

Tesis de Maestría

Cuantificación de la expresión del gen WT1 en leucemia mieloide crónica y su utilidad como marcador biológico de progresión tumoral

Álvarez Martínez, Claudio Lucas

2008

Tesis presentada para obtener el grado de Magíster de la
Universidad de Buenos Aires en Biología Molecular Médica
de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the Master's and Doctoral Theses Collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Álvarez Martínez, Claudio Lucas. (2008). Cuantificación de la expresión del gen WT1 en leucemia mieloide crónica y su utilidad como marcador biológico de progresión tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4734_AlvarezMartinez

Cita tipo Chicago:

Álvarez Martínez, Claudio Lucas. "Cuantificación de la expresión del gen WT1 en leucemia mieloide crónica y su utilidad como marcador biológico de progresión tumoral". Tesis de Magíster. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.
http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n4734_AlvarezMartinez

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Cuantificación de la expresión del gen WT1
en leucemia mieloide crónica y su utilidad
como marcador biológico de progresión tumoral**

Bioq. Claudio Lucas Álvarez Martínez

87998

Directora: Dra. Irene B. Larripa

Co-Director: Dr. Michele Bianchini

Academia Nacional de Medicina
Instituto de Investigaciones Hematológicas - Departamento de Genética.

Tesis
Magíster en Biología Molecular Médica de la UBA.
2008

Agradecimientos:

- *Principalmente le agradezco a la Dra. Irene B. Larripa, persona admirable, por su humildad profesional, quien me ha ofrecido la oportunidad para desarrollar la Tesis en su laboratorio, brindándome su apoyo y experiencia, por su dedicación durante estos años orientándome en este estudio durante muchas horas de su tiempo.*
- *Al Dr. Michele Bianchini, por quien tengo un gran aprecio, por su disposición para enseñarme los detalles de cada metodología de trabajo que he aplicado en este estudio, transmitiéndome sus conocimientos y experiencia.*
- *A los compañeros del Dpto. de Genética: Carlos, Carolina, Fernanda y Mabel por los momentos compartidos dentro del laboratorio. A los profesores del Instituto Leloir: Dr. Jose Mordoh, Dra. Rosa Wainstok, Dra. Marcela Barrios, juntamente con Estrella y Erika, quienes me han dado las herramientas necesarias para el aprendizaje teórico de esta Maestría.*
- *A mi esposa Mirta y mis hijos, Pablo, Camila y Agustina, por el amor y la sabiduría que me muestran cada día.*
- *A mi madre, que ha luchado por hacer de mi un hombre de bien, acompañándome siempre en cada paso de la vida.*

Claudio

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del gen WT1 y su producto génico	6
1.2 Función del WT1 y su interacción con otros genes	10
1.3 Mutaciones asociadas al gen WT1	12
1.4 Leucemia Mieloide Crónica – Etiología de la enfermedad	13
1.4.1. Inhibidores de Tirosin Kinasa usados en la terapéutica de LMC	15
1.5 Expresión de WT1 en hematopoyesis normal	16
1.6 Implicancia de WT1 en Leucemia	17
1.7 WT1 como supresor tumoral u oncogen en leucemias	18
1.8 Estudios moleculares de WT1 en Leucemias	19
1.9 Técnicas de monitoreo de la respuesta al tratamiento en LMC	20
1.10 Determinación de la respuesta molecular en LMC	26

2. OBJETIVO DEL TRABAJO 28

3. MATERIALES Y METODOS 30

3.1 Técnicas experimentales con líneas celulares y material celular obtenido de pacientes con LMC	31
3.1.1 Línea K-562	31
3.1.2 Características de la población elegida	31
3.1.3 Procesamiento de las células	32
3.2 Metodología empleada para ARN	33
3.2.1 Extracción de ARN celular total	33
3.2.2 Cuantificación espectrofotométrica del ARN	33
3.2.3 Electroforesis de ARN en geles de agarosa	34
3.3 Reacción de retrotranscripción inversa (RT-PCR)	34
3.3.1 Programa de RT-PCR	35

3.4 Amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa con cuantificación en tiempo real (qRT-PCR)	35
4. RESULTADOS	39
4.1 Curvas de Calibración de los primers y eficiencia de amplificación	40
4.2 Curvas de desnaturalización (curvas de melting)	42
4.3 Cuantificación relativa (WT1/ABL) de las muestras y controles	45
4.4 Correlación de WT1/ABL con otras características clínicas	47
5. DISCUSIÓN:	50
6. CONCLUSIONES:	55
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	56

Abreviaturas por orden de aparición:

WT1:	Gen Tumor de Wilms
WT :	tumor de Wilms
LMC:	Leucemia Mieloide Crónica
Ph'	Cromosoma Philadelphia
LLA:	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA:	Leucemia Mieloide Aguda
qRT-PCR:	Reacción en cadena de la Polimerasa- Transcriptasa Inversa-Real Time cuantitativa.
SMD:	Síndrome Mielodisplásico
PKA, PKC	Proteín Kinasas A , Proteín Kinasas C
MO	Médula ósea
FISH	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
RT-PCR	Reverse Trasncription Polimerase Chain Reaction
EGR1	Early Growth Response 1
WAGR	Tumor de Wilms con anormalidades genitourinarias, aniridia, y retardo mental.
DDS	Síndrome de Denys-Drash
Cp	Crossing point
Csp	Cantidad suficiente para
EMR	Enfermedad Mínima Residual
DS	Desvio estandar
ITK	Inhibidores de Tirosin Kinasa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Descripción del gen WT1 y su producto génico:

El gen Wilms Tumor (WT1), fue clonado por primera vez 1990 siendo el candidato en neoplasia renal en niños denominada tumor de Wilms (WT) ó nefroblastoma, es un tumor maligno que se origina en las células del riñon que afectan aproximadamente a 1 de cada 10.000 niños (Call KM,1990).

La función normal del WT1 es necesaria para el desarrollo genitourinario siendo importante durante la embriogénesis en la diferenciación del blastema renal, en etapas tempranas del crecimiento, desarrollo y diferenciación sexual. En tejidos adultos la expresión de WT1 se encuentra además, en el sistema nervioso central, testículo, ovario, miometrio, células estromales del útero, órganos viscerales, estroma de soporte, cápsula esplénica del riñón, y en tejidos hematopoyéticos, incluidos la médula ósea y nódulos linfáticos (Pritchard –Jones 1990).

WT1, fue inicialmente caracterizado como supresor tumoral, donde las mutaciones en este gen por inactivación bialélica llevan a la pérdida de su función como supresor. En general estas mutaciones se producen luego del nacimiento, sin embargo, en ciertos casos los niños nacen con una alteración genética que los predispone a desarrollar cáncer (Gessler,M 1990).

Estas mutaciones se asocian con síndromes relacionados, tales como el síndrome de WAGR (tumor de Wilms con Aniridia, anomalías Genitourinarias, y Retardo mental), Síndrome de Denys-Drash (DDS), nefroblastoma en niños, Síndrome de Frasier, algunos mesoteliomas y tumores de células granulomatosas (Call KM 1990, Akasaka Y,1993)).

El gen está localizado en el cromosoma 11p13 con una unidad transcripcional compuesta por 10 exones, el cual a través de un complejo *splicing* alternativo forma un RNA mensajero de aproximadamente 3 kb que se traduce a diferentes isoformas proteicas, cada una de ellas con diferentes propiedades biológicas (Figura 1.1) (Call KM,1990).

En su extremo carboxilo terminal se encuentra el dominio de unión a DNA formado por cuatro *zinc finger*, codificados por los exones 7-10. Los *zinc finger* número 2 y 4 presentan alta homología en su secuencia de aminoácidos con los presentes en el factor de transcripción *Early Growth Response 1* (EGR1). En su extremo amino terminal se localizan un dominio de activación rico en prolina y glutamina, involucrado en la interacción con RNAs y proteínas que es capaz de regular la transcripción, un dominio de dimerización y un dominio de represión (Figura 1.1) (Gessler M 1992).

Aunque varias modificaciones transcripcionales pueden ocurrir, hay dos *splicing* alternativos predominantes: uno en el exon 5, que lleva a la eliminación de 17 aminoácidos entre el dominio de transactivación y el dominio de unión al DNA. El

segundo *splicing* alternativo ocurre entre los exónes 9 y 10 eliminando una corta secuencia de tres aminoácidos, (lisina, treonina y serina) denominado KTS en el 3' final del exón 9 (Dallos AR, 2004). La presencia de estos tres aminoácidos KTS altera el espacio existente entre el tercero y cuarto dedo del dominio, ampliando la gama de genes que pueden ser activados o reprimidos por su unión a la secuencia consenso de los promotores, dependiendo del tipo de célula (Figura 1.1 y 1.2) (Nakagama H 1995; Wang ZY 1995).

Los dos *splicing* alternativos en los sitios mencionados anteriormente pueden formar cuatro isoformas diferentes de proteínas designadas A, B, C y D o (-/-), (+/-), (-/+) y (+/+), representando la presencia o ausencia del exón 5 y secuencia KTS, respectivamente. En general la isoforma KTS (+) está asociada con procesos de maduración del RNAm, mientras que la isoforma KTS (-) está asociada al proceso de transcripción (Figura 1.1 y 1.2) (Rauscher FJ, 1993).

Bajo condiciones fisiológicas normales la relación de las isoformas KTS(+) / KTS(-) es mantenida en una proporción aproximada de 2:1. Además existe una variante de *splicing* con N- terminal truncado llamada AWT1. A esta se llega como resultado de la transcripción con un promotor dentro del intrón (1a). La isoforma AWT1 difiere de la WT1 en que la primera carece de los primeros 147 amino ácidos que contienen el dominio de represión (Hossain A, 2006).

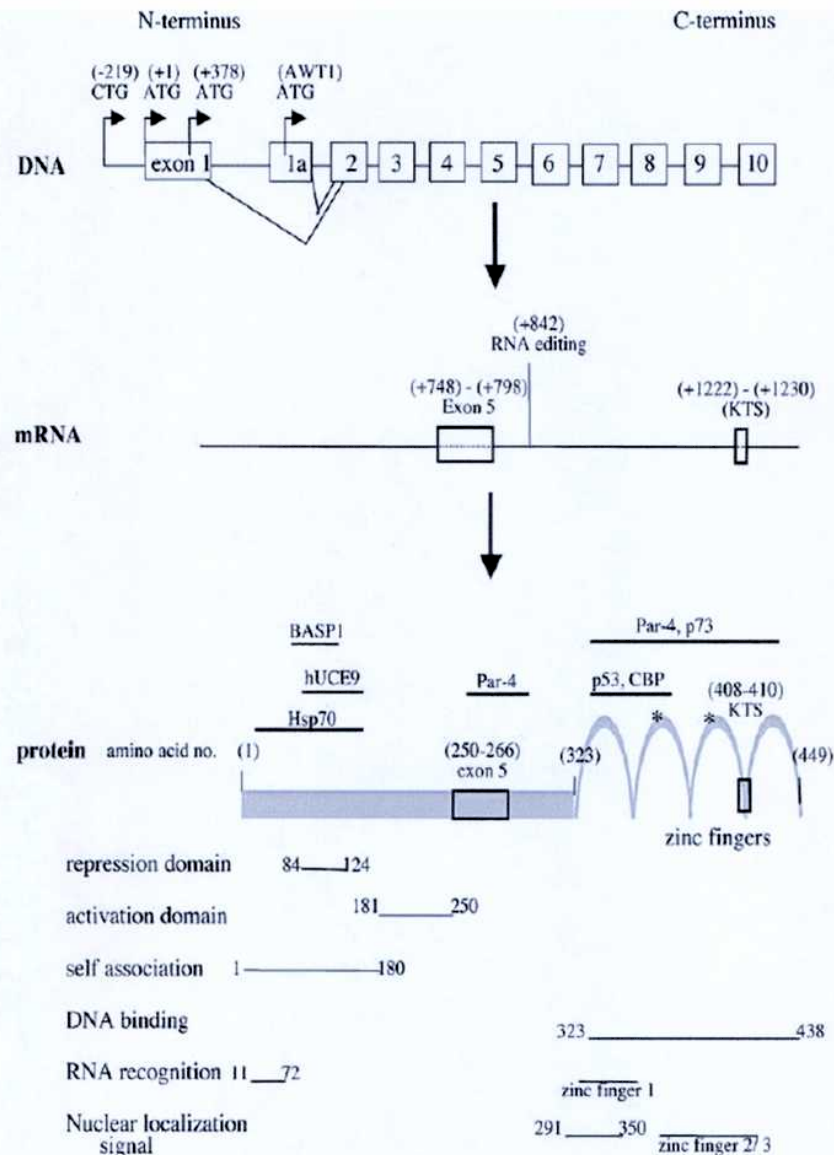


Figura 1.1: Diagrama esquemático de la estructura del DNA del WT1 (solo los exones), el mRNA y proteína. Varias modificaciones post-traduccionales ocurren en WT1. WT1 puede transcribirse a partir de cuatro sitios de iniciación. La variante truncada de WT1 denominada AWT1 se transcribe a partir de un ATG localizado internamente en el intrón 1a. A nivel del mRNA, WT1 es editado en el nucleótido 842, en el splicing del exon 5 y de los tres aminoácidos (KTS) ubicados entre el exón 9 y 10 en las isoformas variantes mayoritarias.

La proteína WT1 tiene varios dominios funcionales, el dominio N-terminal es rico en prolina glutamina y contiene ambos dominios de represión y activación transcripcional, además un dominio de asociación y reconocimiento de RNA. El dominio C- terminal contiene cuatro dedos Zinc C2H2, los que forman el sitio de unión al DNA y algunas proteínas. El numero indicado en el DNA y RNA representa la secuencia de nucleótidos y el numero indicado en la proteína representa el residuo de aminoácidos para la isoforma (+/+). Las líneas que se muestran sobre la proteína WT1 indican la región involucrada en la interacción con moléculas reguladoras, (*) indica los sitios de fosforilación de Ser 365 y Ser 393 localizados en los dedos de zinc 2 y 3 respectivamente (Yang I, 2007).

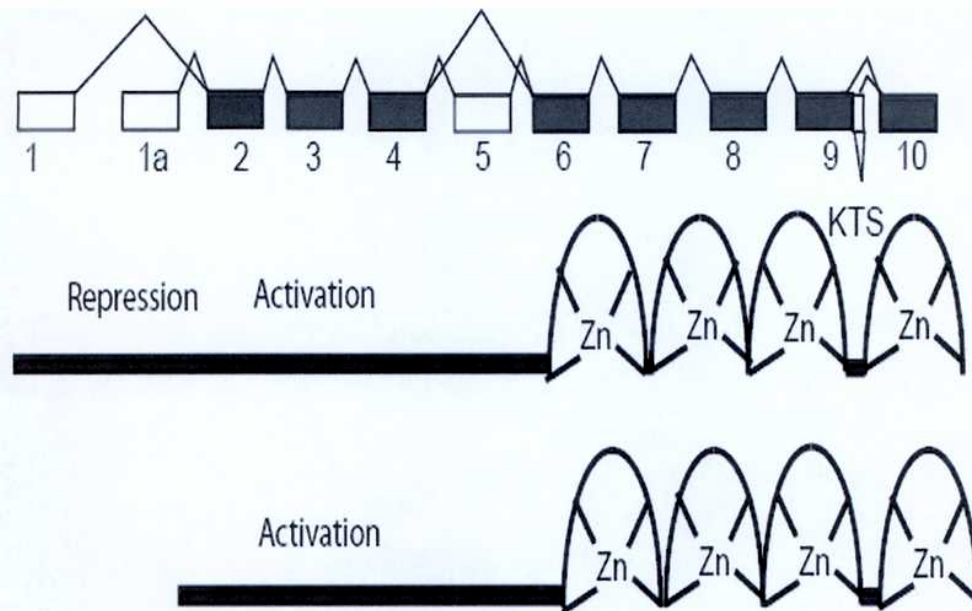


Figura 1.2: Representación esquemática del gen WT1 y sus transcritos provenientes de los splicing alternativos, en el exón 5, entre el exón 9 y 10 y en el sitio crítico del exón 1 (Houssain A ,2006).

1.2 Función del WT1 y su interacción con otros genes.

Durante el proceso de maduración, los *splicing* alternativos del RNAm de WT1 generan isoformas protéicas que actúan como reguladoras de factores de crecimiento (Figura 1.3), modulando genes tempranos intervinientes en el mecanismo de diferenciación y desarrollo sexual (Madden, 1991; Scharnhorst V, 1999).

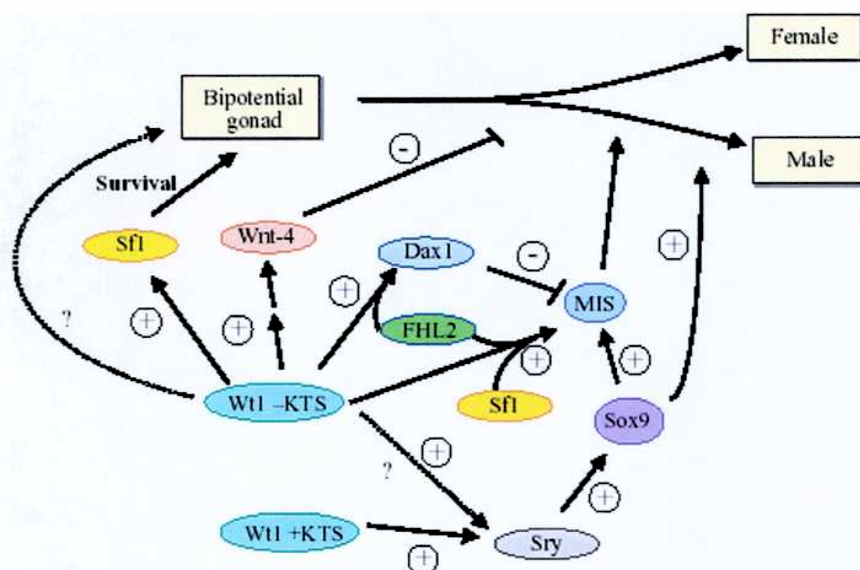


Figura 1.3: WT1 actúa en múltiples pasos durante la formación y determinación sexual. La isoforma WT1 (-)KTS puede transactivar Sf1. Ambos WT1 y Sf1 son necesarios para la supervivencia de la bipotencialidad gonadal. Los productos de WT1(+)KTS son necesarios para la expresión de altos niveles del gen Sry en la determinación sexual. Sry directamente o indirectamente activa Sox 9, el cual estimula la expresión de hormonas anti Mullerianas (AMH) MIS. La isoforma WT1 (-)KTS puede transactivar directamente MIS, Dax 1 y al menos indirectamente Wnt-4. La transactivación de promotor MIS puede ocurrir a través de la interacción directa de WT1(-)KTS con la proteína SFI. Dax1, un gen que interfiere con el desarrollo sexual masculino es represor del promotor MIS. (Kay- Dietrich W, 2003).

La presencia del zinc finger en el C-terminal de la proteína sugiere su función como regulador de la transcripción. Los genes blanco sobre los que actúa WT1 son importantes en el crecimiento celular, metabolismo, componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento y otros factores de transcripción (tabla 1.1). Los niveles de expresión de WT1, las isoformas predominantes (+KTS ó -KTS), la localización del sitio de inicio de la transcripción, y el tipo de célula donde se expresa, pueden hacer que el gen actúe activando o reprimiendo la expresión de otros genes específicos. Entre ellos podemos citar: “*Epidermal Growth Factor Receptor*”, *Sindecam 1*, *bcl-2*, *Amphiregulin* y *E-cadherin* (Yang I, 2007).

Tabla 1.1 : Genes reprimidos y/o activados por WT1 (L Yang, 2007)

Factores de Crecimiento

<i>Amphiregulin</i>	Activación
<i>Colony stimulating factor-1</i>	Represión
<i>Insulin growth factor II</i>	Activación / Represión
<i>Platelet derived growth factor</i>	Activación / Represión
<i>Transforming growth factor-beta</i>	Represión

Receptores

<i>Androgen receptor</i>	Represión
<i>Epidermal growth factor receptor</i>	Represión
<i>Insulin receptor</i>	Represión
<i>Insulin growth factor- I receptor</i>	Represión
<i>Retinoic acid receptor alpha</i>	Represión

Factores de transcripción

<i>c-Myb</i>	Represión
<i>c-Myc</i>	Activación / Represión
<i>Cyclina E</i>	Represión
<i>Cyclina G1, IGFBP-4</i>	Activación
<i>P21</i>	Activación
<i>Pax-2</i>	Represión

Enzimas

<i>Human telomerase reverse</i>	Represión
<i>Transcriptase Ornitina Decarboxilase</i>	Represión

Matriz Extracelular

<i>E-Cadherin</i>	Incrementada
<i>Syndecan-1</i>	Activación / Represión

Otras

<i>Wnt-4</i>	Activación
<i>Bcl-2</i>	Activación / Represión
<i>Erythropoietin</i>	Activación

1.3 Mutaciones asociadas al gen WT 1

Las mutaciones en WT1 asociadas con WT se encuentran en muy baja frecuencia y aparecen en forma esporádica. Incluyen grandes deleciones y mutaciones intragénicas (10 y 5% respectivamente). No obstante la mayoría de WT expresan la forma *wild-type*

de WT1, algunas veces en alto nivel. Esto sugiere que las mutaciones de WT1 son importantes solo en una pequeña proporción de casos. Aquellos donde se expresa la forma *wild-type*, no se sabe si la persistencia de la expresión de WT1 contribuye al desarrollo de la enfermedad o es solo una consecuencia de la misma (Lapillonne H, 2006).

Se ha observado que pacientes con WT que sobreviven a la enfermedad, pueden desarrollar neoplasias secundarias tales como, mesoteliomas y leucemias. En estos tipos de cánceres, las mutaciones adquiridas en WT1 son independientes de las que dieron origen al WT, avalando la hipótesis que el gen WT1 puede también jugar un rol en estas patogénesis (Miyagi T, 1993).

1.4 Leucemia Mieloide Crónica – Etiología de la enfermedad

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un desorden hematológico mieloproliferativo clonal de la célula madre hematopoyética, caracterizado por la proliferación desregulada de células del linaje mieloide asociada a la inhibición de la apoptosis. La LMC constituye el 20% de las leucemias del adulto, con una incidencia aproximada de 1-2/100.000 por año en población occidental. El grupo etario de prevalencia es el adulto joven, entre 25-60 años.

La fisiopatogenia de la LMC reside en una alteración genética adquirida caracterizada por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph'), resultado de una translocación cromosómica específica, balanceada, entre los cromosomas 9 y 22 $t(9;22)(q34;q11)$ (Nowell, 1960) (Rowley, 1973). Este marcador es detectado en el 95% de los casos con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), en el 25%-40% de las Leucemias

Linfoblásticas Agudas (LLA) del adulto y aproximadamente en 3% - 5% de las LLA pediátricas. Como resultado de la translocación t(9;22) se produce la yuxtaposición del oncogen c-abl, que mapea en 9q34 a una zona de 5,8 Kb denominada *M-bcr* (*Major breakpoint cluster region*) que se ubica en 22q11 (Groffen, 1984). El resultando es la formación de un gen quimérico BCR/ABL que codifica una proteína anómala p210^{bcr/abl} con dos configuraciones exónicas: b2a2 y b3a2. Esta proteína oncogénica posee una actividad de tirosina kinasa aumentada respecto de su contraparte normal, p145, codificada por el gen c-abl. Dicha proteína sería la responsable de la patogénesis de la LMC (Cortes, 1996). En leucemias agudas se ha observado que el punto de ruptura ocurre en la zona *m-bcr* (*minor break point cluster region*) originando la configuración exónica e1a2 (p190). Mientras que en las leucemias neutrofilicas el punto de ruptura ocurre en la región *μ-bcr*, dando el reordenamiento e19a2 (p230) (figura 1.4).

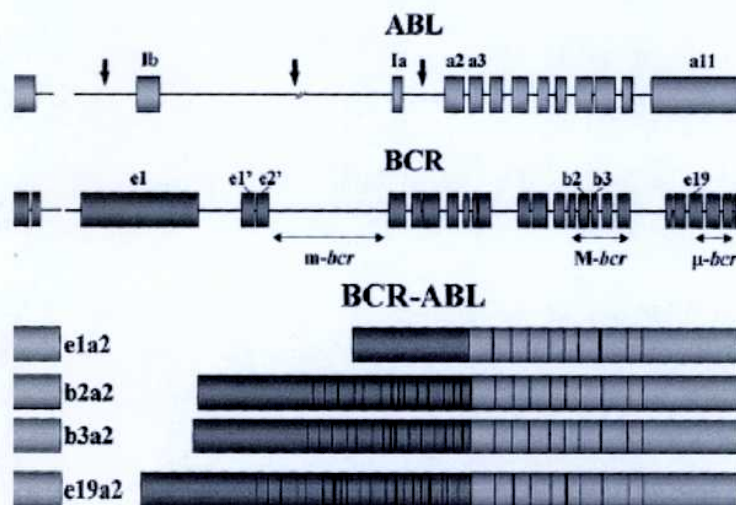


Figura 1.4: Formación de los diferentes transcritos BCR-ABL (Cortes, 1996)

El reordenamiento BCR-ABL típico de la LMC lleva a una severa alteración de la hemopoyesis normal con leucocitosis y visceromegalias, y en ocasiones asociado a trombocitosis o trombocitopenia y anemia. Inicialmente la enfermedad transcurre por una fase crónica dado que las células conservan alguna capacidad de diferenciación. Posteriormente el clon leucémico pierde dicha capacidad y los pacientes evolucionan inexorablemente a una leucemia aguda (crisis blástica) (Cortes Je, 1996).

1.4.1 Inhibidores de Tirosin Kinasa usados en la terapéutica de LMC.

Teniendo en cuenta que la etiopatogenia de esta enfermedad radica en la presencia del gen quimérico BCR/ABL, todos los tratamientos actuales apuntan a la supresión o inhibición del reordenamiento molecular BCR-ABL, permitiendo entrar en apoptosis a la célula tumoral. Por lo tanto inhibidores de proteína kinasas son útiles como agentes terapéuticos en LMC. Actualmente el Imatinib (derivado de la 2-fenilaminopiridina) también denominado STI571, es el tratamiento de primera línea, este fármaco inhibe todas las ABL kinasas incluyendo la p210, p190, v-abl, c-abl, c-Kit, y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Druker, 2001).

Algunos pacientes con LMC y LLA Ph⁺, pueden desarrollar resistencia o intolerancia a los inhibidores de tirosina kinasas (ITK). Se han descrito mutaciones en el gen ABL entre los exones 4 y 7 que determinan sustitución de aminoácidos dentro del dominio quinasa, lo cual impide la unión de la droga al sitio ABL kinasa. Como consecuencia se han desarrollado inhibidores de segunda generación que pueden superar la resistencia adquirida al Imatinib. Entre estos el Dasatinib (BMS-354825;

Bristol-Myers Squibb) es un potente inhibidor de la familia de SRC- kinasas que suprime además del BCR-ABL, las quinasas: FGR, FYN, HCK, LCK, LYN y YES, teniendo además actividad adicional contra KIT, PDGFR y ERTK. La falta de selectividad sobre la familia SRC-kinasas es probablemente debida al hecho que Dasatinib en contraste con Imatinib, se une tanto a la conformación activa como la inactiva de los ARG (*ABL related genes*) (Guilhot F,2007).

1.5 Expresión de WT1 en hematopoyesis normal

En contraste con la expresión de otros genes supresores, tales como p53 o RB (retinoblastoma), la expresión normal de WT1 se restringe en adultos a un número muy limitado de tejidos, principalmente del sistema genitourinario. En médula ósea normal, WT1 es expresado en muy bajos niveles y está confinado principalmente a la población celular tipo CD34+ durante etapas tempranas de la diferenciación hematopoyética. Luego WT1 es reprimido en las etapas subsiguientes, permitiendo el ingreso a la diferenciación celular. WT1 juega un rol importante en el mantenimiento y renovación de las células sanguíneas (Hosen N,2002; Baird PN, 1997).

En células hematopoyéticas normales humanas, WT1 parece comportarse como un gen supresor tumoral dado que la sobreexpresión de WT1 en células tempranas de médula ósea lleva a un arresto del crecimiento y a una reducción en la formación de colonias hematopoyéticas. Este fenómeno es dependiente del dominio *zinc fingers*, dado que se ha demostrado que la delección de este dominio elimina el efecto de arresto de crecimiento en médula ósea (Gessler M, 1990).

1.6 Implicancia de WT1 en Leucemia

Estudios realizados con la línea celular K-562 derivada de una LMC en crisis blástica, confirman que la expresión de WT1 va disminuyendo cuando se induce la diferenciación celular con drogas específicas, lo cual permite estudiar el rol del WT1 en este proceso (Phelan SA, 1993). También se ha demostrado que el WT1 esta consistentemente sobreexpresado en la mayoría de las leucemias mieloides agudas (LMA), leucemias linfoblásticas agudas (LLA), síndromes mielodisplásticos (SMD) y crisis blástica de leucemia mieloide crónica (LMC) (Barragán E, 2004).

Esta observación, pudo ser confirmada mediante el uso de nucleótidos antisentido WT1 ó RNA de interferencia, los cuales inhiben tanto el crecimiento de células leucémicas humanas como de líneas celulares leucémicas provocando una rápida inducción a la apoptosis, pero no inhibe el crecimiento en las unidades formadores granulocíticas macrofágicas (CFU-GM) normales (Elmaagacli AH, 2005). Estas observaciones soportan evidencias del rol de WT1 en el mantenimiento de la supervivencia de células leucémicas. La sobreexpresión de WT1 en células K562 las protege contra la muerte celular causada por tratamiento con drogas quimioterápicas, existiendo correlación entre la expresión de WT1 y resistencia al tratamiento en neoplasias hematológicas (Yamagami T, 1996).

Para demostrar que la alta expresión de WT1 está asociada con agravamiento del pronóstico a largo plazo, se transfectaron líneas celulares leucémicas con WT1 *wild type*, esto produjo la pérdida de respuesta ante la acción de los agentes de

diferenciación, demostrando que WT1 contribuye al desarrollo de la leucemia, e interfiere en la diferenciación y supervivencia celular (Bergmann L, 1997).

La sobreexpresión de WT1 es consistente con muchos tipos de leucemias. El grado de expresión parece variar entre los pacientes y los distintos tipos de neoplasias leucémicas alcanzando niveles de hasta tres logaritmos por encima de los valores en células normales (Cilloni D. 2002).

La sensibilidad de las células leucémicas al tratamiento con Imatinib pudo ser comprobada por testeo de la expresión de WT1 luego de una corta incubación in vitro de las células con Imatinib, viendo que la sensibilidad o resistencia a ITK puede predecir la respuesta al tratamiento (Cilloni D, 2003, 2004).

1.7 WT1 como supresor tumoral u oncogen en leucemias

En leucemia mieloide aguda (LMA) dos importantes publicaciones apoyan la acción de WT1 como supresor tumoral. Primero, se comprobó que algunos pacientes tenían mutaciones en el WT1 en las células leucémicas, tales como mutaciones puntuales que incluían cuatro inserciones de nucleótidos en los exones 1 o 7, ó mutaciones sin sentido en el exón 9. Estas mutaciones llevan a una proteína WT1 truncada o modificada. Pero no se pudo determinar si estas mutaciones contribuían al desarrollo de la enfermedad (King- Underwood L 1996). Segundo, en algunas formas de LMA se encuentran muy bajos niveles de WT1 a nivel del RNA, lo cual sugiere una pérdida de la función supresora. Por ejemplo cuando la isoforma WT1 KTS (+) es expresada en la línea celular LMA M1 (WT1 negativa), disminuye la proliferación tumoral. Lo cual es observado cuando las células son injertadas en un ratón

inmunocomprometido. Esto es consistente con la función de supresor tumoral en algunas formas de LMA (Valk PJ, 2004).

Sin embargo la determinación de la expresión de WT1 en LMA en un grupo de 285 pacientes mostró que la mayoría de los pacientes tenían altos niveles de WT1 en médula ósea y sangre periférica en comparación con células normales, y la secuenciación demostró que el gen WT1 sobreexpresado es el wild-type, sugiriendo que podría tener paradójicamente actividad oncogénica en células hematopoyéticas (Miyagi T, 1993). Además se ha demostrado que la expresión de WT1 en líneas celulares de cancer de mama MDA-MB-468 y MCF-7, así como en líneas celulares de leucemia humana K-562, puede estimular la proliferación celular por activación del promotor c-Myc, siendo esto consistente con una función de oncogen. La presencia o ausencia de otros cofactores acompañantes podría justificar el comportamiento dual de WT1 como supresor u oncogén (Yang L. 2007).

1.8 Estudios moleculares de WT1 en Leucemias

Recientemente datos obtenidos usando *Quantitative RT-PCR* (qRT-PCR) determinaron que en progenitores normales la expresión de WT1 está a muy bajos niveles, aún indetectables por métodos de nested-PCR. (Bergmann L, 1997; Cilloni D, 2003).

La cuantificación de los transcritos WT1 mediante qRT-PCR se ha utilizado como un marcador molecular para evaluar enfermedad mínima residual, clasificando a los pacientes en grupos de acuerdo al nivel del transcrito de WT1. A mayor nivel de

expresión mayor probabilidad de progresión neoplásica (Garg M ,2003 ;Weissner M.,2005).

Estudios previos demuestran que la cuantificación relativa de WT1 sería un factor pronóstico independiente para predecir evolución en pacientes con LMA, sugiriendo que el nivel de transcripto de WT1 podría incluirse como un estudio inicial pronóstico para establecer y definir grupos de mayor riesgo de recaída (Barragán E, 2004). Con respecto a este punto, trabajos recientes demuestran que, teniendo en cuenta los niveles de expresión del WT1 es posible predecir la respuesta in vitro al Imatinib (Branford S, 2004; Cilloni D, 2004)

WT1 se sobreexpresa en la mayoría (70-90%) de las leucemias agudas, aunque su implicancia clínica en pacientes pediátricos con LLA aún no es muy clara. El incremento en la expresión del WT1 se asocia con mayor riesgo de recaída. Se ha descrito que la expresión en niños con LLA es muy variable y más baja que en adultos con LMA y LLA. Por lo tanto estos estudios sugieren que este marcador no sería de gran utilidad en pediatría, aunque su presencia representa un riesgo potencial independiente de otros factores. Es interesante ver que una proporción de los niños con LLA expresan niveles de WT1 más bajos que los normales fisiológicos en MO, y que esta reducción, llamativamente parece estar también asociada con alto riesgo de recaída (Boublikova L, 2006 ; Lapillonne H, 2006).

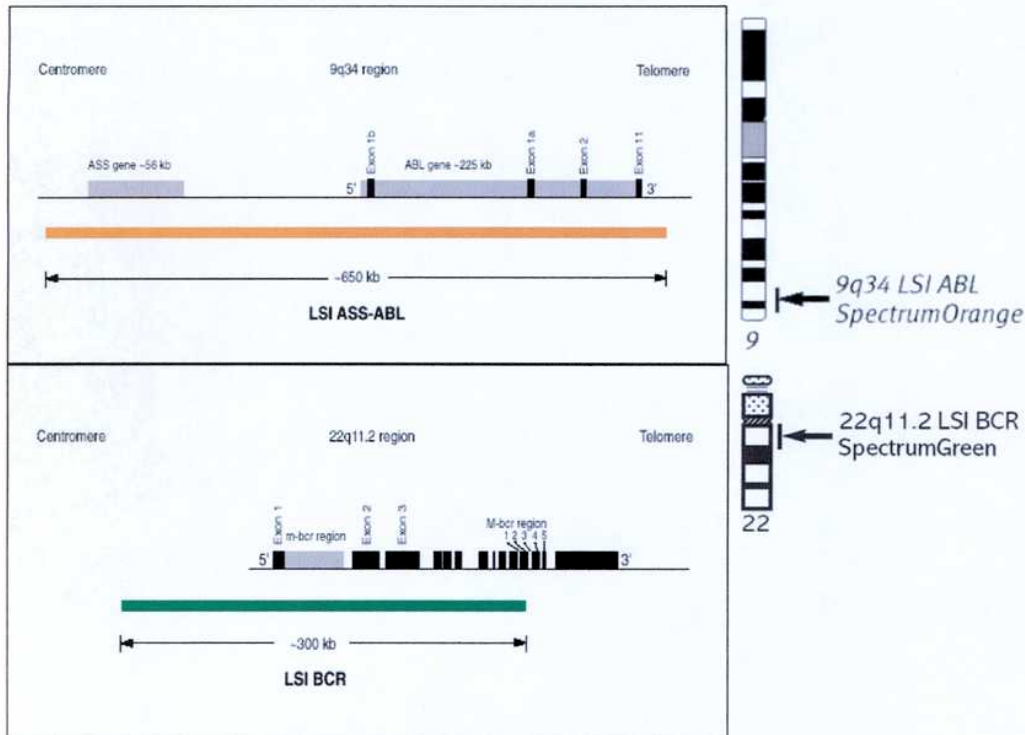
1.9 Técnicas de monitoreo de la respuesta al tratamiento en LMC

El estudio citogenético del cromosoma Ph en LMC es un análisis de gran importancia al momento del diagnóstico por su alta especificidad a pesar de su baja

sensibilidad. Al inicio de la enfermedad cuando la carga tumoral es alta el estudio citogenético es el más apropiado, pero a medida que el clon neoplásico va disminuyendo en respuesta al tratamiento este estudio muchas veces es poco informativo por el escaso número de metafases observadas. Por esta razón es necesario implementar otras metodologías de mayor sensibilidad tales como el FISH (*Fluorescence In Situ Hybridization*) y RT-PCR (*Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*) (Schoch C, 2002).

A fines de 1980, hubo un rápido desarrollo de las metodologías basadas en hibridación *in situ* fluorescente (FISH), permitiendo así el estudio de células interfásicas y posibilitando una caracterización más precisa de determinadas anomalías cromosómicas. La metodología FISH es una técnica que utiliza diferentes tipos de sondas que permiten reconocer secuencias específicas en núcleos interfásicos o cromosomas metafásicos. Se distinguen cuatro tipos de sondas, en función de las estructuras que son capaces de detectar: a) sondas específicas de gen o locus, b) sondas centroméricas, c) sondas subteloméricas y d) sondas de pintado cromosómico. En el estudio de LMC se utilizan sondas locus específico que hibridan con secuencias únicas de ADN. Dentro de los diferentes tipos de sondas utilizadas para detectar la translocación t(9;22)(q34;q11), la sonda comercial LSI BCR/ABL ES (VYSIS) permite detectar la presencia del cromosoma Ph, con un *cut off* de 1.5%. En la figura 1.5 se ejemplifica el lugar de hibridación de las sondas marcadas con los diferentes fluorocromos y la observación al microscopio de fluorescencia del patrón de señal de un núcleo patológico.

Ubicación de las sondas en los genes ABL Y BCR



Núcleo anormal mostrando una señal verde (correspondiente al BCR del cromosoma 22 normal), una señal grande roja (correspondiente al ABL del cromosoma 9 normal), una señal roja pequeña (*extrasignal* correspondiente al 9 traslocado) y una señal amarilla de fusión (correspondiente a la t(9;22)).

Figura 1.5: Representación esquemática de la sonda comercial *BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe*. La secuencia LSI ASS-ABL de 650 kb marcada con *SpectrumOrange* hibrida con el gen ABL cubriendo desde el gen ASS hasta el último exón del gen ABL, mientras que la secuencia LSI BCR de 300 kb marcada con *SpectrumGreen* hibrida con el gen BCR abarcando desde los exones 13 y 14 del gen BCR (M-bcr exons 2 and 3) hasta más allá de la región m-bcr.

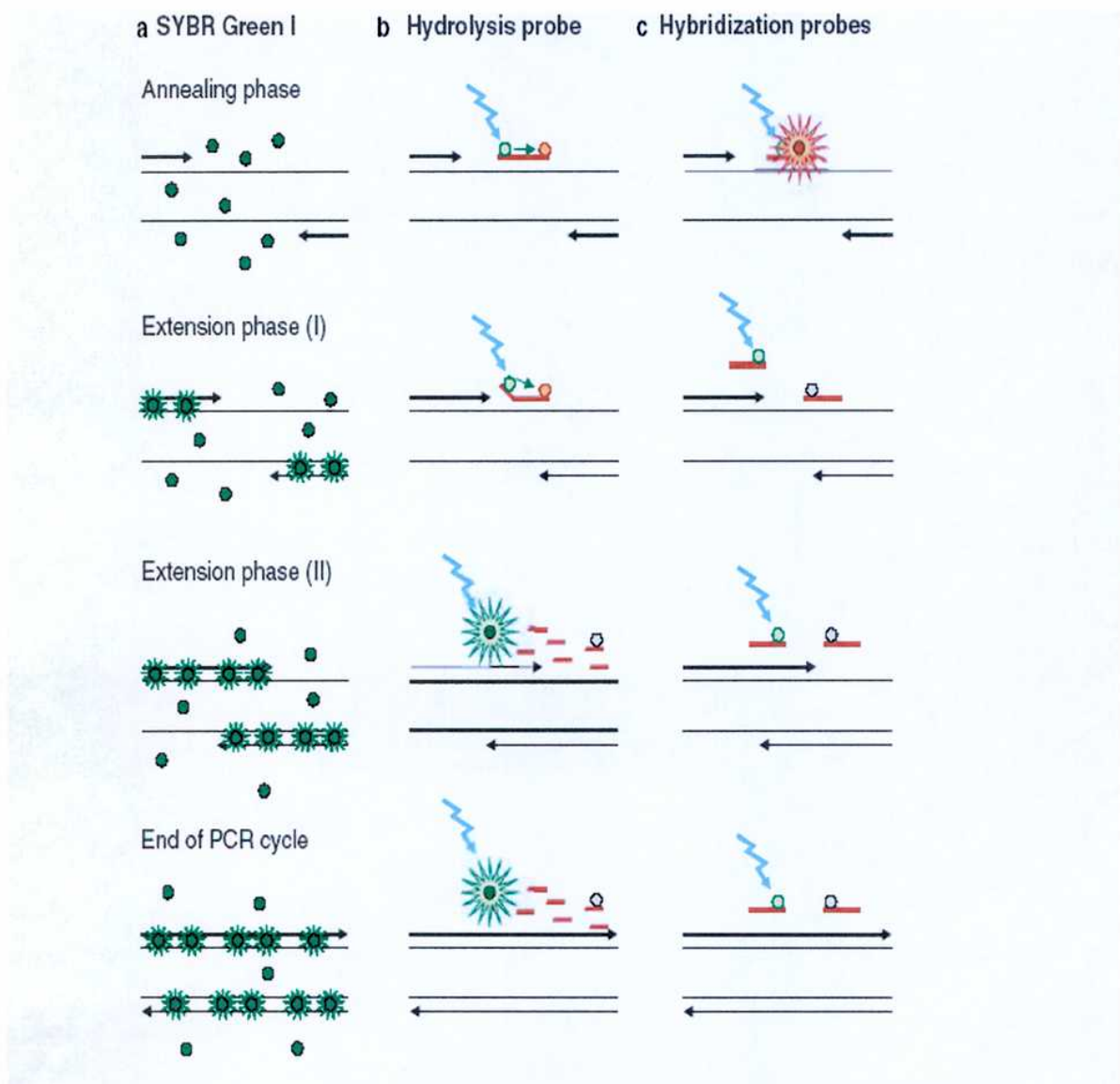
Por otra parte la PCR representa la técnica más utilizada por su mayor sensibilidad y practicidad (Kawasaki ES, 1988). La identificación del transcripto BCR-ABL por RT-PCR cualitativa se comenzó a realizar a fines de los años '80, con el fin de

determinar la presencia o ausencia de estos transcritos, en los pacientes transplantados con células *stem* alogeneicas (Morgan GJ, 1989; Hughes TP, 1991). Sin embargo, el simple análisis cualitativo, por medio de RT-PCR, es actualmente insuficiente, para el hematólogo, que luego de un trasplante de médula o un régimen de quimioterapia, quiere monitorear en el tiempo, el perfil de expresión de los transcritos BCR-ABL. Por esta razón la cuantificación se hizo cada vez más indispensable. Por lo tanto al principio se realizaron PCR en presencia de un competidor que permitiera cuantificar la abundancia relativa del transcrito (Cross et al, 1996). Esta metodología de trabajo fue rápidamente reemplazada por las actuales técnicas moleculares de PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando equipos capaces de medir la fluorescencia liberada en cada reacción. Esta metodología es actualmente utilizada en el seguimiento de pacientes con LMC en tratamiento o post trasplante de médula ósea (TMO) .

En 1993 Higuchi y col fueron los primeros en llevar a cabo la técnica de la PCR en tiempo real, aplicando técnicas de fluorescencia a las de PCR, permitiendo así combinar la amplificación, la detección y la cuantificación de ácidos nucleicos. Esta técnica se caracteriza por ser altamente sensible, cinco órdenes de magnitud mayor que las técnicas de *blotting*, y por permitir trabajar en un rango dinámico más amplio, de hasta 6 órdenes de magnitud. Todo ello hace que esta técnica sea de gran utilidad para la cuantificación de la expresión génica. Una metodología conceptualmente simple, práctica y relativamente poco costosa, como la qRT-PCR (quantitative real time-PCR) es hoy en día una herramienta de fundamental importancia en hemato-oncología. El principio fundamental de la “*real time*” PCR es la detección y medición del producto de

amplificación en tiempo real durante su acumulación. En la fase exponencial se genera una cantidad de producto que es directamente proporcional a la cantidad inicialmente presente en la muestra. Todo el sistema se basa en el uso de una sonda fluorescente y dos primers específicos. Las técnicas de qRT-PCR pueden dividirse en dos grupos principales de acuerdo al momento en que cuantifican la fluorescencia: aquellas donde la cuantificación se realiza en la etapa de extensión, por ejemplo *SYBR-Green*, *Taqman* (*hidrólisis probe*) o las que cuantifican la fluorescencia en la etapa de *annealing*, como la *Molecular beacom* (*hibridization probe*) (Figura 1.6). En ambos casos la señal fluorescente incrementa luego de finalizar cada ciclo de PCR; el número de ciclos en el cual la señal supera significativamente ($\text{media} + 3\text{DE}$) el umbral de fluorescencia es tomado como valor de referencia (C_p o C_t ; *crossing point* o *cycle threshold* respectivamente) lo cual permite estimar la cantidad de transcripto inicial. La cuantificación “absoluta” del transcripto de interés es obtenida a través de la realización de curvas estándar utilizando diluciones seriadas del gen de interés.

Para realizar la cuantificación relativa se recurre al uso de un gen de referencia (*housekeeping gene*) que permite normalizar la cuantificación del gen en estudio. El fundamento teórico de la PCR cuantitativa es la amplificación exponencial de un segmento de ADN definido, mediante el uso de secuencias cortas de nucleótidos sintéticos “*primers*” que se hibridan de forma específica con cada una de las dos hebras complementarias de DNA. La amplificación se consigue al realizar una serie de ciclos repetitivos que consisten en la desnaturalización del DNA molde o templado, la hibridación de los “*primers*” con el templado y la síntesis del DNA complementario mediante la acción de la enzima DNA polimerasa.



Van der Velden. Leukemia 2003 ([www](http://www.elsevier.com/locate/ylme))

Figura 1.6: Esquemas representativos de las metodología mas comúnmente utilizadas; (a) SYBR Green I . Durante la fase de extensión, el SYBR Green I se une a los productos de PCR, resultando en un incremento de la fluorescencia. Consecuentemente, durante cada ciclo subsiguiente de PCR más fluorescencia será detectada. (b) Técnica de sonda hidrolizada o Taqman. La sonda está conjugada con un quencher, el cual absorbe la fluorecencia del fluorocromo reporter durante el tiempo que la sonda está intacta. En la medida que la secuencia se amplifica, la sonda es hidrolizada por la Taq polimerasa. De esta forma se separa el reporter del quencher emitiendo fluorescencia. (c) técnica de sonda de Hibridización o FRET (*fluorescent resonanse energy transfer*). En esta técnica una sonda está marcada con un fluorocromo en el extremo 3' y una segunda sonda lleva un aceptor de flourocromo. Cuando estas dos sondas hibridan muy próximas (de 1 a 5 nucleótidos), se produce la emisión de fluorescencia, que es detectada durante la fase de annealing y primera parte de la fase de extensión de la reacción de PCR.

1.10 Determinación de la respuesta molecular en LMC

El análisis molecular por *Real-time* (RQ-PCR) es un método sensible y específico, que cuantifica en tiempo real el producto de amplificación. Actualmente es el método de elección para cuantificar en la LMC el nivel de expresión del reordenamiento BCR-ABL y monitorear la respuesta a la acción antitumoral del imatinib. Los datos se expresan usualmente como el cociente de número de copias de transcritos BCR-ABL (gen de fusión) en relación al número de copias de transcritos ABL (gen control) expresado en porcentaje (% BCR-ABL/ABL) .

$$\text{Respuesta Molecular (\%)} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ copias BCR/ABL}}{\text{n}^{\circ} \text{ copias ABL}} \times 100$$

Las respuestas moleculares se clasifican como: Completa o RMC (BCR-ABL/ABL < 0,01% o No detectable), Mayor o RMMa (BCR-ABL/ABL de < 0,1%), Menor o RMMe (BCR-ABL/ABL < 1%) y Nula o RMNula (BCR-ABL/ABL > 10%) .

La reducción (Red) en escala logarítmica respecto de los valores iniciales cercanos al 100%, caracteriza la intensidad de la respuesta según el siguiente criterio: Red > 4 log = RMC, Red > 3 log = RMMa, Red > 2 log = RMMe, Red > 1 log = RMMin y Red < 1 log = RMNula.

Respuesta Molecular Estimada	Rangos de los cocientes %	Reducción Logarítmica en base 10
COMPLETA	$\leq 0,01$	≥ 4
MAYOR	$> 0,01 \leq 0,1$	≥ 3
MENOR	$> 0,1 \leq 1$	≥ 2
MINIMA	$> 1 \leq 10$	≥ 1
NULA	> 10	< 1

2.OBJETIVOS DEL TRABAJO

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo enunciado precedentemente, el objetivo principal de este trabajo de investigación es:

Analizar el nivel de expresión del gen WT1 en pacientes con leucemia mieloide crónica en sus diferentes fases: crónica, acelerada y blástica, a fin de evaluar si este marcador biológico se correlaciona con el status de la enfermedad o con otras variables clínicas o genéticas. Con esto podremos determinar si la cuantificación de los transcriptos WT1 es de importancia pronóstica en LMC asociándose con evolución de la enfermedad.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y Métodos:

3.1 Técnicas experimentales con líneas celulares y material celular obtenido de pacientes con LMC

3.1.1 Línea celular K-562

La línea celular K562, adquirida en ATCC (cat. No. CCL-243) fue la primera línea celular establecida con un cromosoma Ph⁺ persistente a lo largo de sucesivos pasajes in vitro. A nivel molecular, dichas células expresan el rearrreglo BCR-ABL de tipo b3a2. La línea K-562 se obtuvo a partir de una efusión pleural de una paciente de 53 años con LMC en el estadio terminal de una crisis blástica (Lozzio et al, 1975). La población se caracteriza por ser altamente indiferenciada y multipotente. La línea presenta amplificación del reordenamiento BCR-ABL detectado por la metodología FISH. Las células se mantienen en RPMI 1640+SFB 10% a 37°C en atmósfera con un 5% de CO₂, repicándose dos veces por semana.

3.1.2 Características de la población elegida.

Se estudiaron muestras de RNA provenientes de pacientes con LMC, teniendo en cuenta el estadio clínico y respuesta al tratamiento. Estas muestras se agruparon de

acuerdo al status de la enfermedad a fin de obtener grupos homogéneamente comparables.

Se analizaron 34 muestras correspondientes a:

- 12 pacientes con LMC en fase avanzada de la enfermedad (acelerada y crisis blástica).
- 12 pacientes con LMC en fase crónica.
- 10 dadores normales.

El diagnostico de LMC fue suministrado por los médicos tratantes y confirmado por estudios de laboratorio clínico, citogenético y molecular.

3.1.3 Procesamiento de las células

La extracción de RNA se realizó a partir de la línea celular K-562, sangre periférica o médula osea de pacientes y controles (individuos sanos), siguiendo el método del TRIZOL (Invitrogen Life Technology).

La muestras de sangre periférica o médula ósea se anticoagularon con EDTA 0,5 %. Los eritrocitos se lisaron usando buffer de lisis (0,144M NH_4CL ; 0,01M NH_4HCO_3). Las glóbulos blancas se separaron por centrifugación a 3.500 rpm durante 10 minutos. Se repitió este lavado una o dos veces más hasta obtener un pellet limpio. Las células se resuspendieron en TRIZOL (solución monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina) en una proporción de 1ml por cada 10 ml de sangre, luego con una jeringa y aguja se homogenizaron para asegurar su lisis, posteriormente se almacenaron las muestras a -80°C .

3.2 Metodología empleada para ARN

3.2.1 Extracción de ARN celular total

A las muestras en trizol se les adicionó 200 μ l de cloroformo, se agitaron vigorosamente por 15 segundos, luego se dejaron reposar 3 minutos a temperatura ambiente para permitir la separación de las dos fases, se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos, se extrajo la fase acuosa que contiene el ARN y se descartó la fase orgánica que contiene el DNA y proteínas.

Luego de precipitar el ARN con 500 μ l de isopropanol, se agitó suavemente y se dejó reposar 10 minutos en hielo.

Seguidamente se centrifugaron las muestras 10 minutos a 13.000 rpm, se descartó el sobrenadante, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó 5 minutos a 7500 rpm, este último lavado se realizó una vez más.

Luego se resuspendió el pellet en 30 μ l de agua apirogena libre de nucleasas y se procedió a la cuantificación de la concentración de ARN. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -80°C .

3.2.2 Cuantificación espectrofotométrica del ARN

Una vez aislado, el ARN se cuantificó en espectrofotómetro (260nm). Además se valoró la pureza de la muestra, mediante las absorbancias a las longitudes de onda de 230 y 280 nm.

Para realizar las mediciones, las muestras se resuspendieron en buffer TE (Tris-HCl 10 mM con EDTA 1mM pH 7,5) ya que las relaciones absorbancia – concentración son sensibles a los cambios de pH del diluyente.

Si la relación $DO_{260} / DO_{280} < 1.8$, ello indica que la muestra está contaminada con proteínas o fenol, y debe ser purificada.

Si la relación $DO_{260} / DO_{280} \geq 1.8$, la muestra se considera pura.

3.2.3 Electroforesis de ARN en geles de agarosa

Para evitar la degradación del ARN durante la corrida es aconsejable lavar la cuba con SDS 0,1% para inhibir las RNasas y utilizar el buffer MOPS (0,1 M), pH 7.0 previamente autoclavado. La tinción de los geles (agarosa 1,2%) para visualizar el ARN se realizó con bromuro de etidio.

3.3 Reacción de retrotranscripción inversa (RT-PCR)

El ARN total se retro-transcribió a cDNA con la transcriptasa inversa MMLV (*Invitrogen Life Technology*).

La síntesis de cDNA se realizó en un volumen final de 20µl utilizando 2,5µg de RNA total por cada tubo de reacción.

Las cantidades de cada reactivo en la reacción de RT-PCR se describen en la siguiente tabla:

Reactivo	Volumen
H ₂ O (libre de nucleasas)	csp 20 µl
Random Primer 1 µg/µl	1 µl
dNTPs (10mM cada uno)	1.25 µl
Buffer RT(5X)	4 µl
RNAsa – out (40U/µl)	0.25 µl
Enzima MMLV RT (200 U/µl)	1 µl

3.3.1 Programa de RT-PCR:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Desnaturalización inicial: | 65°C 5 min. |
| 2. Retro-transcripción: | 37°C 1h |
| 3. Inactivación transcriptasa inversa: | 70°C 10 min. |

3.4 Amplificación de cDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa con cuantificación en tiempo real (qRT-PCR)

Cada amplificación de cDNA por qRT-PCR se realiza en un volumen final de 20 µl, de los cuales 15 µl corresponden a la mezcla de reacción y 5 µl al cDNA de cada muestra que se quiere amplificar (pacientes y controles). De acuerdo con la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen	Conc. final
cDNA	5 µl	
Mezcla de reacción:		
H ₂ O (libre de nucleasas)	10 µl	
Cl ₂ Mg (50 mM)	2 µl	5mM
Primer forward (10µM)	0.5 µl	250nM
Primer Reverse (10µM)	0.5 µl	250nM
Mezcla Pre Mix * (10x)	2 µl	1 x

(*) La mezcla Pre mix se prepara según indicación del fabricante (*lightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1 Roche*) 10x conc.

El termociclador utilizado en todos los casos fue el LightCycler® 2.0 de Roche <http://www.roche-applied-science.com>. Este sistema utiliza capilares de vidrio (hasta un máx. de 32 capilares) ubicados en un carrusel que durante la medición de las fluorescencias va rotando, con el fin de posicionar el capilar en el punto focal de máxima intensidad con respecto a la óptica del fluorímetro. Se utilizó el kit *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green 1* (Roche Diagnostics), el cual suministra todos los componentes necesarios para la reacción, exceptuando los oligonucleótidos primers y el cDNA.

Tabla 3.3: Primers utilizados para las ampliaciones de los transcritos.

Transcriptos	GenBank	Tamaño del fragmento (bp)	Conc. Primer (nM)	Secuencia de los primers (Cilloni, 2004)
WT1	BC032861	89	250	Secuencia Forward: 5' CAGGCTGCAATAAGAGATATTTTAAGCT 3' Secuencia Reverse: 5' GAAGTCACACTGGTATGGTTTCTCA 3'
ABL	NM_005157	125	250	Secuencia Forward: 5'-TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGTGA-3' Secuencia Reverse: 5'-GATGTAGTTGCTTGGGACCCA-3'

```

661 gataaccaca caacgccat cctctgcgga gcccaataca gaatgcacac gcacggtgtc
721 ttcagaggca ttcaggatgt gcggcgtgtg cctggagtag ccccgactct tgtacggtcg
781 gcatctgaga ccagtgaaga acgccccttc atgtgtgctt acccaggctg caataagaga
841 tttttaagc tgtcccactt acagatgcac agcaggaagc aactggtga gaaaccatac
901 cagtgtgact tcaaggactg tgaacgaagg ttttctcggt cagaccagct caaaagacac
961 caaaggagac atacagggtg gaaaccattc cagtgtaaaa cttgtcagcg aaagtctctc
1021 cgttcggacc acctgaagac ccacaccagg actcatacag gtgaaaagcc cttcagctgt
1081 cgttgcccaa gttgtcagaa aaagtgtgcc cgttcagatg aattagtccg ccatcacaac
1141 atgcatcaga gaaacatgac caaactccag ctggcgcttt gaggggtctc cctcggggac

```

Figura 3.1: Secuencia del transcritpo [BC032861](#) donde hibridizan los primers, www.ncbi.nlm.nih.gov, Homo sapiens Wilms tumor 1, mRNA

El programa básico de amplificación utilizado para WT1 con un canal de lectura de 530 nm fue:

1. Desnaturalización inicial: 95°C 15 min.
2. Ciclado de amplificación (45 ciclos):

Desnaturalización:	95°C 5 seg.
Hibridación:	64°C (5 ciclos) 6 seg
	(-0,5°C x ciclo hasta 58°C 6 seg)
Extensión:	72°C 8 seg.

3. Cuantificación de la fluorescencia (discontinua): 78°C 1 seg.
4. Curvas de Melting: 97°C 20 seg.
- Renaturalización: 50°C 15 seg.
- Cuantificación de la fluorescencia (continua): 98°C 0,1° por seg.

Este sistema de cuantificación está basado en la presencia de un intercalante del DNA doble cadena llamado **SYBR Green** que libera fluorescencia (a la longitud de onda de 530 nm). Los productos de amplificación obtenidos con este kit se analizaron mediante un programa de “*melting*” realizado con el mismo ciclador. Este análisis permite evidenciar eventuales productos inespecíficos que pudieran alterar la calidad de la estimación cuantitativa.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS:

Se analizaron mediante qRT-PCR, 24 muestras de RNA provenientes de sangre periférica de pacientes con LMC, de las cuales 12 estaban en fase avanzada de la enfermedad (acelerada y crisis blástica) y 12 en fase crónica, además se incluyeron 10 controles sanos.

La estrategia de PCR cuando es utilizada con propósitos “cuantitativos”, requiere determinar la eficiencia de amplificación de los diferentes juegos de *primers* con el fin de depurar el resultado final de cualquier artefacto experimental. (Se midió por qRT-PCR la relación de la expresión del gen WT1 con respecto al gen control, ABL).

4.1 Curvas de Calibración de los primers y eficiencia de amplificación

La realización de curvas estándar de calibración de los genes de interés, permite.

- a) Calcular la eficiencia de amplificación de los *primers*.
- b) Encontrar un rango dinámico de sensibilidad de la reacción.

La eficiencia de una reacción de PCR se define como el porcentaje de conversión de DNA molde a producto por ciclo. El máximo valor de eficiencia es 2, donde todas las moléculas de DNA existentes son duplicados por amplificación en cada ciclo y el mínimo valor es 1, cuando no se ha producido amplificación.

Para una exacta cuantificación es necesario que la eficiencia de los *primers* sean muy similares (posiblemente por encima del 80%) puesto que pequeñas diferencias conllevan a considerables variaciones en los valores de concentración. La eficiencia de

la PCR depende, entre otros factores, de la calidad de los *primers* diseñados, de las condiciones de amplificación (Taq, concentración de nucleótidos, concentración de Mg^{2+}), del fragmento a amplificar y de la pureza de la muestra. Se determinaron las curvas de calibración, usando concentraciones decrecientes de la línea K-562, para cuantificar el gen ABL: (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) y el gen WT1: (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}). Cada punto de la curva se duplicó para estimar el error estandar de la reacción. Estas curvas se usaron para determinar los niveles de expresión de WT1 y ABL de los pacientes incluidos en este estudio.

Se determinó el Crossing Point (Cp) (siendo este el ciclo en donde la reacción de amplificación supera el umbral) en función del logaritmo de la concentración de las diluciones seriadas. La eficiencia se calculó a partir de la pendiente de la recta resultante aplicando la siguiente fórmula: Eficiencia = $10^{-1/\text{pendiente}}$. Obteniéndose una eficiencia de 1.832 ± 0.032 y 1.810 ± 0.013 para los genes ABL y WT1 respectivamente. Estos valores indican que los primers tienen buena y similar eficiencia cercana a 2 (Figura 4.1 y 4.2).

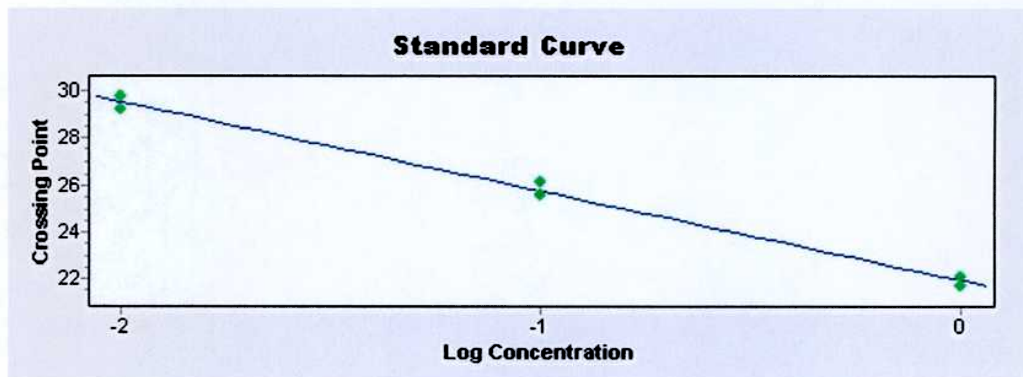


Figura 4.1: Curva estandar de calibración de los primers del gen ABL. La eficiencia de amplificación obtenida fue de $E = 1.832 \pm 0.032$

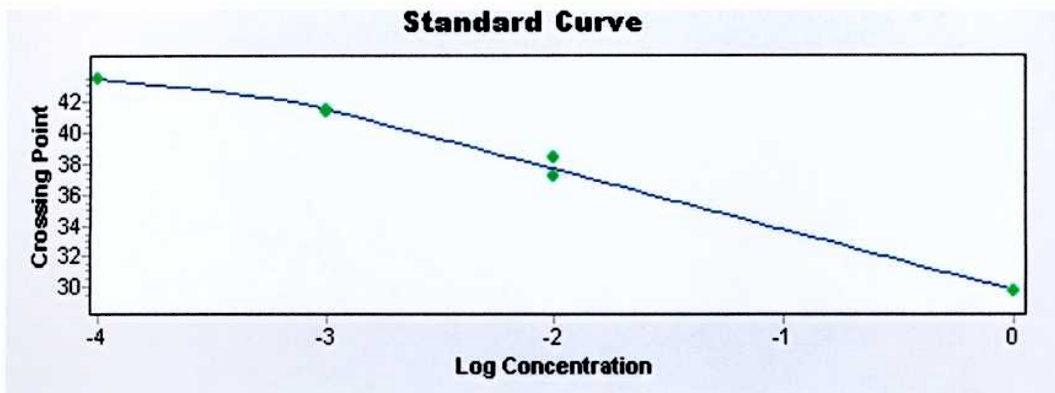


Figura 4.2: Curva estandar de calibración de los primers del gen WT1.
La eficiencia de amplificación obtenida fue de $E = 1.810 \pm 0.013$

4.2 Curvas de desnaturalización: (Melting curve)

Para determinar la especificidad de la qRT-PCR con el método de SYBR–Green I hay que tener en cuenta que el fluoróforo se intercala en cualquier DNA doble cadena, detectando tanto el producto específico como algún inespecífico y dímeros de primers que pudieran formarse durante la reacción. Por lo tanto, es necesario comprobar la pureza del producto amplificado. Para ello se realizó la curva de desnaturalización (*Melting curve*). Este método se lleva a cabo con un programa de *melting* el cual consiste en incrementar la temperatura de 50°C a 95°C a fin de desnaturalizar la doble hélice formada. Este proceso se realiza con monitoreo continuo de la fluorescencia, la cual será alta a bajas temperaturas dado que todo el DNA se encuentra en doble hélice. A medida que aumenta la temperatura se produce el fenómeno de desnaturalización provocando al principio un descenso gradual de la fluorescencia hasta llegar a la temperatura de *melting* correspondiente al producto específico.

Los valores de fluorescencia son convertidos en curvas de desnaturalización, mediante la representación de la derivada negativa de la fluorescencia respecto a la

temperatura versus la temperatura ($-dF/dT$ vs T). Debido a que la desnaturalización de un fragmento de DNA depende de su longitud, su secuencia de bases y su contenido en GC, las curvas de desnaturalización son características de cada fragmento, pudiendo así identificar la especificidad de los amplímeros. El programa de “*melting*” se realiza al finalizar los 45 ciclos de amplificación a los efectos de evidenciar los productos inespecíficos que pudieran alterar la estimación cuantitativa, los picos que determinan la identidad del amplímero se muestran en las figuras 4.3 y 4.4; en nuestro estudio las temperaturas de *melting* fueron de 82,04°C y 84,14°C para el WT1 y ABL respectivamente.

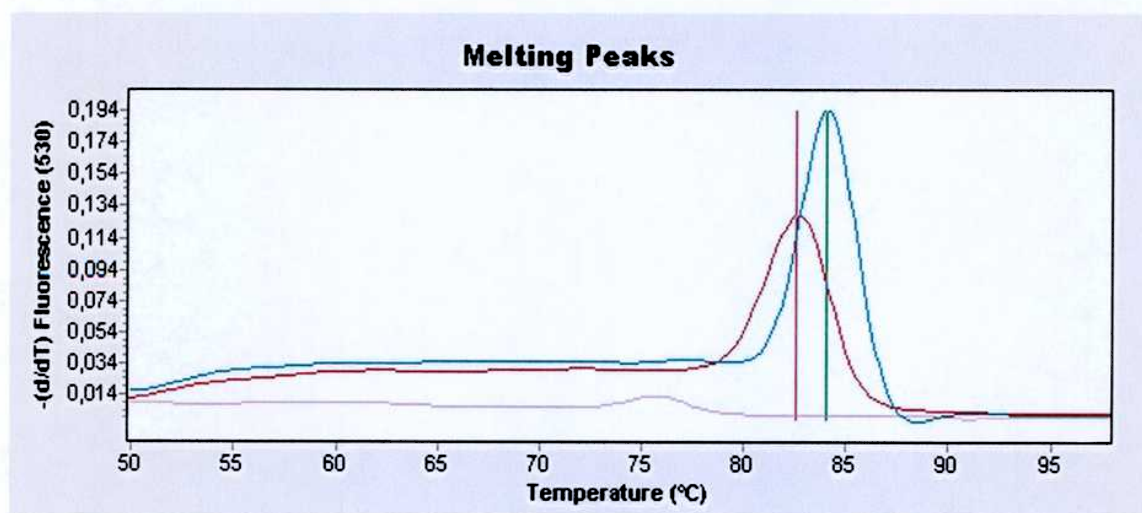


Figura 4.3: Picos de melting para WT1 (82,04 °C) — , ABL (84,14 °C) — medidos en K-562 y control negativo —.

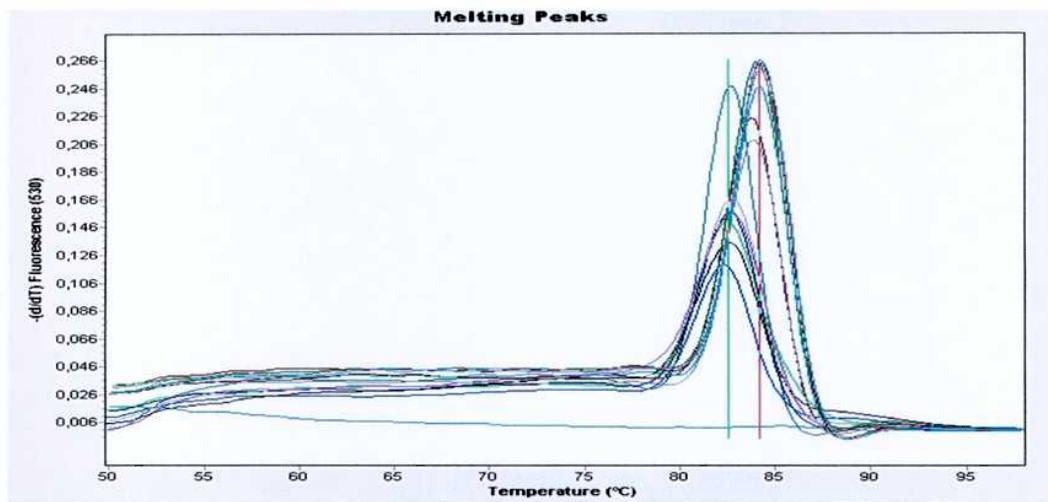


Figura 4.4: Representación del Tm (temperatura de melting) del gen WT1 y ABL de varias muestras analizadas.

En la figura 4.5 se muestra el gráfico de fluorescencia en función del número de ciclos, observándose que el rango exponencial de amplificación del transcripto ABL está entre los ciclos 19 a 22, mientras que para el transcripto WT1 se encuentra en los ciclos 27 a 30. Un Cp en menor cantidad de ciclos indica mayor expresión del gen, lo cual es característico del gen ABL utilizado como *house keeping*.

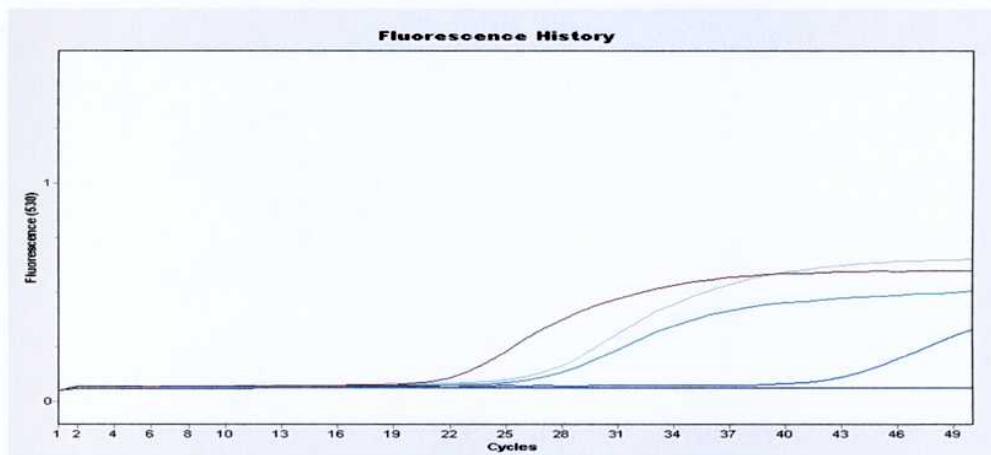


Figura 4.5: Representación esquemática de la fluorescencia en función del ciclo de amplificación de una de las muestras analizadas.

muestra :WT1 — , ABL —

Controles positivos K-562 : WT1 — , ABL —

Control negativo (H₂O) — ambos genes.

4.3 Cuantificación relativa (WT1/ABL) de las muestras y controles sanos.

Los datos obtenidos con las muestras analizadas se resumen en la tabla 4.1 donde se incluyen datos clínicos, respuesta hematológica, citogenética, citomolecular, molecular, tratamientos recibidos y cuantificación del WT1. Los datos se ordenaron de acuerdo a los niveles crecientes de expresión de WT1. (anexo 1)

El mRNA de WT1 fue detectado en altos niveles en todas las muestras estudiadas tanto en fase crónica como avanzada, mientras que en los controles sanos, la expresión del gen WT1 fue muy baja, casi nula. Se agruparon los pacientes de acuerdo a la fase de la enfermedad con sus respectivos niveles de expresión de WT1 (tabla 4.2).

Tabla 4.2: Relación WT1/ABL de los pacientes y controles sanos analizados.

<u>N° control</u>	<u>Controles sanos WT1/ABL</u>	<u>N° paciente</u>	<u>Fase crónica WT1/ABL</u>	<u>N° paciente</u>	<u>Fases avanzadas WT1/ABL</u>
1	$1,25 \times 10^{-08}$	1	$4,79 \times 10^{-06}$	13	$3,00 \times 10^{-02}$
2	$2,40 \times 10^{-08}$	2	$1,46 \times 10^{-05}$	14	$6,00 \times 10^{-02}$
3	$8,50 \times 10^{-08}$	3	$1,65 \times 10^{-05}$	15	$9,00 \times 10^{-02}$
4	$5,00 \times 10^{-07}$	4	$2,00 \times 10^{-05}$	16	$1,90 \times 10^{-01}$
5	$5,80 \times 10^{-08}$	5	$2,41 \times 10^{-05}$	17	$1,31 \times 10^{-01}$
6	$2,10 \times 10^{-08}$	6	$2,95 \times 10^{-05}$	18	$9,00 \times 10^{-02}$
7	$8,00 \times 10^{-08}$	7	$3,75 \times 10^{-05}$	19	$6,00 \times 10^{-02}$
8	$5,50 \times 10^{-08}$	8	$4,31 \times 10^{-05}$	20	$5,27 \times 10^{-03}$
9	$2,10 \times 10^{-08}$	9	$5,09 \times 10^{-05}$	21	$1,90 \times 10^{-01}$
10	$9,60 \times 10^{-07}$	10	$2,39 \times 10^{-04}$	22	$1,70 \times 10^{-01}$
		11	$7,64 \times 10^{-04}$	23	$1,87 \times 10^{-05}$
		12	$2,88 \times 10^{-03}$	24	$9,92 \times 10^{-03}$
X ± ES=	$8,73 \times 10^{-8} \pm 4,68 \times 10^{-8}$	X ± ES=	$3,44 \times 10^{-4} \pm 2,39 \times 10^{-4}$	X ± ES=	$1,84 \times 10^{-1} \pm 1,04 \times 10^{-1}$

Fecha ingreso de muestra	sexo / edad	Material	Fase LMC	Fecha Diagnostico	WT1/ABL < 1,82x 10 ⁻²	BCR-ABL / ABL	Tiempo trat. anteriores (meses)	Dosis (mgr) / Tiempo Tratamiento Imatinib (meses)	Citogenetico	Respuesta Citogenética	Respuesta Hematológica	FISH	Respuesta Molecular BCR/ABL
28/11/05	F/73	sp	FC	01/04/2004	4,79E-06	8,60E-01	-	400 - (4)	46,XX,[9,22][41%]/46,XX[59%]	RCMe	RHC	1,00%	RMN
10/08/06	F/47	sp	FC	03/11/2000	1,46E-05	1,11E+00	-	600 - (31)	46,XX,[9,22][100%]	RCN	RHC	25,00%	RMN
10/11/05	F/67	sp	FC	21/05/2004	1,65E-05	3,36E-05	-	500 - (17)	46,xx [100%]	RCC	RHC	0,00%	RMC
03/11/06	M/46	mo	CB	21/09/2006	1,87E-05	2,40E-01	-	800 - (1)	46,XY,[9,22][90%]/46,XY[10%]	RCN	RHP	58,00%	RMN
29/08/06	F/18	sp	FC	01/06/2005	2,10E-05	2,36E-06	-	400 - (12)	46,XX [100%]	RCC	RHC	1,00%	RMC
11/06/07	M/29	sp	FC	02/12/2006	2,41E-05	1,30E-01	-	600 - (5)	46,XY,[9,22][78%]/46,XY[22%]	RCMe	RHP	50,00%	RMN
16/06/07	F/48	sp	FC	01/06/2004	2,95E-05	1,83E-06	-	400 - (24)	46,XX [100%]	RCC	RHC	1,00%	RMC
04/10/06	F/45	sp	FC	01/06/2004	3,75E-05	1,80E-11	-	400 - (24)	46,XX [100%]	RCC	RHC	1,00%	RMC
15/09/06	F/68	mo	FC	05/12/2001	4,31E-05	5,23E-05	HU/INFARA-C (19)	400 - (39)	46,XY,[9,22][42%]/46,XY[58%]	RCMe	RHC	1,50%	RMC
16/11/05	M/47	sp	FC	13/02/2002	5,09E-05	8,00E-02	HU/INF (25)	600 - (20)	46,XX,[9,22][20%]/46,XX[80%]	RCMa	RHC	14,00%	RMN
28/09/06	F/66	sp	FC	20/04/2005	2,39E-04	7,73E-08	-	400 - (17)	46,XX [100%]	RCC	RHC	1,00%	RMC
08/08/06	F/62	sp	FA	27/05/2005	7,64E-04	9,80E-01	HU - (2)	800 - (13)	46,XX,[9,22][40%]/46,XX[60%]	RCMe	RHP	10,00%	RMN
WT1/ABL > 1,82x 10⁻²													
11/06/07	F/63	sp	FC	01/06/2000	2,88E-03	4,89E-05	TMO 03/04/02	-	46,XX [100%]	RCC	RHC	1,00%	RMC
11/04/07	M/38	sp	FA	02/04/2002	5,27E-03	2,70E-01	INF (50)	800 - (11)	46,XY,[9,22][100%]	RCN	RHP	84,00%	RMN
01/11/05	M/20	mo	FA	01/09/1992	9,92E-03	7,02E-05	-	600 - (40)	46,XY,[9,22][100%]	RCN	RHP	92,00%	RMN
24/11/05	F/69	sp	CB	10/12/2003	3,00E-02	3,50E-01	HU/INF (7)	800 - (7)	46,XX,[9,22][100%]	RCN	RHP	8,00%	RMN
13/02/06	F/62	sp	CB	01/09/1993	6,00E-02	3,79E+00	BU/HU/INF (104)	800 - (48)	46,XX,[9,22][100%]	RCN	RHP	92,00%	RMN
10/05/07	F/48	sp	FA	01/06/2001	6,00E-02	3,00E-02	Actual Dasatinib	400 - (24)	46,XX,[9,22][30%]/47,XX,[9,22][70%]	RCN	RHP	92,00%	RMMin
01/12/05	F/68	sp	FA	03/12/2004	9,00E-02	7,13E-04	-	600 - (12)	46,XX,[9,22][19%]/16,XX[81%]	RCMa	RHP	1,00%	RMC
15/07/07	M/65	sp	FA	01/07/2006	9,00E-02	3,00E-02	-	600 - (12)	47,XY,[9,22]+8[30%]/46,XY[70%]	RCMa	RHC	12,00%	RMN
16/02/07	M/39	sp	CB	03/03/2005	1,70E-01	0,00E+00	-	400 - (24)	46,XY,[9,22][85%]/46,XY[15%]	RCMe	RHP	54,00%	RMN
18/10/06	M/44	sp	CB	20/06/2002	1,90E-01	1,21E-03	INF (26)	600 - (27)	46,XY,[9,22][30%]/47,XY,[9,22][70%]	RCN	RHP	91,00%	RMN
08/05/07	M/64	sp	FC	26/06/2003	1,90E-01	1,10E-01	INF (4)	800 - (30)	46,XY,[9,22][100%]	RCN	RHP	35,00%	RMN
08/03/06	M/24	sp	CB	09/03/2005	1,31E+00	1,50E-01	-	400 - (12)	46,XY,[9,22][25%]/46,XY[85%]	RCMa	RHP	4,80%	RMN

Aclaraciones:

Las muestras se agruparon de acuerdo al valor WT1/ABL menor o mayor a la mediana: 1,82 x10⁻³

Los datos citogenéticos y hematológicos corresponden a la fecha de ingreso de muestra

sp: sangre periférica, mo: médula osea

FC: Fase crónica, FA: Fase Acelerada, CB: Crisis blástica

HU: Hidroxiurea, INF: Interferón, ARA-C: Citarabina

RCC: Respuesta Citogenética Completa (0% Ph)

RCMa: Respuesta Citogenética Mayor (< 35% Ph)

RCMe: Respuesta Citogenética Menor (> 35% Ph)

RCN: Respuesta Citogenética Nula (100% Ph)

RHC: Respuesta Hematológica Completa

RHP: Respuesta Hematológica Parcial

RMN: Respuesta Molecular Nula

RMMin: Respuesta Molecular Mínima

RMC: Respuesta Molecular Completa

Con los datos obtenidos en esta tabla se realizaron los estudios estadísticos graficados en la figura 4.6, mostrando la cuantificación relativa promedio del WT1/ABL, de los controles sanos, pacientes en fase crónica y en fase avanzada. Puede apreciarse que el valor de las medias de las relaciones de los transcritos de pacientes diagnosticados en fase avanzada (acelerada y crisis blástica) están en niveles de cuatro logaritmos por encima de los obtenidos en fase crónica. Del mismo modo la media de los transcritos WT1/ABL en muestras de pacientes en fase crónica están aproximadamente tres logaritmos por encima de los controles sanos.

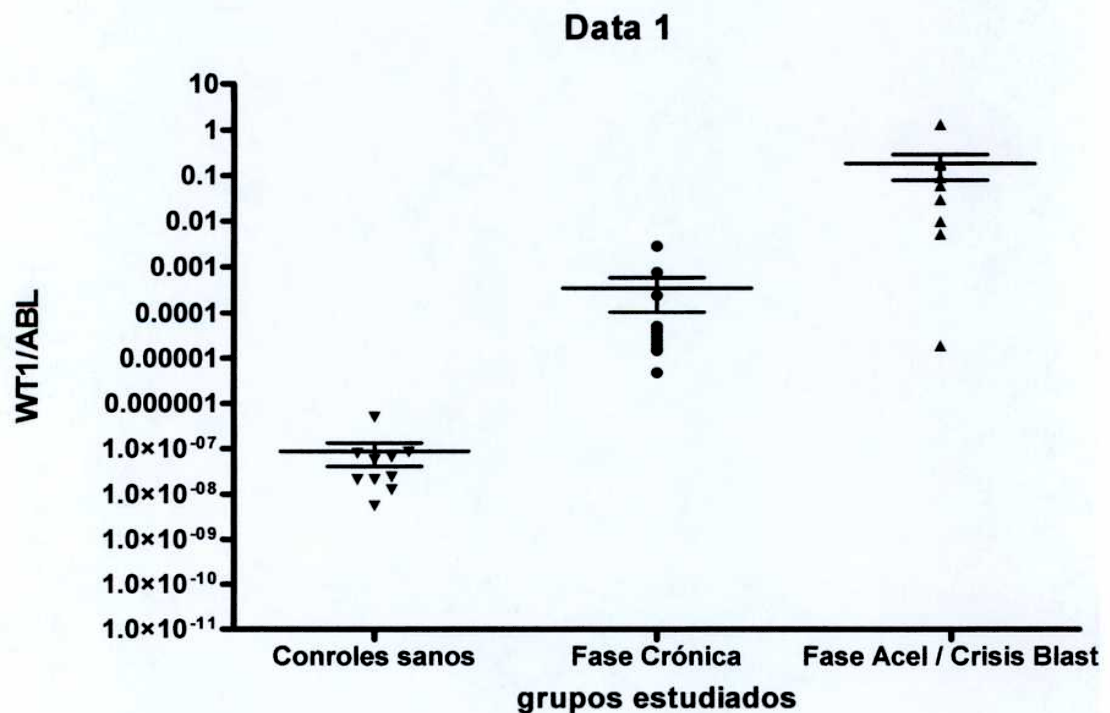


Figura 4.6: Relación WT1/ABL

Controles sanos :

Fase crónica:

Fases Aceleradas:

$$X \pm ES : 8,73 \times 10^{-8} \pm 4,68 \times 10^{-8} (*)$$

$$X \pm ES : 3,44 \times 10^{-4} \pm 2,39 \times 10^{-4} (*)$$

$$X \pm ES : 1,84 \times 10^{-1} \pm 1,04 \times 10^{-1} (*)$$

(*) ($p < 0,05$)

La cuantificación relativa del WT1/ABL mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tres grupos analizados aplicando el test de ANOVA corregido por el test estadístico de Kruskal-Wallis. Lo cual indica que la cuantificación del gen WT1 podría ser utilizada como un marcador de progresión tumoral.

4.4 Correlación de WT1/ABL con otras características clínicas

Se determinó la mediana (1.82×10^{-3}) de los valores de las relaciones WT1/ABL, a los efectos de definir un punto de corte entre valores bajos y altos de expresión de WT1 en las muestras analizadas.

Cuando analizamos la fase de la enfermedad y el nivel de transcritos de WT1, observamos que el 83% (10/12) de los casos en fase acelerada y blástica de la enfermedad presentaban altos niveles de WT1 mayor al valor de punto de corte 1.82×10^{-3} , mientras que en los casos en fase crónica, el 83% (10/12) presentaban niveles de WT1 por debajo del punto de corte.

Además se compararon los siguientes datos clínicos de los pacientes: edad, sexo, tiempo de tratamiento con imatinib, respuesta molecular y citomolecular (FISH) con el nivel de transcrito, aplicando el test de Chi cuadrado χ^2 (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 : Porcentaje de pacientes con valores WT1/ABL > 0 o $< 1,82 \times 10^{-3}$ versus datos clínicos de los pacientes.

<u>Datos Clínicos</u>		<u>WT1/ABL</u> <u>$> 1,82 \times 10^{-3}$</u>		<u>WT1/ABL</u> <u>$< 1,82 \times 10^{-3}$</u>		<u>p</u>
		<u>n</u>	<u>(%)</u>	<u>n</u>	<u>(%)</u>	
fase de la enfermedad	Fase Avanzada	10	83%	2	17%	0,001 s
	Fase Crónica	2	17%	10	83%	
		12	100%	12	100%	
Edad de los pacientes	> 60	3	25%	2	17%	0,615 ns
	< 60	9	75%	10	83%	
		12	100%	12	100%	
Sexo	masculino	7	58%	3	25%	0,097 ns
	femenino	5	42%	9	75%	
		12	100%	12	100%	
Tratamiento con Imatinib	> a 2 años	6	50%	4	33%	0,408 ns
	< a 2 años	6	50%	8	67%	
		12	100%	12	100%	
Respuesta Molecular	Nula ó Mínima	11	92%	6	50%	0,025 s
	Completa	1	8%	6	50%	
		12	100%	12	100%	
FISH (% núcleos interfásicos BCR/ABL+)	BCR-ABL (+) > 1,5 %	11	92%	4	33%	0,003 s
	BCR-ABL (-) < 1,5 %	1	8%	8	67%	
		12	100%	12	100%	

La correlación entre los niveles de transcripto WT1 y los diferentes datos clínicos de la población estudiada mostró que:

Los rangos de edad (18-59 años y 60-73 años), el sexo, y la duración del tratamiento con Imatinib (de 1-23 meses y 24-48 meses) con dosis desde 400 mg. a 800 mg, no mostraron diferencias significativas respecto a los niveles de WT1, indicando que la expresión de WT1 no varía con los parámetros mencionados. Mientras que la fase de la enfermedad (avanzada o crónica), la respuesta molecular (mayor o menor a 3 log de reducción de BCR-ABL) y la respuesta citomolecular por FISH (mayor o menor a 1,5%

de núcleos interfásicos BCR-ABL positivos) evidenciaron diferencias significativas ($p < 0.05$) respecto a los niveles de WT1 indicando que la expresión de este transcripto muestra una muy buena correlación con progresión de la enfermedad. Cuando se realizó el test de independencia χ^2 entre la fase de la enfermedad con respecto a la respuesta molecular y/o FISH, las variables no resultaron independientes; $p = 0.0009$ y $p = 0.012$ respectivamente.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN:

WT1 es un gen supresor tumoral (localizado en el cromosoma 11q13 asociado a tumor de Wilms) cuyo producto génico codifica para un factor de transcripción del tipo *zinc finger*. A diferencia de otros genes supresores, WT1 se expresa en un número limitado de tejidos, principalmente en etapas tempranas de la formación del sistema genitourinario (Brieger J. 1995, Kreuzer KA. 2001).

En médula ósea normal y sangre periférica WT1 se expresa en muy bajo nivel, sin embargo numerosos estudios han demostrado que WT1 esta consistentemente sobreexpresado en la mayoría de las neoplasias hematológicas. (Cilloni D, 2002/2003; Kreuser KA, 2001; Ogawa H, 2003).

Para demostrar el rol de la proteína WT1 en los procesos de diferenciación celular, se han utilizado oligonucleótidos antisentido en líneas celulares leucémicas con el propósito de silenciar la expresión de WT1. La menor expresión de WT1, indujo la diferenciación celular, seguida de apoptosis, sugiriendo que WT1 bloquea la diferenciación de precursores hematopoyéticos celulares e interviene en la leucemogénesis (Elmaagacli AH, 2005).

También se ha investigado la proteína WT1 como potencial blanco molecular para la inmunoterapia en leucemias y otras clases de tumores, incluidos el de pulmón y cáncer de mama. Estos estudios han demostrado que péptidos sintéticos de WT1 sensibilizan linfocitos T humanos permitiéndoles reconocer células leucémicas. (Sugiyama H, 2002).

Trabajos previos muestran que el aumento en la expresión del transcripto WT1 en la mayoría de los pacientes con LMC estaría gatillado, al menos en parte,

por el aumento de la actividad tirosina kinasa del BCR-ABL. En estos experimentos, la transfección del constructo BCR-ABL en células con muy baja expresión de WT1, demostró ser capaz de inducir una sobreexpresión de WT1. Esto se confirma en cultivos celulares de líneas leucémicas en presencia de imatinib, donde se restauran los niveles normales de expresión de WT1 (Cilloni D., 2002).

Sin embargo este no es el único mecanismo de activación del WT1, dado que este incremento también se observó en leucemias mieloblásticas y linfoblásticas agudas donde no se observa el reordenamiento BCR-ABL (Nakao M.,1996; Cilloni D., 2002).

Estudios en LMC muestran que los niveles elevados de WT1, son más predictivos de recaída que la cuantificación del reordenamiento BCR-ABL, indicando que los niveles de mRNA de WT1 representan un marcador útil para el monitoreo molecular. Niveles altos de WT1 anticipan el ingreso a fases más agresivas de la enfermedad. Esto corrobora que aquellos pacientes con altos niveles de WT1 tienen una menor frecuencia de remisión completa si los comparamos con aquellos con bajos o indetectables niveles de expresión de WT1 (Inoue K. 1994, Bergmann L. 1997).

En otros estudios se compararon los niveles de ambos transcritos BCR-ABL y WT1, tanto en pacientes respondedores como no respondedores al tratamiento con imatinib; se ha observado que existe una disminución de hasta 3 logaritmos, en los niveles de transcripto WT1 en los pacientes respondedores versus los no respondedores, mientras que los niveles de transcripto BCR-ABL muestran menor variación entre ambos grupos a lo largo del seguimiento. La diferencia observada en los niveles de los transcritos BCR-ABL y WT1 entre los grupos de respondedores y

no respondedores podría deberse a que WT1 es predominantemente expresado en precursores hematopoyéticos, y su expresión disminuye durante la diferenciación celular, mientras el BCR-ABL se expresa tanto en células diferenciadas como no diferenciadas (Na IK, 2005).

Otros estudios en LMC han demostrado que la expresión de WT1 se incrementa en forma paralela con la progresión clínica de la enfermedad, los niveles de expresión en células leucémicas obtenidas de sangre periférica son aproximadamente 10^3 veces mas altos que en células normales de médula ósea y 10^5 veces mas alto que en células normales de sangre periférica, en las fases más agudas de la enfermedad (Ionue K ,1996).

Teniendo en cuenta lo expresado, en este trabajo nos propusimos determinar si los niveles de expresión de WT1 en pacientes con LMC difieren en las diferentes fases de la enfermedad y analizar su correlación con la respuesta molecular y citomolecular.

Para realizar este estudio se seleccionó un número de muestras de ARN de archivo provenientes de pacientes con LMC tratados con imatinib en diferentes fases de la enfermedad. Se cuantificaron los transcritos WT1 optimizando las condiciones metodológicas a fin de obtener una eficiencia similar entre los primers usados en la determinación del gen ABL y WT1.

Nuestros datos muestran que inicialmente la alta expresión de mRNA WT1 está significativamente asociada a un peor pronóstico, los individuos normales tienen bajos niveles de expresión WT1/ABL en el orden de 10^{-8} , pacientes en etapas crónicas en el orden de 10^{-4} , y pacientes en etapas avanzadas, en el orden de 10^{-1} . Esto indica que su expresión se va incrementando en la medida que los pacientes

ingresan a las etapas más agresivas de la enfermedad, correspondiéndose con el aumento del porcentaje de núcleos interfásicos BCR-ABL positivos determinados por FISH y con la expresión BCR-ABL determinada por qRT-PCR. El aumento de la expresión de WT1 observado en nuestro estudio respecto de controles, también fue descrito por Cilloni D.(2002), en leucemias agudas, donde ha demostrado un incremento de al menos tres logaritmos respecto de su contraparte normal. Esta diferencia entre las células leucémicas y las normales permite pronosticar evolución de la enfermedad, asociándose con alto número de blastos y falta de diferenciación.

En este trabajo, la relación de WT1/ABL obtenidas en cada una de las muestras analizadas se ordenaron de mayor a menor y se determinó la mediana ($1,82 \times 10^{-3}$) a fin de definir un punto de corte que permitiera dividir los valores en altos y bajos niveles de WT1, para realizar correlaciones con parámetros clínicos y genéticos. Nuestros resultados muestran que los altos niveles de expresión de WT1 se asocian significativamente ($p < 0,05$) a fases avanzadas de la enfermedad, respuestas moleculares mínimas o nulas y altos niveles de núcleos BCR-ABL positivos por FISH. Las restantes variables analizadas (edad, sexo y duración del tratamiento con imatinib) no mostraron diferencias significativas.

Consideramos que la caracterización molecular de la sobre expresión de WT1 es de importancia en la evaluación de la respuesta al tratamiento que se está aplicando, dado que los pacientes con altos niveles de WT1 podrían ser incluidos en otros esquemas terapéuticos, establecer diagnósticos tempranos que impidan la recaída, y utilizar otros protocolos de tratamiento. Los resultados de este proyecto de investigación son de importancia en el campo de la oncohematología pues están dirigidos a determinar si existe una asociación entre el nivel de los transcritos WT1 y

la evolución de la enfermedad. Nuestro análisis muestra que este gen podría constituir un marcador molecular tumoral de importancia pronóstica en LMC, lo cual debería ser confirmado con estudios prospectivos incluyendo mayor número de pacientes.

6. Conclusiones:

- El nivel de expresión de WT1 muestra un incremento de tres logaritmos en fase avanzada con respecto a la fase crónica.
- El transcripto BCR-ABL, el porcentaje de núcleos interfásicos Ph (+) y la expresión del transcripto WT1 se correlacionan positivamente.
- El aumento de la relación WT1/ABL está asociada con evolución de la enfermedad.
- La cuantificación de WT1 permitirá determinar grupos de riesgo, comportándose como un marcador biológico de progresión tumoral.



Dra. IRENE LARRIPA
JEFE DEL DPTO. DE GENÉTICA
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA

7 Referencias Bibliográficas:

1. Akasaka Y, Kikuchi H, Nagai T, Hiraoka N, et al: **A point mutation in a sporadic Wilms tumor without genitourinary abnormalities is identical with the most frequent mutation in Denys-Drash syndrome** FEBS Lett 1993; 317: 39-43.
2. Braid PN, Simmons PJ. **Expression of the Wilms Tumor gene (WT1) in normal hemopoieses.** Exp Hematol 1997; 25: 312-320.
3. Baragán E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, et al: **Prognostic implications of Wilms tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia.** Hematologia 2004; 89: 926-933
4. Bergmann L, Miething C, Maurer U, Brieger J, et al: **High levels of Wilms' tumor gene mRNA in acute myeloid leukemias are associated with a worse long-term outcome.** Blood 1997; 90:1217-25.
5. Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, et al: **Wilms' Tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring.** Leukemia 2006; 2: 254-63.
6. Branford S, Rudzki Z, Parkinson I, Grigg A, et al: **Real Time quantitative PCR analysis can be used as a primary screen to identify patients with CML treated with imatinib who have BCR-ABL kinase domain mutations.** Blood 2004; 104: 2926-2932.
7. Brieger J, Weidmann E, Maurer U, et al : **The Wilms' Tumor gene is frequently expressed in acute myeloblastic leukemias and may provide a marker for residual blast cells detectable by PCR.** Ann Oncol 1995; 8: 811-6.
8. Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, et al: **Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus.** Cell 1990; 60: 509-520.
9. Cilloni D, Gottardi E, de Micheli D, et al: **Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients.** Leukemia 2002; 16:2115-21.
10. Cilloni D, Saglio G : **Usefulness of Quantitative Assessment of Wilms Tumor Suppressor Gene Expression in Chronic Myeloid Leukemia Patients undergoing Imatinib Therapy.** Seminars in Hematology: 2003 vol 40 N° 2, 37-41.
11. Cilloni D, Mesa F, Gottardi E, Fava M, et al: **Sensitivity to Imatinib Therapy may be predicted by testing Tumor Gene Expression and colony growth after a short in vitro incubation.** Cancer 2004; 101: 979-988.
12. Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian H. **Chronic Myelogenous Leukemia: A Review.** Am J Med 1996; 100: 555.
13. Cross NCP, Lin F, Chase A, et al. **Competitive PCR to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation.** Blood 1993; 82: 1929-1936.
14. Dalloso AR, Sohn RL, Buckler AJ, Pelletier J, et al: **Alternative splicing and genomic structure of the Wilms tumor gene WT1.** Hum Mol Genet 2004; 13: 405-415.

15. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. **Activity Of A Specific Inhibitor Of The Bcr/Abl Tyrosine Kinase In The Blast Crisis Of Chronic Myeloid Leukemia And Acute Lymphoblastic Leukemia With The Philadelphia Chromosome.** The New England Journal Of Medicine 2001b; 344 (14): 1038-42.
16. Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R, Klein L, et al: **WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells.** Haematologica 2005, 90 (3) : 326-34.
17. Garg M, Moore H, Tobal K, Liu Yin JA, et al: **Prognostic significance of quantitative analysis of WT1 gene transcripts by competitive reverse transcription polymerase chain reaction in acute leukemia.** Haematol 2003; 123: 49-59.
18. Gessler M, Konig A, Bruns GA: **The genomic organization and expression of the WT1 gene.** Genomics 1992; 12: 807-813.
19. Gessler M, Poustka A, Cavenee W, Neve RL, et al: **Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping.** Nature 1990; 343: 774-778.
20. Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, et al. **Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22.** Cell 1984;36:93-99.
21. Guilhot F, Apperley J, Kim D, Bullorsky E, et al: **Dasatinib induces significant hematologic and cytogenetic responses in patients with imatinib-resistant or-intolerant chronic myeloid leukemia in accelerated phase.** Blood 2007,vol 109 num 10, 4143-4150.
22. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. **Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.** Biotechnology (N Y) 1993; 11: 1026-30.
23. Hosen N, Sonoda Y, **Very low frequencies of human normal CD 34+ haematopoietic progenitor cell express the Wilms Tumor gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells.** Br J. Haematol 2002; 116: 409-420.
24. Hossain A, Nixon M, Kuo M, et al: **N- terminally truncated WT1 protein with oncogenic properties overexpressed in leukemia.** JBC 2006; 10: 1074
25. Hughes TP, Morgan GJ, Martiat P, Goldman JM. **Detection of residual leukemia after bone marrow transplantation: role of PCR in predicting relapse.** Blood 1991; 77: 874-878.
26. Inoue K, Sugiyama H, Ogawa H, et al : **WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia.** Blood 1994 ; 84(9) : 3071-9.
27. Kawasaki ES, Clark SS, Coyne NY et al. **Diagnosis of chronic myelogenous and acute lymphocytic leukemias by detection of leukemia specific mRNA sequences amplified in vitro.** Proc Nat Acad Sci USA 1988, 85: 5698-5702.
28. King- Underwood L, et al: **Mutations in the Wilms Tumor gene WT1 in leukemias.** Blood 1996;87: 2171-2179.
29. Kreuzer KA, Saborowski A, Lupberger J, et al: **Fluorescent 5'-exonuclease assay for the absolute quantification of Wilms' tumor gene (WT1) mRNA: implications for monitoring human leukemias.** Br J Haematol 2001; 114:313-8.

30. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, et al: **High WT1 expression after induction therapy predicts high risk of relapse and death in pediatric acute myeloid leukemia.** *J. Clin. Oncol.* 2006; 24 :1507-15.
31. Madden SL, Cook DM, Morris JF, Gashler A, et al: **Transcriptional repression mediated by the WT1 wilms tumor gene product.** *Science* 1991; 253: 1550-3.
32. Miyagi T, Ahuja H, Kubota T, et al: **Expresión of the candidate Wilms Tumor gene. WT1 in human leukemia cells.** *Lukemia* 1993;7:970-977.
33. Morgan GJ, Hughes T, Janssen JWG, et al. **Polymerase chain reaction for detection of residual leukaemia.** *Lancet* 1989;1: 928-929.
34. Na IK, Kreuzer KA, Lupberger J, Dorken B: **Cuantitative RT-PCR of Wilms Tumor gene transcripts (WT1) for the molecular monitoring of patients with accelerated phase bcr/abl + CML.** *Leukemia Research* 2005; 29 (3) :343-345.
35. Nakagama H, Heinrich G, Pelletier J, Housman DE. **Sequence and structural requirements for high-affinity DNA binding by the WT1 gene product.** *Mol Cell Biol.* 1995. 15: 1489-1498.
36. Nakao M, Yokota S, Iwai T, et al : **Internal tandem duplications of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia.** *Leukemia* 1996; 10:1911-8.
37. Nowell PC, Hungerford DA. **A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia.** *Science* 1960;132:1499-1504.
38. Ogawa H, Tamaki H, Ikegame K, et al : **The Usefulness of monitoring WT1 gene transcripts for the prediction and management of relapse following allogenic stem cell transplantation in acute type leukemia.** *Blood* 2003; 10:1968-702.
39. Phelan SA, Lindberg C, Call KM: **Wilms' tumor gene , mRNA is down-regulated during induction of erytroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells.** *Cell Growth Differentiation* 1993; 5: 677-86.
40. Pritchard-Jones K, Fleming S, Davidson D, Bickmore W, et al: **The candidate Wilms tumor gene is involved in genitourinary development.** *Nature* 1990; 346 :194-7.
41. Rauscher FJ 3rd: **Tumor suppressor genes which encode transcriptional repressors.** *Adv Exp. Med.Biol* 1993. 348: 23-29.
42. Rowley Jd. **A New Consistent Chromosomal Abnomality In Chronic Myelogenous Leukemia Identified By Quinacrine Fluorescence And Giemsa Staining.** *Nature* 1973; 243: 290.
43. Scharnhorst V, Dekker P, Van Der Eb AJ, Jochemsen AG, et al: **Internal translation initiation generates novel WT1 protein isoforms with distinct biological properties.** *J Biol Chem* 1999; 274: 23456-23462.
44. Schoch C, Schnittger S, Bursch S, et al. **Comparison of chromosome banding analysis, interphase- and hypermetaphase-FISH, qualitative and quantitative PCR for diagnosis and for follow-up in chronic myeloid leukemia: a study on 350 cases.** *Leukemia* (2002) 16, 53–59.
45. Sugiyama H. : **Cancer immunotherapy targeting WT1 protein.** *Int J. Hematol* 2002; 76:127-132.
46. Valk PJ, et al: **Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia.** *New Engl. J. Med* 2004; 350: 1617-1628.
47. Wang ZY, Qiu, AA, Gurrieri M et al: **Products of alternatively spliced transcripts of the Wilms tumor suppressor gene, wt1, have altered DNA binding specificity and regulate transcription in different ways.** *Oncogene* 1995.10: 1243-1247.

48. Weissner M, W Kern, S Rauhut, C Schoch, et al: **Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during myeloid leukemia.** *Leukemia* 2005; 19: 1416-1423.
49. Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, et al: **Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 antisense oligodeoxynucleotides: Implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis.** *Blood* 1996; 87: 2878-2884.
50. Yang I, Han Y, Duarez Saiz F: **A tumor suppressor and oncogene. The WT1 story.** *Leukemia* 2007 21, 868-876.