecuado de solución de lisis eritrocitaria es de 14 mL por 1 mL de sangre total. En este caso, no se obtuvo la distribución de las poblaciones celulares esperadas para una muestra de sangre.
- 2) La determinación de la concentración óptima del agente permeabilizante (triton), siendo la óptima del 0.2% v/v.
- 3) La determinación de la concentración óptima de la solución fijadora (paraformaldehído), ya que en el laboratorio se utiliza a una concentración del 2% y en el protocolo para la incubación con BrdU se indica una concentración del 4%. Al analizar las poblaciones celulares por citometría de flujo se observó una mayor disminución poblacional con la concentración de 4%, por lo que se optó por utilizar la concentración de 2%.

La preparación de muestras de origen hemático analizadas por citometría de flujo con la detección de múltiples parámetros de superficie e intracelulares representa un reto en la reproducibilidad por la calidad de la muestra. Debido a esto se decidió realizar un análisis de respuesta de superficie con el programa Minitab (Soporte técnico de Minitab, 2019). Para ello, se determinaron las variables que pueden interferir en el análisis y los factores que interfieren en cada variable. Estas variables y factores se establecen con base en la experiencia de experimentación y a lo reportado en la bibliografía. Se realizó una matriz de variables (Cuadro 10) teniendo en cuenta las variables y factores que puedan interferir en los análisis de muestras por citometría de flujo.

Para el caso de la determinación de la eficiencia de lisis, se estableció con base en el porcentaje de vestigios celulares definidos como CD45-. Además, se tomó en cuenta la distribución poblacional de FSC y SSC (Fig. 28).

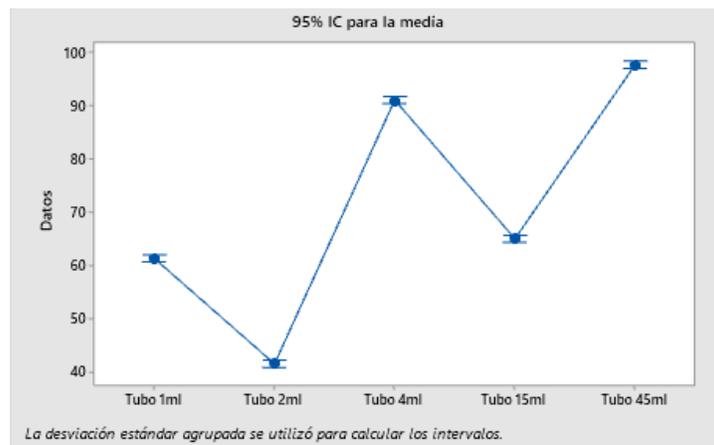
**Cuadro 10. Matriz de variables para el análisis de respuesta de superficie.**

Conceptualización	Dimensiones	Subdimensiones	Factores (Indicadores)	Ítems	Fuente	Instrumentos	
<b>Lisis eritrocitaria</b>	BD		Volumen de solución respecto al de la muestra: 14:1 y 24:1	¿Se modifica la intensidad de fluorescencia?	Sangre con EDTA	Determinación de eficiencia de lisis	
			Temperatura de lisis: 4 y 24°C	¿La eficiencia de lisis depende del volumen de buffer utilizado?			
			Tiempo de lisis: 10 y 15 mL				
			Forma del fondo del tubo: Redondo y cónico				
<b>Concentración celular</b>	Solución de lavado	0.5% de BSA	Centrifugación: 200 y 500 g	¿Se reduce la pérdida celular?	Sangre con EDTA	Medición por citometría de flujo	
		0.4% de BSA	Número de lavados: 1 y 2 veces				Conteo manual
		0.2% de BSA					
<b>Fijación celular</b>	Paraformaldehído	2 y 4%	Volumen de solución: 200 y 500 µL	¿Se reduce la pérdida celular?	Sangre con EDTA	Medición por citometría de flujo	
			Tiempo de fijación: 10 y 15 min	¿Se modifica la intensidad de fluorescencia?			
<b>Permeabilización</b>	Tritón X-100	0.2 y 0.5 %	Temperatura: 24 y 37 °C	¿La eficiencia de permeabilización es mejor?	Sangre con EDTA	Medición con colorante vital por citometría de flujo	
			Tiempo de incubación: 10 y 15 min				Azul de tripano

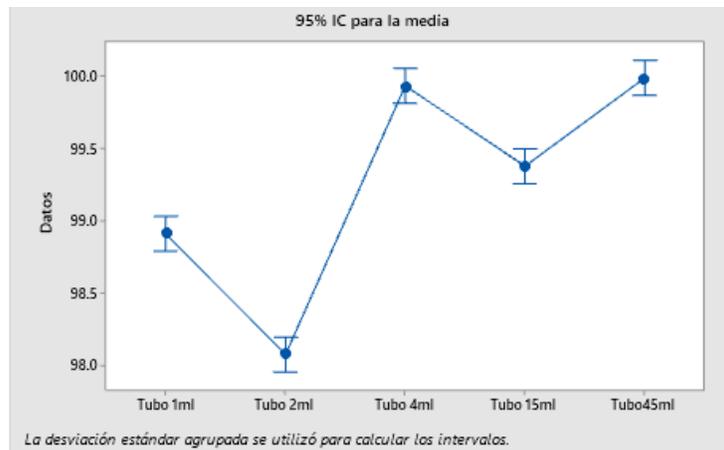


**Figura 28. Distribución representativa de la distribución celular tras la lisis eritrocitaria.** A) Muestra procesada con reactivos de laboratorio, eritrocitos en rojo. B) Muestra procesada con reactivos comerciales, no se observan eritrocitos.

Una vez establecida la matriz, se formularon los experimentos necesarios para la obtención de los datos necesarios en la determinación de la respuesta por superficie. Debido a la cantidad de variables que influyen en la preparación adecuada de la muestra, fue necesario realizar un análisis de ANOVA de una sola vía para reducir el número de experimentos. Se inició con la selección del tubo de trabajo que diera los mejores resultados de eficiencia de lisis para ambos métodos. Los ensayos de lisis utilizados se probaron con las condiciones descritas en cada metodología obteniendo para ambos métodos los mejores resultados con los tubos de 4 y 45 mL (Fig. 29, 30).



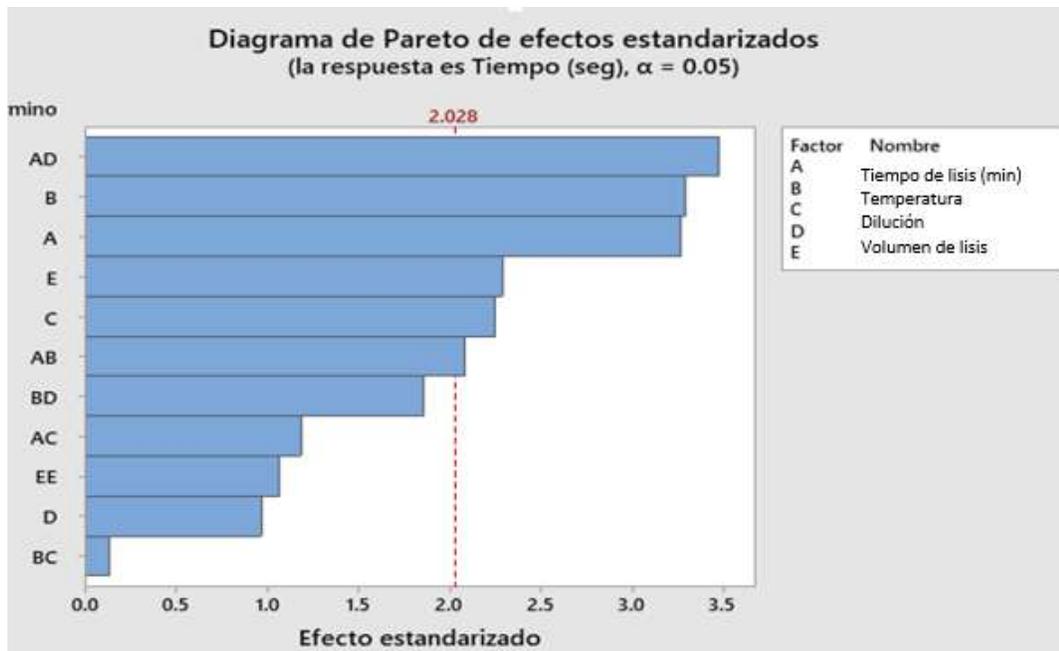
**Figura 29. Análisis ANOVA para la eficiencia de lisis con el uso de reactivos comerciales.** Cada experimento se realizó por triplicado y se obtuvo una  $p < 0.05$ .



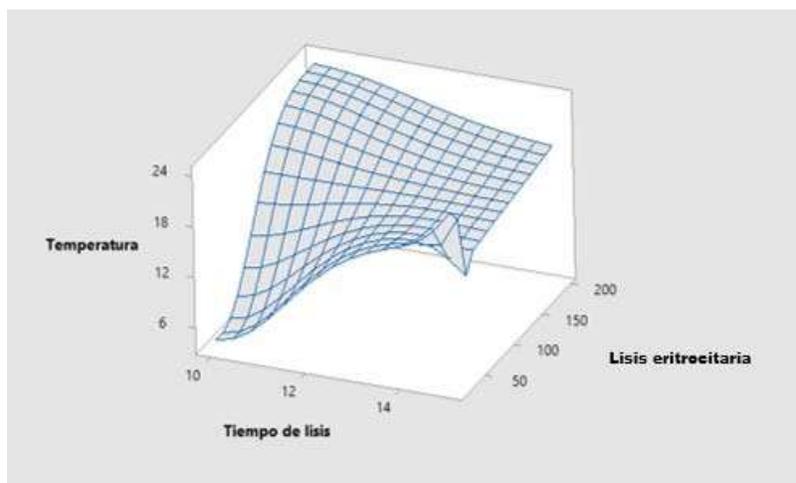
**Figura 30. Análisis ANOVA para la eficiencia de lisis con el uso de reactivos preparados en el laboratorio.** Cada experimento se realizó por triplicado y se obtuvo una  $p < 0.05$ .

Una vez realizado el análisis ANOVA, se establecieron los experimentos necesarios para cada factor de cada variable y se llevaron a cabo los experimentos correspondientes. Cada determinación se realizó por triplicado.

Para el análisis de los factores influyentes en la lisis eritrocitaria se siguió la estrategia descrita en el Cuadro 9, probando condiciones de volumen de solución de lisis con respecto a la muestra (14:1 y 24:1), temperatura de lisis ( $4^{\circ}\text{C}$  y TA), tiempo de lisis (10 y 15 minutos) y forma del tubo (4 mL con forma redonda y 45 mL con forma cónica). Se determinó que los factores influyentes en este proceso son el tiempo y la dilución de lisis, así como la temperatura, teniendo mejores resultados con 15 min de lisis a TA por lo que se determina que en efecto, la eficiencia de lisis depende del volumen utilizado. (Fig. 31 y 32).



**Figura 31. ARS para lisis eritrocitaria: valores influyentes en el proceso.**



**Figura 32. Diagrama de interacciones de los factores para la lisis eritrocitaria.** En el diagrama de ARS se observa que la temperatura y el tiempo de lisis influyen en la lisis celular.

Para el proceso de fijación se probaron concentraciones del 2% y 4% de paraformaldehído, ya que, en el laboratorio de acuerdo a protocolos ya establecidos y en la descripción de algunos anticuerpos utilizados en este proyecto se utiliza la concentración de 2% y en el protocolo descrito por BioLegend para el análisis con BrdU se indica una concentración del 4% probando

además tiempos de fijación de 10 y 15 min. Para este paso del proceso resultó ser altamente influyente el volumen del fijador seguido del tiempo de fijación teniendo menor influencia la concentración de paraformaldehído (Fig. 33 y 34).

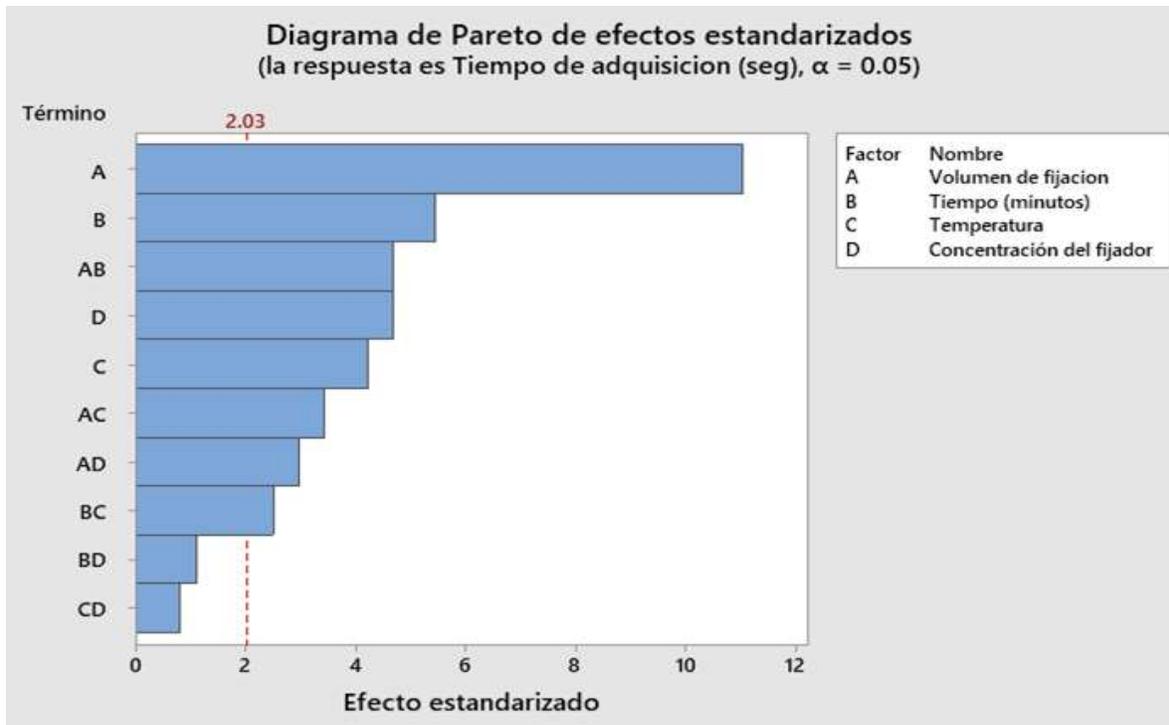


Figura 33. ARS para la fijación celular: valores influyentes en el proceso.

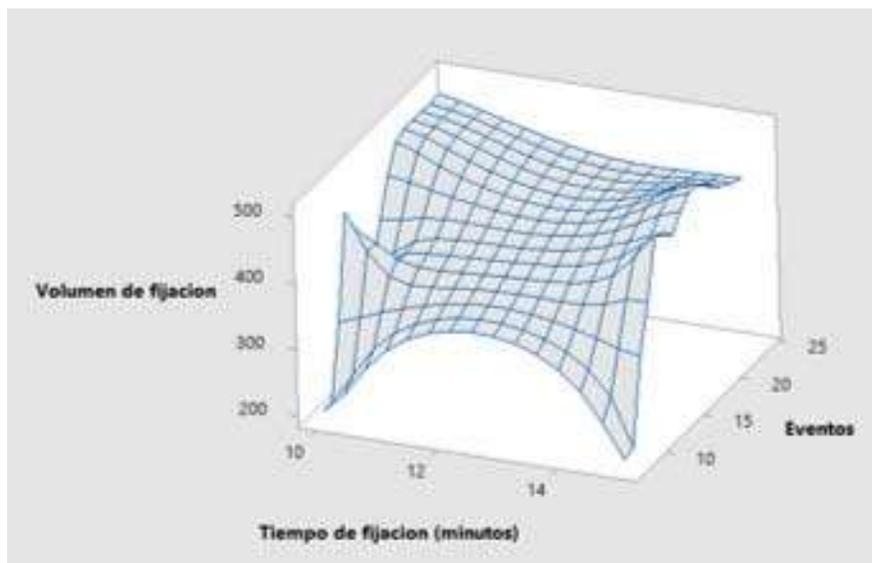


Figura 34. Diagrama de interacciones de los factores para la fijación celular. En el diagrama de ARS se observa que tanto el volumen de fijación como el tiempo tienen influencia sobre el proceso.

Para la permeabilización celular se probaron condiciones del 2% y 4% de tritón de acuerdo al protocolo descrito por BioLegend para el análisis con BrdU y los protocolos descritos en nuestro laboratorio. El análisis de los datos mostraron que los factores influyentes de este proceso son la temperatura y el tiempo, no así la concentración del tritón (Fig. 35 y 36).

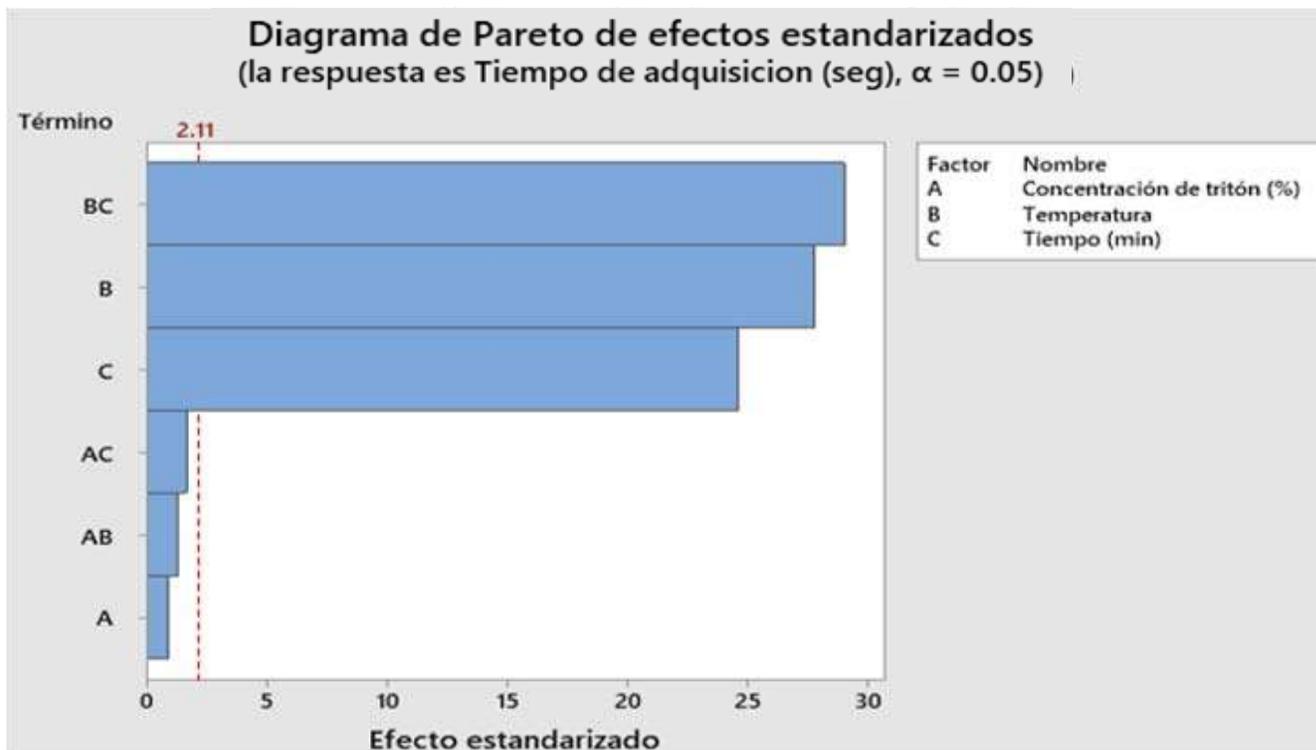
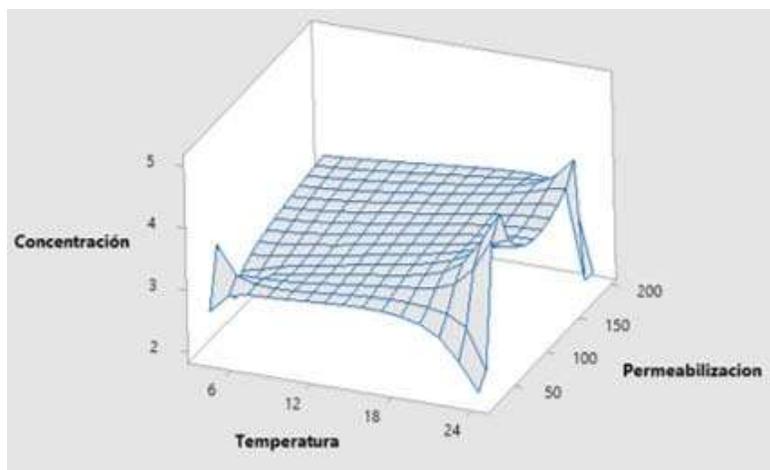
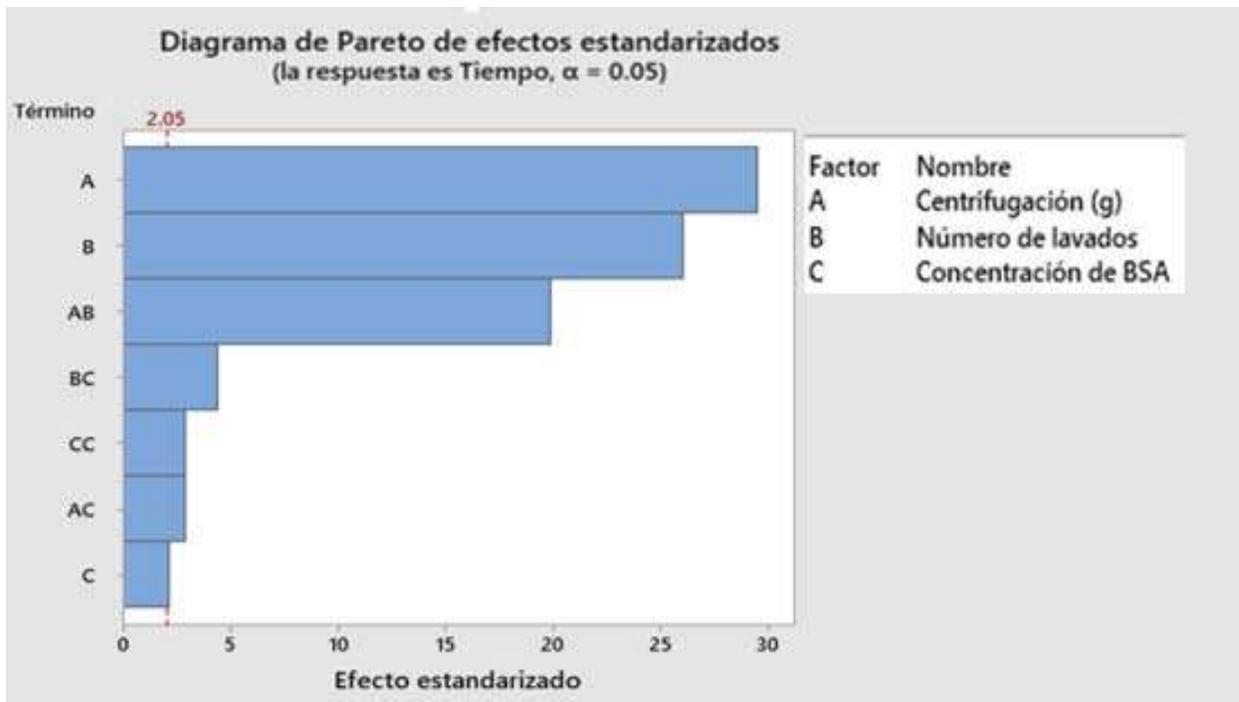


Figura 35. ARS para la permeabilización celular: valores influyentes en el proceso.



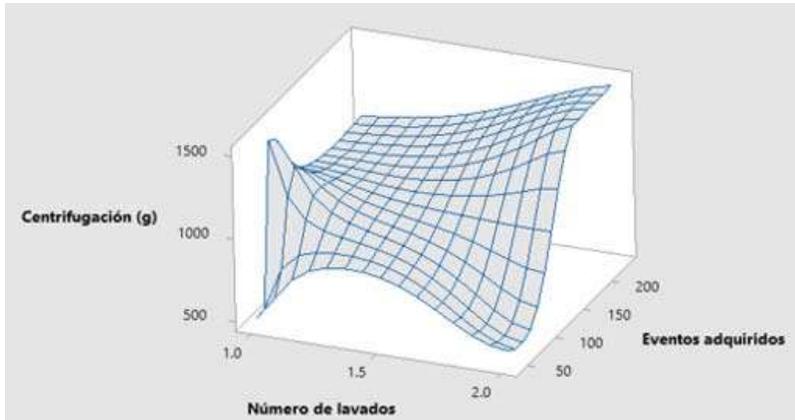
**Figura 36. Diagrama de interacciones de los factores para la permeabilización celular.** En el diagrama de ARS se observa que la temperatura tiene mayor influencia en el proceso.

Finalmente se analizó la pérdida celular debida a los lavados entre cada proceso, para ello se probaron condiciones de centrifugación a 200 y 500 xg, además del número de lavados entre cada proceso (1 y 2) ya que son recomendables dos lavados después de los procesos de fijación y permeabilización celular. Para este proceso se observa una pérdida celular de un 60-70% a 200 xg y de igual manera al aumentar el número de lavados, sin que tenga influencia la concentración de BSA en las condiciones probadas en este análisis (Fig. 37 y 38).

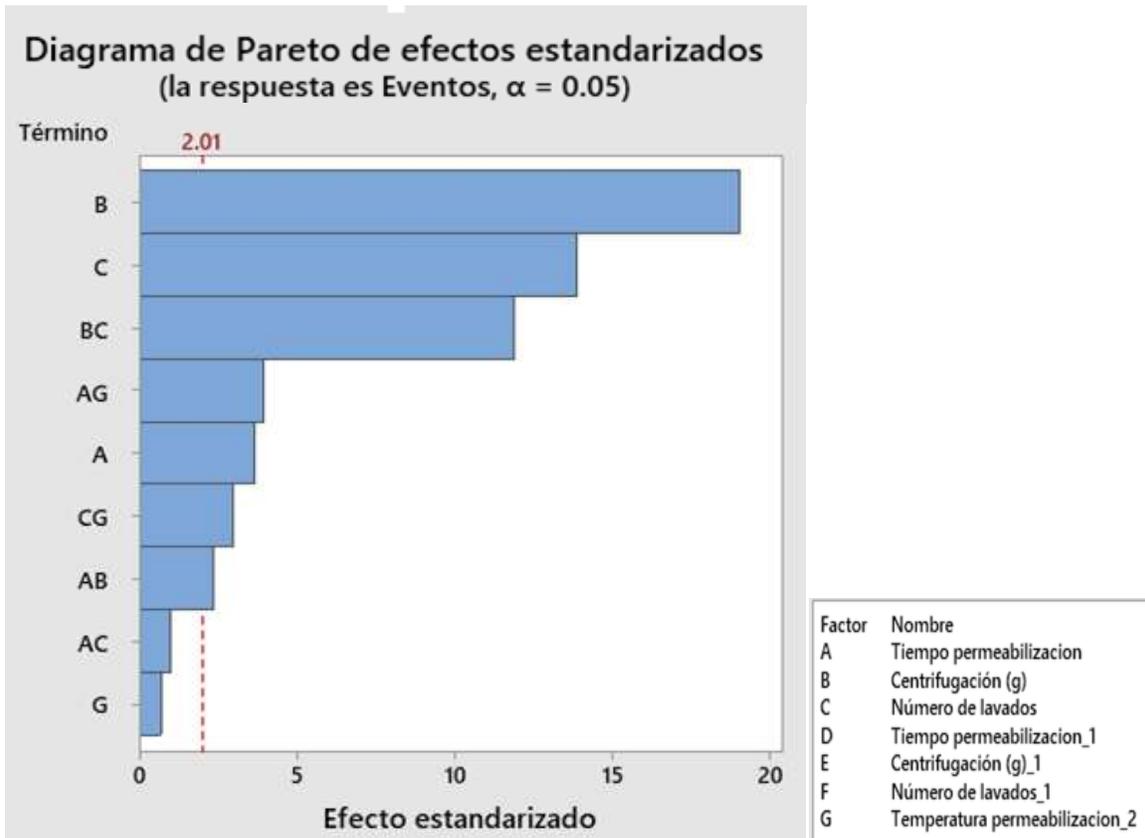


**Figura 37. ARS para la recuperación celular por lavados: valores influyentes en el proceso.**

Con todo lo anterior se realizó un análisis general de los factores más influyentes del proceso (Fig. 39), teniendo como pasos críticos de la pérdida celular, la permeabilización y los lavados entre cada proceso. Se debe tener en cuenta la temperatura y tiempo para cada variable del proceso, especialmente en la permeabilización, además de cuidar las centrifugaciones. Es necesario mencionar que tras la permeabilización son necesarios dos lavados ya que esto evita que se maltraten las células. No se observaron modificaciones en la autofluorescencia celular en ningún paso del proceso.

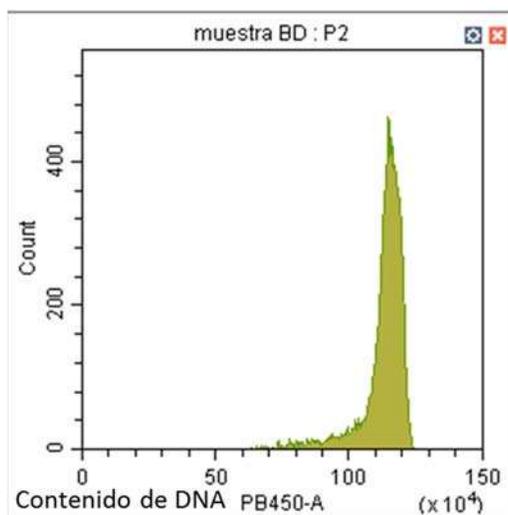


**Figura 38. Diagrama de interacciones de los factores para la recuperación celular por lavados.** En el diagrama de ARS se observa que tanto el número de lavados como la fuerza de centrifugación influyen en la recuperación celular.

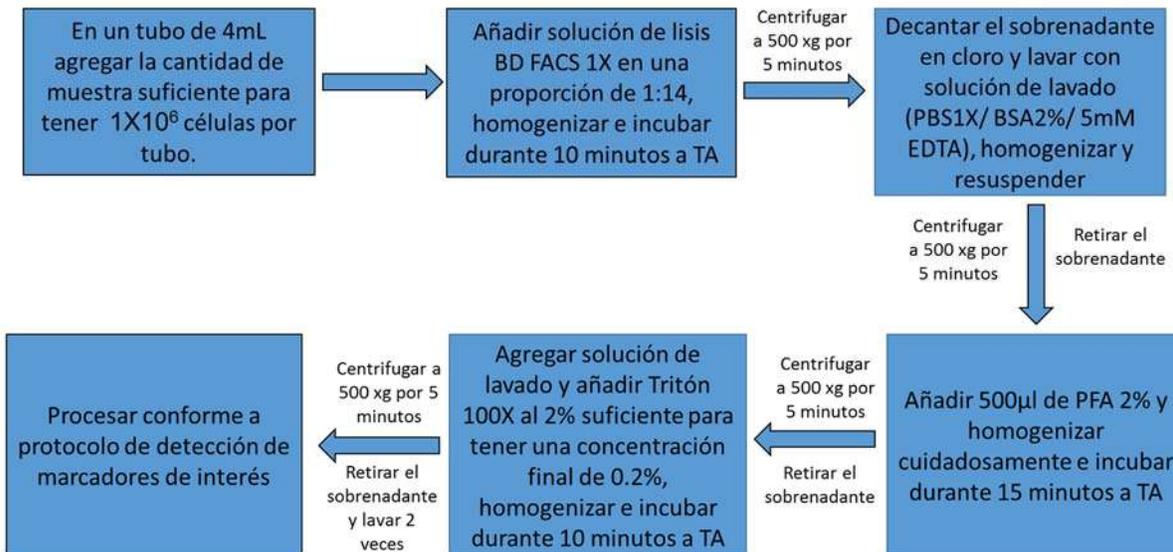


**Figura 39. ARS de todos los factores influyentes en el proceso.**

Con el análisis de respuesta de superficie fue posible determinar las condiciones experimentales teóricas óptimas para el procesamiento de muestras de origen hemático. Para el caso de la lisis eritrocitaria se evaluó la efectividad del buffer de lisis de BD FACS vs. la efectividad del buffer preparado conforme al protocolo de la universidad de California, y siguiendo textualmente los protocolos indicados para cada reactivo. De acuerdo a lo reportado por Bossuyt *et al.* (1997) se determinó, además de la eficiencia de lisis, si éstos modifican el tamaño celular, la distribución poblacional, la cantidad de eventos por segundo y/o la intensidad de fluorescencia. En el caso de BD se observan claramente 3 poblaciones correspondientes a los linfocitos, monocitos y granulocitos (Fig. 28B), concordando con lo descrito por el proveedor y por Bossuyt *et al.* (1997). Para el caso del buffer de lisis preparado en el laboratorio se observa una única población (Fig. 28A), por lo que no es posible distinguir las poblaciones de linfocitos, monocitos y granulocitos con base en sus propiedades de tamaño contra complejidad. Adicionalmente, la eficiencia de lisis resultó ser más eficiente con BD FACS que con el reactivo de laboratorio, razón por la que se optó por BD FACS para la lisis eritrocitaria. En cambio, para la fijación y permeabilización celular se optó por utilizar paraformaldehído al 2% y tritón al 0.2% ya que, de acuerdo al análisis realizado, la concentración del fijador y del permeabilizante no tienen un efecto directo en la eficiencia de estos procesos y, como desventaja, al utilizar una mayor concentración de tritón se puede tener una mayor pérdida celular debida a lisis por acción mecánica y a remanentes del permeabilizante en la muestra. Además, se prefirió el uso de paraformaldehído y tritón debido a que con el PERM2 de BD se observó una interferencia en la señal de DAPI (Fig. 40). El proceso optimizado por medio de ARS se resume en la figura 41.



**Figura 40. Interferencia en la señal de DAPI observada con el uso de PERM2.**



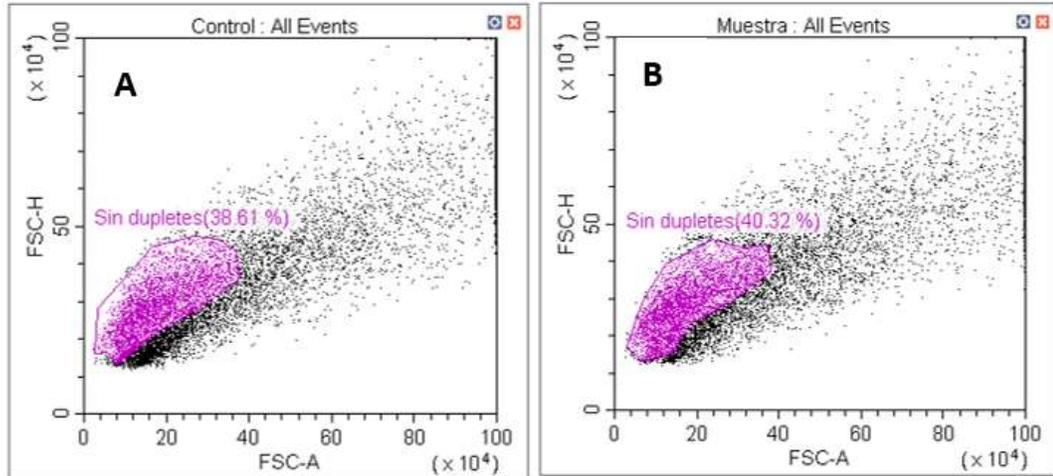
**Figura 41: Diagrama de flujo basado en el ARS para el procesamiento de muestras hemáticas**

Una vez establecido el protocolo con las variables teóricas óptimas del proceso se solicitaron las muestras de MO de los pacientes referidos como *de novo* en el área de oncología del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”. Este protocolo fue aplicado también para los controles cultivados y sin cultivar.

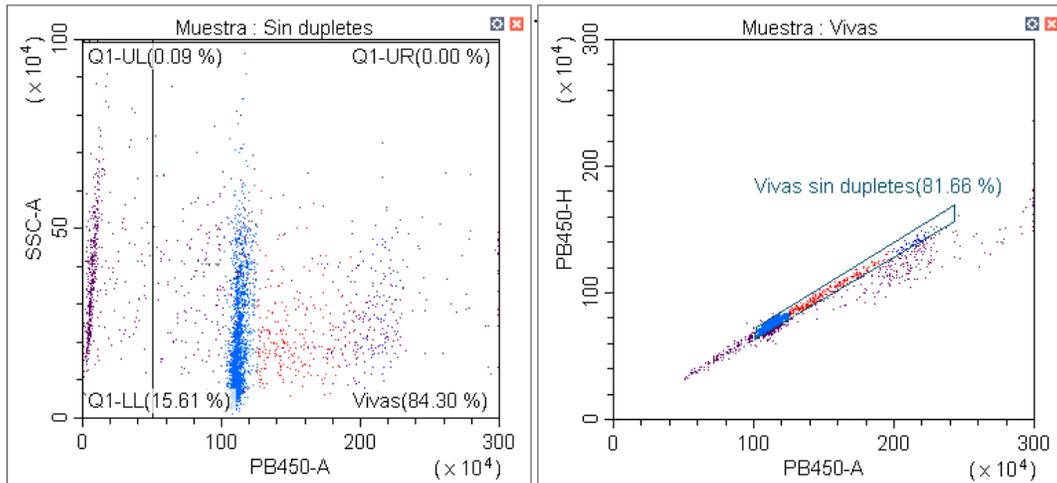
## **8.5 Establecimiento del cultivo de linfocitos para los controles**

Una vez establecido el protocolo optimizado por ARS, se solicitaron las muestras control y se cultivaron de acuerdo al protocolo descrito en materiales y métodos. Para el establecimiento de los controles fue necesario determinar de manera experimental las condiciones de volumen de trabajo, volumen de sangre y temperatura para el cultivo de linfocitos con PHA, esto para obtener un mayor número de células proliferativas donde se observaran todas las fases del ciclo celular

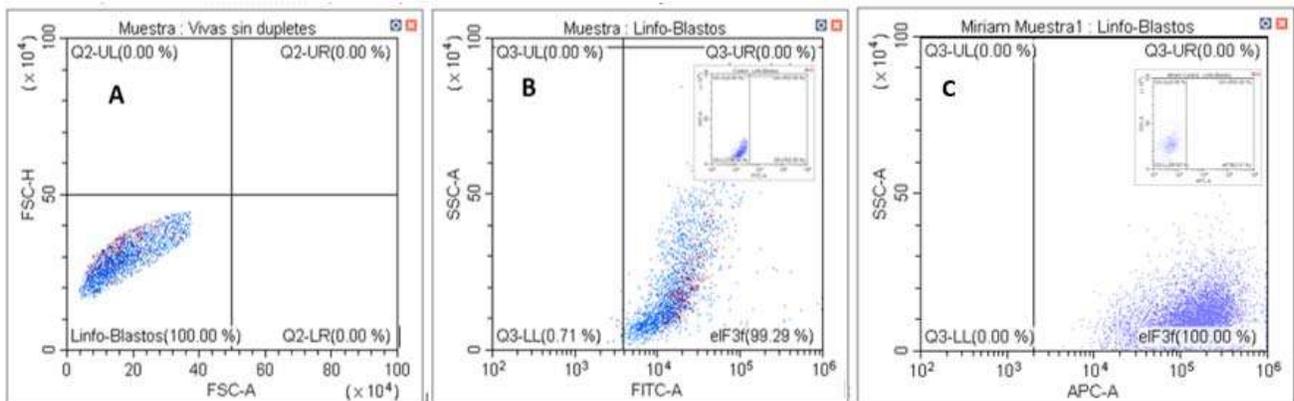
Las muestras fueron cultivadas y procesadas con el protocolo optimizado por medio del ARS observando un enriquecimiento en todas las fases del ciclo celular. El análisis del cultivo inició con la eliminación de dupletes por medio de la selección de un gráfico de FSC-A vs. FSC-H (Fig. 42), posteriormente se seleccionó la población de células vivas en base a la señal de DAPI (Fig. 43-A) para luego proceder con la selección de la población libre de dupletes remanentes en un gráfico de PB450-A vs PB450-H (Fig. 43-B) y, finalmente, se seleccionó la población correspondiente a linfocitos y linfoblastos en una ventana de selección de FSC-A vs FSC-H (el motivo de esta selección se explica en el punto 8.6 y se resume en la figura 47). En una ventana de FITC o AlexaFluor-647, según sea el caso del fluorocromo empleado en la detección de eIF3f, se establece el punto de corte con la autofluorescencia celular y se selecciona la población positiva nombrándola como eIF3f (Fig. 44). Finalmente, se analiza el perfil de ciclo celular de la población de eIF3f en un gráfico de histograma con la señal de DAPI (PB450), cuya selección fue verificada con el software FlowJo (Fig45).



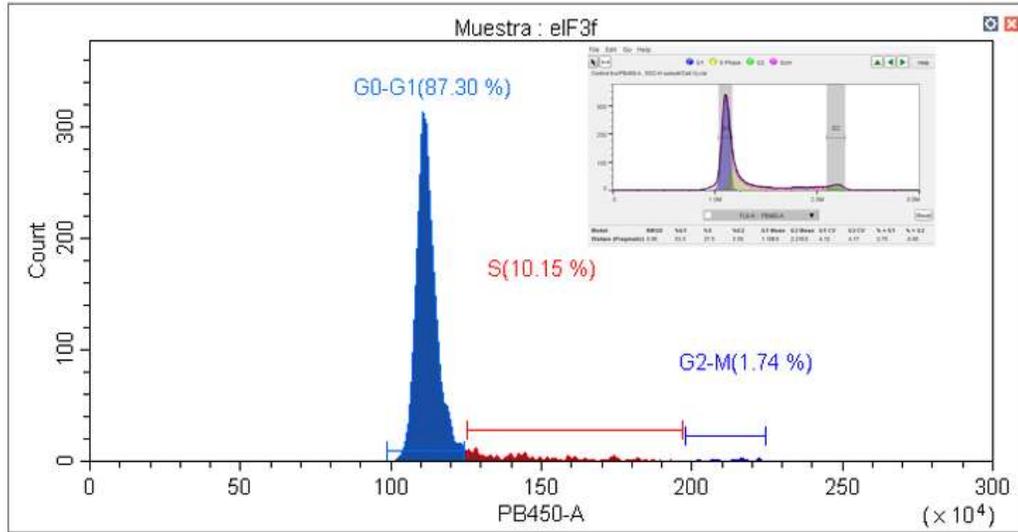
**Figura 42. Selección de la población libre de dupletes en cultivos de linfocitos inducidos con PHA. A) Muestra control sin fluorocromos (control). B) Muestra del cultivo procesado con DAPI y anti-eIF3f.**



**Figura 43. Selección de la población de células vivas libre de dupletes en cultivos de linfocitos inducidos con PHA. A) Selección de la población viva. B) Selección de la población viva libre de dupletes**



**Figura 44. Selección de la población de linfocitos y detección de la fluorescencia para la determinación de la expresión de eIF3f en cultivos de linfocitos inducidos a proliferar con PHA. A) Selección del cuadrante de selección de la población de linfocitos y linfoblastos. B) Selección de la población positiva para FITC. C) Selección de la población positiva para AlexaFluor-647.**



**Figura 45. Histograma de la señal de DAPI para el análisis de ciclo celular**

Al analizar el perfil de ciclo celular con DAPI se observó un enriquecimiento promedio de la fase S del 9.2% y de la fase G2-M del 1.45%. Al comparar estos resultados con lo descrito en 2017 por Bautista-Tejeda, quién reporta un enriquecimiento del 11.5% para la fase S y del 1.97% para la fase G2-M, podemos ver una aparente disminución en el enriquecimiento, sin embargo, el método de selección de la población puede influir en los porcentajes obtenidos, ya que se utilizaron estrategias de selección distintas. Otro punto a considerar es que Bautista-Tejeda utilizó yoduro de propidio para la detección de las fases del ciclo celular por lo que puede haber variaciones.

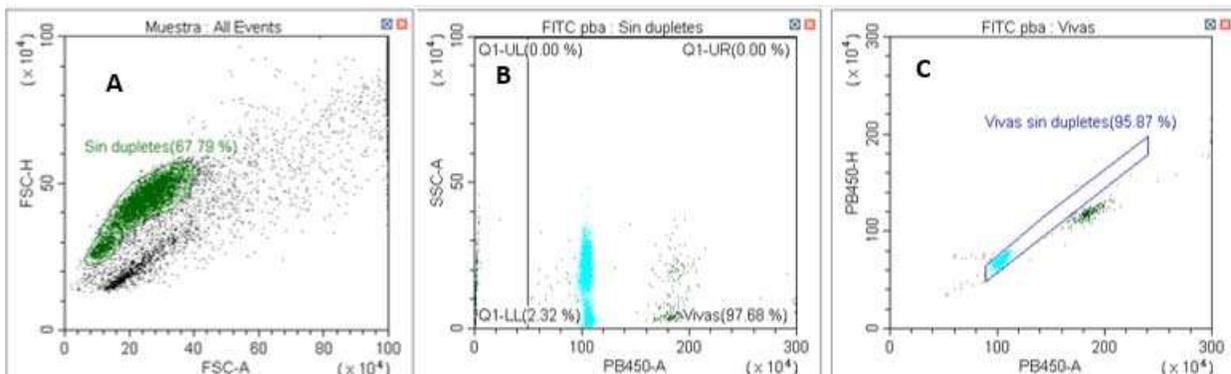
Con la estandarización de los cultivos fue posible analizar la expresión de eIF3f en linfocitos quiescentes y proliferativos (por la adición de un agente mitógeno, PHA) de voluntarios menores a 18 años sin anomalías leucocitarias o eritrocitarias, por lo que se pudo determinar la expresión de esta proteína en las diferentes fases del ciclo celular. Los controles se seleccionaron en voluntarios sin anomalías hemáticas menores de 18 años con el objetivo de tener muestras pareadas.

## 8.6 Estrategia de selección de la población para el análisis de la expresión de eIF3f en las muestras de MO y sus controles

Los controles y las muestras obtenidas fueron procesados inmediatamente con el protocolo obtenido por medio del ARS. En adición, a cada muestra se le realizó el análisis de inmunofenotipo y la descripción morfológica de acuerdo a la FAB, además de la revisión del expediente clínico para completar los datos del cuadro 8 de factores pronósticos. Se obtuvieron en total 10 muestras control para la detección de la expresión de eIF3f con AlexaFluor-647 y 11 muestras control para la detección de eIF3f con FITC.

Debido a la disponibilidad de fluorocromos para la detección de CD45 y CD19 fue necesario modificar la estrategia inicial de selección de linfocitos y linfoblastos, ya que solo fue posible emplear DAPI para el análisis de ciclo celular y FITC o AlexaFluor-647 para la detección y cuantificación de eIF3f.

Para la selección inicial de la población celular se eliminaron los dupletes de en un gráfico de FSC-A vs FSC-H (Fig. 46-A), posteriormente se seleccionaron las células vivas por medio de la señal de DAPI (Fig. 46-B); para la eliminación de dupletes remanentes se seleccionó la población de células vivas en una ventana de PB45-A vs. PB450-H (Fig. 46-C). Cabe aclarar que los dupletes son células que pasan juntas y dan señales dobles de tamaño, complejidad y señal de fluorescencia.

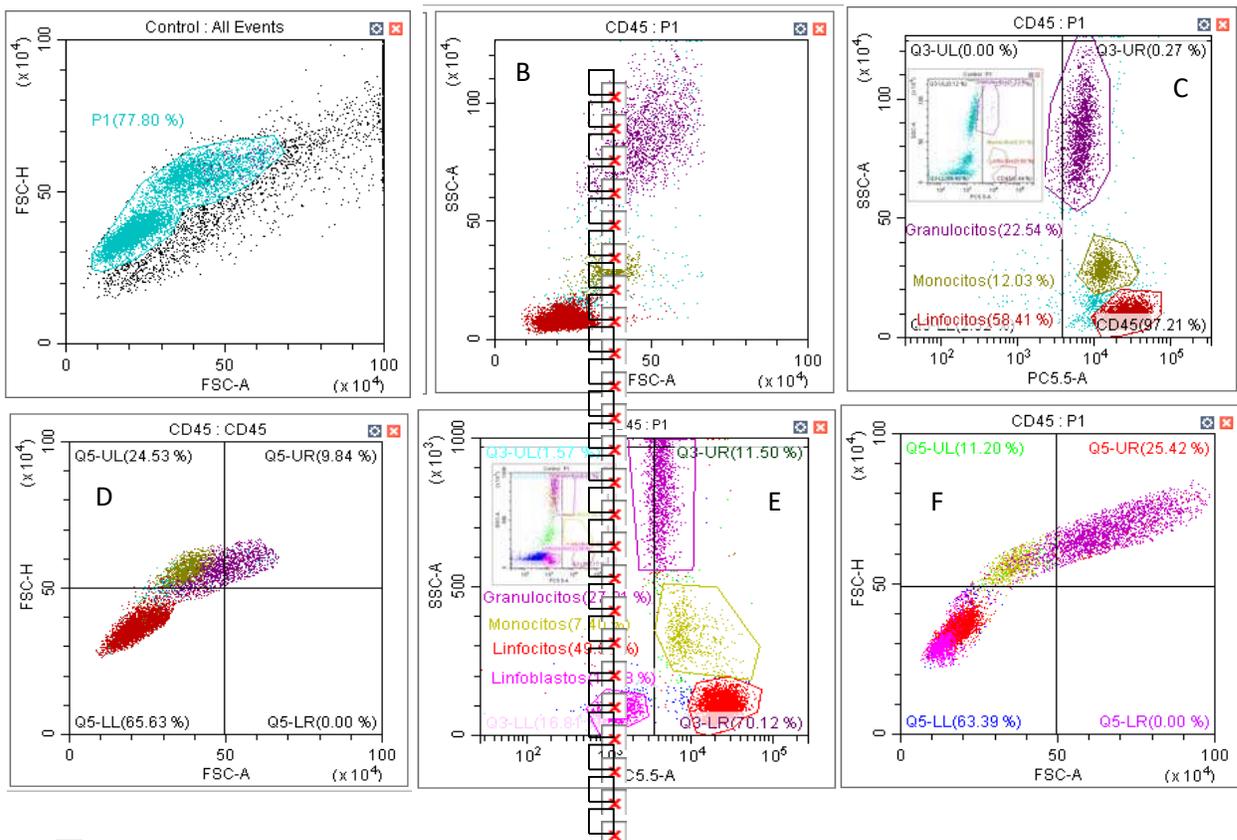


**Figura 46. Selección inicial de la población celular en muestras de MO y controles.** A) Selección de células sin duupletes. B) Selección de células vivas. C) Selección de células vivas sin duupletes remanentes.

La población de células vivas libre de duupletes remanentes fue analizada y se observó que es posible seleccionar a los linfocitos y linfoblastos en una ventana de FSC-A vs FSC-H ya que, debido a sus propiedades de tamaño y complejidad los linfocitos y linfoblastos son diferentes de la población de monocitos y de granulocitos, y por lo tanto distinguibles. Esto se comprobó con el análisis de inmunofenotipo con la señal de CD45 y de CD19 de muestras de MO con linfoblastos y en los controles (libres de linfoblastos) (Fig. 47). Obsérvese que tanto en la figura 47-D y 47-F los monocitos (en color verde) y los granulocitos (en color morado) quedan fuera de la selección de linfocitos (en color rojo) y linfoblastos (en color rosa). La distribución de la población concuerda en lo reportado por Bossuyt *et al.* (1997) y con lo reportado por Lacombe *et al.* (2008) de la expresión de CD45 para estos estirpes celulares, ya que los linfocitos expresan una mayor cantidad de CD45, seguido por los monocitos y finalmente los granulocitos que expresan una menor cantidad. También concuerda con lo reportado por Leach *et al.* (2015) en cuanto a la la distribución clásica para un gráfico de tamaño vs complejidad, por lo que nos aseguramos de la correcta selección poblacional. De manera que, ya que los granulocitos que son las células complejas que presentan una menor expresión de CD45 se encuentran más alejados del origen del eje y y en un punto medio en el eje x, los monocitos con una complejidad menor que los granulocitos pero mayor a la de los linfocitos se encuentran en un punto medio del eje de las y y un poco mas alejado del origen el eje x y, finalmente, los linfocitos que son las células menos complejas se encuentran en el punto más alejado del eje x ya que expresan más CD45 y más cercano al origen del eje y, en donde en el eje x se ve la intensidad de fluorescencia de CD45 (PC5.5) y en el eje y la complejidad celular. Con este mapeo celular es posible distinguir a los linfocitos de los linfoblastos ya que, al tener una menor expresión de CD45 la población linfoblástica se desplaza hacia la derecha, estando más cerca del origen en ambos ejes.

Debido a las combinaciones posibles de los fluorocromos disponibles no fue posible utilizar la estrategia de selección poblacional de CD45 por lo que, aprovechando las propiedades de tamaño y complejidad, se puede discernir entre la población linfocítica (linfocitos y linfoblastos) de los monocitos y granulocitos.

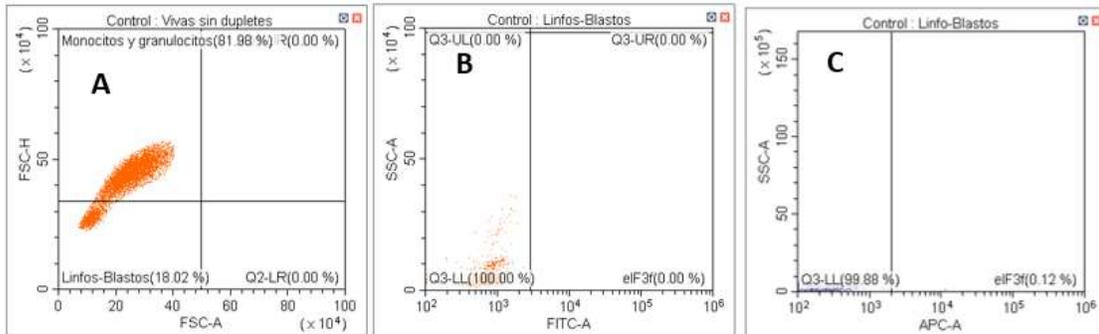
Aunque por este método de selección no sea posible distinguir linfocitos de linfoblastos nos permite discernir de las demás estirpes que no son de interés para el proyecto.



**Figura 47. Estandarización de la selección de la población linfocítica.** A) Selección de la población por medio de FSC-H vs. FSC-A. B) Ventana de tamaño vs. complejidad, donde se observan 3 poblaciones celulares correspondientes a linfocitos, monocitos y granulocitos. C) Señal de CD45 por PC5.5 de un control sano; se observan los linfocitos en rojo, los monocitos en verde y los granulocitos en morado. D) Gráfico de Dot-plot de FSC-H vs. FSC-A para la selección de linfocitos (en rojo) de un control sano; véase la exclusión de monocitos y granulocitos. E) Señal de CD45 por PC5.5 de una muestra de MO correspondiente a un paciente con LLA; linfocitos en rojo, linfoblastos en rosa, monocitos en verde y granulocitos en morado. F) Gráfico de Dot-plot de FSC-H vs. FSC-A para la selección de linfocitos (en rojo) y linfoblastos (en rosa) en una muestra de MO correspondiente a un paciente con LLA; véase la exclusión de monocitos y granulocitos.

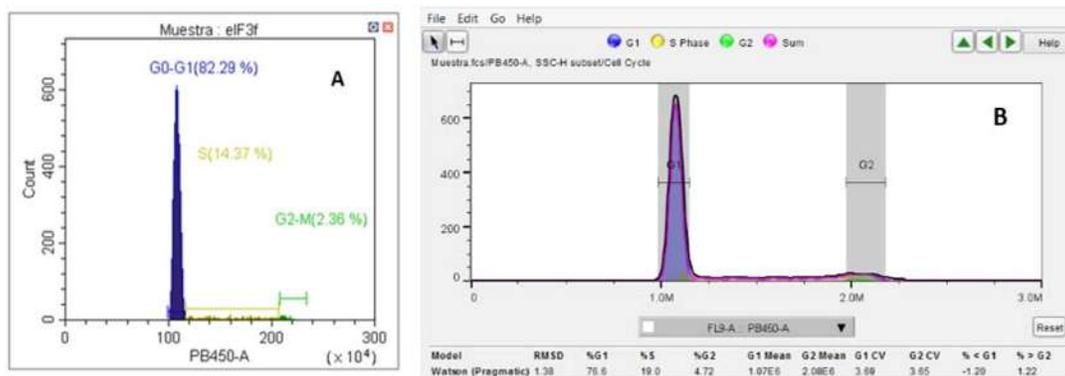
Una vez seleccionada la población correspondiente a linfocitos y linfoblastos se establecen los puntos de corte para la señal de FITC o AlexaFluor-647, según

sea el caso, en base a la auto fluorescencia de los controles y se nombra al cuadrante positivo de la señal como eIF3f, y es a partir de esta población de la que se genera el histograma de análisis para ciclo celular (Fig. 48).



**Figura 48. Establecimiento de los puntos de corte para las señales de FITC y AlexaFluor-647**

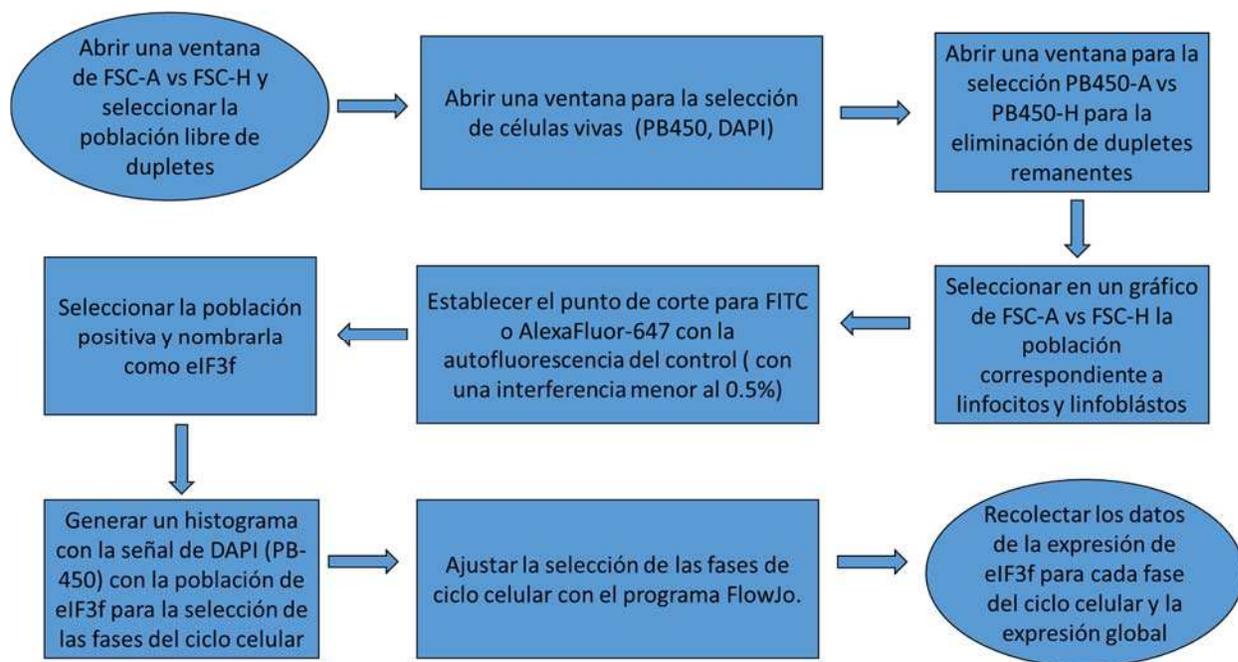
En el gráfico de histograma generado a partir de la población denominada como eIF3f se detectaron las fases del ciclo celular a través de la señal correspondiente a DAPI (contenido de ADN). La selección de las fases fue corroborada por medio del programa FlowJo a través de la función de ciclo celular, esto para cada una de las muestras y los controles. Es necesario mencionar que los porcentajes se modifican por la selección poblacional utilizada, la cual no puede ser replicada en el programa de FlowJo, pero que los picos de las señales coinciden con ambos métodos (Fig. 49).



**Figura 49: Señales de DAPI en los programas CytExpert y FlowJo. A) Selección de las fases del ciclo celular en el programa CytExpert ajustada con el programa FlowJo. B) Selección de las fases del ciclo celular en el programa FlowJo.**

Finalmente, para la obtención de los valores de expresión de eIF3f y el porcentaje de células en cada fase se selecciona la opción de estadística del programa CytExpert seleccionando la fluorescencia utilizada y las poblaciones de interés (eIF3f para la expresión global, G0-G1, S y G2-M).

Esta estrategia de selección se resume en la figura 50 y fue aplicada a cada muestra y control, independientemente del fluorocromo utilizado, para la detección de eIF3f. Cabe señalar que las únicas variaciones que se observaron entre los dos grupos fue la intensidad de fluorescencia propia de cada fluorocromo.



**Figura 50. Estrategia de selección de la población celular para la determinación de la expresión de eIF3f.**

## **8.7 Expresión de eIF3f en las fases del ciclo celular de muestras de médula ósea de pacientes *de novo* y sus controles.**

Los controles y las muestras de médula ósea (MO) fueron procesadas conforme a lo descrito en el apartado de materiales y métodos para la determinación de la concentración de eIF3f. De manera general se realizó un frotis y se tiñó con reactivo de Wright para observar y describir los tipos celulares presentes en la muestra y realizar el conteo diferencial de los leucocitos. Esta tinción permite además la distinción entre LMC y LLA de acuerdo a las características morfológicas descritas por la FAB. Una vez analizado el frotis, se contabilizaron los leucocitos por medio de la cámara de Neubauer, realizando una lisis eritrocitaria previa.

Para iniciar el proceso experimental basado en el ARS se tomó un volumen de muestra correspondiente a 1,000,000 células por tubo para el ensayo con eIF3f (un tubo control para el establecimiento de los puntos de corte y uno para la determinación de eIF3f) y para la determinación del inmunofenotipo se emplearon 10,000 células. Para la determinación de la concentración de eIF3f se lisaron los eritrocitos, se fijaron y permeabilizaron las células para posteriormente incubar con anti eIF3f; terminada esta incubación se adicionó el anticuerpo secundario (AlexaFluor-647 para las primeras 6 muestras o FITC para las 34 muestras restantes) y, finalmente, se añadió DAPI.

Para el caso del inmunofenotipo, ya que los anticuerpos disponibles poseen fluorocromos idénticos, fue necesario realizar el análisis de cada marcador por separado. Para ello se alicuotaron tubos con la cantidad necesaria de muestra y se lisaron los eritrocitos. Para el caso de los anticuerpos superficiales (CD45, CD19, Cd11b, CD33, CD13, CD10) se incubó con cada anticuerpo después de la lisis eritrocitaria, finalizando con la fijación de la muestra. Para el caso de los anticuerpos intracelulares (TdT, IgM, MOP), la muestra libre de eritrocitos se fijó, permeabilizó e incubó con cada anticuerpo. Finalmente se analizaron todas las muestras por citometría de flujo.

Para el análisis de las poblaciones celulares por citometría se siguió la estrategia descrita en el punto 8.6 que se resume en la figura 50.

Las muestras de MO fueron divididas en dos grupos de análisis basados en el fluorocromo utilizado para determinación de la expresión de eIF3f teniendo en el grupo 1 a las muestras y controles procesadas con FITC y en el grupo 2 a las muestras y controles procesadas con AlexaFluor-647. Estos grupos a la vez se subdividieron en base al diagnóstico en 3 o 4 subgrupos dependiendo de los diagnósticos: 1.- Pacientes con diagnóstico de LLA, 2.- Paciente con diagnóstico de LMA, 3.- Paciente con diagnóstico diferente a leucemia y 4.- Pacientes con sospecha de leucemia. Finalmente se realizó un análisis general que engloba a todas las muestras de cada grupo.

A continuación se describen los resultados obtenidos en los grupos y subgrupos.

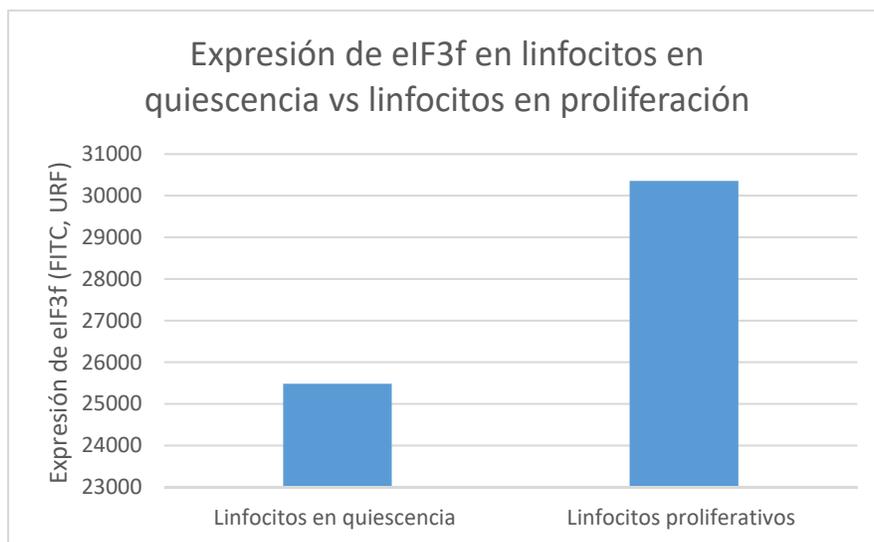
### **8.7.1 Muestras analizadas con FITC para la determinación de la expresión de eIF3f**

Siguiendo la estrategia de selección descrita en el punto 8.6 se seleccionó la población correspondiente a linfocitos y linfoblastos y se definieron las fases del ciclo celular por medio de la señal de DAPI de linfocitos en quiescencia y en proliferación, así como en las muestras de MO de pacientes *de novo*. Con esta selección se determinó la expresión de eIF3f, definida por la media de la intensidad de FITC (equivalente a la concentración relativa de eIF3f), en las diferentes fases del ciclo celular y de manera global (que no distingue entre fases). En total se procesaron 11 controles y 34 muestras de MO para la determinación de la expresión de eIF3f con FITC. Los controles corresponden a voluntarios menores de 18 años sin alteraciones hemáticas por lo que las muestras son pareadas.

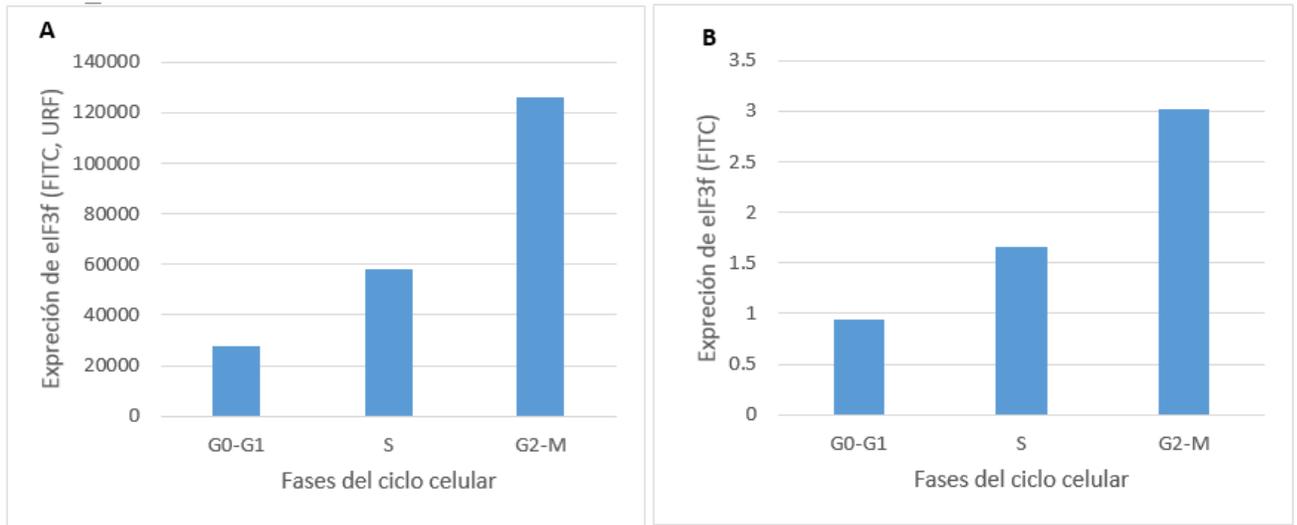
Al analizar los datos de los controles se puede observar que la expresión de eIF3f de linfocitos en quiescencia es menor a la de linfocitos en proliferación (Fig. 51). En relación a la expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular se

observa un aumento en S y un máximo en G2-M (Fig. 52-A), esta diferencia es más evidente al normalizar los datos con la expresión global (Fig. 52-B) y coinciden con lo reportado por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván en 2010 y con lo reportado por Bautista-Tejeda en 2017.

Cabe mencionar que los controles utilizados por Bautista-Tejeda fueron establecidos con linfocitos quiescentes e inducidos a proliferación por medio de la adición de un agente mitógeno (PHA) de muestras de voluntarios adultos sanos, de manera que evaluó la expresión de eIF3f en los controles para la comparación con las muestras de MO y que en el presente estudio se realizó la misma determinación con muestras de voluntarios menores de 18 años, por lo que se puede concluir que la relación de la expresión es independiente a la edad y que los linfocitos en proliferación expresan una mayor cantidad de eIF3f en comparación con los linfocitos quiescentes.



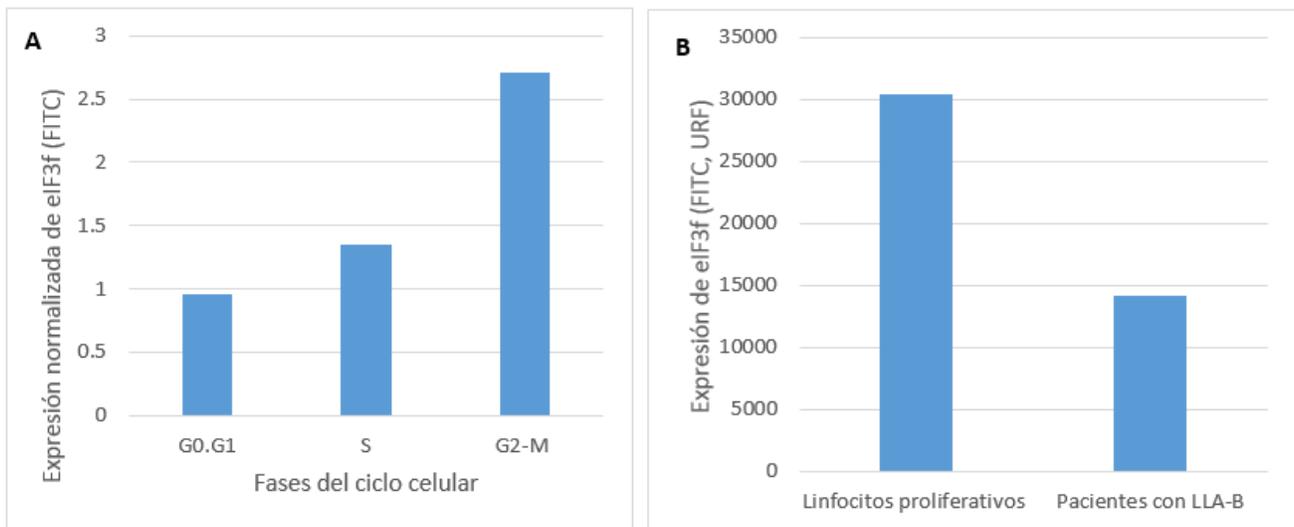
**Figura 51. Comparación de la expresión de eIF3f detectado por FITC en linfocitos quiescentes vs. linfocitos en proliferación**



**Figura 52. Determinación de la expresión de eIF3f con FITC en las diferentes fases del ciclo celular de linfocitos proliferativos. A)** Expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular. **B)** Expresión normalizada de eIF3f en relación a la expresión global en las diferentes fases del ciclo celular. Se realizó una prueba de T de student en la cual se obtuvo una  $p < 0.05$  para la expresión de G0-G1, S y G0-G1, G2-M.

Para la evaluación de las muestras de MO se determinaron 4 subgrupos de estudio en base al diagnóstico:

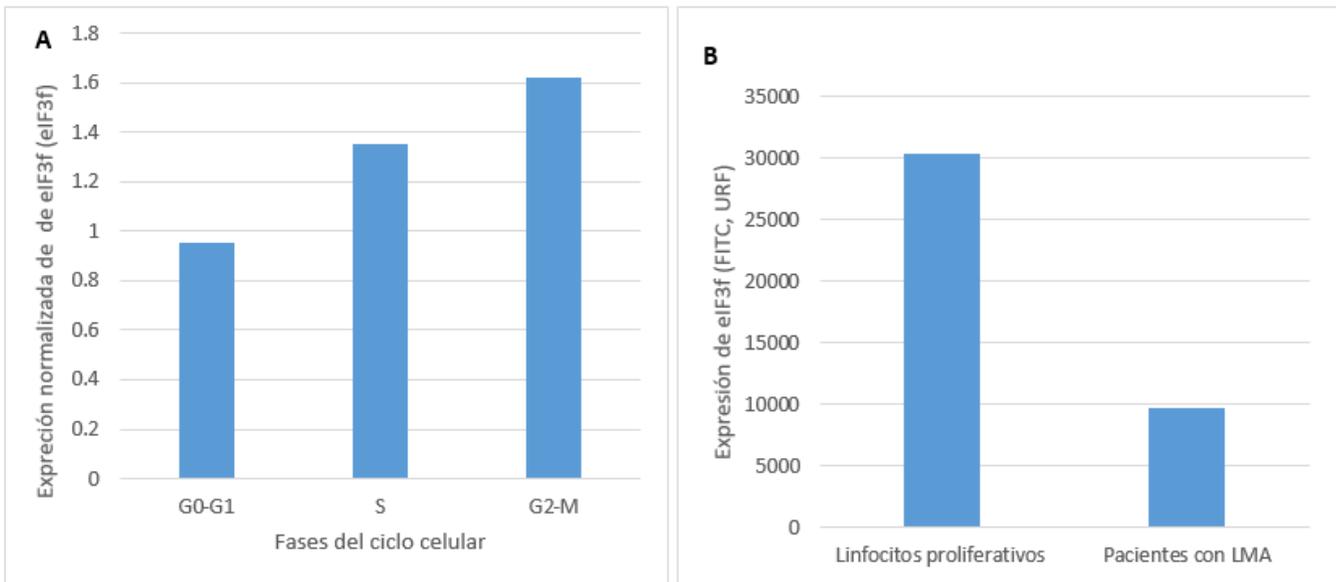
**1.- Pacientes con diagnóstico confirmado de LLA-B:** Este subgrupo se conforma de 16 muestras en las cuales se puede observar una expresión inicial de eIF3f en G0-G1 que aumenta en S y tiene un máximo de expresión en las fases G2-M presentando diferencias significativas de expresión entre las fases G0-G1 y G2-M, de acuerdo al análisis de t de Student (Fig. 53-A). Al comparar la expresión de eIF3f de los linfocitos inducidos a proliferación con las muestras de éste subgrupo podemos apreciar una disminución en la expresión global de la proteína (Fig. 53-B), lo que concuerda con lo descrito por Bautista-Tejeda en el 2017.



**Figura 53. Detección de la expresión de eIF3f con FITC en muestras de MO de pacientes con LLA-B, A)** Expresión relativa de eIF3f en las fases del ciclo celular, **B)** Comparación de la expresión de eIF3f entre linfocitos proliferativos y las muestras de MO de pacientes con LLA-B. Se realizó una prueba de t de student en la que se obtuvo una  $p < 0.05$ .

**2.- Pacientes con diagnóstico confirmado de LMA:** Este subgrupo está conformado por 7 muestras y al analizar la expresión de eIF3f podemos observar una expresión inicial de eIF3f en las fases G0-G1 que aumenta en S y que tiene un máximo de expresión en G2-M (Fig. 54-A), pero que a diferencia del subgrupo anterior no se encontraron diferencias significativas entre las expresiones de eIF3f entre las fases G0-G1, S y G2-M. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que las células G0 y G1 son indistinguibles por medio de la señal de DAPI y que, como se muestra en los controles, la expresión de eIF3f aumenta en las fases G0-G1 cuando las células son proliferativamente activas, por lo que es posible que se vea un aumento de la expresión de eIF3f debido a que en la fase G1 se inicia la síntesis de proteínas para el inicio del ciclo celular, síntesis en la cual eIF3f tiene una función importante (Herráez, 2012; Querol-Audi *et al.*, 2016), además de que en la mayoría de los casos de LMA se presenta la translocación de BCR-ABL y esto favorece el incremento de la proliferación celular (Pavón-Morán, *et al.* 2005), por lo que al no distinguirse las fases G0 y G1 existe un error de discriminación de fases y por lo tanto de células proliferativas (que tienen una mayor expresión de

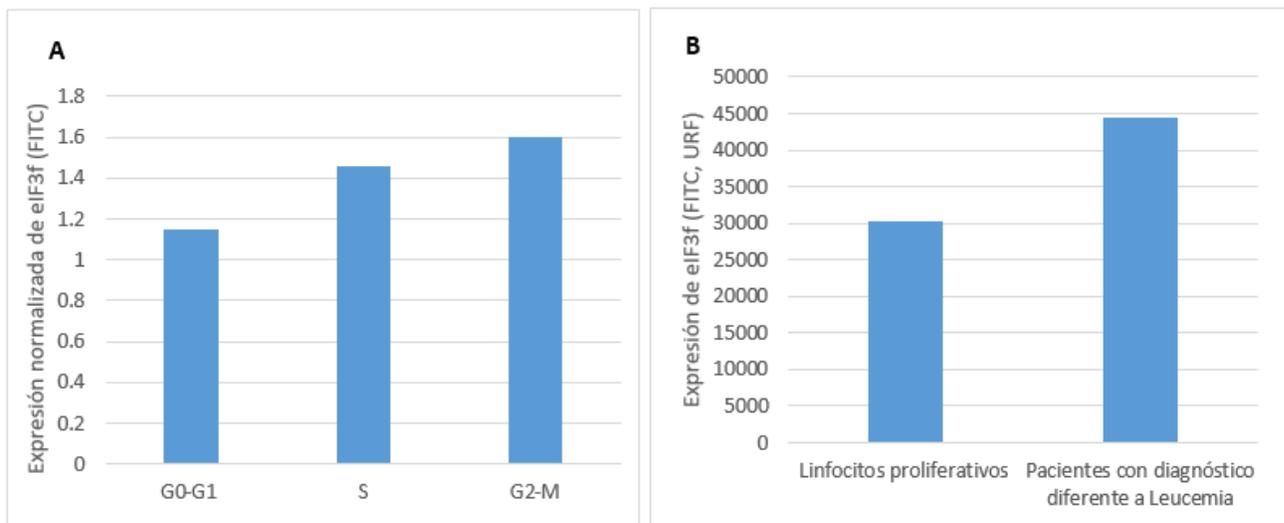
eIF3f), por lo que las diferencias de expresión resultan no significativas. Al comparar la expresión de eIF3f de las muestras de MO de pacientes con LMA con la expresión de los linfocitos inducidos a proliferación podemos ver una disminución en la expresión de la proteína (Fig. 54-B).



**Figura 54. Detección de la expresión de eIF3f con FITC en muestras de MO de pacientes con LMA. A)** Expresión normalizada de eIF3f en las fases del ciclo celular muestras de MO de pacientes con LMA.**B)** Comparación de la expresión de eIF3f de linfocitos proliferativos con la expresión en las muestras de MO de pacientes con LMA. Se realizó una prueba de t de student en la que se obtuvo una  $p > 0.05$ .

**3.- Pacientes con diagnóstico diferente a leucemia:** Este subgrupo está conformado por una sola muestra de MO con diagnóstico de linfoma de Hodgkin y en esta muestra se conservan una expresión inicial de eIF3f que aumenta en S y que tiene un máximo de expresión en G2-M (Fig. 55-A). Sin embargo, no fue posible determinar si estas diferencias de expresión son estadísticamente significativas debido al número de muestras. Al comparar esta muestra con los linfocitos inducidos a proliferación podemos observar un aumento considerable en la expresión de eIF3f en comparación a la expresión global de linfocitos proliferativos (Fig. 55-B). Para analizar esta muestra debemos considerar que el aspirado de MO es de utilidad para la descripción de la morfología celular y se pueden describir situaciones de infiltración, así como la descripción de la

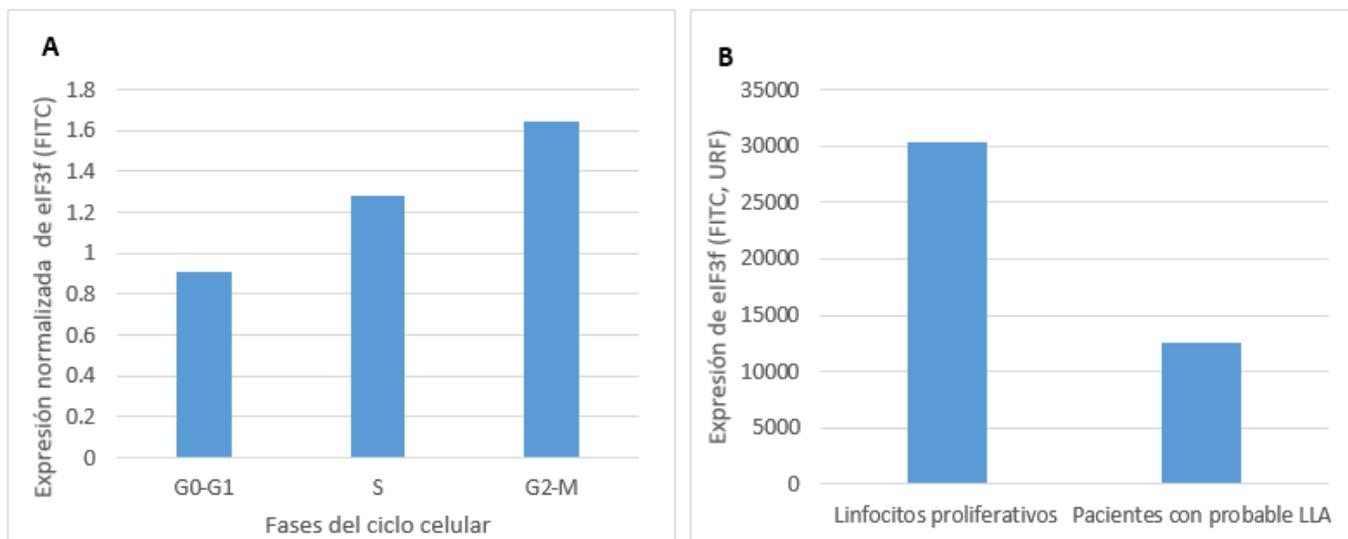
morfología celular en diferentes afecciones hemáticas (Torres-Gómez, 1996). En el caso del paciente de este subgrupo se reporta en los estudios que tiene un cariotipo sin alteraciones numéricas o estructurales, sin presencia de células Reed-Sternberg que, de acuerdo a la definición del Instituto Nacional del Cáncer, son linfocitos grandes y anormales que pueden contener más de un núcleo presentes en el linfoma de Hodgkin. Adicionalmente, no se reportó la presencia de blastos, por lo que esta muestra se comporta como una muestra de MO sin células malignas, además de que este caso se comporta de manera similar a la muestra de leucopenia sin malignidad reportada por Bautista-Tejeda (2017).



**Figura 55. Detección de la expresión de eIF3f con FITC de MO de pacientes con diagnóstico diferente a leucemia. A)** Expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular en una muestra con diagnóstico diferente a leucemia (Linfoma de Hodgkin), **B)** Comparación de la expresión de eIF3f entre linfocitos proliferativos y la muestra con diagnóstico diferente a leucemia.

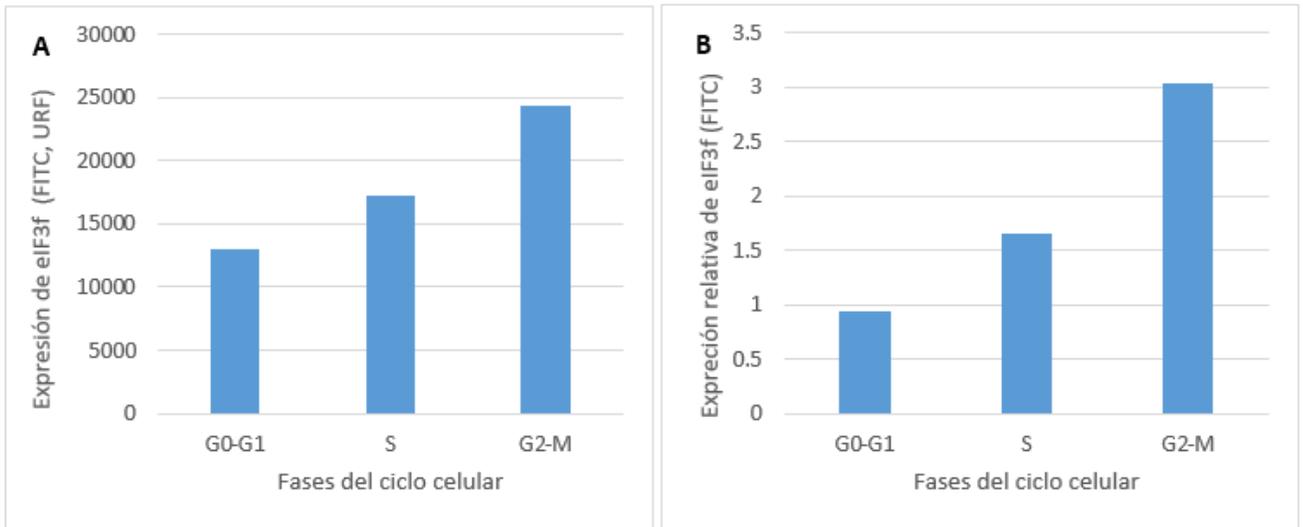
**4.- Pacientes con sospecha de LLA:** Este subgrupo está conformado por las muestras recibidas de pacientes que no cuentan con la confirmación del diagnóstico y se basa en las características morfológicas del frotis, el análisis de inmunofenotipo y en los estudios de gabinete compartidos por el hospital infantil. Está conformado por 10 muestras en las cuales se observa una expresión inicial de eIF3f en las fases G0-G1 que aumenta en S y tiene un máximo de expresión en G2-M (Fig. 56-A), teniendo diferencias significativas en la expresión de eIF3f entre

las fases G0-G1, S y G0-G1, G2-M de acuerdo al análisis de t de Student con una  $p < 0.05$ . Al comparar la expresión de eIF3f de estas muestras con la expresión de los linfocitos proliferativos se observa una disminución en la expresión de la proteína (Fig. 56-B).



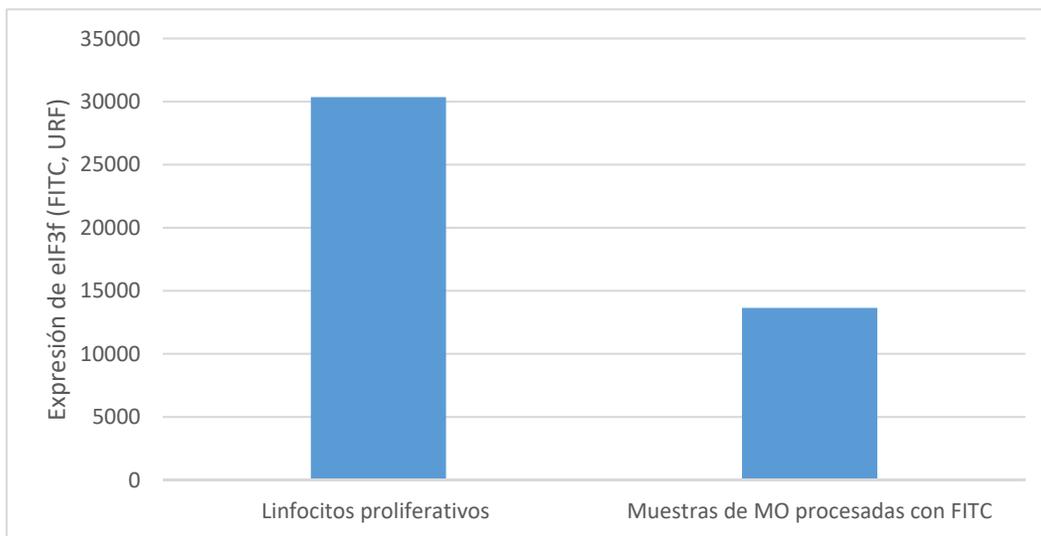
**Figura 56. Determinación de la expresión de eIF3f con FITC en muestras de MO de pacientes con probable leucemia. A)** Expresión relativa de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular en muestras de MO de pacientes con probable LLA. **B)** Comparación de la expresión de eIF3f entre linfocitos proliferativos y las muestras de MO de pacientes con probable leucemia. Se realizó un análisis de t de student en la que se obtuvo una  $p < 0.05$ .

En todas las muestras se utilizó el valor normalizado de eIF3f en relación con la expresión global. Si evaluamos todas las muestras de MO procesadas con FITC en conjunto, podemos observar cómo se mantiene el patrón de expresión de eIF3f (Fig. 57) y al realizar un análisis de t de Student podemos ver que existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre las fases G0-G1, S y entre G0-G1, G2-M y que la diferencia entre las fases S y G2-M no resultó significativa concordando con lo observado en los subgrupos y con lo reportado por Bautista-Tejeda (2017).



**Figura 57. Expresión de eIF3f en las muestras de MO procesadas con FITC. A)** Media de la expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular de las muestras de MO procesadas con FITC. **B)** Expresión normalizada de eIF3f en relación a la expresión global en las muestras de MO procesadas con FITC.

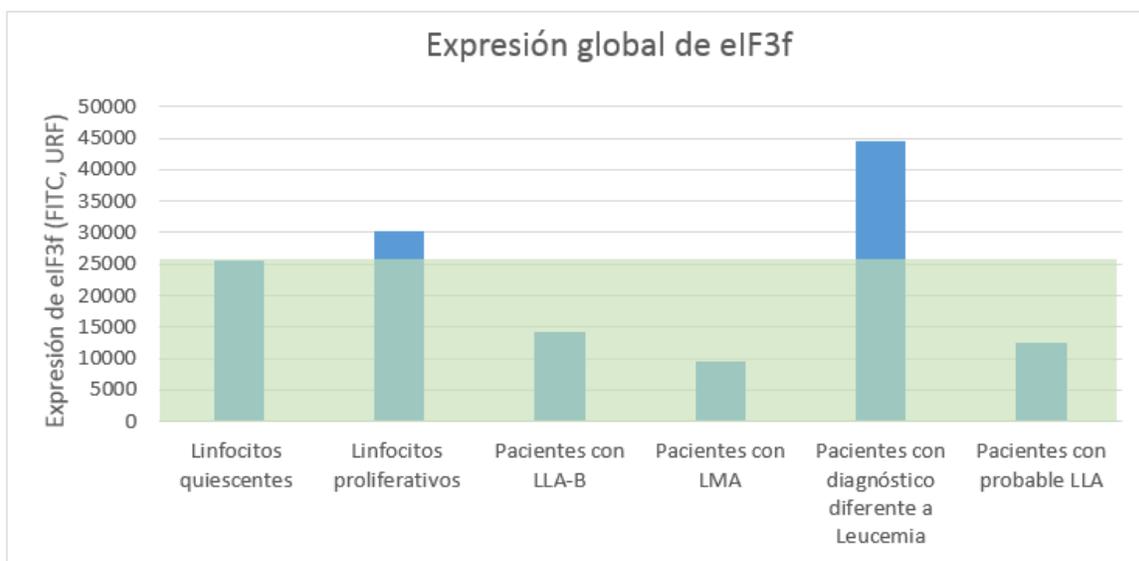
Al comparar la expresión de eIF3f de todas las muestras de MO analizadas con FITC con los linfocitos inducidos a proliferación observamos una disminución de la expresión en las muestras de MO (Fig. 58).



**Figura 58. Comparación de la expresión de eIF3f de linfocitos en proliferación vs el valor global de las muestras de MO procesadas con FITC**

Finalmente y a manera de resumen en la figura 59 se presenta un gráfico comparativo definiendo como punto de corte la expresión de eIF3f de los linfocitos quiescentes debido a que es la expresión basal de eIF3f en linfocitos no

neoplásicos. En este gráfico se compara con la expresión de eIF3f de linfocitos proliferativos y podemos observar un aumento de expresión en comparación al punto de corte y, al comparar la expresión en las muestras de MO de cada subgrupo se observa la disminución de la expresión por debajo del punto de corte a excepción de la muestra con diagnóstico diferente a leucemia (diagnóstico de Linfoma de Hodgkin), ya que en esta muestra se observa un aumento considerable en la expresión de eIF3f. Es importante tener en cuenta el origen de las muestras ya que, como se mencionó anteriormente, la médula ósea es un tejido con una actividad proliferativa importante debido a las funciones que tiene en el organismo para el recambio celular, por lo que el aumento de expresión puede ser debido a un mayor número de células proliferativas (incluyendo a la fase G1). Al realizar un análisis estadístico de t de Student intergrupar se obtuvo una  $p < 0.05$



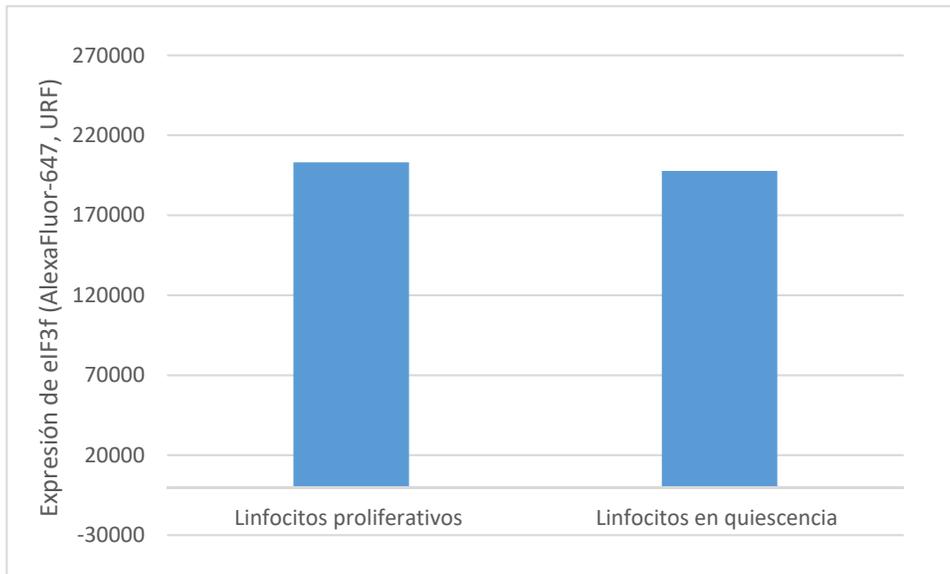
**Figura 59: Expresión comparativa de eIF3f en los controles y subgrupos de las muestras de MO procesadas con FITC.**

### **8.7.2 Muestras analizadas con AlexaFluor-647 para la determinación de la expresión de eIF3f**

Siguiendo la estrategia de selección descrita en el punto 8.6 se seleccionó la población correspondiente a linfocitos y linfoblastos y se definieron las fases del ciclo celular por medio de la señal de DAPI de linfocitos en quiescencia y en proliferación (controles) así como en las muestras de MO de pacientes *de novo*. La determinación del patrón de expresión de eIF3f en las diferentes fases y de forma global se define por la media de la intensidad de AlexaFluor-647 (equivalente a la concentración relativa de eIF3f y detectado en el canal de fluorescencia de APC). En total se procesaron 10 controles y 6 muestras de MO para la determinación de la expresión de eIF3f por FITC, los controles corresponden a voluntarios menores de 18 años por lo que las muestras son pareadas y las muestras de MO se subdividieron en grupos en base al diagnóstico, además de que se realizó la comparación de todas las muestras en conjunto.

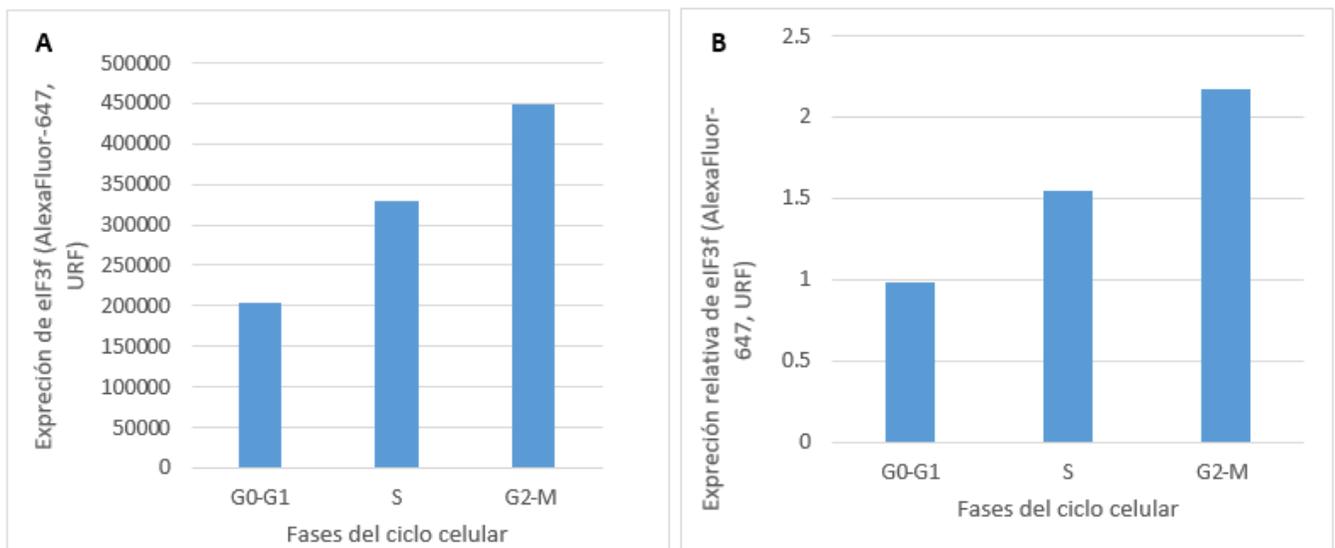
Al analizar los datos de los controles se puede observar que la expresión de eIF3f de linfocitos en quiescencia es ligeramente menor a la de linfocitos en proliferación (Fig. 60).

Esto puede deberse a que AlexaFluor-647 posee una fluorescencia excesiva en comparación a FITC y esto puede ocasionar interferencias por saturación.



**Figura 60. Comparación de la expresión de eIF3f detectada por AlexaFluor-647 de linfocitos en quiescencia vs. linfocitos en proliferación**

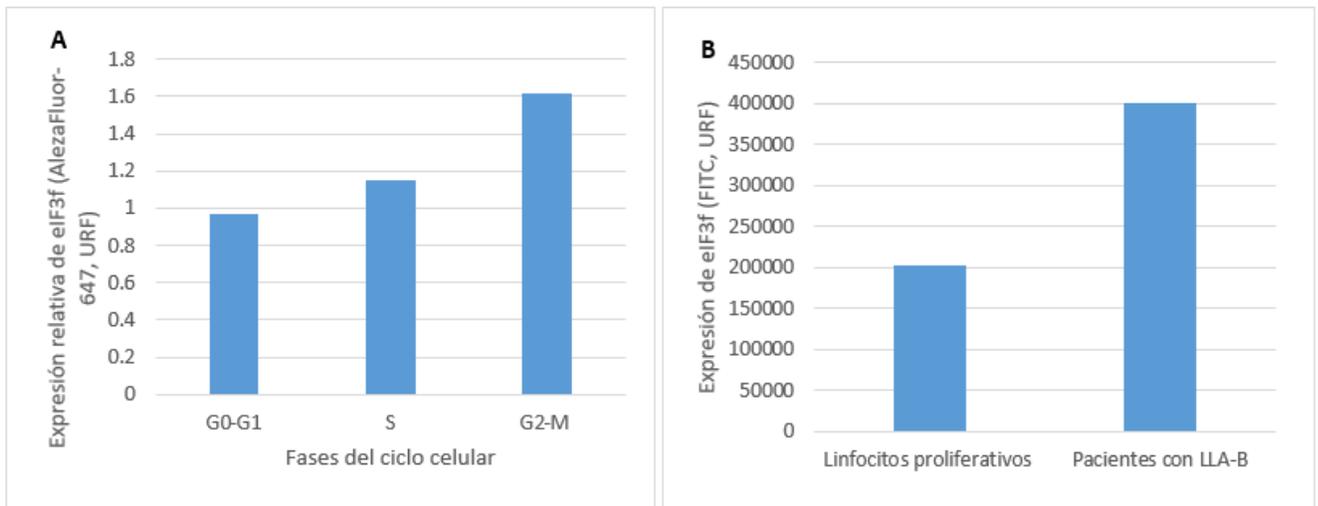
En los linfocitos inducidos a proliferación podemos observar que hay un aumento en la expresión de eIF3f en la fase S con un máximo de expresión en G2-M (Fig. 61) teniendo una  $p < 0.05$  en la prueba de t de Student, por lo que estas diferencias son significativas. Es decir, aunque el fluorocromo de detección cambio con respecto a lo reportado en el punto anterior y con lo descrito Bautista-Tejeda en 2017 (quien utilizó FITC para la detección de eIF3f), el patrón de expresión se mantiene, por lo que los cambios en la detección de la expresión no son producidos por un efecto de intensidad de fluorescencia.



**Figura 61. Determinación de la expresión de eIF3f con AlexaFluor-647 en las fases del ciclo celular de linfocitos proliferativos. A)** Promedio de la media de la intensidad de fluorescencia de AlexaFluor-647 (equivalente a la expresión de eIF3f) en las fases del ciclo celular de linfocitos proliferativos. **B)** Expresión de eIF3f normalizada en relación a la expresión global en las fases del ciclo celular de linfocitos proliferativos.

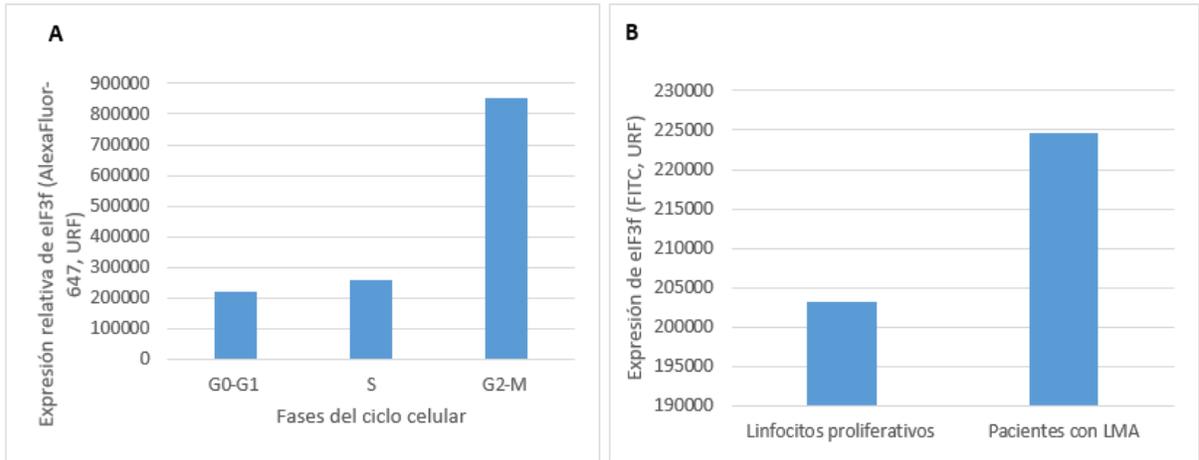
Para la evaluación de las muestras de MO se determinaron 3 subgrupos de estudio en base al diagnóstico:

**1.- Pacientes con diagnóstico confirmado de LLA-B:** Este subgrupo está conformado por una sola muestra. Al analizar la expresión de eIF3f observamos una expresión inicial en G0-G1 que aumenta en S y que tiene un máximo de expresión en G2-M (Fig. 62-A) y que debido a que solo es una muestra no se pudo determinar si estas diferencias son significativas. Al comparar la expresión de eIF3f de los linfocitos inducidos a proliferación con la muestra observamos un aparente aumento en la expresión de eIF3f en la muestra (Fig. 62-B)



**Figura 62. Detección de la expresión de eIF3f con AlexaFluor- 647 en muestras de MO de pacientes con LLA-B. A)** Expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular en muestras de MO de pacientes con LLA-B. **B)** Comparación de la expresión de eIF3f entre linfocitos proliferativos y las muestras de MO de pacientes con LLA-B. Se realizó un análisis de t de student en la que se obtuvo una  $p < 0.05$ .

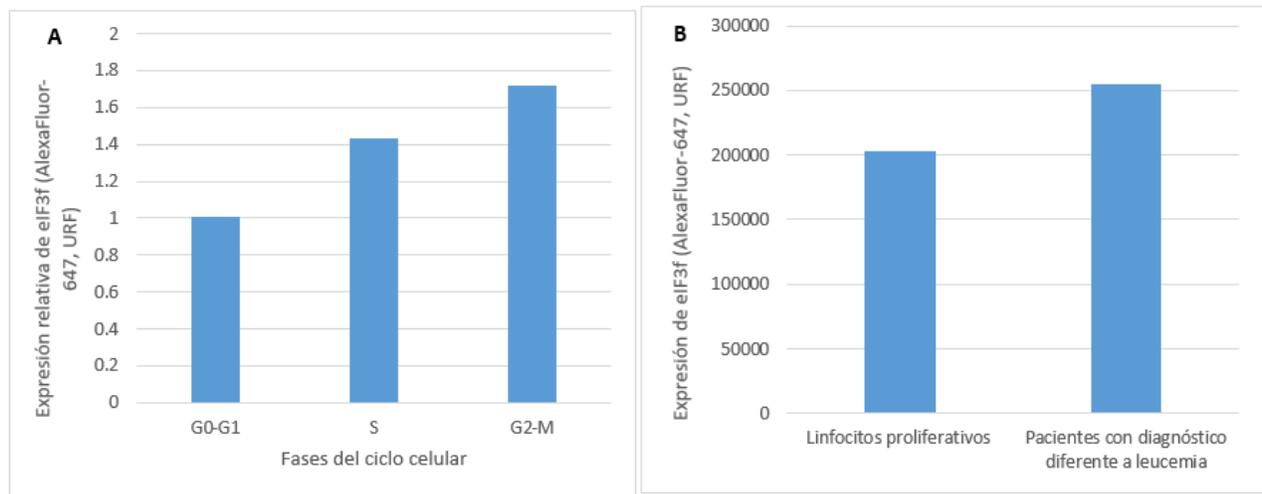
**2.- Pacientes con diagnóstico confirmado de LMA:** Este grupo está conformado por 3 muestras en las que podemos observar una expresión inicial de eIF3f en las fases G0-G1 con un aumento de la expresión la fase S y con un máximo en G2-M (Fig 63-A). Al comparar la expresión de eIF3f de linfocitos proliferativos con las muestras de MO de este subgrupo podemos apreciar un aparente aumento de la expresión de eIF3f en las muestras de MO (Fig. 63-B)



**Figura 63. Detección de la expresión de eIF3f con AlexaFluor- 647 en muestras de MO de pacientes con LMA. A)** Expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular en muestras de MO de pacientes con LMA. **B)** Comparación de la expresión de eIF3f entre linfocitos proliferativos y las muestras de MO de pacientes con LMA. Se realizó un análisis de t de student en la que se obtuvo una  $p < 0.05$ .

**3.- Pacientes con diagnóstico diferente a leucemia:** Finalmente tenemos el grupo de pacientes con diagnóstico diferente a leucemia conformado por 2 muestras pertenecientes a un paciente con diagnóstico de Linfoma de Hodgkin y a un paciente con diagnóstico de histiocitosis. En estas muestras también es posible apreciar el patrón de expresión de eIF3f teniendo el aumento de expresión en S y un máximo en G2-M (Fig. 64-A). Al comparar las muestras de este grupo con la expresión de eIF3f de linfocitos proliferativos ´podemos ver un aumento de la expresión de eIF3f en las muestras de MO (Fig. 64-B). Para analizar estas muestras debemos considerar que el aspirado de MO es de utilidad para la descripción de la morfología celular y se pueden describir situaciones de infiltración así como la descripción de la morfología celular en diferentes

afecciones hemáticas (Torres-Gómez, 1996). En el caso del paciente con Linfoma de Hodgkin se reporta en los estudios que tiene un cariotipo sin alteraciones numéricas o estructurales sin presencia de células Reed-Sternberg que de acuerdo a la definición del Instituto Nacional del Cáncer, son linfocitos grandes y anormales que pueden contener más de un núcleo presentes en el linfoma de Hodgkin, además de que no se reportó la presencia de blastos por lo que esta muestra se comporta como una muestra de MO sin células malignas. Para el caso de la muestra con diagnóstico de histiocitosis se reporta la presencia de células de aspecto histiocitario en una biopsia de hueso de cráneo y en la biopsia de MO se reporta que los blastos son menores al 2% además de que no se observó proliferación o infiltración neoplásica. Con estos datos se puede esperar que las muestras de este grupo se comporten de manera similar a una muestra de MO sin células neoplásicas y podemos ver que este subgrupo se comporta de manera similar a la muestra de leucopenia sin malignidad reportada por Bautista-Tejeda (2017).



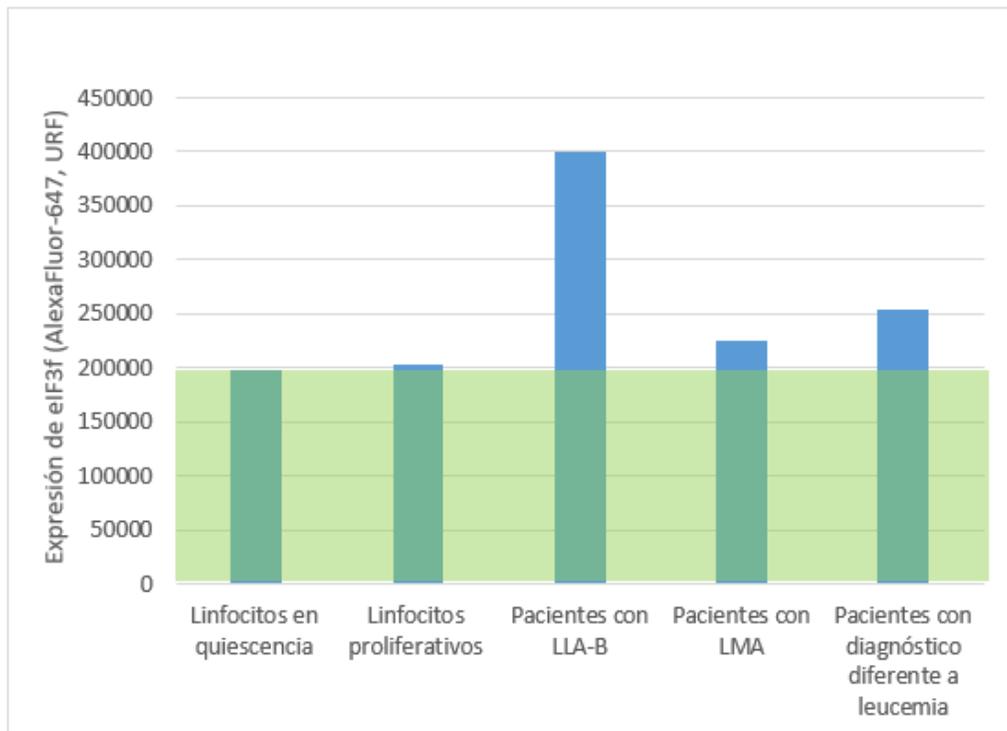
**Figura 64. Determinación de la expresión de eIF3f con AlexaFluor- 647 en muestras de MO de pacientes con diagnóstico diferente a leucemia. A)** Expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular en muestras de MO de pacientes con un diagnóstico diferente a leucemia. **B)** Comparación de la expresión de eIF3f entre linfocitos proliferativos y las muestras de MO de pacientes con un diagnóstico diferente a leucemia. Se realizó un análisis de t de student en la que se obtuvo una  $p < 0.05$ .

Al evaluar de manera conjunta a las muestras procesadas con AlexaFluor-647 observamos que el patrón de expresión se mantiene a pesar de que son muestras con diagnósticos diferentes y que, la expresión de eIF3f del grupo de estudio es mayor a la del grupo control; sin embargo es necesario tener en cuenta varios factores en la evaluación de este aumento de expresión ya que de acuerdo a lo reportado en la bibliografía y a lo observado en las muestras procesadas con FITC se esperaría una disminución en la expresión de eIF3f. También, es importante tomar en cuenta el porcentaje de células en G0-G1, S y G2-M ya que, como se puede observar en el análisis de la expresión de eIF3f en las diferentes fases del ciclo celular en los linfocitos proliferativos, las diferencias en las fluorescencias en las fases S y G2-M son mucho mayores, además de que G0 y G1 son indistinguibles utilizando DAPI por lo que al aumentar estas fases aumenta el valor de la media de la fluorescencia y, ya que es mucho mayor a la observada con FITC, puede parecer un aumento en la expresión de la proteína. Otro factor a considerar es que en el caso del análisis de los controles la diferencia de la expresión de eIF3f en linfocitos quiescentes vs linfocitos en proliferación es casi nula; esto puede ser debido a dos factores: 1) Debido a que los controles procesados con AlexaFluor-647 fueron las primeras muestras procesadas y la parte práctica en el cultivo pudo tener fallos, lo que puede interferir en la media global de detección con AlexaFluor-647, 2) Debido al aumento de células en las fases G1, S y sobre todo en la fase G2-M en las muestras de MO, la media global de fluorescencia de AlexaFluor-647 puede verse aumentada debido a que resultó ser un fluorocromo con una gran intensidad de fluorescencia por lo que la subestimación de las células proliferativas en este grupo afecta de manera directa los resultados.

Debido a lo observado en estas muestras se decidió trabajar con FITC (ya que Bautista-Tejeda trabajó con este fluorocromo sin complicaciones), pero es posible observar en estas muestras que el patrón de expresión de eIF3f se mantiene a pesar de la intensidad de fluorescencias de AlexaFluor-647, por lo que podemos decir que es una propiedad de la expresión de la proteína tal como se observa en el trabajo de Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) y no por un

efecto de la intensidad del fluorocromo empleado, que, a diferencia de la expresión en el ciclo celular, si influye en la expresión global dificultando el análisis en conjunto de los datos obtenidos con ambos fluorocromos.

A manera de resumen, en la figura 65 se puede observar la comparación de la expresión de eIF3f de linfocitos en quiescencia, linfocitos en proliferación y de los subgrupos analizados.



**Figura 65. Comparación de la expresión eIF3f en los controles y las muestras de MO analizadas con AlexaFluor-647.**

Al analizar los resultados de las muestras y controles procesados con FITC y AlexaFluor-647 podemos observar que la expresión de eIF3f concuerda con lo reportado por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván ya que presentan una expresión inicial en G0-G1 que aumenta en S y tiene un máximo de expresión en G2-M, sin importar de que muestra se trate, es decir que este patrón se presenta en las células proliferativamente activas. Este dato concuerda con lo descrito por Medina-García en 2016 quién al analizó la expresión de eIF3f en distintas líneas celulares (A549: Adenocarcinoma pulmonar, C33A: Carcinoma de cérvix, MC3T3-E1: Preosteoblastos murinos; CaLo: Carcinoma de cérvix, HepG2: Carcinoma de

Hígado, Caski: Carcinoma cervicouterino, Ramos: Linfoma de Burkitt, Raji: Linfoma de Burkitt), además de analizar la expresión de eIF3f en linfocitos inducidos a proliferación de humanos y de rata (es decir, de especies mamíferas distintas) encontrando una diferencia en la expresión de eIF3f en la fase G0/G1, S y G2/M significativa confirmando que en líneas celulares mamíferas, tumorales y no tumorales, la expresión de eIF3f es mayor en la fase G2/M, moderada en la fase S y baja en la fase G0/G1 y que la expresión de la proteína eIF3f es dependiente de la fase del ciclo celular, presentando un perfil de expresión bifásico en células de distinto origen embrionario por lo que se esperaría este comportamiento independientemente de la etiología y/o patologías.

En adición a lo anteriormente comentado, en todos los casos de análisis salvo en el subgrupo 3, del cual se han discutido las variables que pueden causar este aumento en la expresión incluyendo la escases de células neoplásicas en estas muestras, se observó una disminución de la expresión de eIF3f lo que concuerda por lo reportado por Bautista- Tejada en 2017.

La disminución de la expresión de eIF3f concuerda también con lo reportado por Doldan *et al.* 2008<sub>a</sub>, Doldan *et al.* 2008<sub>b</sub>, Li *et al.* 2014, Cheng *et al.* 2014, Cheng *et al.* 2015 quienes evaluaron la expresión de eIF3f en muestras de melanoma, cáncer pancreático y cáncer gástrico, respectivamente, vs el tejido adyacente (no neoplásico) reportando una disminución de la expresión de eIF3f en el tejido neoplásico vs el tejido adyacente; en todos estos estudios se utilizó la técnica de inmunohistoquímica.

Por otra parte, en el artículo de Doldan *et al.* del 2008<sub>a</sub> se buscaron mutaciones o translocaciones que pudieran verse implicados en una modificación de la proteína eIF3f y encontraron cambios de citosina por timina en 2 de los 8 exones sin que esto afectara a los aminoácidos o estructura de la proteína por lo que se descartó que éste fuera el motivo de la disminución de la expresión.

En otro estudio de en 2019 el grupo de Docquier *et al.* realizaron ensayos en ratones knockout heterocigotos en los que se reemplazó la secuencia de eIF3f de un alelo por medio de un casete de inserción. Para ver los efectos de la

invalidación de eIF3f inmovilizaron unilateralmente a los ratones homocigotos sin depleción (control) y a los heterocigotos (grupo de estudio). El grupo heterocigoto presentó una disminución de la expresión de eIF3f y al inmovilizar los animales presentaron atrofia muscular tras un periodo que no fue observado en el grupo control (es decir sin modificaciones en la síntesis de eIF3f total) , finalmente, no fue posible obtener individuos homocigotos con doble knockout ya que los embriones no sobrevivieron. En este estudio se demuestra que efectivamente, las células no soportan cambios en la expresión de eIF3f y, en los individuos heterocigotos la concentración de eIF3f disminuyó, lo cual tuvo consecuencias en la síntesis general de la proteína, teniendo como consecuencia la atrofia muscular. No se reportan casos de "wild type" con este tipo de deleciones, por lo que éstas son situaciones meramente experimentales y no explican la disminución de la expresión de eIF3f. Esta disminución global de se puede explicar al tener en cuenta el patrón descrito por Higareda-Mendoza y Pardo-Galván (2010) ya que al tener una cantidad menor de células proliferativas, el promedio u expresión global de eIF3f también será menor.

En el único caso en el cual se encuentra un aumento de la expresión de eIF3f en comparación a los controles es en el subgrupo 3 de ambos grupos con la peculiaridad de que en este subgrupo se encuentran las muestras con escasas o nulas células neoplásicas por lo que se comportan de manera parecida a una muestra control.

### **8.8 Determinación de la correlación de la expresión de eIF3f y los marcadores considerados de mal pronóstico para LLA-B**

Para el cumplimiento del objetivo número 3 se empleó un formato de recopilación de datos (Anexo 4); este formato se basó en el trabajo de Bautista-Tejeda ya que es un antecedente y base para el desarrollo de esta investigación. Para completar los datos del cuadro 8 de los factores pronóstico fue necesario realizar un expediente interno para cada paciente el cual contiene: el expediente clínico y un resumen de la evolución del paciente, los estudios compartidos por el Hospital

Infantil de los pacientes que no poseen aún un expediente clínico, los datos del análisis por citometría de flujo de la expresión de eIF3f y ciclo celular, los datos del análisis por citometría de flujo de la inmunotipificación, fotografías del frotis y la tinción Wright con el formato de la descripción de la morfología y el conteo celular anexo. Con estos datos se analizaron los grupos (muestras procesadas con FITC y con AlexaFluor-647) y los subgrupos (pacientes con diagnóstico de LLA, pacientes con diagnóstico de LMA, paciente con diagnóstico diferente a leucemia, paciente con sospecha de leucemia) y se realizó un análisis de correlación de Spearman. Se tomó el valor de 1 para el caso de un diagnóstico mayormente favorable y un valor de 0 para los casos con un diagnóstico mayormente desfavorable; para el análisis de correlación se utilizó la fórmula:

$$\rho = 1 - \frac{6 \sum d^2}{n(n^2 - 1)}$$

En donde  $\rho$ = valor de Rho (correspondiente al valor de la correlación) también llamado  $r$ ,  $6$ = constante,  $\sum d^2$ = suma de la diferencia de los rangos al cuadrado,  $n$ = número de datos. Con esta fórmula se puede determinar si existen correlaciones y dependiendo del resultado obtenido tenemos que:

**Si  $r = 1$** , Existe una correlación positiva perfecta con dependencia total

**Si  $r = 0 < r < 1$** , Existe una correlación positiva

**Si  $r = 0$** , No existe relación lineal

**Si  $r = -1 < r < 0$** , Existe una correlación negativa

**Si  $r = -1$** , Existe una correlación negativa perfecta

La regla de decisión dicta que si  $r$  obtenido es mayor o igual a  $r$  crítico se rechaza la hipótesis nula. Para determinar el valor crítico y, por lo tanto, si la correlación es significativa es necesario consultar una tabla de los valores críticos para el coeficiente de correlación de Spearman para los niveles de significancia en

pruebas de una o dos colas (Fig. 66), en el caso del presente estudio se tomó el valor para dos colas (Betanzos *et al.*, 2017).

### COEFICIENTE DE CORRELACIÓN $r_s$ DE SPEARMAN

Se presentan los valores críticos ( $r_{\text{crítico}}$ ) para el coeficiente de correlación  $r_s$  de Spearman.

Para un valor de  $N$  igual al número de sujetos. Cuando el número exacto de sujetos no se encuentra en la tabla use el valor inferior inmediato.

Nivel de significancia para prueba de una cola				
	0.05	0.025	0.01	0.005
Nivel de significancia para prueba de dos colas				
$N$	0.1	0.05	0.02	0.01
5	0.900	1.000	1.000	
6	0.829	0.886	0.943	1.000
7	0.714	0.786	0.893	0.929
8	0.643	0.738	0.833	,881
9	0.600	0.683	0.783	0.833
10	0.564	0.648	0.746	0.794
12	0.506	0.591	0.712	0.777
14	0.456	0.544	0.645	0.715
16	0.425	0.506	0.601	0.665
18	0.399	0.475	0.564	0.625
20	0.377	0.450	0.534	0.591
22	0.359	0.428	0.508	0.562
24	0.343	0.409	0.485	0.537
26	0.329	0.392	0.465	0.515
28	0.317	0.377	0.448	0.496
30	0.306	0.364	0.432	0.478

Fuente: tomada de Coolican (2004).

**Figura 66. Tabla de los valores críticos para el coeficiente de correlación de Spearman para los niveles de significancia en pruebas de una o dos colas. Obtenido y adaptado de Betanzos *et al.*, 2017**

Los resultados del análisis de correlación se describen a continuación de acuerdo al grupo (FITC, AlexaFluor-647) y a los subgrupos de acuerdo al diagnóstico.

### **8.8.1 Análisis de correlación Spearman de las muestras procesadas con FITC**

Al realizar el análisis grupal (sin distinción entre los diagnósticos) observamos que la disminución de la expresión de eIF3f posee una correlación negativa tanto con el índice proliferativo como con el pronóstico, sin embargo al analizar la significancia de los resultados observamos que éstos no son significantes teniendo valores de -0.08 para la correlación de la expresión de eIF3f con el pronóstico y -0.23 para la correlación de la expresión del índice proliferativo y, de acuerdo con el número de muestras (34), se consideran significativos valores fuera del rango de -0.34 a 0.34. Para muestras mayores de 30 es necesario un análisis de puntuación Z en el cual sigue sin tener un valor significativo por lo que se acepta la hipótesis nula. Ya que las muestras analizadas en esta determinación son muestras con diferentes diagnósticos es posible que se presenten interferencias en los análisis de los datos.

Al analizar las muestras en base al diagnóstico se observaron los siguientes resultados:

#### **Subgrupo 1 correspondiente a muestras de MO con diagnóstico de LLA-B:**

Este subgrupo conformado por 16 muestras observamos que la disminución de la expresión de eIF3f posee un valor de correlación de 0.005882353 con el pronóstico y de -0.294117647 con el índice proliferativo, ambos valores resultan no ser significativos ya que para una n de 16 de acuerdo a la tabla se esperarían valores fuera del rango de -0.665 a 0.665 por lo que se acepta la hipótesis nula y se determina que los valores no resultan ser significativos, es decir, no se

encontró una correlación entre la disminución de la expresión de eIF3f con el pronóstico ni con el índice proliferativo en este subgrupo.

**Subgrupo 2 correspondiente a muestras de MO con diagnóstico de LMA:**

Este subgrupo conformado por 7 muestras observamos que la disminución de la expresión de eIF3f posee un valor de correlación de 0.0625 con el pronóstico y de 0.214285714 con el índice proliferativo, ambos valores resultan no ser significativos ya que para una n de 7 de acuerdo a la tabla se esperarían valores fuera del rango de -0.929 a 0.929 por lo que se acepta la hipótesis nula y se determina que los valores no resultan ser significativos, es decir no se encontró una correlación entre la disminución de la expresión de eIF3f con el pronóstico ni con el índice proliferativo en este subgrupo.

**Subgrupo 3 correspondiente a muestras de MO con diagnóstico diferente a**

**leucemia:** Este subgrupo está conformado por 1 muestra, en este caso no fue posible realizar el análisis de correlación ya que el mínimo de muestras es de 5, sin embargo es posible decir que observamos un aumento en la expresión de eIF3f en esta muestra y que el diagnóstico para este paciente resultó ser mayormente desfavorable (en base a la suma de valores descritos en el cuadro de factores pronóstico).

**Subgrupo 4 correspondiente a muestras de MO con probable leucemia:**

Este subgrupo conformado por 10 muestras observamos que la disminución de la expresión de eIF3f posee un valor de correlación de -0.166666667 con el pronóstico y de -0.236363636 con el índice proliferativo, ambos valores resultan no ser significativos ya que para una n de 10 de acuerdo a la tabla se esperarían valores fuera del rango de -0.794 a 0.794 por lo que se acepta la hipótesis nula y se determina que los valores no resultan ser significativos, es decir no se encontró una correlación entre la disminución de la expresión de eIF3f con el pronóstico ni con el índice proliferativo en este subgrupo.

**8.8.2 Análisis de correlación Spearman de las muestras procesadas con AlexaFluor-647**

Al realizar el análisis grupal (sin distinción entre los diagnósticos) observamos que la disminución de la expresión de eIF3f posee una correlación de 0.5 con el pronóstico y de -0.25 con el índice proliferativo, sin embargo al analizar la significancia de los resultados observamos que éstos no son significativos ya que para 6 muestras se consideran significativos valores fuera del rango de -0.886 a 0.886 por lo que se acepta la hipótesis nula, es decir no se encontró una correlación entre la disminución de la expresión de eIF3f con el pronóstico ni con el índice proliferativo para este grupo. Ya que las muestras analizadas en esta determinación son muestras con diferentes diagnósticos es posible que se presenten interferencias en los análisis de los datos.

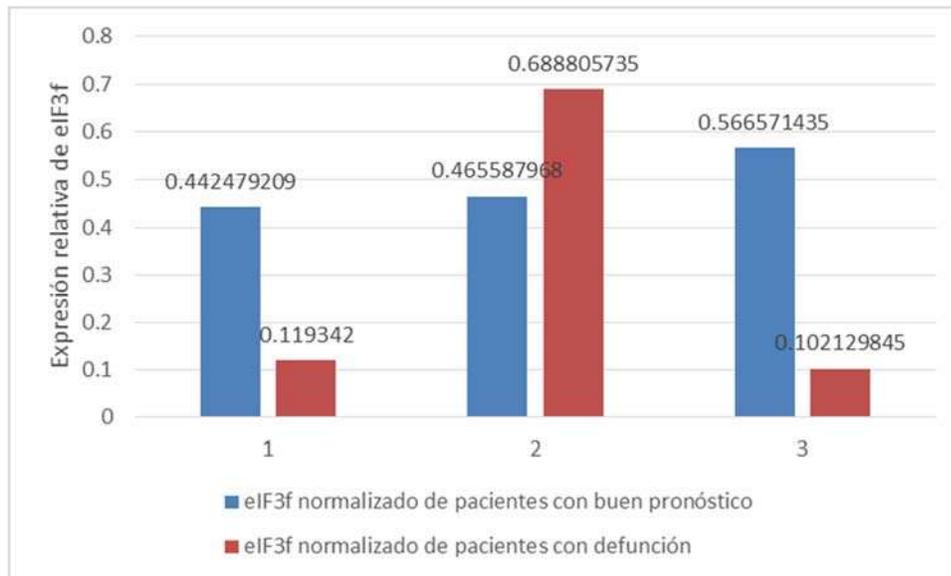
Dentro de este grupo tenemos al primer subgrupo de muestras de MO de pacientes con LLA-B con una muestra, el segundo grupo es de muestras de MO con diagnóstico de LMA y se tienen 3 muestras y en el tercer grupo correspondiente a las muestras de pacientes con un diagnóstico diferente a leucemia se tienen 2 muestras por lo que no fue posible analizar los datos por subgrupos ya que el mínimo de variables para este análisis es de 5.

Para el análisis de los datos obtenidos en los grupos y subgrupos es necesario aclarar que el porcentaje de células proliferativas puede verse subestimado ya que no fue posible distinguir entre las fases G0 y G1 por medio de la metodología empleada además de que los porcentajes de S y G2-M son en promedio menores al 10 y 5% en las muestras de MO, esto puede ser debido a dos factores: 1) Pérdida de células en estas fases, en específico durante la manipulación de las muestras, 2) Debido a la estrategia de selección poblacional.

Con el ARS se pudo optimizar el método para el procesamiento de muestras de origen hematopoyético evitando la pérdida celular pero, si consideramos el porcentaje de células proliferativas en comparación a las quiescentes podremos observar que en la mayoría de los casos son menores al 20%, por lo que esta población se puede ver afectada. Una posible solución a esta problemática sería aumentar el volumen de trabajo inicial teniendo un exceso de células que se ajustaría antes de la adición de los anticuerpos, el problema con

esta estrategia es que la cantidad de muestra puede ser insuficiente para pensar en un exceso inicial y debido a la complejidad de su obtención es impensable en solicitar una segunda muestra. Otra estrategia sería concentrar los volúmenes descartados de los lavados buscando coleccionar las células en estas fases que pudieran ser descartadas.

Aunque en el análisis de Spearman no se encontró un valor de correlación significativo en el grupo ni en ningún subgrupo podemos ver que si comparamos el valor normalizado de eIF3f con el promedio de la expresión global de eIF3f de los linfocitos inducidos a proliferación y lo comparamos con 3 casos de pacientes que han tenido una buena respuesta al tratamiento podemos ver que la disminución de eIF3f es mayor en los casos de defunción (Fig. 67).



**Figura 67. Comparación de la expresión relativa de eIF3f en muestras de MO de pacientes con una buena respuesta al tratamiento vs pacientes con defunción.** En las 6 muestras la determinación de la expresión de eIF3f se realizó con FITC.

Podemos ver que los valores de los pacientes con una buena respuesta al tratamiento son muy parecidos (barras en color azul) y que en los pacientes con defunción la expresión relativa es mucho menor (barras rojas) a excepción de uno de los casos, en este caso en particular el paciente tuvo un buen pronóstico de acuerdo a los factores tomados en cuenta en esta investigación.

Teniendo en cuenta que este trabajo se realizó con pacientes *de novo* y que muchos expedientes aún no están disponibles o están incompletos sería conveniente revisar los expedientes clínicos de los pacientes que participaron en el presente proyecto en un futuro para tener una mejor interpretación de los resultados obtenidos ya que se podrían obtener más datos acerca de la evolución de los pacientes y así saber con certeza el papel de eIF3f como factor pronóstico.

## 9. CONCLUSIONES

La expresión de eIF3f oscila en el ciclo celular independientemente de la patología hemática, presentando un aumento de expresión en la fase S y con un máximo de expresión en la fase G2-M, coincidiendo con el estudio de la expresión de eIF3f en diferentes líneas celulares humanas y en linfocitos cultivados de rata, lo que permite proponer que el perfil de expresión de eIF3f está conservado y que su expresión global depende de la actividad proliferativa celular.

## 10. REFERENCIAS

- Abbas A., Lichtman A., Pillai S. (2015). Inmunología celular y molecular. 8ª ed. Elsevier, Barcelona, España. 239-288 pp.
- Agarwal, A., Fleischman, A. G., Petersen, C. L., MacKenzie, R., Luty, S., Loriaux, M., Deininger, M. W. (2012). Effects of plerixafor in combination with BCR-ABL kinase inhibition in a murine model of CML. *Blood*, 120(13), 2658-2668
- Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology. URL <http://AtlasGeneticsOncology.org>, recuperado el 29 de julio de 2019
- Alberts B., Bray D., Hopkin K., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2006). Intriducción a la Biología Celular, segunda edición. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. p. 612-625.
- Bautista-Tejeda AA. (2017). Perfil de expresión del gen eIF3f en linfocitos humanos. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 68 pp.
- Betanzos, F. G., & López, J. K. C. (2017). Estadística aplicada en Psicología y Ciencias de la salud. Manual Moderno.
- Bolaños-Cornejo D. A. (2009). Búsqueda de elementos de represión génica en el promotor f humano. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Biólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Burke J. R., Deshong A. J., Pelton J. G., Rubin S. M. (2010). Phosphorylation-induced conformational changes in the retinoblastoma protein inhibit E2F transactivation domain binding. *Journal of Biological Chemistry*, 285(21), 16286-16293.
- Bossuyt X., Marti, G. E., Fleisher, T. A. (1997). Comparative analysis of whole blood lysis methods for flow cytometry. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 30(3), 124-133.
- Control de cáncer Aplicación de los conocimientos, Guía de la OMS para desarrollar programas eficaces, 2017. Recuperado el 10 de diciembre, 2018 de [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44005/9789243547404\\_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44005/9789243547404_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y&ua=1)

- Cooper, S. (1998). Mammalian cells are not synchronized in G1-phase by starvation or inhibition: considerations of the fundamental concept of G1-phase synchronization. *Cell proliferation*, 31(1), 9-16.
- Buchner M., Swaminathan S., Chen Z., Müschen M. (2015). Mechanisms of pre-B-cell receptor checkpoint control and its oncogenic subversion in acute lymphoblastic leukemia. *Immunological Reviews*, 263(1), 192-209.
- Cheng Y., Jia C., Li G., Li H. (2014). Expression of eukaryotic initiation factor 3f is associated with prognosis in gastric carcinomas. *Oncology Research and Treatment*, 37(4), 198-202.
- Cheng Y., Zhou J., Li H. (2015). Clinicopathologic Implications of Eukaryotic Initiation Factor 3f and Her-2/neu Expression in Gastric Cancer. *Clinical and translational science*, 8(4), 320-325.
- Cuesta R., Gupta M., Schneider R. (2009). The regulation of protein synthesis in cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 90, 255-292.
- Instituto Mexicano del Seguro Social. (2018). Diagnóstico y Tratamiento Leucemia Linfoblástica Aguda en el Adulto. Guía de Referencia Rápida Guía de Práctica Clínica. México. Consultado el 5 de octubre de 2018.
- De la Fuente Burguera A. (2017). Leucemia Linfoblástica Aguda GUIA PARA PACIENTES Y FAMILIARES. GEPAC/AEAL primera edición. p20-38.
- Drach J., Gatttringer C., Glassl H., Schwarting R., Stein H., Huber H. (1989). Simultaneous flow cytometric analysis of surface markers and nuclear Ki-67 antigen in leukemia and lymphoma. *Cytometry: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 10(6), 743-749.
- Docquier A., Pavlin L., Raibon A., Bertrand-Gaday C., Sar C., Leibovitch S., Bernardi H. (2019). eIF3f depletion impedes mouse embryonic development, reduces adult skeletal muscle mass and amplifies muscle loss during disuse. *The Journal of physiology*, 597(12), 3107-3131.
- Doldan A., Chandramouli A., Shanas R., Bhattacharyya A., Leong S., Nelson M., Shi, J. (2008a). Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in melanoma. *Molecular Carcinogenesis*, 47(10), 806-813.

- Doldan A., Chandramouli A., Shanas R., Bhattacharyya A., Cunningham J. T., Nelson M. A., Shi J. (2008b). Loss of the eukaryotic initiation factor 3f in pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis*, 47(3), 235-244.
- Emadi, A. y Karp, J. E. (Eds.). (2017). *Acute Leukemia: An Illustrated Guide to Diagnosis and Treatment*. Springer Publishing Company.p 29
- Fainboim L., Geffner J. (2005). *Introducción a la inmunología humana*. 5ª ed. Médica Panamericana, Madrid, España. P. 229-231
- Ferrero-Díaz S. (2010) *Morfología: de la FAB a la OMS*. Recuperado el 23 de junio, 2018 de <http://www.aghh.es/images/cursohemsastre/fab%20-oms.pdf>
- F. Lacombe, C. Arnoulet, F. Durrieu, J. Feuillard, C. Fossat, B. Husson, H. Jouault, M. Maynadié, M.C. Béné (2008). *Flow Cytometry Atlas*. Recuperado el 02/05/2020 de [https://www.leukemia-net.org/content/diagnostics/diagnostics/flow\\_cytometry\\_atlas/index\\_eng.htm](https://www.leukemia-net.org/content/diagnostics/diagnostics/flow_cytometry_atlas/index_eng.htm)
- Galvin A., Weglarz M., Folz-Donahue K., Handley M., Baum M., Mazzola M., Silberstein L (2019). Cell Cycle Analysis of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells by Multicolor Flow Cytometry. *Current protocols in cytometry*, 87(1), e50.
- Gómez-Correa C. A (2013). *Análisis de fosforilación en EIF3f humano por CDK1/CiclinaB*. Tesis de Maestría en ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Gookin S., Min M., Phadke H., Chung M., Moser J., Miller I., Spencer S. (2017). A map of protein dynamics during cell-cycle progression and cell-cycle exit. *PLoS biology*, 15(9), e2003268.
- Herráez A. (2012). *Texto ilustrado e interactivo de biología molecular e ingeniería genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud*. 2ª ed. Elsevier, Barcelona, España. P. 275-283
- Hernández-Soto P. (2005). *Análisis estructural del gen y la proteína psif en eucariotes superiores*. Tesis de licenciatura para obtener el grado de Biólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

- Higareda-Mendoza A.E., Pardo-Galván M.A. (2010). Expression of human eukaryotic initiation factor 3f oscillates with cell cycle in A549 cells and is essential for cell viability. *Cell Division*, 5, 10. <http://doi.org/10.1186/1747-1028-5-10>.
- Hoffman R., Benz E., Shattil S., Furie B., Silberstein L., McGlave P., Heslop H. (2009). *Hematology: Basic Principles and Practice*. Elsevier, Churchill Livingstone, Barcelona, España. P. 105-116.
- Hurtado-Monrroy R., Solano-Estrada B., Vargas-Viveros P. (2012). Leucemia para el médico general. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 55(2), 11-25.
- Jaroslav P., Martina H., Hana K., Petr S., Tomáš K., Julius M., Cedrik H. (2005). Expression of cyclins D1, D2 and D3 and Ki-67 in human leukemia. *Leukemia & lymphoma*, 46(11), 1605-1612.
- Joyce N. C., Meklir B., Joyce S. J., Zieske J. D. (1996). Cell cycle protein expression and proliferative status in human corneal cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 37(4), 645-655.
- Kastan, M. B., & Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 432(7015), 316-323
- Lees J. A., Buchkovich K. J., Marshak D. R., Anderson C. W., Harlow E. (1991). The retinoblastoma protein is phosphorylated on multiple sites by human cdc2. *The EMBO journal*, 10(13), 4279-4290.
- Li G., Wang N., Sun C., Li B. (2014). Decreased expression of eukaryotic initiation factor 3f is an adverse prognostic factor for stage I–III gastric cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 12(1), 72.
- Madrigal-Vargas G. (2003). *Manual de diagnóstico y terapéutica en pediatría*. 1ª ed. Editorial Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. P 1, 85-96, 115-128.
- Manual para la toma, envío y recepción de muestras para diagnóstico” versión no. 01.INDRE, 2015. Recuperado el 20 de Abril de 2020 de [http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/documentos/manual\\_para\\_la\\_toma\\_envio\\_y\\_recepcion\\_de\\_muestras.pdf](http://www.censida.salud.gob.mx/descargas/biblioteca/documentos/manual_para_la_toma_envio_y_recepcion_de_muestras.pdf)

- Medina-García DL. (2016). Perfil de expresión de la proteína eIF3f en cultivos celulares de eucariotas superiores por citometría de flujo. Tesis de grado para la obtención del título de Químico Farmacobiólogo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 50 pp.
- McKenzie S.B. (2000). Hematología clínica. 2ª ed. El Manual Moderno, CDMX, México. P.23, 429-478.
- Medina-Medina E.A. (2010). Determinación de perfiles inmunofenotípicos por citometría de flujo de Leucemia Linfoblástica Aguda en niños y su valor en la detección de enfermedad mínima residual. Tesis de Especialidad en Patología Anatómica y Clínica. Universidad Nacional de Colombia. 115 pp.
- Mendoza-Pineda A. (2008). Producción y efecto de RNAi sobre eIF3f de células tumorales humanas. Tesis de Maestría en Farmacología Básica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- National Cancer Institute. (s.f.). Recuperado de: <https://www.cancer.gov/types/leukemia/hp/child-all-treatment-pdq>
- Núñez-Enríquez, J. C. y Aranguré, J. M. M. (2015). Biología molecular y leucemia: E2A-PBX1 y recaída al sistema nervioso central. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 53(3), S236-S239.
- O'Hare, T., Deininger, M. W., Eide, C. A., Clackson, T., & Druker, B. J. (2011). Targeting the BCR-ABL signaling pathway in therapy-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemia. Clinical Cancer Research, 17(2), 212-221.
- Poon, R. Y. (2016). Cell Cycle Control: A System of Interlinking Oscillators. Cell Cycle Oscillators: Methods and Protocols, 3-19.
- Passarge E. (2007). Genética Texto y Atlas, tercera edición. Madrid, España. Editorial Médica Panamericana. p. 124-128.
- Pavón-Morán V., Hernández-Ramírez P., Jaime-Fagundo J. C., Agramonte-Llanes O. (2005). Imatinib en leucemia mieloide crónica. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia, 21(3), 0-0.
- Peralta-Zaragoza O., Bahena-Román M., Díaz-Benítez C., Madrid-Marina V. (1997). Regulación del ciclo celular y desarrollo de cáncer: perspectivas terapéuticas. Salud Pública de México, 39, 451-462.

- Pérez, V. (2004). Leucemia linfoblástica aguda y alta hiperdiploidía en pediatría. *Medwave*, 4(03).
- Pui C., Behm F., Crist W. (1993). Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 82(2), 343-362.
- Querol-Audi J., Sun C., Vogan J., Smith M., Gu Y., Cate J., Nogales E. (2013). Architecture of human translation initiation factor 3. *Structure*, 21(6), 920-928.
- Rhind N., Russell P. (2012). Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(10), a005942.
- Rivera-Luna R., Cárdenas-Cardos R., Olaya-Vargas A., Shalkow-Klincovstein J., Pérez-García M., Pérez-González O.A., Díaz-Jiménez V., Amador-Zarco J.J., Melchor-Vidal Y. (2015). El niño de población abierta con cáncer en México: consideraciones epidemiológicas. *Anales Médicos*, 60(2), 91-97.
- Rodak B. (2005). *Hematología: Fundamentos y aplicaciones clínicas*. 2ª ed. Médica Panamericana, Madrid, España. P. 65-82.
- Ruiz-Argüelles A., Pérez-Romano B. (2010). La necesidad de las recomendaciones de consenso para la inmunotipificación de las hemopatías malignas. *Revista de Hematología*, 11(2), 82-90.
- Sánchez-Ortega M., Osnaya-Ortega M., Rosas-Barrientos J. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 23(1), 26-33.
- Silva-Cruz, R., Bobadilla-Morales, L., Corona-Rivera, J. R., & CORONA-RIVERA, A. L. F. R. E. D. O. (2016). Impacto del gen de fusión ETV6/RUNX1 en leucemia linfoblástica aguda pediátrica. *Revista Venezolana de Oncología*, 28(4), 261-271.
- Schmitz N. M., Leibundgut K., Hirt, A. (2001). Phosphorylation of the retinoblastoma protein in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 6(1), 29-39.
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*, 182(3), 311-322.

- Secretaría de Salud. (2009). GPC de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México. Recuperado el 23 de junio, 2018 de <https://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>.
- Secretaría de Salud. (2015). Cáncer Infantil en México. Recuperado el 23 de junio, 2018 de <https://www.gob.mx/salud/articulos/cancer-infantil-en-mexico>.
- Seguro Popular. (2005). Protocolo de la Atención para Leucemia Linfoblástica: Guía clínica y esquema de tratamiento. Recuperado el 23 de junio, 2018 de <http://www.salud.gob.mx/unidades/dgpfs/micsitio/ptcia/recursos/LEUCEMIA.pdf>
- Shalkow J. (2017). Cáncer infantil en México: Situación Actual y Retos. Recuperado el 23 de junio, 2018 de <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/Cancer-infantil-en-MEXICO.pdf>.
- Soporte técnico de Minitab. (2019). Recuperado el 23 de julio, 2019 de <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/18/getting-started/designing-an-experiment/>.
- Spoerri, L., Oo, Z. Y., Larsen, J. E., Haass, N. K., Gabrielli, B., & Pavey, S. (2015). Cell Cycle Checkpoint and DNA Damage Response Defects as Anticancer Targets: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. In Stress Response Pathways in Cancer (pp. 29-49). Springer Netherlands.
- Sun, C., Chang, L., & Zhu, X. (2017). Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*, 8(21), 35445.
- Takimoto C. H., Calvo E. (2019). Principles of oncologic pharmacotherapy. *Oncology*, 33(6), 1-16.
- Tenorio-Martinez KJ. (2018). Perfil de interacción del receptor adrenérgico alfa 1B con eIF3f durante el ciclo celular de células humanas A549. Tesis de Maestría en Ciencias de la Salud. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. 65 pp
- Tirado, C. A., Shabsovich, D., Yeh, L., Pullarkat, S. T., Yang, L., Kallen, M., Rao, N. (2015). A (1; 19) translocation involving TCF3-PBX1 fusion within the

- context of a hyperdiploid karyotype in adult B-ALL: a case report and review of the literature. *Biomarker research*, 3(1), 4.
- Valdespino-Gomez, V.M., Valdespino-Castillo, P.M., Valdespino-Castillo, V.E. (2015) Interacción de las vías de señalización intracelulares participantes en la proliferación celular: potencial blanco de intervencionismo terapéutico. *Cirugía y Cirujanos*, 83(2), 165-174.
- Vermeulen K., Van Bockstaele D. R., Berneman Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*, 36(3), 131-149.
- Welsch U.S. (2008). *Histología*. 2ª ed. Médica Panamericana, Madrid, España. P. 224-233.
- Wu J., Zhang W., Ran Q., Xiang Y., Zhong J. F., Li S. C., Li, Z. (2018). The differentiation balance of bone marrow mesenchymal stem cells is crucial to hematopoiesis. *Stem cells international*, 2018:1540148.

## ANEXOS

### Anexo 1. Carta de aprobación del Hospital Infantil de Morelia “Eva Sámano de López Mateos”.



Gobierno del Estado  
de Michoacán de Ocampo

## SECRETARÍA DE SALUD DE MICHOACÁN HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA “EVA SÁMANO DE LÓPEZ MATEOS” MEMORANDUM No. EEI/EPR/058/2019

Morelia Michoacán, 20 marzo 2019

QFB. JÉSSICA ANETH VERGARA HERNÁNDEZ  
PRESENTE

Me permito informar a usted que el protocolo de investigación titulado: ***“Utilidad de la proteína eIF3f, como marcador de proliferación linfoblástica y mal pronóstico en niños con LLA, atendidos en el Hospital infantil de Morelia de marzo 2019 a febrero 2020”*** ha sido aprobado por el Comité de Ética en Investigación de este Hospital con ***número de registro: HIM/OP/12/2019.***

Le recordamos que deberá enviar a este Comité informe de avance e informe final de acuerdo al desarrollo del cronograma de esta investigación.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo

Atentamente

Dr. José Luis Martínez Toledo  
Presidente del Comité de Ética en Investigación



JEFATURA DE ENSEÑANZA  
E INVESTIGACIÓN

“El contenido del presente documento es responsabilidad directa del titular del Área Administrativa que lo genera, en apego a sus atribuciones”

**Anexo 2. Carta de aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.**



**Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas  
"Dr. Ignacio Chávez"**

SECRETARÍA ACADÉMICA  
No. de Oficio: 1109

A S U N T O: ENVÍO DICTAMEN

Morelia, Mich., a 31 de Mayo de 2019.

**C. Q.F.B. JESSICA ANETH VERGARA HERNÁNDEZ  
P R E S E N T E .**

Por este conducto me permito remitir a Usted, copia del **DICTAMEN DE APROBACIÓN** enviado a esta Secretaría Académica a mi cargo por parte del Comité de Ética en Investigación de esta Facultad en relación a la solicitud de autorización del Proyecto de Investigación titulado **"UTILIDAD DE LA PROTEÍNA e1F3f COMO MARCADOR DE PROLIFERACIÓN LINFOBLÁSTICA Y MAL PRONÓSTICO EN NIÑOS CON LLA, ATENDIDOS EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA, DE MARZO 2019 A FEBRERO 2020"** que presenta dentro del Programa de Maestrías dentro de la Facultad, con la finalidad de obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.

Sin más por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**A T E N T A M E N T E :**

**M.C.L. MARIO MIGUEL ÁNGEL HERRERA CHAVRES**  
SECRETARIO ACADÉMICO



FACULTAD DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y BIOLÓGICAS  
"DR. IGNACIO CHÁVEZ"  
SECRETARÍA ACADÉMICA

C.c.p. Departamento de Archivo y Correspondencia de la Facultad.  
C.c.p. Archivo de la Secretaría Académica.

MCL.MMAHC/msgm\*

### Anexo 3. Carta de consentimiento informado para pacientes del Hospital Infantil de Morelia.



#### HOSPITAL INFANTIL DE MORELIA “EVA SÁMANO DE LÓPEZ MATEOS” CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA EN PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Morelia, Mich., a \_\_\_\_ del mes de \_\_\_\_\_ del año \_\_\_\_\_.

Autorizo que mi hijo(a) \_\_\_\_\_ participe en el protocolo de investigación titulado:

#### **“eIF3f como posible marcador pronóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)”**

Estoy enterado y de acuerdo en que se obtendrán los remanentes de las muestras que hayan sido utilizadas para los fines con los que se solicitaron (muestra de sangre periférica y de médula ósea) teniendo en cuenta que el médico especialista será quien realice la toma de muestra de médula ósea y el personal del laboratorio clínico en el caso de la muestra sanguínea con los siguientes riesgos relacionados: infección, hemorragia y dolor en el sitio de punción siendo el estudio de riesgo mínimo de acuerdo al artículo 17 del reglamento de la ley general de salud. El estudio de estas muestras permitirá ampliar los conocimientos respecto a las diversas alteraciones que se pueden presentar en patologías oncológicas y se mantendrá comunicación constante con el personal del hospital infantil proporcionando información que pueda ser de apoyo para la orientación al tratamiento. Así mismo, se me ha explicado que la participación en este estudio no pone en riesgo la salud de mi hijo, ni condiciona la atención dentro del Hospital.

Se me ha informado que puedo retirar a mi hijo del protocolo en cualquier momento que considere conveniente, sin que ello afecte la atención recibida en el Hospital; también, que la identidad de mi hijo quedará protegida, por lo que sus datos serán utilizados únicamente en la investigación en la que apruebo su participación.

Firmo la presente carta de consentimiento bajo la información voluntaria y estando enterado ampliamente de los beneficios y riesgos del acto autorizado.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del familiar o tutor legalmente responsable

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de investigador responsable  
Dr. Misael Herrejón Carmona  
Hospital Infantil de Morelia

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de investigador responsable  
Dr. Ana Edith Higareda Mendoza  
FCMB-UMSNH

#### Anexo 4. Formato de recopilación de datos

**Nombre:**

**Número de expediente:**

**Fecha:**

**Número de muestra:**

	Datos del paciente
Edad	
Número de leucocitos por $\mu\text{l}$	
Inmunofenotipo	
Clasificación morfológica (FAB)	
Translocaciones cromosómicas	

#### Conteo diferencial

Tipo celular	Conteo con barras	Totales/Procentaje	Valores absolutos
Blastos			
Neutrófilos totales			
Banda			
Segmentados			
Linfocitos			
Basófilo			
Eosinófilo			
Monocitos			
Totales			

<b>Descripción morfológica de los eritrocitos</b>	
---------------------------------------------------	--

**Observaciones y comentarios:**