



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Secretaría de Investigación y Posgrado
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

“**Expresión del factor de crecimiento
endotelial vascular (VEGF-A) y de su
receptor (VEGFR-2) en la leucemia
linfoblástica aguda pediátrica**”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICOBIOLOGICAS

Presenta:

AYERIM DOMÍNGUEZ CHÁVEZ

Directoras de tesis:

Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios

Dra. Mónica Moreno Galván



México, D.F. Julio 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de **México, D.F.**, el día **29** del mes de **Junio** del año **2011**, el que suscribe **Ayerim Domínguez Chávez** alumno (a) del Programa de **Maestría en Ciencias Quimicobiológicas** con número de registro **B091014**, adscrita a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, manifiesta que es autora intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios** y la **M. en C. Mónica Moreno Galván** ceden los derechos del trabajo intitulado “**Expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y de su receptor (VEGFR-2) en la leucemia linfoblástica aguda pediátrica**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **ralezama@hotmail.com** si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ayerim Domínguez Chávez

Nombre y Firma del Alumno (a)

Dra. Ruth Angélica Lezama Palacios

Nombre y Firma del Alumno (a)

M. en C. Mónica Moreno Galván

Nombre y Firma del Alumno (a)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	V
I. ANTECEDENTES	1
1. Leucemia	1
1.1 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	2
1.1.2 Clasificación inmunofenotípica	3
1.1.3 Factores pronóstico	4
2. Angiogénesis	5
3. Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	8
3.1 Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1)	10
3.2 Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2)	11
3.3 Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3)	11
4. Funciones pato-fisiológicas del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el microambiente de la médula ósea	12
5. Angiogénesis en enfermedades hematológicas	13
II. JUSTIFICACIÓN	15
III. HIPÓTESIS	15
IV. OBJETIVOS	16
V. MATERIAL Y MÉTODOS	17
1. Estrategia general	17
2. Tipo de estudio	18

3. Población de estudio	18
4. Criterios de inclusión	19
5. Criterios de exclusión	19
6. Criterios de eliminación	19
7. Análisis de VEGF-A y VEGFR-2 por RT-PCR en tiempo real	19
8. Cuantificación de VEGF-A y VEGFR-2 por el método de ELISA	22
9. Análisis estadístico	22
VI. RESULTADOS	23
Descripción de la población	23
Determinación del mRNA de VEGF-A	24
Determinación de la proteína VEGF-A	26
Determinación del mRNA de VEGFR-2	27
Determinación de la proteína VEGFR-2	29
VII. DISCUSIÓN	31
VIII. CONCLUSIONES	34
IX. BIBLIOGRAFÍA	35
ANEXOS	
Apéndice 1	40
Apéndice 2	41
Apéndice 3	43
Apéndice 4	44
Apéndice 5	45
Apéndice 6	46

ABREVIATURAS

Ang – 1, -2	Angiopoyetina-1, -2
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
ct	Ciclos requeridos para alcanzar el umbral
CEs	Células endoteliales
EGF	Factor de crecimiento epidermal
HIF-1	Factor de hipoxia inducible -1
IL-1	Interleucina – 1
IL-6	Interleucina – 6
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
MDR	Resistencia a drogas múltiples
NO	Óxido nítrico
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
TGF- α	Factor de crecimiento transformante – α
TGF- β	Factor de crecimiento transformante – β
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
VEGFR	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

RESUMEN

La Leucemia linfoblástica aguda es el tipo más común de cáncer infantil; constituye la segunda causa de muerte en niños mexicanos de entre uno y 14 años. Al igual que en los tumores sólidos, se sugiere que la diseminación de células malignas en enfermedades hematopoyéticas tiene una asociación con un incremento en la expresión de factores angiogénicos. Dentro de ellos el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus receptores (VEGFR) se han sugerido como principales biomarcadores para el seguimiento y pronóstico de pacientes con leucemia. Por esta razón, en el presente estudio se evaluó a VEGF-A y VEGFR-2 en pacientes pediátricos con LLA.

Se seleccionaron 28 pacientes pediátricos con diagnóstico nuevo de LLA y sin tratamiento; se realizaron 3 tomas: antes del tratamiento, y a los 15 y 30 días con tratamiento. A partir de sangre periférica se obtuvo RNA y realizó RT-PCR en tiempo real para medir la expresión de VEGF-A y VEGFR-2. La cuantificación en plasma de las proteínas VEGF-A y VEGFR-2 se realizó mediante la prueba de ELISA. El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 15, se incluyó la prueba U de Mann-Whitney y comparación de medias.

De los 28 pacientes analizados, 14 fueron mujeres y 14 hombres, con una edad mínima de 2 meses y máxima de 14 años; la media obtenida en la expresión del VEGF-A en el día 0 fue de 27.74, las medias obtenidas en los días 15 y 30 fueron de 10.26 y 9.55 respectivamente; en la expresión de VEGFR-2 las medias obtenidas fueron de 64.15 (día 0), 78.43 y 111.56 (días 15 y 30). Con respecto a la cuantificación de las proteínas, las medias obtenidas fueron en VEGF-A de 371.11, 320.81 y 419.71 (día 0, 15 y 30 días); y en VEGFR-2 fueron de 432.86, 415.89 y 468.39 (día 0, 15 y 30 días). Dos pacientes presentaron recaída. Cuatro pacientes fallecieron después del día 30, en dos de ellos no hubo disminución de VEGF-A y VEGFR-2 en el día 15 y 30.

En la mayoría de los pacientes se presenta una correlación entre la expresión génica con la proteína. En la expresión génica y cuantificación proteica, hay diferencias del ligando (VEGF-A) con su receptor (VEGFR-2). Se sugiere una relación entre los niveles de mRNA y la proteína de VEGF-A con el pronóstico de la enfermedad.

ABSTRACT

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the principal childhood cancer. It represents the second mortality cause in Mexican childhood between one and 14 years old. Similarly to solid tumor growth, it has been suggested an association between the expansion of malignant cells in hematopoietic diseases with an increase expression of angiogenic factors. This includes: the vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptor (VEGFR) which have been suggested as prognostic biomarkers in leukemic patients. For these reasons, the present study analyzed the expression of VEGF-A and VEGFR-2 in ALL in pediatric patients

28 pediatric patients with newly diagnosed ALL were selected. A blood sample was analyzed at three different times, first at the beginning of the diagnosis (without treatment), 15 and 30 days post-treatment. RNA was obtained and a real time RT-PCR for VEGF-A and VEGFR-2 was done. The VEGF-A and VEGFR-2 protein in plasma were measured by ELISA. The results were analyzed using the U test of Mann-Whitney and comparison of means.

A total of 28 patients were studied, 14 were women and 14 men, with a minimum age of 2 months and a maximum of 14 years old, the mean gene expression for VEGF-A on day 0 was 27.74, and the means obtained in 15 and 30 days with treatment were 10.26 and 9.55 respectively; in the expression of VEGFR-2 gene the mean obtained was 64.15 (day 0, untreated), 78.43 and 111.56 (15 and 30 with treatment). With regard to the quantification of proteins, the means obtained were VEGF-A 371.11, 320.81 and 419.71 (day 0, 15 and 30 days with treatment). Two patients relapsed; four patients died after day 30, two of them there was no decrease of VEGF-A and VEGFR-2 on day 15 and 30.

We suggest a correlation between gene expressions with the protein and a relationship between levels of mRNA and protein VEGF-A with the prognosis of the disease.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades asociadas con la angiogénesis patológica	7
Tabla 2. Resumen de estudios de la participación de VEGF en enfermedades hematológicas	14
Tabla 3. Secuencia de iniciadores y sondas para el análisis de los genes VEGF-A y VEGFR-2 por RT-PCR tiempo real	19
Tabla 4. Características generales de los pacientes pediátricos con LLA	23
Tabla 5. Análisis estadístico de VEGF-A y VEGFR-2 en los diferentes días de las tomas	30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de linfoblastos en la leucemia linfoblástica aguda según la FAB.	3
Figura 2. Etapas de diferenciación linfoide e inmunofenotipo de células precursoras B y T en LLA infantil	4
Figura 3. Proceso de angiogénesis	8
Figura 4. Familia VEGF y sus receptores	10
Figura 5. Componentes del microambiente de médula ósea y angiogénesis tumoral	12
Figura 6. Funciones biológicas adicionales de VEGF	13
Figura 7. Diagrama de trabajo	18
Figura 8. Curvas de amplificación del gen VEGF-A	24
Figura 9. Producto de RT-PCR del gen VEGF-A	24
Figura 10. Curvas de amplificación del gen VEGFR-2	25
Figura 11. Producto de RT-PCR del gen VEGFR-2	26
Figura 12. Expresión del gen VEGF-A	27
Figura 13. Cuantificación de la proteína VEGF-A	27
Figura 14. Expresión del gen VEGFR-2	28
Figura 15. Cuantificación de la proteína VEGFR-2	29

I. ANTECEDENTES

1. Leucemia

La leucemia es una enfermedad maligna, progresiva producida por la proliferación desordenada de una célula de origen hematopoyético a nivel de médula ósea. Estas células proliferan y reemplazan a los elementos normales en todas las regiones de la médula, invaden el tejido linfoide (ganglios) y la sangre periférica, pudiendo llegar así a todos los tejidos. Dependiendo de su agresividad y grado de diferenciación de las células neoplásicas, la leucemia se clasifica en dos tipos, aguda y crónica¹.

Las leucemias agudas son desórdenes agresivos caracterizados por acumulación en la médula ósea de células malignas inmaduras de estirpe linfoide. Esta suele ser de inicio súbito y curso corto, de no lograrse la remisión, el paciente fallece a los pocos meses después del diagnóstico. Los síntomas varían según el tipo de leucemia, pero dentro de ellos pueden mencionarse la astenia, anorexia, pérdida de peso, fiebre, dolores osteoarticulares, hepatomegalia y esplenomegalia^{2, 5}.

En las leucemias crónicas, la médula ósea presenta la acumulación de células maduras, que pasan a la circulación produciendo leucocitosis. Las leucemias crónicas por lo general, son de inicio gradual y si no se produce una remisión, el paciente sobrevive más de un año después del comienzo de los síntomas². Los pacientes con leucemia crónica pueden permanecer durante años sin síntomas aparentes. Cuando la enfermedad se activa, progresa rápidamente y la persona puede presentar fatiga, anorexia, pesadez bajo las costillas del lado izquierdo, sudores nocturnos, anemia, fiebre y hemorragia^{2, 3}.

Las leucemias se clasifican de acuerdo a su evolución clínica y a la línea celular afectada así, se reconocen 4 tipos de leucemias¹:

- a) Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)
- b) Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)
- c) Leucemia Mielocítica Crónica o Granulocítica Crónica (LMC o LGC)
- d) Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

Es una proliferación maligna de células linfoides, bloqueadas en una etapa temprana de la diferenciación. La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad biológicamente heterogénea, de modo que es necesario conocer las características morfológicas, inmunológicas, citogenéticas, bioquímicas y moleculares de los linfoblastos para establecer el diagnóstico definitivo de la leucemia o para excluir otras posibles causas de falla en la médula ósea; así como, para clasificar los subtipos de LLA. Esta heterogeneidad, refleja el hecho de que la leucemia se puede desarrollar en cualquier momento durante las múltiples etapas de la diferenciación linfoide normal^{4, 5}.

En el 2008 se reportó que el cáncer constituye la segunda causa de muerte en niños mexicanos de entre uno y 14 años, después de los accidentes. Pero de entre todos los tipos de cáncer, destaca la leucemia como el tipo más frecuente entre los menores, pues representa casi la mitad de los casos; donde aproximadamente el 98% de las leucemias son agudas⁶.

En 1976, el Grupo de Trabajo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), clasificó en tres categorías morfológicas a los linfoblastos presentes en las leucemias linfoides: **linfoblastos L1** como células pequeñas caracterizadas por una alta relación núcleo-citoplasma, cromatina homogénea, nucléolos poco definidos (Figura 1A); **linfoblastos L2**, son blastos más grandes, con menor relación núcleo-citoplasma, nucléolos prominentes (a menudo con condensación de la cromatina perinuclear) y las membranas nucleares pueden ser irregulares (Figura 1B); **linfoblastos L3** de tamaño intermedio a grande, núcleo redondo, cromatina homogénea en punteado fino, citoplasma muy basófilo y destacada vacuolización citoplasmática (Figura 1C). Aproximadamente 85% de los niños con LLA tienen morfología predominante L1, 14% tiene L2 y el 1% L3^{4, 8}.

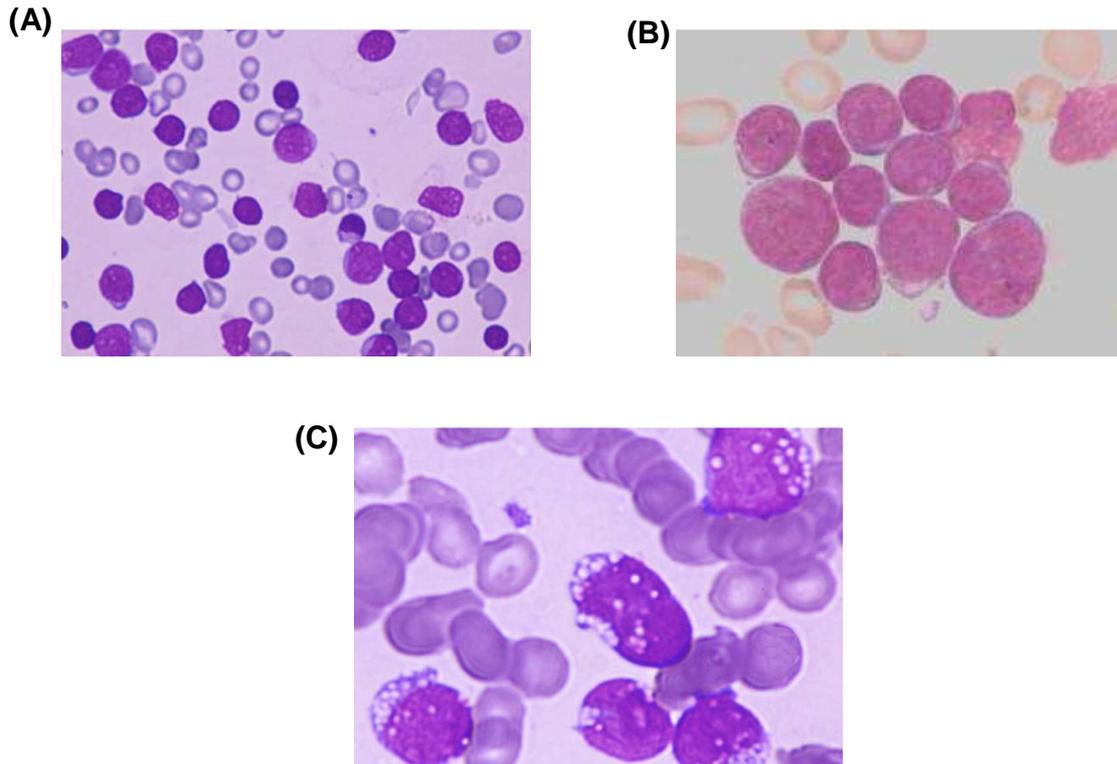


Figura 1. Tipos de linfoblastos en la leucemia linfoblástica aguda según la FAB. Se observan imágenes de médula ósea con presencia de linfoblastos L1, (A), linfoblastos L2 (B) y linfoblastos L3 (C).⁴

1.1.2 Clasificación inmunofenotípica

El estudio de los marcadores inmunológicos de superficie es de gran importancia para la clasificación de las leucemias agudas de acuerdo a su estirpe, como la LLA de linaje B o T en con base al grado de diferenciación o maduración de la clona normal B afectada, por la transformación neoplásica (figura 2); siendo en la leucemia linfoblástica infantil el inmunofenotipo pre-B el más común.^{4, 8}

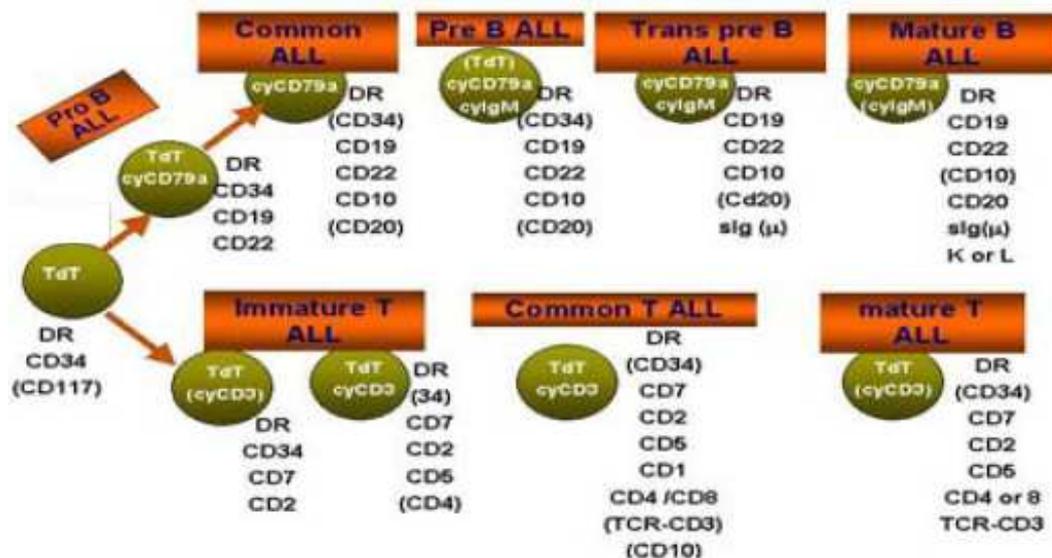


Figura 2. Etapas de diferenciación e inmunofenotipo de células precursoras B y T en LLA infantil. Muestra las moléculas de superficie que presenta la célula linfocítica durante sus diferentes fases.⁴

1.1.3 Factores pronóstico

Diversas características clínicas y de laboratorio, tienen valor pronóstico para predecir la duración de la remisión de los pacientes tratados con LLA. Sin embargo, los cambios en las estrategias de tratamiento pueden resultar en la pérdida significativa de su valor pronóstico. El avance en la tecnología, especialmente en la genética molecular, ha conducido a definir de una manera más precisa algunos factores de riesgo^{5,7}.

Diversas características clínicas se han relacionado con el pronóstico; la cuenta inicial leucocitaria se ha considerado un factor de pronóstico importante; los pacientes con una cuenta mayor que 50 000 cels/mL tienen un pobre pronóstico. También se ha implicado la edad; pues pacientes menores de 2 años y mayores de 10 años tienden a tener peor pronóstico. El inmunofenotipo también correlaciona con el pronóstico; los pacientes con LLA con inmunofenotipo de células B o T maduras tienen peor pronóstico que los pacientes con LLA de células B precursoras. Con respecto a la relación entre el subtipo morfológico y el pronóstico; el subtipo L3 (FAB) está asociado con LLA de células B maduras y conlleva a un pobre pronóstico. El subtipo L2 (FAB) también se ha asociado

con un pobre pronóstico; mientras que el subtipo L1 (FAB) se asocia con un resultado más favorable. Las anormalidades en la estructura de los cromosomas también conlleva información pronóstica importante; diversas traslocaciones cromosomales se han asociado con una tasa alta de falla en la inducción de la remisión y recaída temprana, incluyendo t(8;14), el cromosoma Filadelfia t(9;22), t(1;19), t(4;11) que ocurren frecuentemente en infantes⁴⁻⁹.

En los últimos 10 años, se ha logrado la remisión completa en más de 98% de los niños con LLA y una supervivencia libre de la enfermedad a 5 años que varía entre 81% y 88%. A pesar de la mejora significativa en el tratamiento de la LLA infantil, un grupo de pacientes no se beneficia de ella o es sobretratado con terapia convencional, lo cual plantea la urgente necesidad para identificar biomarcadores adicionales en el diagnóstico. Ello permitiría realizar una clasificación precisa de los grupos de riesgo y tratamiento más individualizado para minimizar la enfermedad recurrente^{11, 17}. Recientemente, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) se ha reportado como un importante biomarcador en enfermedades hematopoyéticas; dicho factor es clave en el proceso de formación de vasos sanguíneos (angiogénesis)^{10, 16}.

2. Angiogénesis

El desarrollo del cáncer consta de varias etapas secuenciales e interrelacionadas que llevan a la generación de una o varias clonas autónomas, con capacidad de crecimiento y sin control. Estos pasos incluyen auto señales de crecimiento y resistencia a la apoptosis, entre otras. El establecimiento y desarrollo de un tumor también requiere de eventos adicionales, que confieren la capacidad de diseminación hacia otros órganos (metástasis). Dentro de ellos, el estroma debe ser vascularizado para apoyar el crecimiento continuo y la diseminación, a este proceso se le conoce como angiogénesis^{12, 13, 15}.

La angiogénesis es un proceso que se define por la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red vascular existente. Este proceso incluye la activación de células endoteliales (CEs), degradación de la matriz extracelular, proliferación y migración

celular hacia el sitio del estímulo angiogénico. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis, la angiogénesis fisiológica y la angiogénesis patológica²⁰.

La angiogénesis fisiológica, ocurre durante la embriogénesis y continúa hasta después del nacimiento en el desarrollo temprano postnatal, para proveer de manera adecuada el oxígeno y los nutrientes requeridos por los órganos en crecimiento, además de proporcionar señales promotoras de la morfogénesis que son fundamentales en funciones como la formación de hueso endocondral y el crecimiento del esqueleto. A lo largo del desarrollo así como en la etapa adulta, la angiogénesis fisiológica ocurre únicamente en el ovario en mujeres durante la menstruación, debido a que el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares, y en la placenta durante el embarazo; también está presente en algunos de los vasos sanguíneos que permanecieron quiescentes y que pueden reactivarse durante la reparación y cicatrización de las heridas. Este mecanismo fisiológico implica una estructura y funcionamiento jerárquico bien ordenado de la vasculatura corporal^{19, 21}.

La angiogénesis patológica aparece cuando se sobrepasa el umbral entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis patológica: “angiogénesis activada” y “angiogénesis inhibida”. La primera se caracteriza por una sobreproducción de factores pro-angiogénicos (aumentando el proceso angiogénico). Por el contrario, cuando hay una mayor cantidad de inhibidores angiogénicos se produce un efecto de “angiogénesis inhibida” este proceso se asocia con mal funcionamiento de CEs, a la regresión o malformación de los vasos, además de prevenir la revascularización, cicatrización y regeneración celular^{22,23}. En la tabla 1 se muestran algunas enfermedades asociadas a la angiogénesis activa o inhibida¹⁷.

Tabla 1. Enfermedades asociadas con la angiogénesis patológica

ACTIVADA	INHIBIDA
Cáncer	Isquemia del miocardio
Hemangiomas	Isquemia periférica
Sarcoma de kaposi	Isquemia cerebral
Neovascularización ocular	
Artritis reumatoide	
Aterosclerosis	

Tomado de: Martínez, 2006

Los factores que participan en la angiogénesis, incluyen al factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), al factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), al factor de crecimiento de hepatocitos, la interleucina 6 (IL-6), al factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y al factor de crecimiento epidermal (EGF), entre otros. La angiogénesis, también incluye angiopoyetinas (Ang -1, -2) e integrinas^{24, 25}.

La angiogénesis se lleva a cabo principalmente en los siguientes pasos (figura 3):

- 1) las CEs precursoras dan origen a los vasos sanguíneos,
- 2) las CEs se ensamblan formando un laberinto vascular primitivo de capilares pequeños (vasculogénesis),
- 3) el plexo vascular se expande de manera progresiva debido al nacimiento de los vasos, el cual se remodela formando un red vascular altamente organizada de vasos grandes que se ramifican en vasos pequeños,
- 4) los canales recién formados por CEs, se cubren por pericitos y células de músculo liso, las cuales regulan la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, proporcionando resistencia y permitiendo la regulación de la perfusión de los vasos¹⁹.

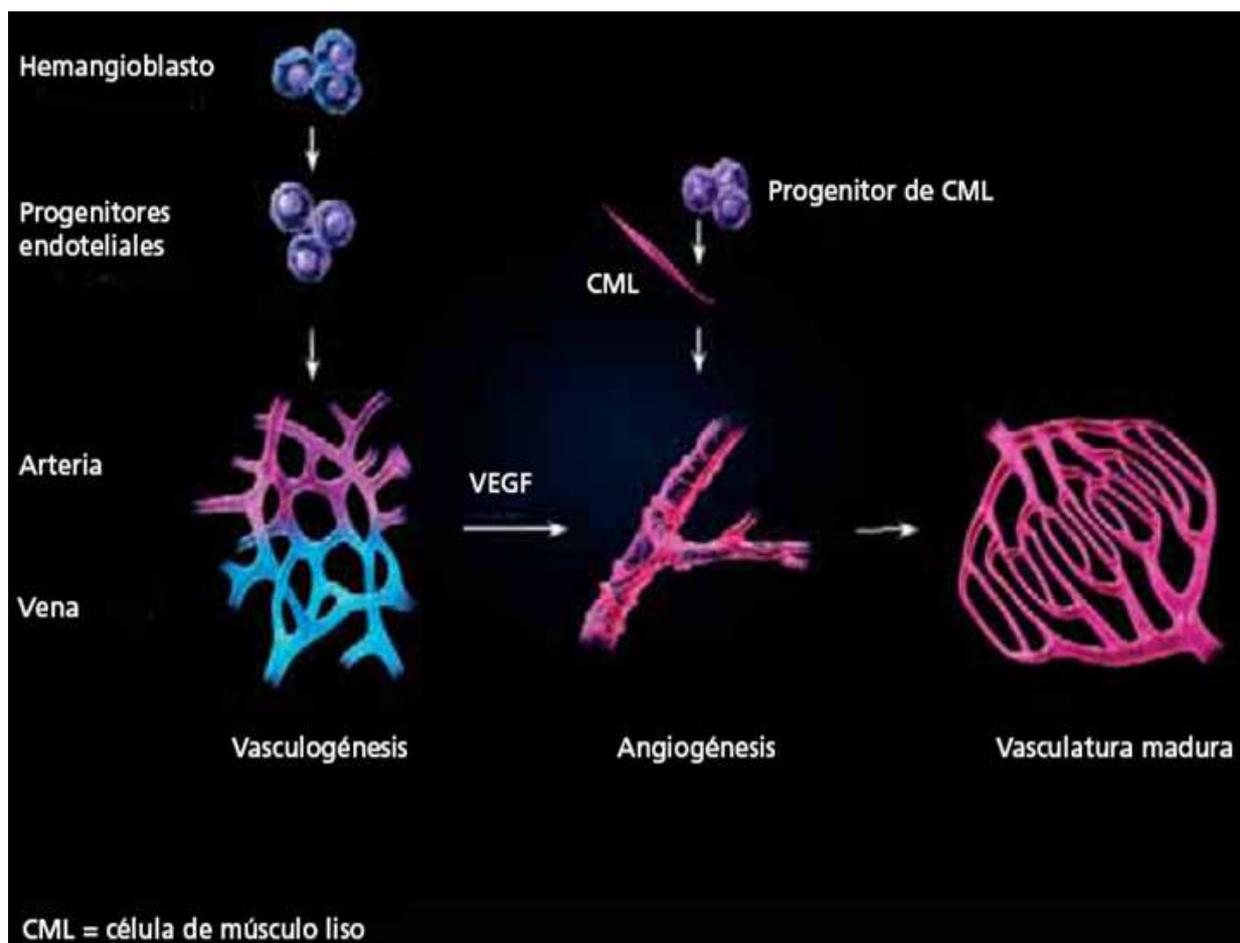


Figura 3. Proceso de la angiogénesis. Se muestra de manera general los pasos que se requieren para la formación de nuevos vasos sanguíneos.¹⁹

3. Factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF)

Es un factor de crecimiento con actividad mitogénica altamente específica para las CE; miembro de la super familia de genes VEGF-PDGF que incluye al VEGF-A, -B, -C, -D y -E, así como al factor de crecimiento de placenta (PLGF)²⁶.

Es el principal factor en la vasculogénesis durante la embriogénesis, angiogénesis fisiológica y neovascularización en enfermedades. El gen que codifica para VEGF se localiza en el brazo corto del cromosoma 6, este gen contiene ocho exones y nueve intrones. En su estado activo se encuentra formando un homodímero (40-45 kDa); la unión a su receptor es mediada por el homodímero a través de la unión del núcleo de la

proteína^{14, 18}. El proceso de señalización que resulta en la angiogénesis esta mediado por uniones de alta afinidad entre los VEGFs con receptores específicos con actividad de tirosina cinasa (RTKs)²⁸.

El VEGF se expresa en mucho tipos de cáncer humano, dicha expresión se incrementa en tumores que pueden ser originados por numerosos factores ambientales, como hipoxia principalmente por el factor inducible por hipoxia (HIF-1), pH bajo, diferentes interleucinas (IL-1, IL-6), factores de crecimiento como bFGF, factor de crecimiento endotelial (EGF), factor de crecimiento transformante α y β (TGF- α y $-\beta$) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), hormonas sexuales (andrógenos y estrógenos) y quimiocinas (factor 1 derivado de células estromales). Otras causas incluyen cambios genéticos inductivos como la activación de diferentes oncogenes (ejemplo Ras) o pérdida o inactivación mutacional de una variedad de genes supresores de tumores (p53 mutado); y óxido nítrico (NO)^{29, 30}. La unión de VEGF a su receptor VEGFR-2 conduce a una cascada de diferentes vías de señalización. Por ejemplo, a la dimerización del receptor, seguido por la activación intracelular de la vía PCLy - PKC - Raf cinasa - MEK - MAPK y subsecuentemente, la iniciación de la síntesis de DNA y el crecimiento celular; mientras la activación de la vía PI3K - Akt conduce al incremento de la supervivencia de las células endoteliales (figura 4)¹⁸.

Mediante los diferentes estímulos que aumentan la expresión del VEGF, se induce la proliferación de CEs derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos así como la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales; además, el VEGF promueve la migración celular e inhibe la apoptosis, incrementa la conductividad hidráulica de los microvasos aislados y la vasodilatación³¹. Como resultado del NO derivado de CEs, promueve la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos, participa en la vasculogénesis y linfangiogénesis³². Cuando su regulación es normal, el VEGF contribuye a la remodelación vascular durante el ciclo ovárico y la implantación embrionaria, a la cicatrización y reparación, mientras que cuando es inadecuada, este factor contribuye al desarrollo de tumores sólidos al promover la angiogénesis³³.

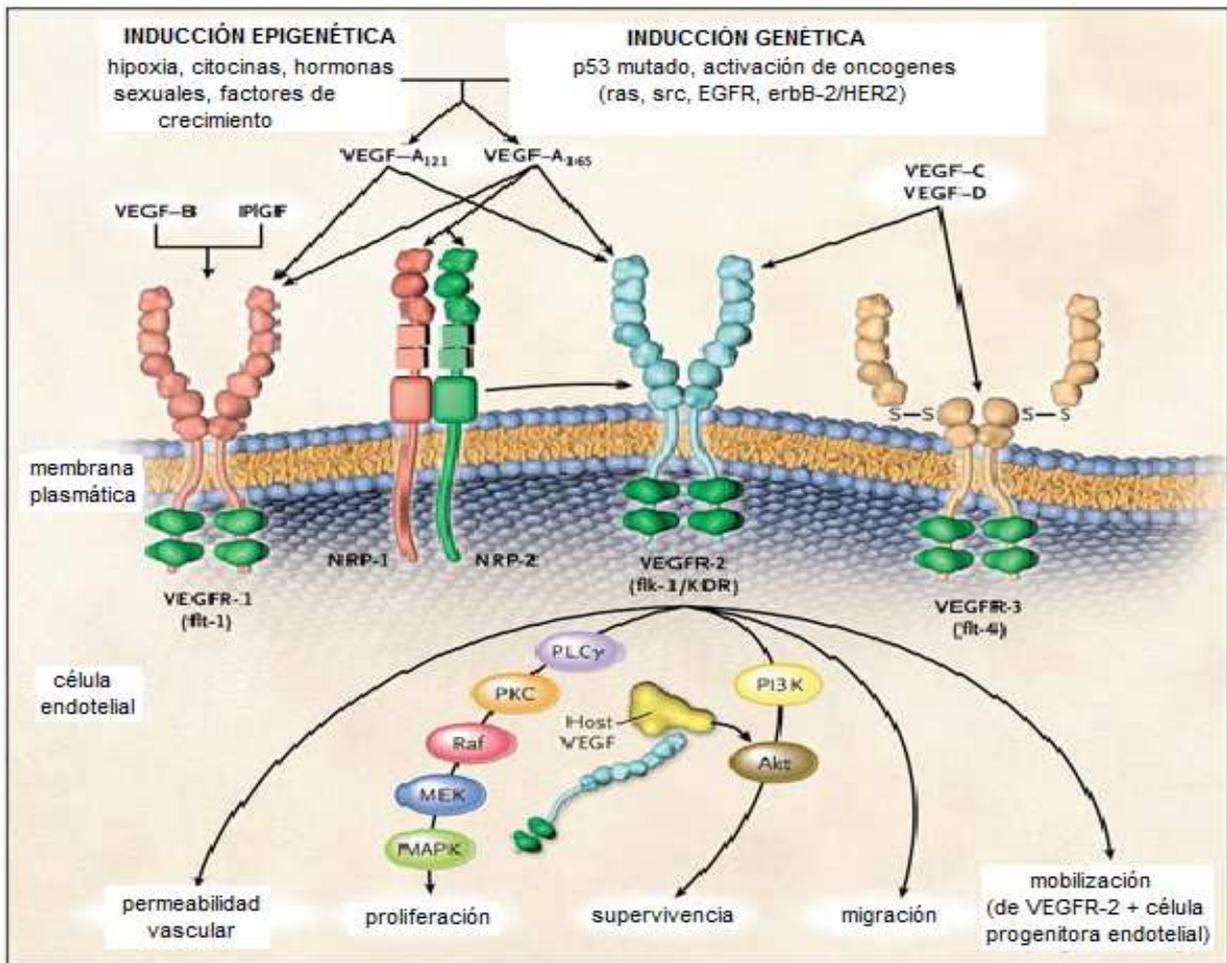


Figura 4. Familia VEGF y sus receptores. Muestra como pueden ser inducidos los diferentes VEGFs y así interactuar con sus receptores específicos que se encuentran en la superficie de células endoteliales, para desencadenar diversas vías de señalización.¹⁸

3.1 Receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-1)

Es una glicoproteína transmembranal de 180 KDa, conocida también como FLT-1, pertenece a la familia de los receptores de tirosina cinasa; se compone de siete dominios extracelulares homólogos a inmunoglobulinas, un dominio tirosina cinasa intracelular. VEGFR-1 se une a VEGF-A VEGF-B y factor de crecimiento placentario (PLGF) con elevada afinidad; por si solo transmite señales débilmente mitogénicas a las CE, también está involucrado en la movilidad celular³⁴.

VEGFR-1 se expresa en CEs así como en osteoblastos, monocitos/macrófagos, pericitos, trofoblasto de la placenta y en algunas células madre hematopoyéticas. Promueve la generación de proteasas como la metaloproteasa de matriz extracelular 9 (MMP-9), las cuales se requieren para la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos en las etapas iniciales de la angiogénesis²³.

3.2 Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-2)

Proteína de 230 KDa de la cual se conocen dos variantes funcionales producto del procesamiento del mRNA. Este receptor se une a VEGF-A y a formas maduras del VEGF-C y -D. Únicamente la forma glicosilada final del VEGFR-2 es capaz de autofosforilarse en respuesta al VEGF2³⁵.

Participa de manera crucial en la angiogénesis y la hematopoyesis, siendo el mediador mayor de los efectos mitogénico, angiogénico, actividad proliferativa y de aumento de la permeabilidad del VEGF. Se expresa principalmente en las CEs, además de células madre hematopoyéticas y megacariocitos²⁶.

3.3 Receptor 3 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-3)

Es un receptor de superficie celular tipo tirosina cinasa altamente glicosilado y relativamente estable de 180 KDa, se denomina también Flt-4; se compone de seis dominios homólogos a inmunoglobulinas, el quinto dominio se rompe proteolíticamente, poco después de la biosíntesis y las cadenas de polipéptidos resultantes, permanecen unidas a través de un enlace por puente de disulfuro²⁸.

El VEGFR-3 se une a VEGF-C y VEGF-D. En tumores sólidos como melanomas se ha observado sobre-expresión de VEGFR-3, así mismo se ha comprobado su importancia para la producción y desarrollo de nuevos vaso sanguíneos. Se expresa en las CEs vasculares durante las etapas tempranas del desarrollo, mientras que después de la

organogénesis, permanece restringido a las CEs linfáticas. Sus ligandos están involucrados en la linfangiogénesis, al igual que en la angiogénesis y migración celular²².

4. Funciones pato-fisiológicas del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en el microambiente de la médula ósea

En el microambiente de médula ósea y la angiogénesis tumoral, participa una población heterogénea de células, incluyendo a las células madre hematopoyéticas, células endoteliales, células estromales incluyendo fibroblastos, células dendríticas, macrófagos, linfocitos T, eritrocitos, células involucradas en la homeostasis ósea como son los osteoclastos, osteoblastos y células tumorales (figura 5)²⁷.

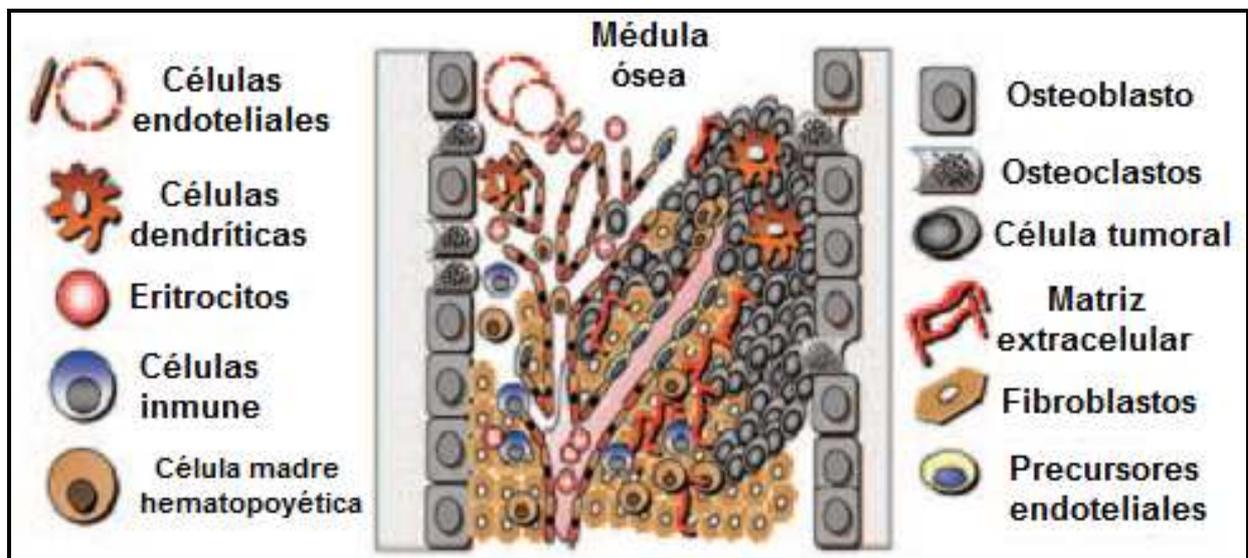


Figura 5. Componentes del microambiente de la médula ósea y angiogénesis tumoral. Muestra la diversa población de células presentes en el microambiente de la médula ósea, que participan en la angiogénesis tumoral.²⁷

Además de la angiogénesis, VEGF regula la hematopoyesis, induce la diferenciación de múltiples linajes hematopoyéticos, inhibe la maduración de células dendríticas, incrementa la actividad de resorción ósea, modula la respuesta inmune, y desencadena la diferenciación de los progenitores de las células endoteliales. En el contexto del cáncer, VEGF es un importante factor de crecimiento, migración y supervivencia por ejemplo en la leucemia y mieloma múltiple (figura 6)²⁷.

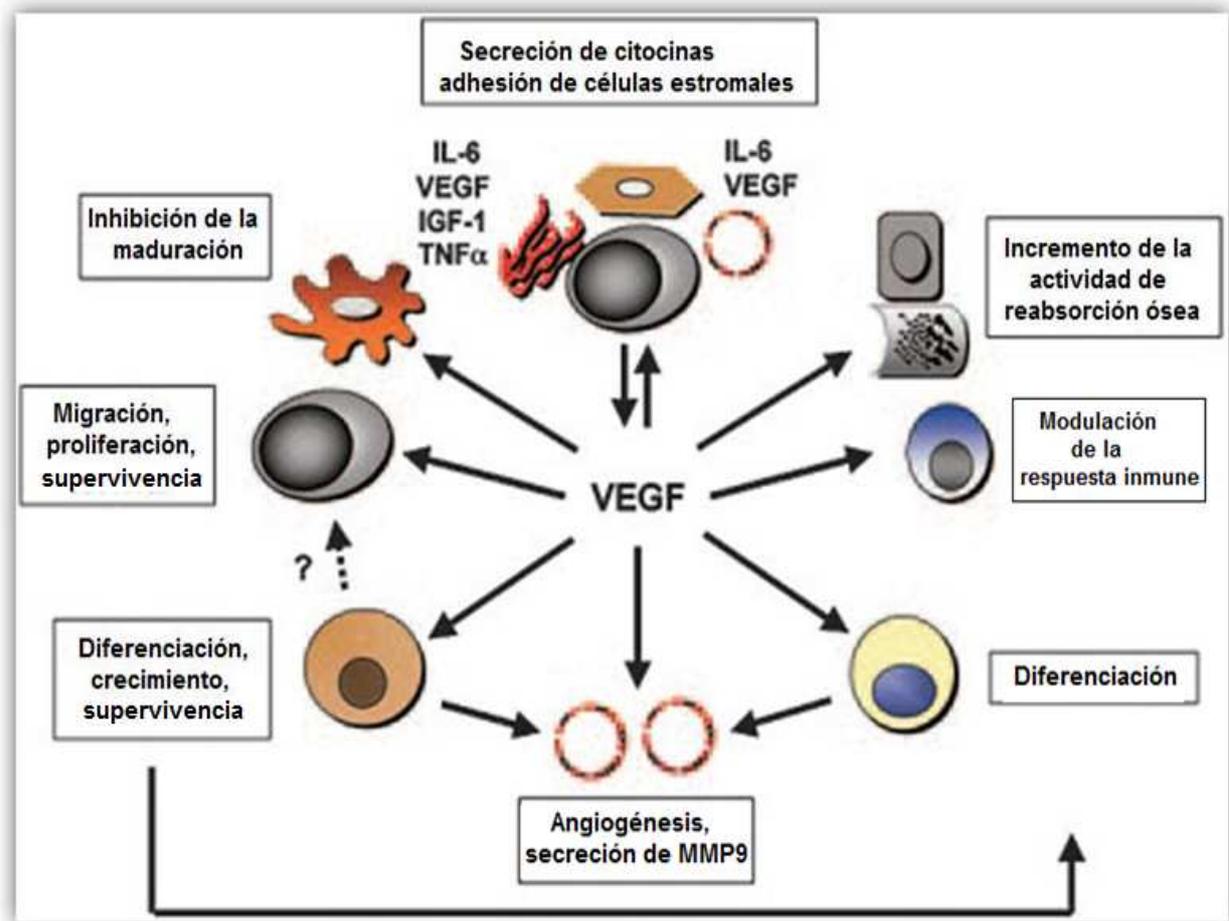


Figura 6. Funciones biológicas adicionales de VEGF. Se observan los diferentes procesos fisiológicos que involucran al VEGF, así como su participación en patologías hematológicas.²⁷

La diferenciación, mantenimiento y expansión de células tumorales en el microambiente de la médula ósea, es un proceso altamente coordinado que involucra la participación de múltiples factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas secretadas por las células tumorales (vía autocrina), células estromales (vía paracrina), y por contacto directo células estromales – células tumorales (vía yuxtacrina)³⁶.

5. Angiogénesis en leucemias.

El papel de la angiogénesis tumoral en el crecimiento y la diseminación de los tumores sólidos es ya conocido y ampliamente estudiado. Por el contrario, la angiogénesis en las

leucemias es un área en desarrollo; donde algunos estudios han demostrado el aumento de vascularización de la médula ósea en la leucemia aguda y crónica³⁷, en la tabla 2 se muestra un resumen de estas investigaciones.

Tabla 2. Resumen de estudios de la participación de VEGF en leucemias

AUTOR	REPORTE
<i>Bellamy y col.</i> (1999)	Sugieren que VEGF puede jugar un papel en el crecimiento de neoplasias hematológicas a través de mecanismos paracrinos o autocrinos.
<i>Koomagi y col.</i> (2001)	Mostraron que niveles de VEGF fueron significativamente altos en LLA recurrente, comparada con LLA de novo.
<i>Días y col.</i> (2002)	Identifican la vía VEGF-C/VEGFR-3 como un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de las leucemias agudas.
<i>Wellmann y col.</i> (2004)	Analizaron la expresión de mRNA del VEGF a partir de aspirados de médula ósea en pacientes pediátricos con recaída, reportando que aquellos pacientes con MDR tuvieron 2.2 veces más expresión de RNAm que aquellos pacientes que respondieron favorablemente a la quimioterapia (sin MDR).
<i>Faderl y col.</i> (2005)	Reportaron que pacientes con LLA con niveles altos de VEGF y bFGF demostraron una supervivencia más corta.
<i>Yang y col.</i> (2007)	En 23 niños de población china con LLA, reportaron que la concentración en plasma de VEGF y del factor tisular fue significativamente mayor, en los pacientes que no presentaron remisión que en aquellos que si lo hicieron.
<i>Hsin – An Hou y col.</i> (2008)	Evaluaron la expresión de VEGF-A y VEGF-C en 26 pacientes adultos con LMA de <i>novo</i> por RT-PCR en tiempo real, y concluyeron que los niveles altos de dichos genes tienen un impacto en el pronóstico.

II. JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo más común de cáncer infantil; representando 30% de todos los cánceres diagnosticados en niños menores de 15 años. El riesgo de recaída varía considerablemente entre pacientes y depende de varias anormalidades genéticas además de la influencia de factores de crecimiento.

Se conoce ya la participación de la angiogénesis en el desarrollo de tumores sólidos, en los últimos años se ha investigado su participación en patologías hematológicas como las leucemias. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un importante mediador de la angiogénesis. Los principales activadores de proliferación y supervivencia celular son VEGF-A/VEGFR-2, razón por lo cual se ha sugerido su utilización tanto como factores de pronóstico, así como de blanco terapéutico.

En el presente estudio, se analizará el comportamiento de la expresión de VEGF-A y de su receptor (VEGFR-2) antes y después del tratamiento, en pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de *novo*. Los datos resultantes darán las bases para su futura evaluación como indicadores de pronóstico.

III. HIPÓTESIS

Los niveles de expresión de VEGF-A y VEGFR-2 en pacientes pediátricos con LLA *de novo* serán mayores al inicio del diagnóstico, y estos disminuirán con la respuesta al tratamiento.

En caso de que el paciente presente recaída los niveles de VEGF-A y VEGFR-2 aumentarán.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

- Cuantificar la expresión de VEGF-A y VEGFR-2 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda *de novo*.

Objetivos específicos:

- Evaluar los niveles de mRNA de VEGF-A y VEGFR-2 en pacientes con diagnóstico de LLA *de novo* sin tratamiento (día cero) y a los 15 y 30 días post-tratamiento
- Evaluar la concentración de la proteína de VEGF-A y VEGFR-2 en pacientes con diagnóstico de LLA *de novo* sin tratamiento (día cero) y a los 15 y 30 días post tratamiento
- Correlacionar los niveles de expresión de mRNA y proteína de VEGF-A y VEGFR-2 antes y después del tratamiento

V. MATERIAL Y MÉTODOS

Estrategia general

El presente proyecto se llevó a cabo en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y CENAVECE SSA. Se seleccionaron 28 pacientes con diagnóstico de LLA *de novo*, menores de 18 años y sin tratamiento (toma basal). A cada uno de ellos se le solicitó la autorización de los padres o tutores, explicando en qué consistía el proyecto. Considerando lo anterior, se realizaron 3 determinaciones: antes del tratamiento, quince y treinta días después de iniciado el tratamiento con vincristina, L-asparaginasa, daunorrubicina y prednisona. Después de obtener las muestras, se realizó la extracción de RNA por el método de columna utilizando un kit de extracción marca Qiagen y posteriormente, la síntesis de DNA complementario utilizando otro kit (Roche); una vez obtenido se almacenó a -20°C.

La determinación del mRNA de VEGF-A y VEGFR-2 se realizó mediante RT-PCR en tiempo real, para lo cual se utilizaron 500 uL de médula ósea y 1 mL de sangre periférica (al inicio del diagnóstico) y 1mL de sangre periférica adicional para los seguimientos. Se realizó primero la estandarización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final de los genes VEGF-A y VEGFR-2 a través de curvas de temperatura de alineación, una vez obtenidas las condiciones óptimas de amplificación se procedió a realizar RT-PCR en tiempo real de los genes para cada una de las muestras de los pacientes.

La cuantificación de las proteínas VEGF-A y VEGFR-2 se realizó por el método de ELISA, utilizando 100 y 20 µL de plasma respectivamente, para cada determinación. Se correlacionó la expresión de dichas proteínas con el estado clínico de cada uno de los pacientes antes y después del tratamiento. Los resultados se analizaron por la prueba U de Mann-Whitney con el programa SPSS versión 15.

Este estudio se realizó de conformidad con los principios que establece la 18ª Asamblea Médica Mundial y todas las modificaciones aplicables establecidas por las Asambleas

Médicas Mundiales y los lineamientos ICH para la Buena Práctica Clínica (GCP). Es un estudio con riesgo mínimo.

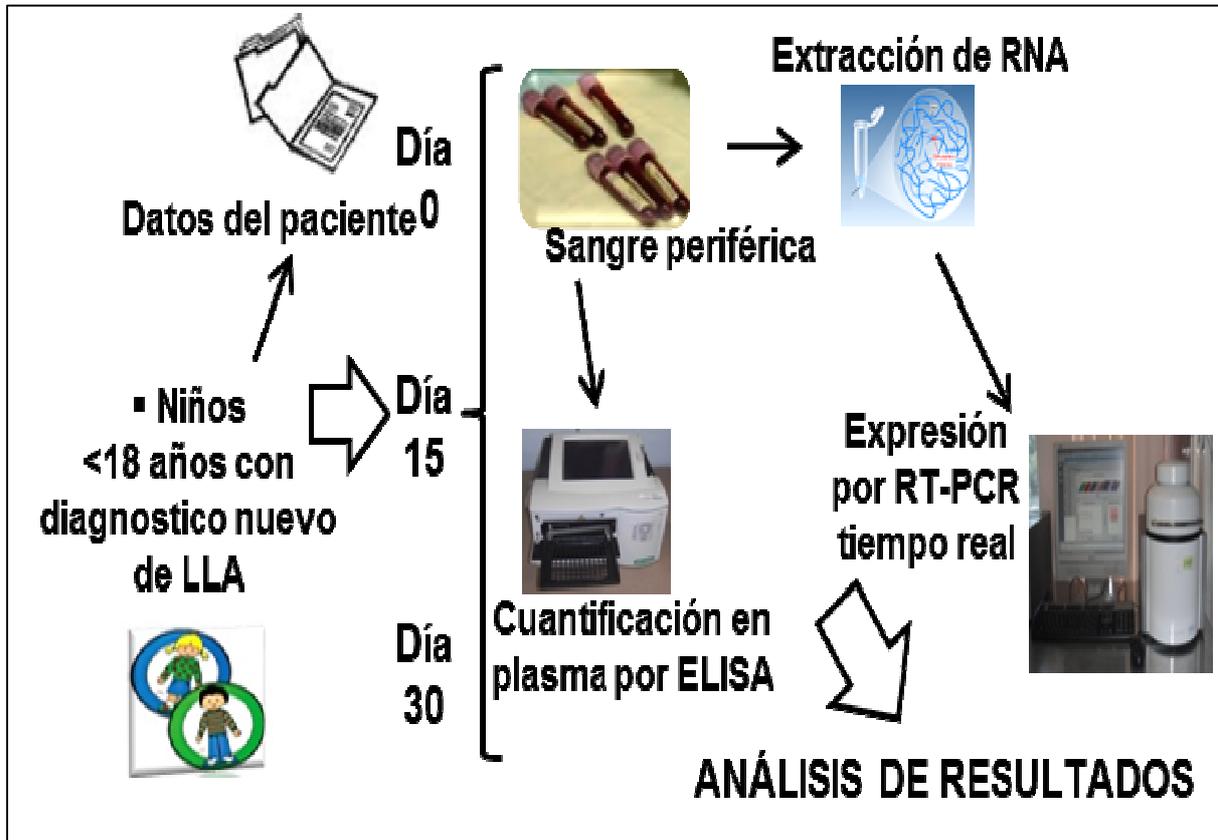


Figura 7. Diagrama de trabajo. Secuencia de los pasos generales de la metodología. Se obtuvieron las muestras de sangre periférica, se separó el plasma para la cuantificación por ELISA de las proteínas VEGF-A y VEGFR-2. Así como también se obtuvo el RNA medir la expresión de VEGF-A y VEGFR-2 por RT-PCR.

Tipo de estudio

El presente estudio es prospectivo en una cohorte.

Población de estudio

Se analizaron pacientes pediátricos, que acudieron al Hospital Infantil de México “Federico Gómez” con diagnóstico de LLA *de novo*; en el estudio se incluyeron 28 pacientes, el tamaño de muestra se obtuvo de acuerdo al teorema de límite central, que indica que no es necesario saber cuál es la distribución de la población para estar en condiciones de obtener inferencias respecto a la población a partir de datos muestrales.

Criterios de inclusión

- ❑ Pacientes de 1 mes a 18 años
- ❑ Con diagnóstico de LLA de novo
- ❑ Sin tratamiento
- ❑ Firma de consentimiento informado del paciente y del padre o tutor

Criterios de exclusión

- ❑ Abandono del tratamiento
- ❑ Tratamiento previo
- ❑ Que presente adicionalmente otra patología oncológica

Criterios de eliminación

- ❑ Defunción del paciente antes de concluir las determinaciones programadas
- ❑ Que el paciente y/o padre o tutor decida retirarse del estudio

Análisis de VEGF-A y VEGFR-2 por reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (LightCycler 2.0)

- ❑ A partir de 1mL de médula ósea y/o sangre periférica, se obtuvo el RNA por el método de columna (QUIAGEN, México) (Apéndice 2). El cDNA se sintetizó utilizando el Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) (Apéndice 3). Se utilizaron iniciadores específicos para cada gen (tabla 3); la secuencia y producto de amplificación de cada gen se describen en el Apéndice 4.

Tabla 3. Secuencia de iniciadores y sondas empleados para el análisis de los genes VEGF-A y VEGFR-2 por RT-PCR tiempo real

GEN	SECUENCIA DE INICIADORES	T_m	SONDA
VEGF-A (1)	5' CGAGGGCCTGGAGTGTGT 3'	60	6FAM - CCCACTGAGGAG
VEGF-A (2)	5' CCGCATAATCTGCATGGTGAT 3'	62	TCC – BBQ
VEGFR-2 (A)	5' GTGACCAACATGGAGTCGTG 3'	62	6FAM – TTCCATGTCTCG
VEGFR-2 (B)	5' CCAGAGATTCCATGCCACTT 3'	60	GGTCCATTTCAA – BBQ

PCR punto final del gen VEGF-A

Se amplificó en una mezcla de PCR con 12.5 pM de cada iniciador, dNTP's 2.5 mM, regulador 1X (20 mM Tris-HCl, 2 mM MgSO₄) y 2 U de Taq DNA polimerasa (New England), según las condiciones descritas a continuación:

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94 °C	2 min
Desnaturalización		94 °C	30 seg
Alineamiento	35	64 °C	30 seg
Extensión		72 °C	1 min
Extensión final	1	72 °C	5 min

RT-PCR tiempo real del gen VEGF-A

Se amplificó en una mezcla de PCR: iniciadores (0.5 µM), sonda (0.1 µM) (TIBMOLBIOL), mezcla de reacción (LightCycler TaqMan Master, Roche) y agua de grado PCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95 °C	10 min
Desnaturalización		95 °C	10 seg
Alineamiento	50	64 °C	20 seg
Extensión		72 °C	1 seg
Enfriamiento	1	40 °C	30 seg

RT-PCR tiempo real del gen VEGFR-2

Se amplificó en una mezcla de PCR: iniciadores (1.0 µM), sonda (0.1 µM) (TIBMOLBIOL), mezcla de reacción (LightCycler TaqMan Master, Roche) y agua de grado PCR.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95 °C	10 min
Desnaturalización		95 °C	10 seg
Alineamiento	50	60 °C	1 min
Extensión		72 °C	1 seg
Enfriamiento	1	40 °C	30 seg

RT-PCR tiempo real del gen G6PDH (gen constitutivo)

Se amplificó en una mezcla de PCR (LightMix para la detección de G6PDH humano, TIBMOLBIOL), el fragmento del amplificado es de 194 pb.

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	95 °C	10 min
Desnaturalización		95 °C	05 seg
Alineamiento	50	59 °C	15 seg
Extensión		72 °C	10 seg

Curva estándar

Se realizó una curva estándar para cada gen en estudio (VEGF-A y VEGFR-2), primero fue purificado el producto de PCR (Apéndice 7), se cuantificó lo obtenido y con el peso molecular y el valor de la lectura obtenida se realizaron diferentes diluciones.

% de expresión de un gen con respecto al constitutivo:

$$\%RATIO = EFICIENCIA^{(\Delta ct)}$$

$$\Delta ct = (ct \text{ gen problema} - ct \text{ gen constitutivo})$$

Cuantificación de VEGF-A y VEGFR-2 por el método de ELISA

- ▣ Se utilizó plasma, la cantidad y el procedimiento se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Apéndice 4 y 5).

Análisis estadístico

- ▣ El análisis no paramétrico, para dos muestras independientes se llevó a cabo mediante la prueba U de Mann-Whitney; además se realizó una comparación de medias de una muestra sencilla y por muestras pareadas con el programa SPSS versión 15.

VI. RESULTADOS

Descripción de la población

En total se obtuvieron 120 muestras (31 de médula ósea y 89 de sangre periférica); correspondiente a 59 pacientes, de los cuales 31 no cumplieron el criterio de inclusión (26 solo con 2 muestras y 5 con la muestra basal). Por lo que el análisis se realizó solo en 28 pacientes. Las características generales de los pacientes se presentan en la siguiente tabla 4.

Tabla 4. Características de los pacientes pediátricos con LLA

Característica	Media	Rango
Edad	6	3 meses – 14 años
% blastos en médula ósea		
basal	82	32 – 99
% blastos en circulación		
basal	20	1 – 48
15 días post-tratamiento	17	0 – 98
30 días post-tratamiento	7	0 – 91
Cuenta de leucocitos (10³/uL)		
basal	68	4.1 – 48.7
15 días post-tratamiento	7	0.4 – 65.3
30 días post-tratamiento	3	0.5 – 18.2

Característica	Total
Clasificación FAB	
LLA-L1	8
LLA-L2	18
LLA-L3	2
Inmunofenotipo	
Pre-B	16
B	8
T	4
Cariotipo	
t(9;22)	2
t(1;19)	2
t(4;11)	1
t(8;14)	1

Determinación del mRNA de VEGF-A

Para la determinación de la expresión del gen VEGF-A se realizó RT-PCR en tiempo real (LightCycler 2.0, Roche), en la figura 8 se muestra un ejemplo de las curvas de amplificación obtenida de dos pacientes con LLA con seguimiento completo y curvas sin amplificar de niños sin LLA.

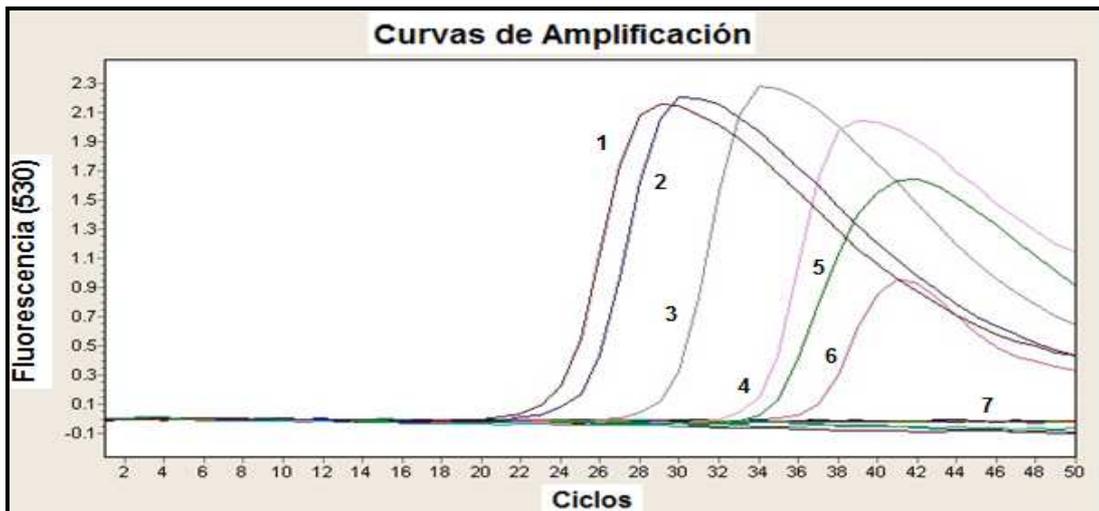


Figura 8. Curvas de amplificación de VEGF-A. Se observan curvas de amplificación (1-3 y 4-6) de las tres muestras (basal, 15 y 30 días con tratamiento) de dos pacientes con LLA, además curvas sin amplificar (7) de niños sin LLA.

En la figura 9 se observa el producto de RT-PCR del gen VEGF-A de dos muestras correspondientes a dos pacientes con nuevo diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

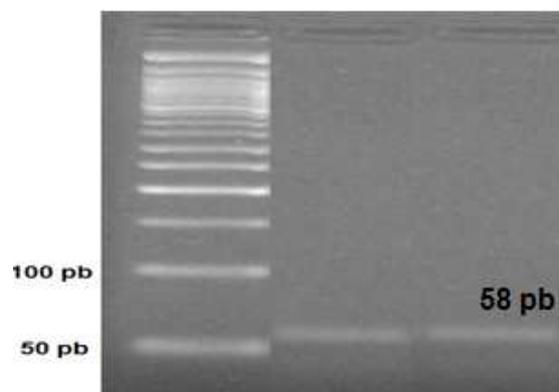


Figura 9. Producto de RT-PCR del gen VEGF-A. Fotografía del producto de RT-PCR del gen VEGF-A correspondiente a 58 pb. Línea 1 Marcador de peso molecular de 50 pb, línea 2 y 3 muestras de pacientes.

Se encontró un rango de expresión del gen VEGF-A entre 0.22 hasta 259.50 con una mediana de 3.61 en la muestra basal (antes de iniciar el tratamiento); en la segunda medición (15 días con tratamiento) el rango de expresión fue de 0.03 hasta 36.48 y con una mediana de 6.89, disminuyendo esta en comparación con la primera; y en la última medición de la expresión de VEGF-A (con 30 días de tratamiento) el rango fue de 0.05 a 36.73 y la mediana de 4.98, manteniéndose parecido al rango de expresión de la segunda medición. En la figura 10 se observa la mediana y la distribución de la población estudiada en los tres tiempos. La caja del día cero (muestra basal) corresponde a 25 pacientes, los tres pacientes restantes presentaron valores mayores a 100. La cajas correspondientes a la segunda (15 días post-tratamiento) y tercera muestra (30 días post-tratamiento) comprenden a los 28 pacientes.

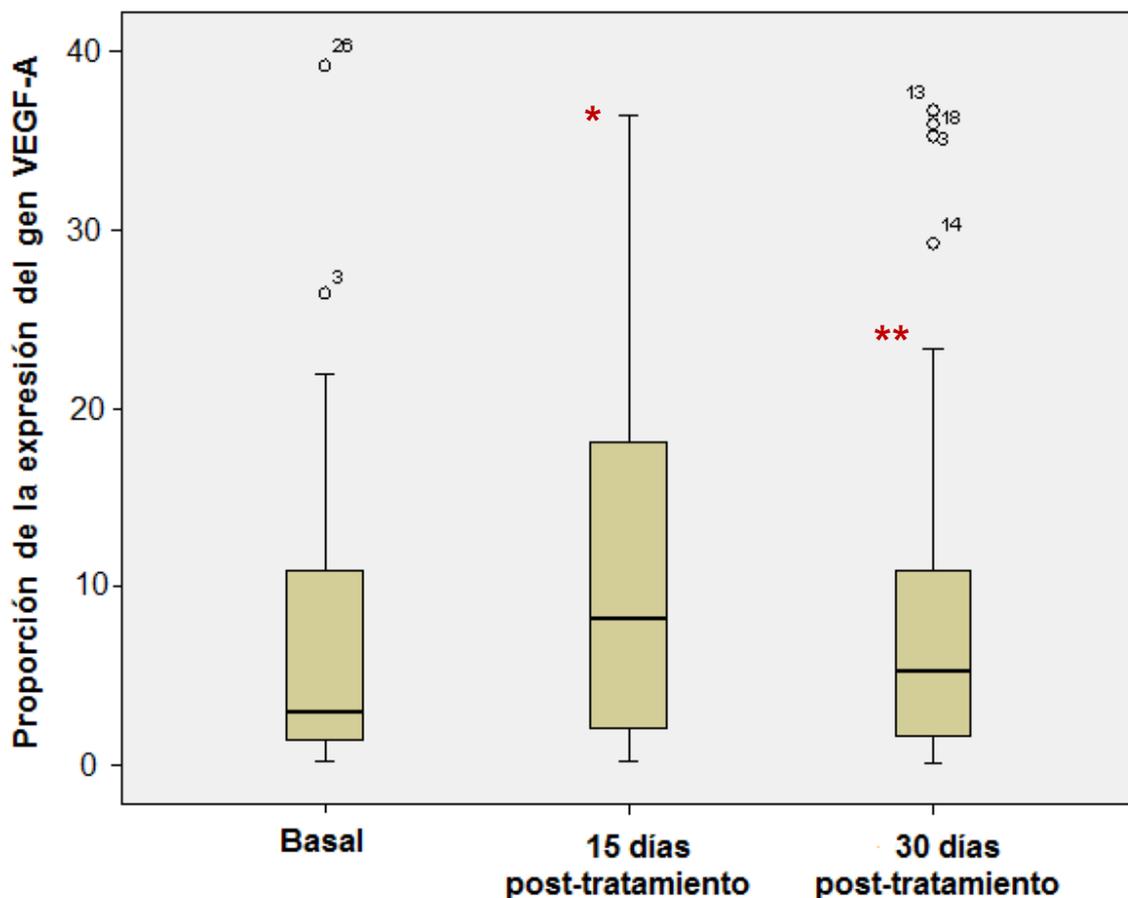


Figura 10. Expresión del gen VEGF-A. Se muestran las medianas y la distribución de la expresión de VEGF-A en los diferentes tiempos. * $p=0.0009$ toma +15 días post-tratamiento con respecto a la toma basal. ** $p=0.0009$ toma +30 días post-tratamiento con respecto a la toma basal.

Determinación de la proteína VEGF-A

Se determinó la cantidad de proteína de VEGF-A por ELISA en plasma; el rango de cuantificación de la proteína en las tres muestras (basal, 15 y 30 días con tratamiento) fue de 1 a 1000 pg/mL. La distribución de los datos de los 28 pacientes pediátricos con LLA se presenta en la figura 11.

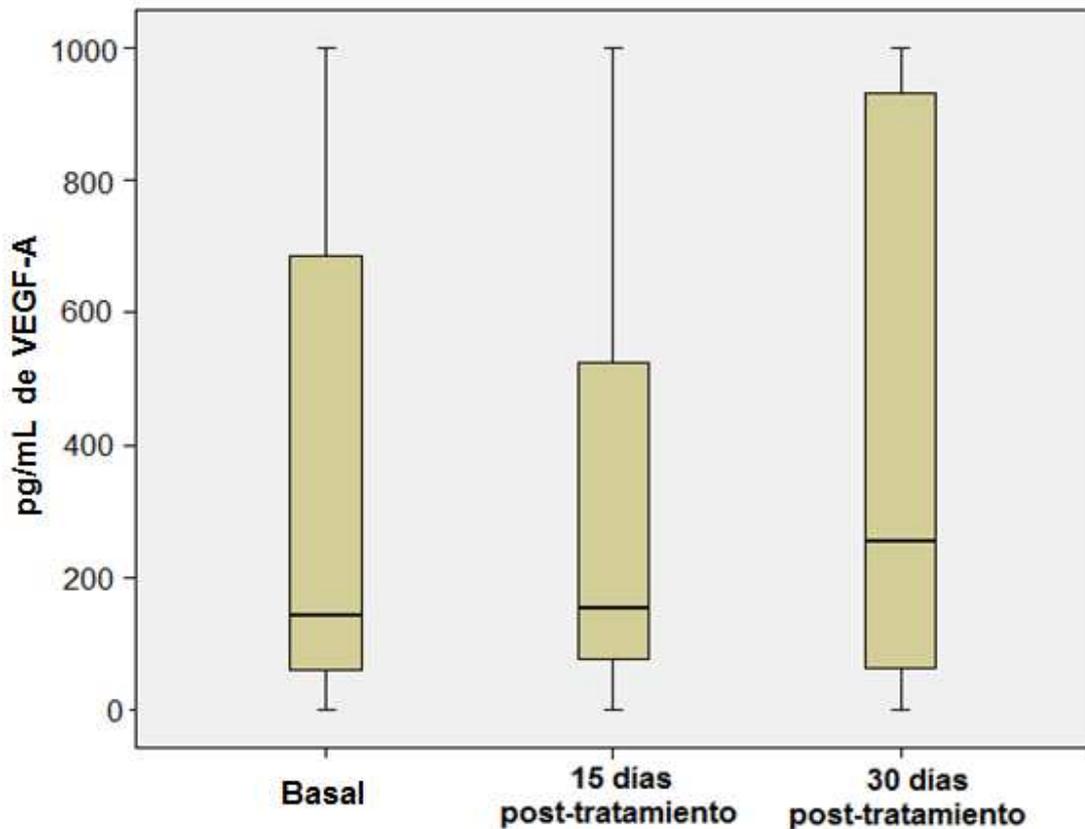


Figura 11. Cuantificación de la proteína VEGF-A. Se muestra la distribución de los datos y las medianas (145, 156 y 255) obtenidas en los diferentes tiempos (basal, 15 y 30 días post-tratamiento) de la cantidad de proteína VEGF-A.

Determinación del mRNA de VEGFR-2

La determinación de la expresión del gen VEGF-A se realizó RT-PCR en tiempo real (LightCycler 2.0, Roche), en la figura 12 se muestra un ejemplo de curvas de amplificación.

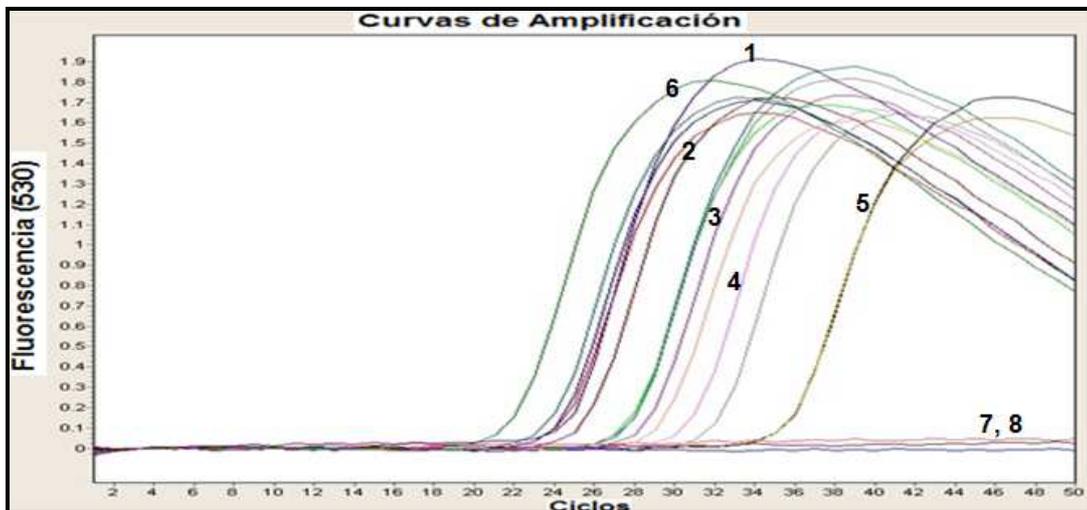


Figura 12. Curvas de amplificación de VEGFR-2. Se observan las curvas de amplificación (1-4) de las tres muestras (basal, 15 y 30 días con tratamiento) de cuatro pacientes con LLA, dos controles positivos (5) y un punto de la curva estándar (6), así como también curvas sin amplificar de dos controles negativos (7) y un blanco (8).

En la figura 13 se muestra el producto de RT-PCR del gen del receptor VEGFR-2 de pacientes pediátricos con nuevo diagnóstico de LLA.

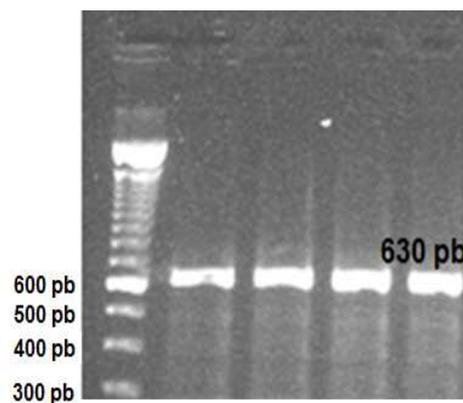


Figura 13. Producto de RT-PCR del gen VEGFR-2. Fotografía del producto de RT-PCR del gen VEGFR-2 correspondiente a 630 pb. Línea 1 Marcador de peso molecular de 100 pb, línea 2-5 muestras basales de pacientes pediátricos con LLA.

El rango de expresión del receptor VEGFR-2 en la muestra basal fue de 0.07 hasta 600 y una mediana de 2.42; en la segunda medición (15 días de tratamiento) el rango fue de 0.23 a 600 con una mediana de 4.81; y en la última medición (30 días de tratamiento) el rango fue de 0.15 a 600 y una mediana de 6.66. No hubo diferencia significativa entre las muestras. En la figura 14 se observa la distribución de los datos de 24 pacientes pediátricos en la muestra basal y segunda muestra (15 días post-tratamiento) debido a que 4 pacientes presentan una expresión del receptor mayor a 150; y en la tercera muestra (30 días post-tratamiento) se grafica con 22 pacientes, debido a que 6 pacientes presentan una expresión mayor a 150. En 8 pacientes la expresión del receptor fue negativa en los tres tiempos.

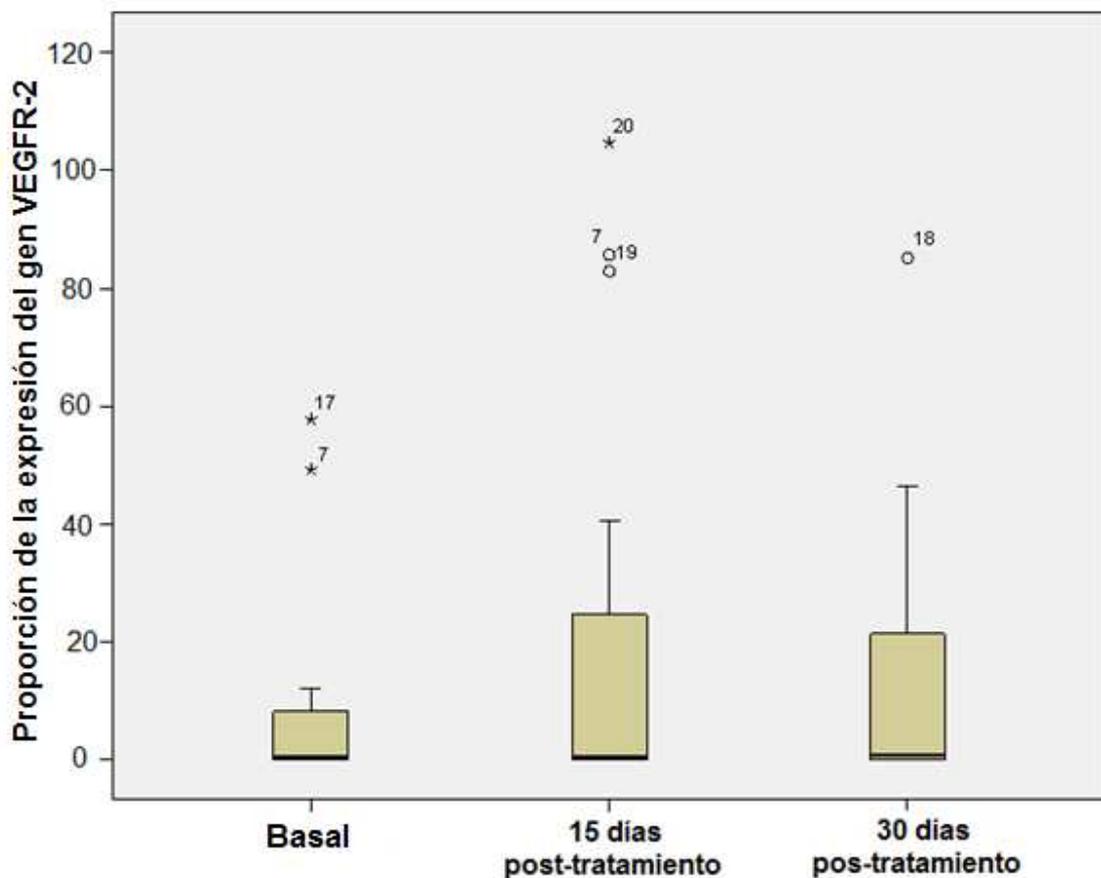


Figura 14. Expresión del gen VEGFR-2. Se muestra la distribución de los datos de la expresión del receptor VEGFR-2 y las medianas obtenidas en los diferentes tiempos.

Determinación de la proteína VEGFR-2

La cantidad de proteína del receptor VEGFR-2 fue determinada por ELISA en plasma; el rango de cuantificación de la proteína en la muestra basal se encuentra entre 75 y 1100 pg/mL con una mediana de 475. En la segunda cuantificación el rango fue de 65 a 700 pg/mL y una mediana de 500, y en la tercera cuantificación el rango obtenido fue de 60 a 1150 pg/mL con una mediana de 550. En la figura 15 se presenta la distribución de los valores obtenidos en la población estudiada.

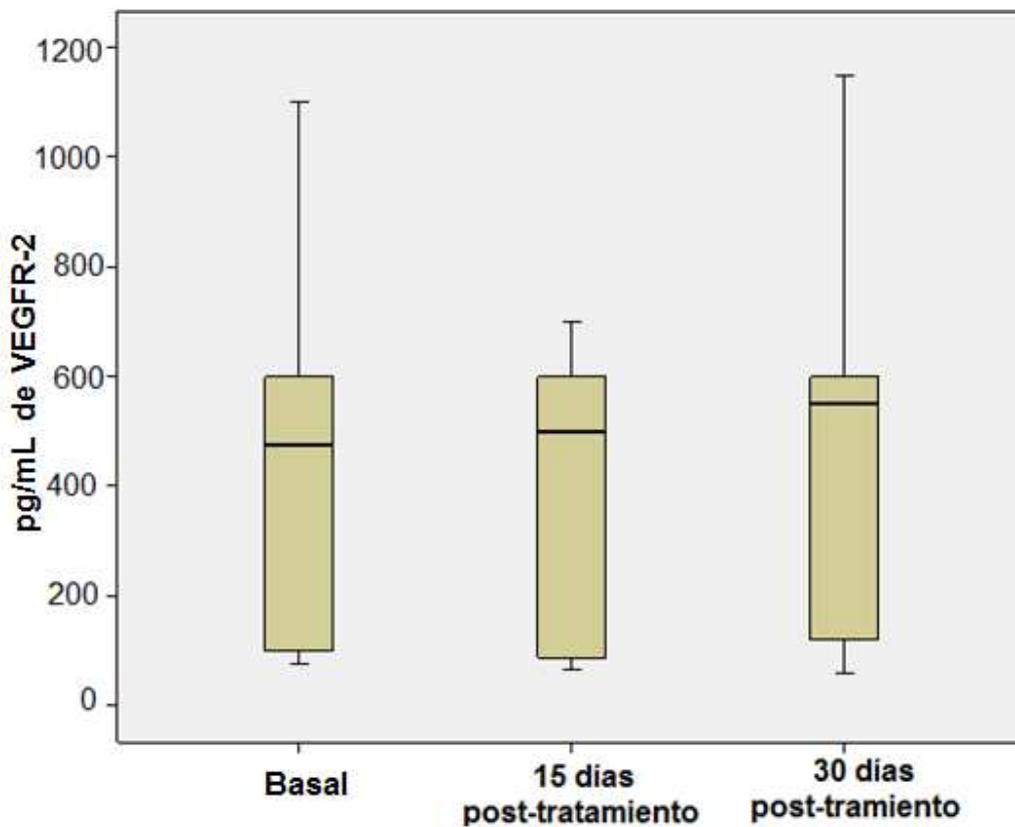


Figura 15. Cuantificación de la proteína VEGFR-2. Se muestra las medianas y la distribución de los datos de la cantidad de proteína del receptor VEGFR-2 presente en los pacientes pediátricos en los diferentes tiempos.

La distribución de los datos no fue normal ya que fue muy amplia, se obtuvo el valor de la media y mediana además se realizó la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (debido al número total de pacientes), la cual no fue significativa en la cuantificación de la proteína ni en la expresión del mRNA tanto para VEGF-A como de VEGFR-2; también se realizó la comparación de medias (muestra simple y muestras pareadas) y solo resultó significativo la expresión de VEGF-A en la muestra del día 15 post-tratamiento con respecto a la muestra basal, y de igual manera hubo significancia en la expresión de VEGF-A en la muestra del día 30 post-tratamiento con respecto a la muestra basal (tabla 5).

Tabla 5. Comparación de VEGF-A y VEGFR-2 en las muestras de los diferentes días

	Día de la toma	Media	Mediana	Prueba de Mann-Whitney	Comparación de medias (t de muestra simple)	Comparación de medias (t de muestras pareadas)
VEGF-A (RT-PCR)	0	27.7400	3.6050	NS	NS	NS
	15	10.2618	6.8900	NS	$p = 0.0009$	NS
	30	9.5493	4.9750	NS	$p = 0.0009$	NS
VEGF-A (ELISA)	0	371.11	145.00	NS	NS	NS
	15	320.81	156.00	NS	NS	NS
	30	419.71	255.00	NS	NS	NS
VEGFR-2 (RT-PCR)	0	64.1493	2.4295	NS	NS	NS
	15	78.4332	4.8100	NS	NS	NS
	30	111.5625	6.6550	NS	NS	NS
VEGFR-2 (ELISA)	0	432.86	475.00	NS	NS	NS
	15	415.89	500.00	NS	NS	NS
	30	468.39	550.00	NS	NS	NS

*NS = no significativo

VII. DISCUSIÓN:

El proceso de angiogénesis no sólo es esencial para el crecimiento de tumores sólidos, sino que hay nuevas evidencias de que la progresión de neoplasias hematológicas como mieloma múltiple, leucemias agudas y síndromes mieloproliferativos, también dependen de la formación de nuevos vasos sanguíneos. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el mediador clave en la angiogénesis; la presencia de VEGFs y de sus receptores (VEGFRs) se consideran determinantes importantes tanto en neoplasias malignas sólidas y hematológicas.

Con el objetivo de dar las bases para su futura evaluación como indicadores de pronóstico, el presente trabajo analiza la expresión a corto plazo del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y de su receptor (VEGFR-2) en población infantil con diagnóstico de novo de Leucemia linfoblástica aguda.

La primera demostración de que la progresión en la leucemia podría estar acompañada de aumento de la vascularización de la médula ósea, fue proporcionada por el grupo de Judah Folkman. En sus estudios, demostró que la médula ósea de pacientes con LLA tenía aumento del contenido de vasos sanguíneos; por otra parte, también se demostró que la sangre periférica de los pacientes con LLA contenía niveles elevados de VEGF¹⁶.

Nuestros resultados ilustran que la expresión de VEGF-A en los pacientes pediátricos con LLA de novo se encuentran elevados en la muestra basal, y que disminuyen significativamente en las siguientes mediciones de la expresión (15 días post-tratamiento); y la última (30 días post-tratamiento) de VEGF-A respecto a la muestra basal resulta disminuida significativamente. No hay estudios previos que proporcionen un valor para la expresión de VEGF-A, como tampoco hay estudios donde se haya realizado un seguimiento durante la primera etapa del tratamiento de los pacientes pediátricos con LLA de novo.

La cantidad de proteína VEGF-A medida en plasma por ELISA en las tres muestras (basal, 15 y 30 días post-tratamiento) realizadas a los pacientes pediátricos con LLA fue alta en el

86% de los pacientes (más de 50 pg/mL), mientras que el 14% de los pacientes solo presentaban menos de 5 pg/mL. Comparado con el trabajo realizado en un grupo de pacientes pediátricos norteamericanos con LLA, donde midieron la concentración de VEGF-A utilizando la misma metodología mostró que un incremento en las concentraciones séricas de VEGF-A durante la etapa de inducción se correlaciona con eventos de baja supervivencia de los pacientes pediátricos con LLA de riesgo estándar y que los niveles séricos de VEGF-A <40 y > a 100 pg/mL se han asociado con buen y mal pronóstico, respectivamente³⁷. También se ha reportado que niveles celulares y en circulación elevados de la proteína VEGF-A, se asocian con mal pronóstico en leucemia³⁹.

Con respecto a la expresión del receptor VEGFR-2 en las tres muestras (basal, 15 y 30 días post-tratamiento) se encontró elevado en el 50% de los pacientes, el 21% presentaron un nivel de expresión baja, y el resto de los pacientes (29%) fueron negativos. Se observó que el 25% de los pacientes disminuyen de la muestra basal con respecto a la del día +15 post-tratamiento, 25% se mantuvieron con similar expresión entre las tres muestras y un 21% de los pacientes se elevó la expresión en las siguientes muestras con respecto a la muestra basal. En cuanto a la expresión de este receptor en células de LLA, en este estudio se encontró que tanto los pacientes con inmunofenotipo B como T lo presentan, comparado con lo reportado por otro grupo de trabajo donde trabajando con diferentes líneas celulares observaron que diferentes VEGFRs se encuentran expresados en ambos linajes³⁶.

Al cuantificar la proteína VEGFR-2 se encontró en el 71% de nuestra población presentó concentraciones altas en la muestra basal, de los cuales en la siguiente determinación (15 días post-tratamiento) la mitad disminuyeron, una tercera parte se mantuvo similar y el resto aumentó la cantidad de proteína VEGFR-2; al día 30 se observó un comportamiento de forma similar. El 29% de los pacientes que no expresaron VEGFR-2, al medir la proteína en las tres muestras, se obtuvieron cantidades menores a 100 pg/mL de VEGFR-2. Resultados similares han sido reportados trabajando con 3 líneas celulares y 10 muestras de pacientes con diferentes tipos de leucemia, donde únicamente 50% de las muestras de leucemias primarias y dos de 3 líneas celulares expresaron VEGFR-2 a nivel

de mRNA, además de que la cantidad máxima de proteína fue de 200 pg/mL⁴⁰; en otro estudio donde solo 38% de los pacientes con LMA expresaron VEGFR-2, el investigador propone un efecto directo de VEGF sobre células LMA en los pacientes con expresión de VEGFR-2, y que el mecanismo por el cual VEGF afecta el pronóstico de la enfermedad no es completamente claro⁴¹.

Con base en trabajos previos en los que encuentran aumento significativo ($p = 0.001$) de VEGF-A y VEGFR-2 en casos de LLA con recaída comparada con LLA de novo²⁴; se ha propuesto que los niveles altos de mRNA de VEGF-A y VEGFR-2 están asociados con mal pronóstico y mala respuesta molecular a la quimioterapia, así como con una baja probabilidad de supervivencia libre de la enfermedad a 3 años⁴².

Se obtuvo de cada uno de nuestros pacientes, la cuenta de leucocitos y el porcentaje de blastos en cada una de las tomas, y considerando la edad, cariotipo y subtipo de linfoblastos; observamos que en 75% de los pacientes estos factores pronósticos ya establecidos así como los datos obtenidos del análisis de VEGF-A y VEGFR-2 se relacionan tentativamente con el pronóstico de la enfermedad. Comparado con el trabajo hecho en un grupo de 47 niños con LMA, donde al dividir al grupo con base a la edad y clasificación (FAB) en alto y bajo riesgo, encontraron niveles bajos de VEGF en el grupo de bajo riesgo con una significancia ($p = 0.002$)⁴¹.

18% de los pacientes con niveles elevados de expresión y cantidad de proteína VEGF-A y del receptor VEGFR-2 en la segunda muestra (15 días post-tratamiento) respecto a la muestra basal, al revisar su expediente clínico dichos pacientes presentaron una mala respuesta a esteroides.

VIII. CONCLUSIONES:

- ▣ Se presenta correlación entre la expresión génica con la proteína en un (VEGF-A) y (VEGFR-2).
- ▣ En la expresión génica y cuantificación proteica, hay diferencias del ligando (VEGF-A) con su receptor (VEGFR-2)
- ▣ Se sugiere una relación entre los niveles de mRNA y la proteína de VEGF-A con el pronóstico de la enfermedad
- ▣ Es necesario aumentar el tamaño de la muestra y realizar un seguimiento a largo plazo.

IX. BIBLIOGRAFÍAS:

1. Vardiman J, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Porwit A. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009; 114:937-951.
2. Pui CH. Childhood leukemias. *N Engl J Med* 1995; 332:1618-1630.
3. Dighiero G, Hamblin T. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008; 371: 1017–29
4. Conter V, Rizzari C, Sala A, Chiesa M, Biondi A. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Orphanet J Rare Dis* 2004:1-13.
5. Lassaletta A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda. *Pediatría Integral* 2004; 5:435-442.
6. Belson M, Kingsley B, Holmes A. Risk Factors for Acute Leukemia in Children: A Review. *Environ Health Perspect* 2007; 115:138-145.
7. Bhojwani D, Howard S, Pui CH. High-Risk Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009; 9:1-18.
8. Mejstrikova E, Volejnikova J, Fronkova E, Zdrahalova K, Kalina T, Sterba J. Prognosis of children with mixed phenotype acute leukemia treated on the basis of consistent immunophenotypic criteria. *Haematologica* 2010; 95: 928-935.
9. Rivera R. La importancia de los factores pronósticos en leucemia aguda linfoblástica (LAL) de la población pediátrica en un país en vías de desarrollo. *Rev Inst Nal Cancerol* 2000; 46:260-266.
10. Nishida N, Yano H, Nishida T, Kamura T, Kojiro M. Angiogenesis in cancer. *Vasc Health and Risk Manag* 2006; 2:213-219.

11. Diffner E, Gauffin F, Anagnostaki L, Nordgren A, Gustafsson B, Sander B. Expression of VEGF and VEGF Receptors in Childhood Precursor B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia Evaluated by Immunohistochemistry. *J Pediatr Hematol Oncol* 2009; 31:696-701.
12. Karamysheva F. Mechanisms of Angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2008; 73:751-762.
13. Brown A, Citrin D, Camphausen K. Clinical biomarkers of angiogenesis inhibition. *Cancer Metastasis Rev.* 2008; 3:415-434.
14. Martínez J, Herrera L. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. *Cancerología 1* 2006: 83-96.
15. Khosravi P, Del Castillo A, Pérez G. Angiogénesis neoplásica. *An Med Interna* 2008; 25:366-369.
16. Ribatti D. Judah Folkman, a pioneer in the study of angiogenesis. *J Angiogenesis Res* 2008; 11:3-10.
17. Martínez D, Aguayo A. Angiogénesis en Neoplasias Hematológicas. *Cancerología 1* 2006:123-131.
18. Kerbel R. Molecular origins of cancer Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med* 2008; 358:2039-2049.
19. Información en formato electrónico disponible en: www.angiogenesis.es, fecha de consulta: 20 de septiembre de 2009.

20. Stepanova O, Krylov A, Lioudyno V, Kisseleva E. Gene Expression for VEGF-A, VEGF-C, and Their Receptors in Murine Lymphocytes and Macrophages. *Biochemistry (Mosc)* 2007; 72:1194-1198.
21. Tammela T, Enholm B, Alitalo K, Paavonen K. The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* 2005; 65:550-563.
22. Su J, Yen C, Chen P, Chuang S, Hong C, Kuo I. The role the VEGF-C/VEGFR-3 axis in cancer progression. *Br J Cancer* 2007; 96:541-545.
23. Otrock Z, Makarem J, Shamseddine A. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells Mol Dis* 2007; 38:258-268.
24. Koomagi R, Zintl F, Sauerbrey A. Vascular Endothelial Growth Factor in Newly Diagnosed and Recurrent Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia as Measured by Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 3381-3384.
25. Mourah S, Porcher R, Lescaille G, Rousselot, Podgorniak M, Labarchède G. Quantification of VEGF isoformas and VEGFR transcripts by QRT-PCR and their significance in acute myeloid leukemia. *Int J Biol Markers* 2009; 24:22-31.
26. Joo C, Young S, Chul S. Clinical Role of Bone Marrow Angiogenesis in Childhood Acute Lymphocytic Leukemia. *Yonsei Med J* 2007; 48:171-175.
27. Podar K, Anderson K. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood* 2005; 105:1383-1395.
28. Giles F. The Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling Pathway: A Therapeutic in Patients with Hematologic Malignancies. *Oncologist* 2001; 6:32-39.

29. List A. Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathway as an Emerging Target in Hematologic Malignancies. *Oncologist* 2001; 6:24-31.
30. Perez A, Sallan S, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol* 1997; 150:815-82.
31. Bellamy W, Richter L, Frutiger Y, Grogan T. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 1999; 59:728-733.
32. Dias S, Choy M, Alitalo K, Raii S. Vascular endothelial growth factor (VEGF) – C signaling through FLT – 4 (VEGFR-3) mediates leukemic cell proliferation, survival, and resistance to chemotherapy. *Blood* 2002; 99: 2179-2184.
33. Aguayo A, Kantarjian H, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic síndromes. *Blood* 2000; 96:2240-2245.
34. Padró T, Ruiz S, Bieker R, Bürger H, Steins M, Kienast J. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95:2637-2644.
35. Matsumoto T, Mugishima H. Signal Transduction via Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptors and Their Roles in Atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2006; 13:130-135.
36. Fragoso R, Pereira T, Wu Y, Zhu Z, Cabecadas J, Dias S. VEGFR-1 (FLT-1) activation modulates acute lymphoblastic leukemia localization and survival within the bone marrow, determining the onset of extramedullary disease. *Blood* 2006; 107:1608-1616.

37. Avramis I, Panosyan E, Dorey F, Holcenberg J, Avramis V. Correlation between High Vascular Endothelial Growth Factor-A Serum Levels and Treatment Outcome in Patients with Standard-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia: A Report from Children's Oncology Group Study CCG-1962. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6978-6984.
38. Poyer F, Coquerel B, Pegahi R, Cazin L, Norris V, Lamacz M. Secretion of MMP-2 and MMP-9 induced by VEGF autocrine loop correlates with clinical features in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2009; 33: 407-417.
39. Medinger M, Mross K. Clinical trials with anti-angiogenic agents in hematological malignancies. *J Angiogenesis Res* 2010; 2:1-11
40. Dias S, Hattori K, Zhu Z, Heissig B, Choy M, Lane W. Autocrine stimulation of VEGFR-2 activates human leukemic cell growth and migration. *J Clin Invest* 2000; 106: 511-521.
41. De Bont E, Fidler V, Meeuwsen T, Scherpen F, Hählen K, Kamps W. Vascular Endothelial Growth Factor Secretion Is an Independent Prognostic Factor for Relapse-free Survival in Pediatric Acute Myeloid Leukemia Patients. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2856-2861.
42. Wellmann S, Guschmann, Griethe W, Eckert C, Lottaz C, Seeger K. Activation of the HIF pathway in childhood ALL, prognostic implications of VEGF. *Leukemia* 2004; 18:926-933.

APÉNDICE 1

Extracción de RNA (Quiagen)

- ▣ A un tubo falcon de 15 mL se le adiciona 1 mL de sangre o medula ósea
- ▣ Llenar el tubo con cloruro de amonio, se mezcla en vortex
- ▣ Incubar 5 minutos a -20°C
- ▣ Centrifugar a 3000 rpm 15 minutos a 4°C
- ▣ Tirar el sobrenadante
- ▣ Adicionar 300 µL de buffer RLT, mezclar
- ▣ Adicionar 300 µL de etanol al 70%, mezclar
- ▣ Colocar la mezcla en la columna de extracción (rosa)
- ▣ Centrifugar 15 segundos a 10000 rpm a 4°C
- ▣ Pasar la columna a un nuevo tubo
- ▣ Adicionar 700 µL de buffer RW1
- ▣ Centrifugar 15 segundos a 10000 rpm a 4°C
- ▣ Pasar la columna a un nuevo tubo
- ▣ Adicionar 500 µL de buffer RPE
- ▣ Centrifugar 3 segundos a 14000 rpm a 4°C
- ▣ Pasar la columna a un tubo nuevo y adicionar 50 µL de H₂O DEPC
- ▣ Dejar reposar 1 minuto
- ▣ Centrifugar durante 1 minuto a 15000 rpm a 4°C
- ▣ Correr el RNA en un gel de agarosa al 0.8%

APÉNDICE 2

Procedimiento para la síntesis de cDNA (Roche)

- ❑ A todo el material a esterilizar dar cuando menos 4 pulsos de 30 segundos cada uno en el horno de microondas.
- ❑ Un tubo de 600 uL para RCP estéril y libre de nucleasas colocarlo en un pozo del termobloc frío y preparar 20 uL de la mezcla de reacción agregando los componentes en el orden siguiente: NOTA: siempre usar guantes cuando se maneje ARN.
- ❑ Agregar 5 uL (1 ug de RNA total o 10 ng de ARN poli A).
- ❑ Agregar 1 uL de iniciador Anchored – oligo (dt)₁₈ 50 pmol/uL (**vial 5**), concentración final de 2.5 uM.
- ❑ Agregar 2 uL de iniciador random hexamer 600 pmol/uL (**vial 6**), concentración final de 60 uM.
- ❑ Agua grado RCP (**vial 7 o 9**) agregar 5 uL o volumen variable hasta tener un volumen total de 13 uL.
- ❑ Estas son concentraciones sugeridas para experimentos iniciales. Las concentraciones de ARN plantilla pueden estar en el rango de 10 ng a 5 ug en el caso de ARN total y de 1 a 100 ng en el caso de mRNA.
Cuando se trabaje con muestras de bajas concentraciones de ARN (<10 ug/mL), agregar 10 ug/mL de MS2 RNA* para estabilizar el RNA plantilla.
- ❑ Desnaturalizar la mezcla RNA plantilla – iniciadores por calentamiento durante 10 minutos a 65 °C en un termobloc, evitar al máximo la evaporación. Este paso mejora la desnaturalización de las estructuras secundarias de RNA.
- ❑ Enfriar inmediatamente en un termobloc frío.
- ❑ Al tubo que contiene la mezcla RNA plantilla – iniciadores agregar los siguientes componentes de la mezcla RT en el orden listado a continuación:

REACTIVO	VOLUMEN	CONCENTRACIÓN FINAL
Amortiguador de reacción de la transcriptasa reversa concentración 5X, vial 2	4.0 uL	1X (8nM MgCl ₂)
Protector inhibidor de RNAasa, 40 U/uL, vial 3	0.5 uL	20 U
Mezcla de Deoxinucleotidos, 10 nM, vial 4	2.0 uL	1 nM
Transcriptasa reversa 20 U/uL, vial 1	0.5 uL	10 U
VOLUMEN FINAL	20.0 uL	

- Mezclar los reactivos en el tubo cuidadosamente. No usar vortex.
- Dar un pulso de centrifugación para tener el volumen total en el fondo del tubo.
- Colocar el tubo bien tapado en el termobloc durante 10 minutos a 25 °C, seguido de 60 minutos a 50°C.
- Inactivar la transcriptasa reversa por calentamiento a 85 °C durante 5 minutos.
- Para la reacción colocando el tubo en un termobloc frío.
- Congelar el tubo de - 15 a - 25 °C hasta su uso.

APÉNDICE 3

Secuencia de los amplificados

Gen	Amplificado	Tamaño del amplificado
VEGF-A	<p>CGAGGGCCTGGAGTGTGTGCCACTGAGGAGTCCA ACATCACCATGCAGATTATGCGG</p>	58 pb
VEGFR-2	<p>GTGACCAACATGGAGTCGTGTACATTACTGAGAACA AAAACAAAACCTGTGGTGA TTCCATGTCTCGGGTCCA TTTCAAATCTCAACGTGTCACTTTGTGCAAGATACC CAGAAAAGAGATTTGTTCTGATGGTAACAGAATTT CCTGGGACAGCAAGAAGGGCTTTACTATTCCCAGC TACATGATCAGCTATGCTGGCATGGTCTTCTGTGAA GCAAAAATTAATGATGAAAGTTACCAGTCTATTATGT ACATAGTTGTCGTTGTAGGGTATAGGATTTATGATG TGGTTCTGAGTCCGTCTCATGGAATTGAACTATCTG TTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATTGTACAGCAAGAA CTGAACTAAATGTGGGGATTGACTTCAACTGGGAAT ACCCTTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTA ACCGAGACCTAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATG AAGAAATTTTGGAGCACCTTAACTATAGATGGTGTA CCCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCA TCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAACAGCACATTT GTCAGGGTCCATGAAAACCTTTTGTGCTTTTGGAA AGTGGCATGGAATCTCTGG</p>	630 pb

 Posición de los iniciadores

 Posición de la sonda

APÉNDICE 4

Protocolo de ELISA – VEGF-A (PEPROTECH)

- ❑ Diluir el anticuerpo de captura con PBS a una concentración de 0.5 µg/ml. Inmediatamente, adicionar 100 µL a cada pozo de la placa de ELISA.
- ❑ Sellar la placa e incubar toda la noche a temperatura ambiente.
- ❑ Aspirar los pozos para remover el líquido y lavar la placa 4 veces usando 300 µL de buffer de lavado por pozo.
- ❑ Después de los lavados invertir la placa para remover residuos de buffer y secar con papel.
- ❑ Adicionar 300 µL de buffer de bloqueo a cada pozo. Incubar por lo menos 1 hora a temperatura ambiente.
- ❑ Aspirar y lavar la placa 4 veces.
- ❑ Diluir el estándar desde 1 ng/ml a cero en diluyente. Inmediatamente adicionar 100 µL de estándar o muestra en cada pozo por triplicado. Incubar a temperatura ambiente por lo menos 2 horas.
- ❑ Aspirar y lavar la placa 4 veces. Diluir el anticuerpo de detección en el diluyente a una concentración de 0.25 µg/ml.
- ❑ Adicionar 100 µL por pozo. Incubar a temperatura ambiente por 2 horas.
- ❑ Aspirar y lavar la placa 4 veces. Diluir 5.5 µL de avidina-HRP conjugado 1:2000 en el diluyente para un volumen total de 11 ml.
- ❑ Adicionar 100 µL por pozo. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- ❑ Aspirar y lavar la placa 4 veces.
- ❑ Adicionar 100 µL de la solución substrato en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente para el desarrollo del color. Monitorear el desarrollo del color en un lector de ELISA a una longitud de onda de 405 nm con serie de correcciones a 650 nm.

APÉNDICE 5

Protocolo de ELISA – VEGFR-2 (eBioscience)

- ❑ Diluir la muestra (1:25) con buffer de ensayo (1x), de acuerdo al siguiente esquema:
20 µL de muestra + 480 µL de buffer de ensayo (1x).
- ❑ Lavar los pozos 2 veces con 400 µL de buffer de lavado por pozo, con aspiración profunda del contenido entre lavados. Permitir que el buffer de lavado se quede cerca de 10 – 15 segundos antes de aspirar.
- ❑ Adicionar 100 µL de buffer de ensayo (1x) en los pozos para el estándar.
- ❑ Realizar las diluciones correspondientes del estándar sobre los pozos.
- ❑ Adicionar 100 µL de buffer de ensayo (1x) por duplicado al pozo del blanco.
- ❑ Adicionar 50 µL de buffer de ensayo (1x) a los pozos de las muestras.
- ❑ Adicionar 50 µL de cada muestra pre-diluida por duplicado a los pozos de las muestras.
- ❑ Preparar y adicionar 50 µL de conjugado de biotina a todos los pozos.
- ❑ Cubrir con una cinta adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18 – 25°C) por 2 horas, sobre un agitador de microplacas (100 rpm).
- ❑ Preparar estreptavidina-HRP.
- ❑ Remover la cinta adhesiva y vaciar los pozos. Lavar los pozos 6 veces.
- ❑ Adicionar 100 µL de estreptavidina-HRP diluida a todos los pozos, incluyendo los pozos del blanco.
- ❑ Cubrir con una cinta adhesiva e incubar a temperatura ambiente (18 – 25°C) por 1 hora, sobre un agitador de microplacas (100 rpm).
- ❑ Remover la cinta adhesiva y vaciar los pozos. Lavar los pozos 6 veces.
- ❑ Pipetear 100 µL de TMB solución substrato a todos los pozos.
- ❑ Incubar los pozos a temperatura ambiente (18 – 25°C) por cerca de 30 minutos. Evitar la exposición directa a la luz intensa.
- ❑ Parar la reacción enzimática, adicionando 100 µL de la solución de paro en cada pozo.
- ❑ Leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm como longitud de onda primaria (620 nm corrección).

APÉNDICE 6

Purificación del producto de PCR

- ▣ 100 μ L del producto a purificar
- ▣ Adicionar 400 μ L de buffer de unión, vortex
- ▣ Vaciar todo el contenido a la columna
- ▣ Centrifugar a 13 000 rpm durante 1 minuto (6 °C)
- ▣ Pasar la columna a un tubo nuevo
- ▣ Adicionar 650 μ L de buffer de lavado
- ▣ Centrifugar a 13 000 rpm durante 1 minuto (6 °C)
- ▣ Decantar el sobrenadante
- ▣ Centrifugar a 15 000 rpm durante 3 minutos
- ▣ Pasar la columna a un tubo nuevo
- ▣ Agregar con mucho cuidado 50 μ L de buffer de elución
- ▣ Incubar la columna durante 2 minutos a temperatura ambiente
- ▣ Centrifugar a máxima velocidad (15 000) durante 2 minutos