



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO - BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

LABORATORIO DE BIOMEDICINA MOLECULAR



Análisis de la expresión de las isoformas de OCT4 y su
significado clínico en leucemias agudas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA

Q.B.P. CORAYMA YAZMÍN GÓMEZ SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARCO ANTONIO LEYVA VÁZQUEZ

CO-DIRECTORA DE TESIS: DRA. YAZMIN GÓMEZ GÓMEZ

CHILPANCINGO, GRO., JULIO DE 2021.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ACTA DE APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 03 días del mes de julio de dos mil veinte, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada "Análisis de la expresión de las isoformas de OCT4 y su significado clínico en leucemias agudas", presentada por la alumna Corayma Yazmín Gómez Sánchez, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
Dirección de tesis

Dr. Julio Ortiz Ortiz

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dr. Juan Carlos Balandrán Juárez

Vo. Bo

Vo. Bo

 UAGro
FCQB: Coordinación de la
Maestría en Ciencias
Biomédicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021
Méndez Sotelo
Director de la Maestría en Ciencias
Biomédicas

 UAGro
Facultad de Ciencias
Químico Biológicas
DIRECCIÓN 2018 - 2021
Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas en Chilpancingo, Gro.

Bajo la dirección de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

la co-dirección de

Dra. Yazmín Gómez Gómez

y

la asesoría de

Dr. Juan Carlos Baladrán Juárez

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Julio Ortiz Ortiz

La investigación se efectuó en colaboración con el Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega”, ubicado en Acapulco, Guerrero.

Durante el período en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la **QBP Corayma Yazmín Gómez Sánchez** recibió beca del CONACYT, con el folio 923138.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez**, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo, por sus apreciados comentarios y sugerencias durante el desarrollo de este trabajo de investigación, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo.

A la **Dra. Yazmín Gómez Gómez**, por su valioso apoyo, por estar al pendiente de mis avances, por su asesoría y consejos brindados, por brindarme la oportunidad de recurrir a su capacidad y experiencia en un marco de confianza, afecto y amistad, fundamentales para la concreción de este trabajo.

A los miembros del jurado de esta tesis: **Dr. Juan Carlos Baladrán Juárez, Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres, Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero y Dr. Julio Ortiz Ortiz**, por sus valorables sugerencias, relevantes aportes y consejos que contribuyeron al mejoramiento y ordenamiento del presente trabajo.

A la **M.C Monica Virginia Saavedra Herrera** por su colaboración durante el periodo de muestreo, por el apoyo, la coordinación y la buena gestión de toda la información necesaria.

Con absoluta sinceridad, mi agradecimiento a todos los que hice mención ya que con sus aportes hicieron posible este proyecto.

DEDICATORIAS

Esta tesis se la dedico a mi **Dios** quien supo guiarme y darme fuerzas para continuar, superar obstáculos y no desmayar en los problemas que se presentaban a lo largo de mi vida.

A mis padres **Antonia** y **Octavio**, a mis hermanas **Sindy** y **Fátima**, porque siempre han creído en mí, porque gracias a ustedes hoy puedo ver alcanzada una meta más en mi vida, ya que siempre estuvieron impulsándome en los momentos más difíciles durante la maestría y porque el orgullo que sienten por mí fue lo que me hizo llegar hasta el final. A mis pequeños sobrinos **Oswaldo**, **Octavio** y **Santiago** por su amor y alegría que traen a mi vida. Va por todos ustedes porque son mi mayor tesoro.

A **Oliver** por impulsarme a continuar preparándome, por tu apoyo y por seguir cuidándome y guiándome desde el cielo.

A mis compañeros de la maestría y a todo el equipo del laboratorio de Biomedicina Molecular quienes sin esperar nada a cambio compartieron su conocimiento, alegrías y tristezas, por las charlas que hacen más fácil este camino y principalmente por su valiosa amistad.

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
III. RESULTADOS	10
IV. DISCUSIÓN.....	23
V. CONCLUSIONES	28
VI. ANEXOS.....	29
VII. REFERENCIAS	32

I. RESUMEN

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se caracteriza por la proliferación no regulada de células precursoras comprometidas hacia el linaje linfoide B o T. Las células troncales cancerosas (CSC) desempeñan un papel crucial en el origen y progresión de estas neoplasias debido a su capacidad de autorrenovación, entre los genes involucrados en el mantenimiento de la troncalidad, se encuentra el factor de transcripción OCT4 que es expresado en células troncales tanto embrionarias como adultas y está relacionado con características proliferativas, pluripotentes y de autorrenovación. OCT4 puede dar lugar a tres isoformas por corte y empalme alternativo del mRNA, OCT4A, OCT4B y OCT4B1. La expresión de OCT4 en CSC promueve la carcinogénesis y el desarrollo de tumores malignos, supervivencia global corta y quimiorresistencia.

Objetivo: Analizar la expresión de las isoformas OCT4A, OCT4B, OCT4B1 y su asociación con la recaída y la supervivencia de los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda. **Material y métodos:** Se analizaron un total de 80 muestras; 65 niños con LLA y 15 niños sin LLA, el fenotipo inmunológico de las células blásticas de los casos fue evaluado mediante citometría de flujo multiparamétrica y el análisis de la expresión del mRNA de las isoformas de OCT4 fue mediante RT-qPCR. **Resultados:** OCT4A ($p=0.0241$), OCT4B ($p=0.0256$) y OCT4B1 ($p=0.0421$) mostraron mayor expresión en muestras de niños con LLA en comparación con muestras de niños sin LLA. En pacientes que tuvieron recaídas se observó un incremento en la expresión del mRNA de OCT4A ($p=0.1809$), OCT4B ($p=0.1191$) y OCT4B1 ($p=0.1138$). La alta expresión de la isoforma OCT4A (OR, 2.8, $p=0.097$), OCT4B (OR, 2.7, $p=0.106$) y OCT4B1 (OR, 1.9, $p=0.283$) parecen contribuir en el riesgo de sufrir una recaída comparado con aquellos pacientes con LLA con baja expresión de las isoformas de OCT4 y con características clínicas de bajo riesgo. **Conclusión:** Las isoformas de OCT4 se expresan y se encuentran elevadas en las muestras de pacientes con LLA especialmente en aquellos con recaídas.

Palabras clave: *leucemia linfoblástica aguda, isoformas de OCT4, riesgo de recaída.*

ABSTRACT

Introduction: Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is characterized by the unregulated proliferation of B or T lymphoid precursor cells. Due to their ability to self-renewal, cancer stem cells (CSC) play a crucial role in the origin and progression of ALL. In embryonic and adult stem cells, the expression of the octamer-binding transcription factor 4 (OCT4) is associated with proliferative, pluripotency, and self-renewal characteristics. Alternative splicing generates three isoforms: OCT4A; OCT4B; and OCT4B1. In CSC, carcinogenesis, malignant tumor development, short overall survival, and chemoresistance are promoted by OCT4 expression. **Objectives:** This study aimed to investigate the expression of the OCT4 isoforms, and the association of isoforms expression and relapse or survival in ALL patients. **Material and methods:** A total of 80 samples were analyzed: 65 children with ALL; and 15 children without ALL. The immunological phenotype of the blast cells of the cases was evaluated by multiparametric flow cytometry and the analysis of OCT4 isoforms mRNA expression was assessed by RT-qPCR. **Results:** The expression of OCT4A, OCT4B and OCT4B1 was higher in ALL cases (*p-value: 0.0241, 0.0256, 0.0421*) than children without ALL. In patients who had relapsed, the OCT4A, OCT4B, and OCT4B1 mRNA expression were increased (*p-value: 0.1809, 0.1191, 0.1138*). The high expression of OCT4A, OCT4B, and OCT4B1 seem to contribute to the risk of relapse in children with ALL (OR, 2.8, *p* = 0.097; OR, 2.7, *p* = 0.106; OR, 1.9, *p* = 0.283) compared with low expression of OCT4 isoforms and with low-risk clinical characteristics. **Conclusion:** OCT4 isoforms expressions are elevated in samples from patients with ALL, and especially patients with relapses.

Key words: *acute lymphoblastic leukemia, OCT4 isoforms, risk of relapse.*

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de células hematopoyéticas normales es un proceso ordenado y estrechamente regulado por una compleja red de factores intrínsecos y señales microambientales que controlan el destino celular dentro de la médula ósea (Boulais & Frenette, 2015). En los trastornos hematológicos malignos, incluidas las leucemias agudas, la proliferación incontrolada de los precursores de las series linfoides o mieloides detenidos en un estado indiferenciado sostiene el crecimiento del tumor a expensas de la producción normal de células sanguíneas (Pelayo *et al.*, 2015). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se caracteriza por la proliferación no regulada de células precursoras comprometidas hacia el linaje linfoide B, la más frecuente en la infancia con el 80% de los casos y el linaje linfoide T que comprende del 10 al 15% de los casos de LLA pediátrica (Siegel *et al.*, 2012). Estas células inmaduras invaden a la médula ósea y sangre periférica, así como también a sitios extramedulares como el hígado, bazo y ganglios linfáticos (Pui *et al.*, 2008).

El pronóstico de la leucemia depende en gran medida de su tipo y las características del paciente en el momento del diagnóstico, uno de los factores predictivos importantes de la tasa de remisión es la edad del paciente, debido a que en pacientes más jóvenes se encuentran los tipos genéticos y celulares favorables y que pueden lograr la remisión mientras que el riesgo de mortalidad relacionada con el tratamiento asociado con la quimioterapia aumenta considerablemente en pacientes <1 año de edad o de edad avanzada (Rose-Inman & Kuehl, 2017). También se tienen en cuenta factores como las alteraciones citogenéticas y moleculares, el recuento de glóbulos blancos en el momento del diagnóstico, la respuesta a la terapia primaria y el fenotipo de los blastos (células precursoras linfoides B y T/células precursoras mieloides) (Friedmann *et al.*, 2009). Sin embargo, la detección de la enfermedad mínima residual ha reemplazado a muchos de estos factores pronósticos mencionados anulando su impacto pronóstico en la respuesta al tratamiento, principalmente porque esta información identifica a los pacientes con LLA con mayor riesgo de

recaída y muerte (Short *et al.*, 2017). Los regímenes de quimioterapia han mejorado el pronóstico y las tasas de supervivencia de los pacientes a más de 90% a cinco años. Sin embargo, un porcentaje considerable de pacientes no responde y recae (Hunger *et al.*, 2015), evento relacionado con las células troncales cancerosas (CSC) en quiescencia que sobreviven después de la quimioterapia o radiación y dan lugar a tumores más invasivos y quimioresistentes (Mohiuddin *et al.*, 2019).

La mayoría de los genes implicados en las neoplasias hematológicas codifican para factores de transcripción, muchos de los cuales han revelado ser importantes reguladores del ciclo celular, proliferación, diferenciación y supervivencia de los precursores linfoides y mieloides (Neelkamal, 2013), donde las CSC desempeñan un papel crucial en el origen y la progresión de los tumores y poseen la capacidad de autorrenovación (Di *et al.*, 2013).

El factor de transcripción OCT4 de la familia Pit-Oct-Unc (POU), es expresado en células troncales tanto embrionarias como adultas, está relacionado con características proliferativas, pluripotentes, de autorrenovación y es considerado como un marcador de CSC (Pan *et al.*, 2002). OCT4 se modifica mediante empalme alternativo e iniciación de traducción alternativa, conduce a la producción de 3 isoformas: OCT4A, OCT4B y OCT4B1 con diferentes funciones (Jerabek *et al.*, 2014).

Takeda *et al.*, (1992), informaron por primera vez que OCT4A y OCT4B eran las principales variantes del gen OCT4, mientras que OCT4B1 fue descubierta por Atlasi *et al.*, (2008). OCT4A se expresa altamente en células troncales embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés) pluripotentes, su expresión se regula negativamente durante la diferenciación, y la inactivación de este factor en las ESC produce una diferenciación (Zaehres *et al.*, 2005). OCT4A se limita al núcleo de las ESC, carcinoma embrionario, células troncales del cáncer, células germinales y tumores de células germinales, donde actúa como factor de transcripción clave para mantener la autorrenovación y la pluripotencia de las células. En contraste, OCT4B se expresa predominantemente en el citoplasma

de las células cancerosas y es incapaz de sostener la pluripotencia de las ESC (Shen *et al.*, 2014), se ha observado que aumenta la proliferación y formación de tumores, actuando como un factor antiapoptótico en células cancerosas (Li *et al.*, 2015). Por otra parte, OCT4B1 se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo de células indiferenciadas y pluripotentes (Panagopoulos *et al.*, 2008), y se ha demostrado que también contribuye en el proceso de tumorigenesis como factor antiapoptótico (Mirzaei *et al.*, 2016).

Diversos estudios han demostrado que OCT4 regula proliferación, metástasis del cáncer y desempeña un papel importante en la tumorigénesis. Además de que sirve como marcador pronóstico de la enfermedad, se ha informado una expresión anormal de OCT4 en una variedad de tumores sólidos, en los que induce pluripotencia y suprime la diferenciación (Yasuda *et al.*, 2011), también se ha sugerido que este factor de transcripción pudiera considerarse como un marcador de predicción pronóstica para el tumor de células germinales testiculares (TGCT) y para los cánceres de páncreas, hígado y pulmón (Villodre *et al.*, 2016). OCT4 se expresa fuertemente en el cáncer de próstata recurrente (Guzel *et al.*, 2014), mientras que, en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, el aumento de la expresión de OCT4, como resultado de la activación de la vía citoplásmica/ β -catenina nuclear, se asoció con un peor pronóstico (Lee *et al.*, 2014). Otro estudio reveló que los altos niveles de OCT4 predicen una supervivencia global más corta en el cáncer gástrico humano (Kong *et al.*, 2014). Además, OCT4 juega un papel valioso en la progresión y el pronóstico del carcinoma gástrico, en donde la alta expresión de OCT4 se asocia con un alto grado de tumor, metástasis ganglionar, tumores en estadio III y una supervivencia global más corta, también se asocia significativamente con la expresión de Ki-67 y VEGF, lo que mejora la proliferación tumoral y la angiogénesis (El-Guindy *et al.*, 2019).

En contraste, diversos informes han mostrado que la baja expresión de OCT4 inhibe la proliferación celular o la metástasis en diferentes tipos de células cancerosas (Wang *et al.*, 2013). Además de que la eliminación endógena o la

sobreexpresión ectópica de OCT4 son cruciales para controlar el papel que juega en la iniciación y propagación del tumor (Wang *et al.*, 2015).

Un estudio realizado mediante citometría de flujo múltiparamétrica en pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA), fue analizada una alta expresión de marcadores de ESC, incluido OCT4, observando que los niveles de OCT4 fueron más altos en el compartimento leucémico inmaduro que contienen células troncales leucémicas (células CD34+CD38-) (Picot *et al.*, 2017). Un estudio realizado a 103 muestras de médula ósea de pacientes con LMA observaron que la cantidad de glóbulos blancos era mayor en aquellos pacientes que tuvieron alta expresión de OCT4 a comparación con aquellos pacientes con una baja expresión de OCT4 (18.2×10^9 versus 2.7×10^9), observando también que los pacientes <70 años de edad y con expresión alta de OCT4 tuvieron una supervivencia global significativamente más corta que aquellos con baja expresión de OCT4, estos hallazgos sugieren que la alta expresión de OCT4 es un evento común y puede tener un impacto adverso en el pronóstico de pacientes con LMA (Yin *et al.*, 2015). En un estudio reciente analizaron la correlación de la expresión de OCT4 con las características clínico-patológicas y los perfiles de supervivencia en pacientes con LMA y observaron que, a comparación con sus controles, la expresión de mRNA de OCT4 fue mayor en pacientes con LMA y se correlacionó con la presencia de cariotipo complejo, estratificación de mayor riesgo y podría servir como un biomarcador convincente para predecir un pronóstico desfavorable en pacientes con LMA (Xiang *et al.*, 2018). Diversas investigaciones han demostrado que OCT4 está sobreexpresado en muchos tipos de cáncer y que podría ser un ejemplo de marcador con valor pronóstico debido a que correlacionan la alta expresión de OCT4 con un peor pronóstico en los pacientes, es decir, tumores más agresivos, supervivencia global corta o quimiorresistencia, sin embargo, el nivel de expresión de las isoformas OCT4A, OCT4B, OCT4B1 y la correlación con la recaída y supervivencia de pacientes con leucemia linfoblástica aguda no han sido investigadas, por lo que incluir esta información en el análisis contribuirá en el diagnóstico en la etapa temprana de la enfermedad. Con este fin el objetivo del estudio es analizar la expresión de las isoformas OCT4A, OCT4B, OCT4B1 y su

asociación con la recaída y la supervivencia de los pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

Un total de 65 muestras de pacientes con LLA fueron incluidas en el estudio, una parte de las muestras fueron tomadas del biobanco del Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Guerrero y otra parte fueron tomadas en el servicio de oncología pediátrica del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco, Gro., en el periodo de septiembre del 2016 a abril del 2020. Dicha población fue diagnosticada con LLA mediante citometría de flujo multiparamétrica. Por otra parte, se captaron 15 muestras de sangre periférica de niños sin leucemia aguda que asistieron al laboratorio clínico del Hospital General de Acapulco, Guerrero, sin antecedentes de leucemia y cuenta normal de leucocitos ($4-10 \times 10^3$ leucocitos/mm³). Los sujetos de ambos grupos de estudio tenían entre 1 y 17 años de edad, se consideraron ambos sexos y que fueran residentes del estado de Guerrero, México.

Recopilación de información

Las características clínicas y algunos datos de biología molecular de todos los pacientes incluidos en el estudio fueron tomados de los expedientes clínicos. Dentro de la información recabada se consideró la edad, sexo, recuentos de glóbulos blancos, translocaciones cromosómicas, recaídas, porcentaje de blastos al inicio, tipo de leucemia y porcentaje de marcadores de diferenciación.

Captación de muestras biológicas

Se tomaron muestras del banco de leucocitos de LLA que pertenece al laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas, y muestras de sangre periférica de niños sin leucemia aguda del Hospital General

de Acapulco, Guerrero. Las muestras de sangre periférica o médula ósea fueron colectadas en tubos con EDTA y almacenadas a 2°C – 8°C, se purificaron los leucocitos de la muestra de sangre periférica mediante una lisis osmótica selectiva de eritrocitos, se extrajo el RNA total de las muestras biológicas mediante el método de Trizol de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Inmunofenotipificación por citometría de flujo

Se utilizó el citómetro de flujo FACSCanto II (Becton Dickinson Biosciences) para realizar el análisis inmunofenotípico de las distintas subpoblaciones celulares en muestras de médula ósea, se empleó un panel de anticuerpos monoclonales (AcMo) conjugados con fluorocromos útiles para la caracterización fenotípica de leucemias agudas, combinados en 5 fluorescencias distintas. Fluorocromos utilizados: FITC/PE/PERCP/PECY7/APC (Becton Dickinson Biosciences). Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: CD1a, CD2, CD3, CD5, CD7, CD8, CD10, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD20, CD21, CD22, CD33, CD34, CD41, CD45, CD56, CD79a y CD117 (Becton Dickinson Biosciences) (Anexo 1). La recaída fue definida como reaparición de un conteo >20% de blastos en medula ósea o la presencia de infiltrados leucémicos en algún sitio del organismo después de completar la quimioterapia de inducción.

Transcripción Reversa y PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Se utilizó el Kit “SuperScript™ III First Strand Syntesis (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) para la síntesis de cDNA a partir de RNA total (1 µg) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA para la PCR en tiempo real se utilizó un ensayo que contuvo la sonda TaqMan y los primers diseñados para cada una de las isoformas OCT4A, OCT4B y OCT4B1: se utilizó el reactivo TaqMan Universal PCR Master Mix II de la marca Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando los oligonucleótidos reportados (tabla 1) por Asadi *et al.*, 2011. En cuanto a los volúmenes de reacción utilizados fueron los siguientes: 10 µL del PCR Master Mix, 1 µL del ensayo conteniendo la sonda TaqMan y los iniciadores, 2.5 µL de cDNA y

agua ultrapura. Todas las reacciones se realizaron por duplicado y para normalizar los resultados de expresión se utilizó el gen endógeno GAPDH. Las condiciones de amplificado fueron: etapa inicial a 94°C durante 2 minutos, se realizaron 40 ciclos: 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 1 minuto. La expresión de los mRNA se determinó a partir del ciclo de umbral (Ct) y los niveles de expresión relativos se calcularon mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Nolan *et al.*, 2006).

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos de las isoformas de OCT4 y GAPDH para RT-qPCR (Asadi *et al.*, 2011).

Gen	Oligonucleótidos	Secuencia	Tamaño del amplificado (bp)
OCT4A	F	CGCAAGCCCTCATTTCAC	111
	R	CATCACCTCCACCACCTG	
	P	CTTCGGATTTTCGCCTTCTCGCCC	
OCT4B	F	CAGGGAATGGGTGAATGAC	177
	R	AGGCAGAAGACTTGTAAGAAC	
	P	AGTTAGGTGGGCAGCTTGAAGGCA	
OCT4B1	F	GGGTTCTATTTGGTGGGTTCC	128
	R	TCCCTCTCCCTACTCCTCTTCA	
	P	ATTCTGACCGCATCTCCCCTCTAAG	
GAPDH	F	GTGAACCATGAGAAGTATGACAAC	123
	R	CATGAGTCCTTCCACGATAAC	
	P	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCTCCTG	

Abreviaciones: F, primer sentido; R, primer antisentido; P, sonda (por sus siglas en inglés).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados en el software estadístico STATA (Versión 14.0). La normalidad de las variables se analizó mediante el uso de la prueba Shapiro-Wilk. Se realizaron frecuencias absolutas y relativas de las variables cualitativas, para los datos continuos se presentan como media y desviación estándar. La prueba estadística de Mann-Whitney se empleó para comparar las diferencias de los niveles de expresión del mRNA de las isoformas de OCT4 en pacientes con y sin leucemia linfoblástica aguda. Las tasas de supervivencia global se calcularon con el intervalo entre la fecha del diagnóstico y la fecha de muerte o el último seguimiento. La supervivencia de los grupos de pacientes se comparó mediante la

prueba de log-rank. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

III. RESULTADOS

Características clínicas y generales de la población

Se trabajó con un total de 80 muestras; 65 de niños con LLA que fueron tomadas del banco de leucocitos de LLA que pertenece al laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico-Biológica y del servicio de oncología pediátrica del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” de Acapulco, Gro. El grupo control lo conforman 15 niños aparentemente sanos, sin leucemia y cuenta normal de leucocitos que fueron captados en el laboratorio clínico del Hospital General de Acapulco, Gro.

De acuerdo a la información recabada los niños sin LLA tuvieron un promedio de edad de 9.7 años, mientras que un promedio de edad de 8.4 años fue para el grupo de niños con LLA, donde prevaleció el género masculino (53.85%). En cuanto a otras características clínicas y moleculares de los niños con LLA; el 90.77% (59/65) presento un fenotipo inmunológico de LLA de precursores B, un 7.69% de precursores T (5/65) y solo un caso de LLA-bifenotípica 1.54% (1/65), el 81.54% (53/65) de los pacientes no presentaron alteraciones cromosómicas y el resto (18.47%) fueron positivos para al menos una translocación. Con base a los grupos de riesgo, se encontró mayor frecuencia (61.54%) de niños con LLA en el grupo de bajo riesgo de acuerdo a la edad (>1-<10 años) y un 75.38% fueron de bajo riesgo de acuerdo al conteo inicial de leucocitos ($<50,000 \text{ mm}^3$) al momento del diagnóstico, observando también que 60.00% tuvieron al menos una recaída (Tabla 1).

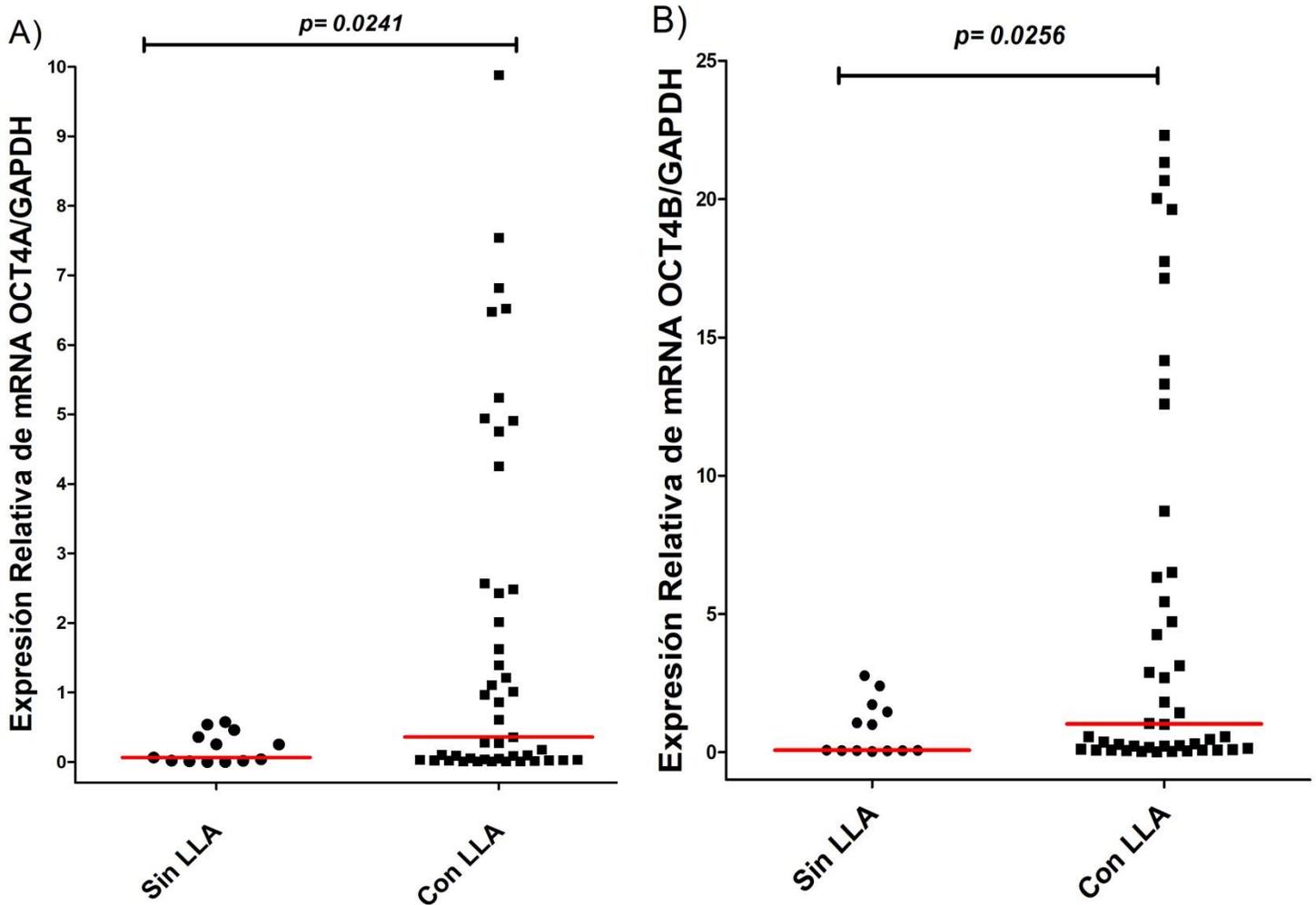
Tabla 1. Características generales y datos clínicos de niños con y sin leucemia linfoblástica aguda (LLA).

Variable	Casos n (%)	Controles n (%)
	65 (100)	15 (100)
Edad ^Ω	8.4 ± 4.4	9.7 ± 7.0
Genero [‡]		
Masculino	35 (53.85)	8 (53.33)
Femenino	30 (46.15)	7 (46.67)
Tipo de leucemia [‡]		
LLA-B	59 (90.77)	-
LLA-T	5 (7.69)	-
LA-bifenotípica	1 (1.54)	-
Presencia de translocación [‡]		
Negativa	53 (81.54)	-
t (12;21)	4 (6.15)	-
t (9;22)	2 (3.08)	-
t (15;17)	1 (1.54)	-
t (1;19)	2 (3.08)	-
TAL1	3 (4.62)	-
Riesgo por edad [‡]		
Bajo (>1 - <10 años)	40 (61.54)	-
Alto (<1 - >10 años)	25 (38.46)	-
Riesgo por cuenta de leucocitos al diagnóstico [‡]		
Bajo <50,000 mm ³	49 (75.38)	-
Alto >50,000 mm ³	16 (24.62)	-
Recaída durante el tratamiento [‡]		
Sin recaída	39 (60.00)	-
Con recaída	26 (40.00)	-
Estado del individuo [‡]		
Vivo	47 (72.31)	-
Finado	18 (27.69)	-

^ΩLos datos representan media ± desviación estándar, [‡]Frecuencia absoluta y relativas, n (%).

Análisis de la expresión de OCTA, OCT4B, OCT4B1 en niños con LLA y sin LLA.

El análisis de la expresión de las isoformas del mRNA de OCT4, mostró un incremento en la expresión del mRNA de OCT4A ($p= 0.0241$), OCT4B ($p= 0.0256$) y OCT4B1 ($p= 0.0421$), (Fig. 1A, B y C), respectivamente, con diferencias significativas entre ambos grupos de estudio. Sin embargo, la isoforma OCT4B y OCT4B1 fueron las que presentaron mayores niveles de expresión en niños con LLA que la isoforma OCT4A.



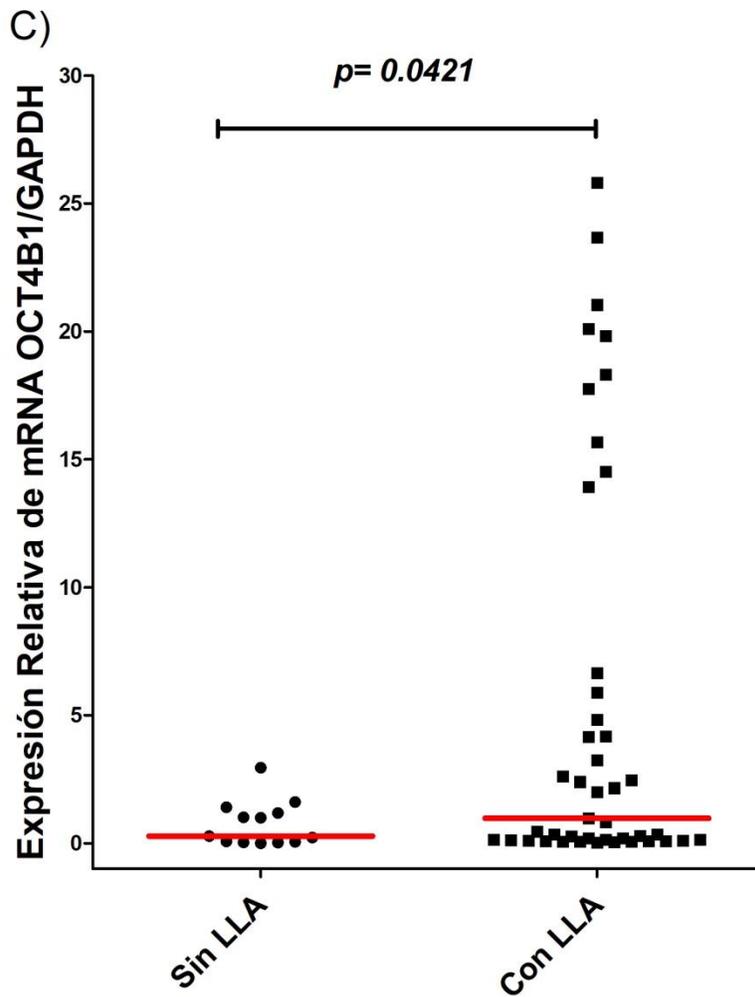


Figura 1. Expresión de las isoformas de OCT4 en niños con y sin LLA. Análisis de RT-qPCR para determinar la expresión del mRNA de **A) OCT4A**, **B) OCT4B** y **C) OCT4B1**. Se realizó por duplicado, valores presentados en medianas, los datos fueron normalizados con GAPDH. U Mann Whitney test $p < 0.05$. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

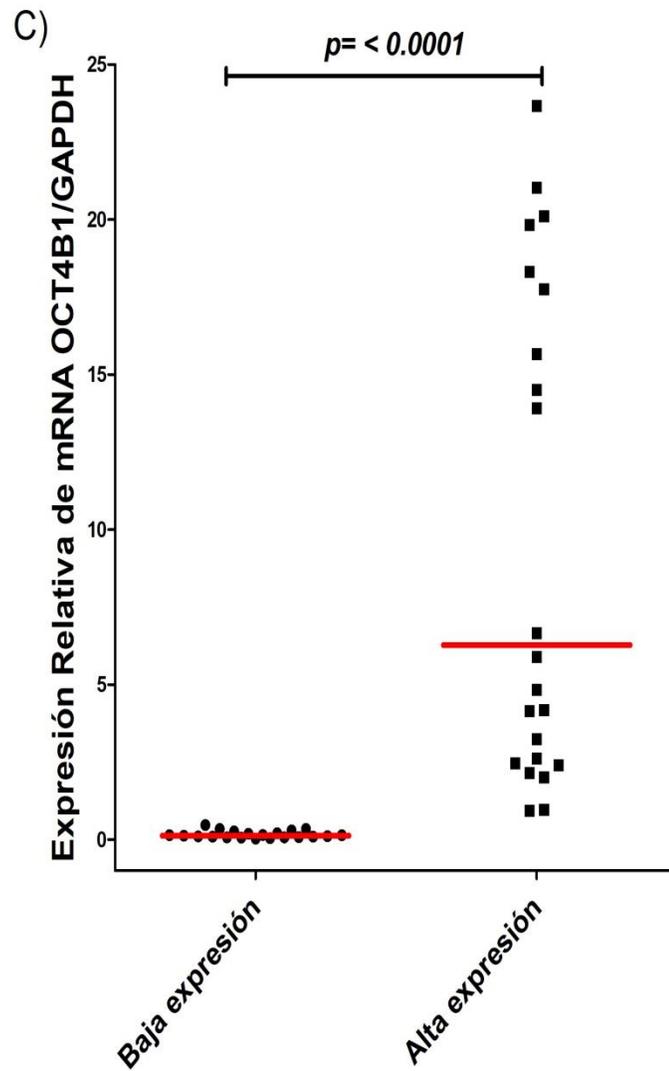


Figura 2. Niveles de expresión de las isoformas de OCT4 en niños con LLA. Análisis de RT-qPCR para determinar la alta y baja expresión del mRNA de **A) OCT4A**, **B) OCT4B** y **C) OCT4B1**. Se realizó por duplicado, valores presentados en medianas, los datos fueron normalizados con GAPDH. U Mann Whitney test $p < 0.05$. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

Análisis de la expresión de las isoformas de OCT4 de acuerdo con las características clínicas de riesgo en niños con LLA.

Partiendo del hecho de que los niños con LLA que mantuvieron alta expresión de las isoformas de OCT4 también mantuvieron características clínicas de alto riesgo, se evaluó la expresión de las isoformas de OCT4 considerando una de las características clínicas más relevantes y de influencia en el pronóstico de los pacientes, entre estas, la recaída durante el tratamiento. Se pudo observar un incremento en la expresión del mRNA de OCT4A ($p=0.1809$), OCT4B ($p=0.1191$) y OCT4B1 ($p=0.1138$) sobre todo en aquellos pacientes que tuvieron recaídas en comparación con los que no tuvieron, sin embargo, no se lograron datos estadísticamente significativos (Figura 3).

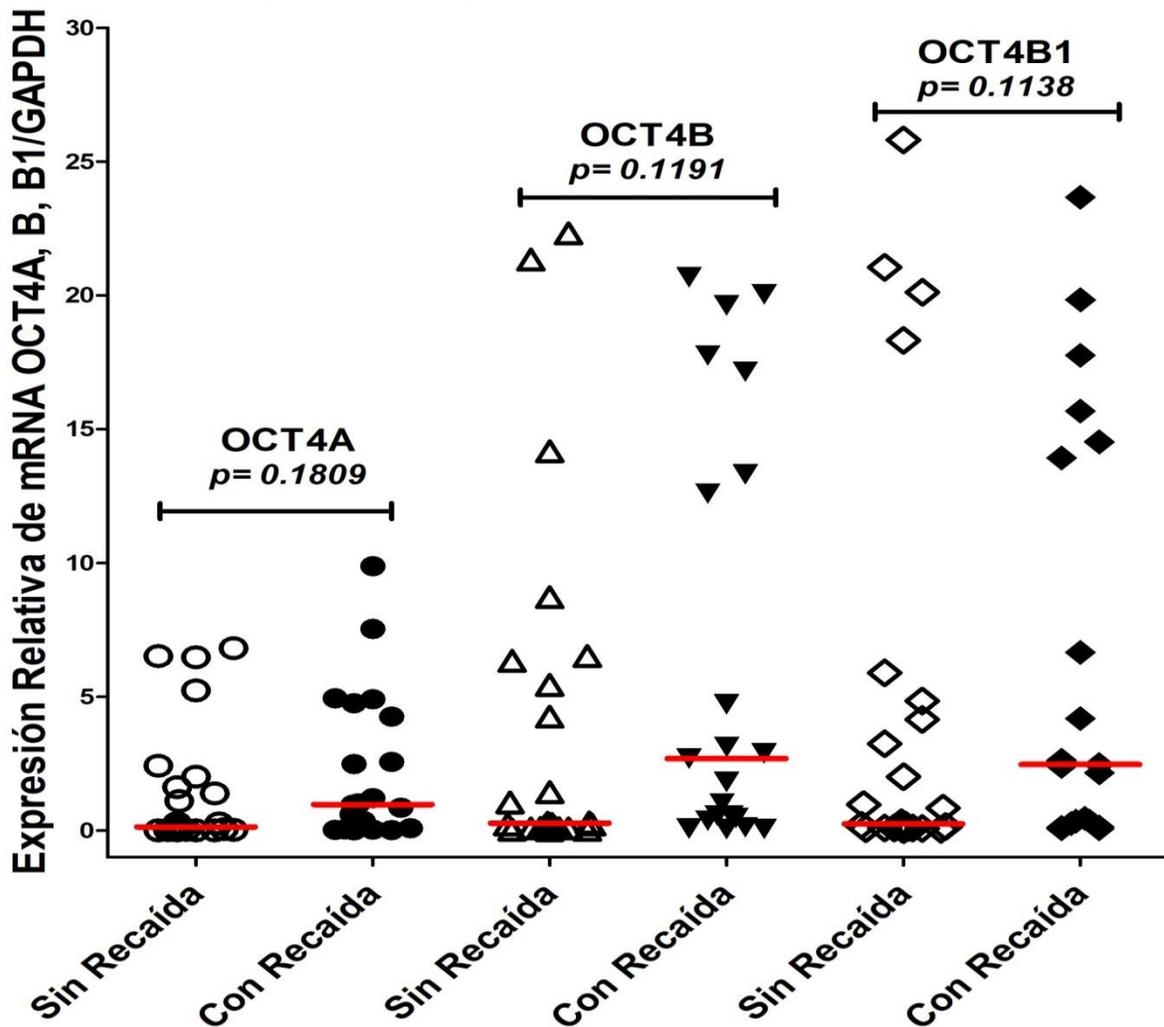
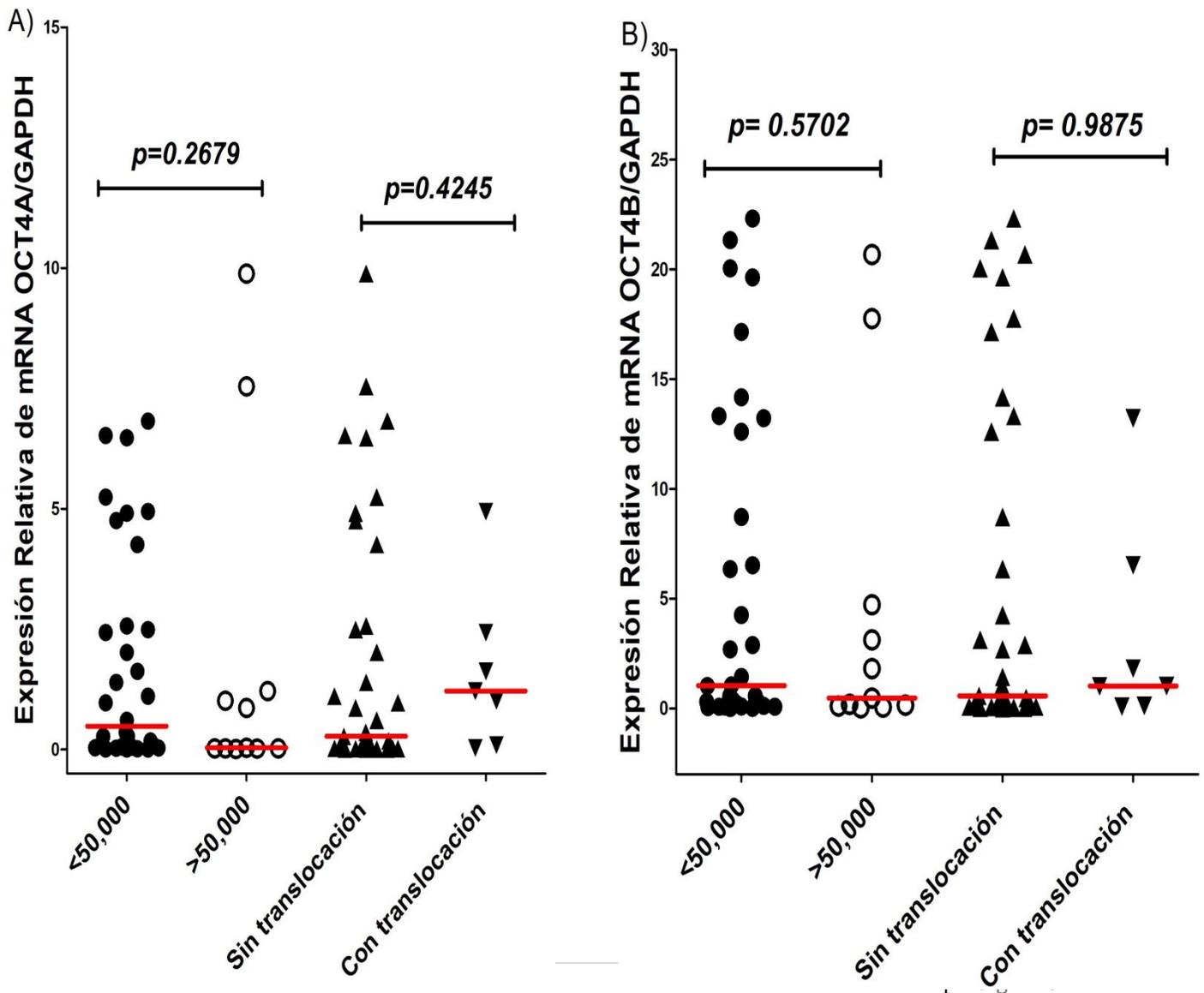


Figura 3. Expresión de las isoformas de OCT4 en presencia de recaídas en niños con LLA. Análisis de RT-qPCR para determinar la expresión del mRNA de las isoformas de OCT4 en niños con LLA con y sin recaída, valores presentados en medianas. Los datos fueron normalizados con GAPDH. U Mann Whitney test $p < 0.05$. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

Se analizó la expresión del mRNA de las isoformas de OCT4 en pacientes con LLA de acuerdo con la cuenta de leucocitos y la presencia de translocaciones cromosómicas, la expresión de OCT4A ($p=0.2679$), OCT4B ($p=0.5702$) y OCT4B1 ($p=0.5176$) en niños con cuentas de leucocitos $<50,000/\text{mm}^2$ fue mayor en comparación a aquellos con $>50,000/\text{mm}^2$, sin diferencias significativas. Por otro lado, al comparar los niños con LLA sin translocaciones con los que si presentan alguna translocación el nivel de expresión del mRNA de OCT4A ($p=0.4245$), OCT4B ($p=0.9875$) y OCT4B1 ($p=0.3863$), es más alto que en aquellos sin translocaciones, sin diferencias significativas para cada grupo de comparación (Figura 4A, B y C), respectivamente. Observando el mismo comportamiento y mayor expresión para la isoforma OCT4B y OCT4B1.



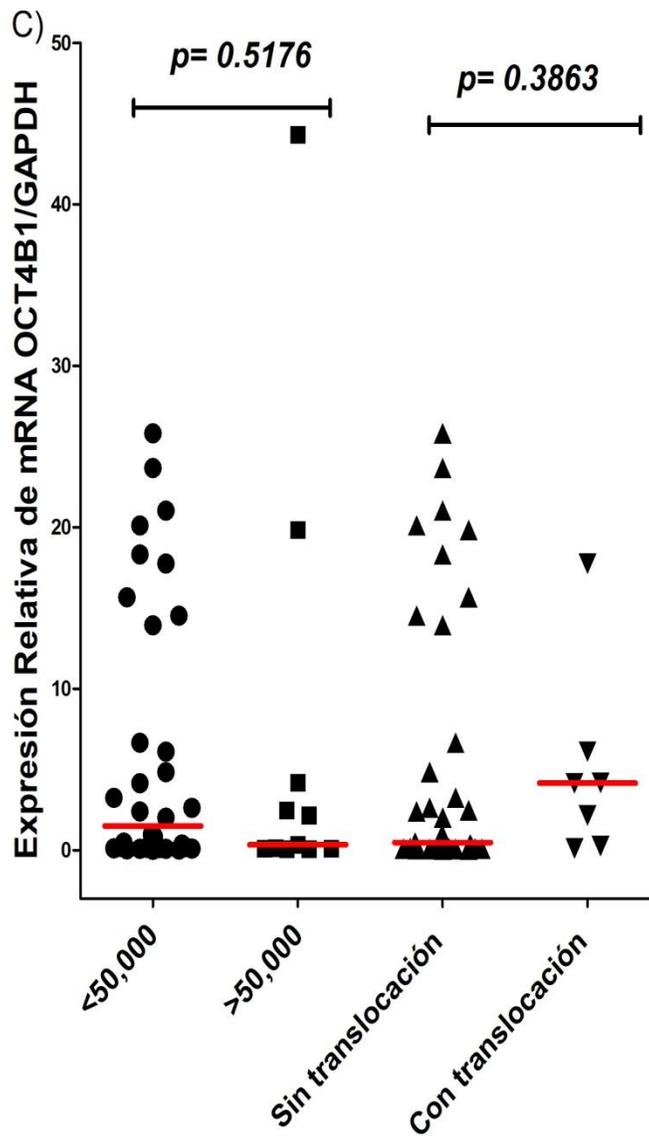


Figura 4. Expresión de las isoformas de OCT4 de acuerdo con la cantidad de leucocitos al diagnóstico y con la presencia de translocaciones. Análisis de RT-qPCR para determinar la expresión del mRNA de las isoformas A) OCT4A, B) OCT4B y C) OCTAB1 en niños con LLA de acuerdo a características clínicas de riesgo, valores presentados en medianas. Los datos fueron normalizados con GAPDH. U Mann Whitney test $p < 0.05$. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda.

Generalmente, los pacientes que muestran una pobre o nula respuesta al tratamiento son precedidos de una o varias recaídas, por tanto, se evaluó el riesgo de recaída de los pacientes considerando las diferentes características clínicas y moleculares como aquellos pacientes con LLA de <1 a >10 años (OR, 1.3, $p=0.715$), del género masculino (OR, 3.3, $p=0.059$), con una cuenta de leucocitos $>50,000\text{ mm}^3$ (OR, 2.0, $p=0.343$), con translocaciones (OR, 3.4; $p=0.170$), alta expresión de la isoforma OCT4A (OR, 2.8, $p=0.097$), OCT4B (OR, 2.7, $p=0.106$) y OCT4B1 (OR, 1.9, $p=0.283$) demostraron que el tener todas estas características de mal pronóstico parecen contribuir en el riesgo de sufrir una recaída comparado con aquellos pacientes con LLA con baja expresión de las isoformas de OCT4 y con características clínicas de bajo riesgo. Sin embargo, de acuerdo a la asociación entre los factores pronósticos del paciente la alta expresión de la isoforma de OCT4A (OR, 2.8, $p=0.097$) fue una de las características moleculares que mostró contribuir más en el aumento en el riesgo de una recaída, además del género masculino (OR, 3.3, $p=0.059$) (Tabla 2).

Tabla 2. Asociación de factores pronósticos y expresión de las isoformas de OCT4 con el riesgo de recaída en casos de LLA.

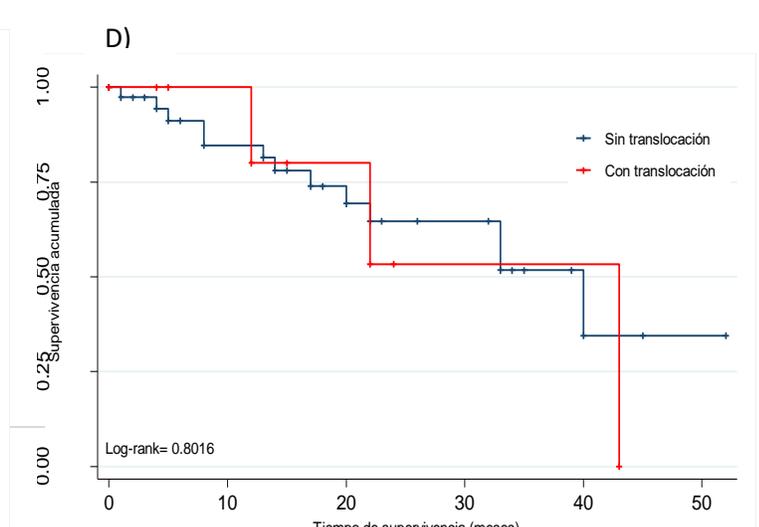
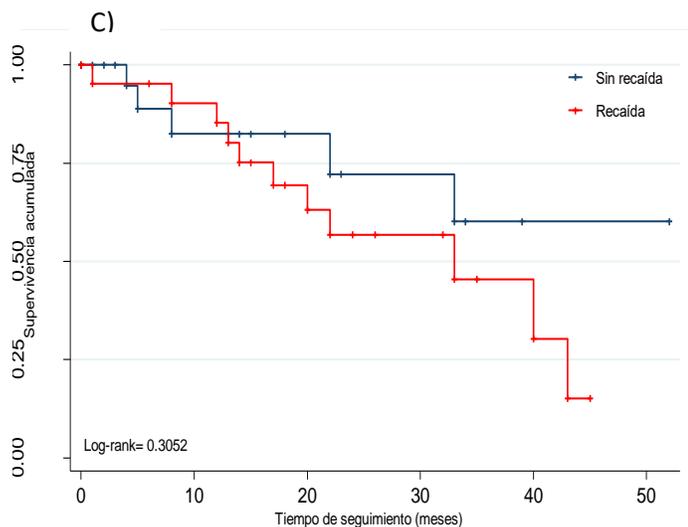
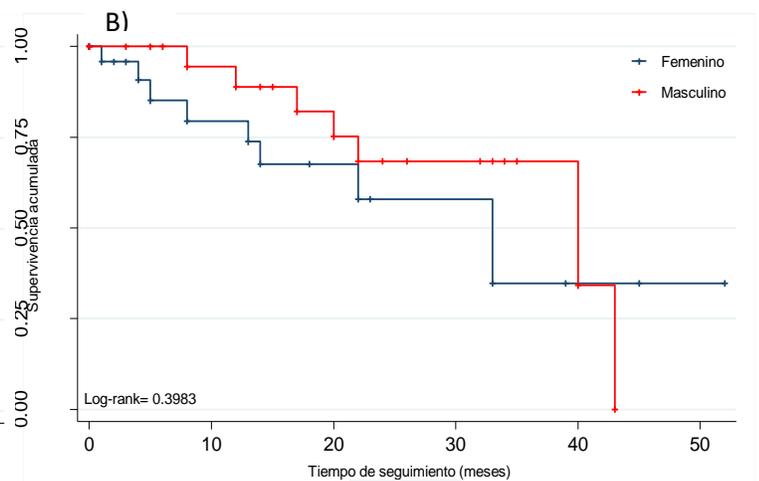
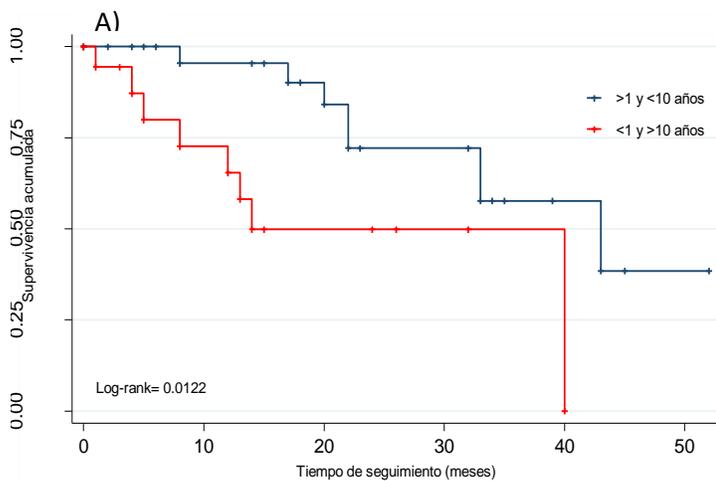
Parámetros	Sin recaída[‡] 58.14% (25)	Con Recaída[‡] 41.86% (18)	Análisis Univariado OR (IC 95%)	p
Riesgo de acuerdo a la edad				
>1 - <10 años	62.50 (15)	57.14 (12)	1.0	
<1 - >10 años	37.50 (9)	42.86 (9)	1.3 (0.4-4.1)	0.715
Género				
Femenino	66.67 (16)	38.10 (8)	1.0	
Masculino	33.33 (8)	61.90 (13)	3.3 (0.9-11.0)	0.059
Leucocitos al diagnóstico				
<50,000 mm ³	83.33 (20)	71.43 (15)	1.0	
>50,000 mm ³	16.67 (4)	28.57 (6)	2.0 (0.5-8.4)	0.343
Translocación				
Sin Translocaciones	91.67 (22)	76.19 (16)	1.0	
Con Translocaciones	8.33 (2)	23.81 (5)	3.4 (0.6-20.0)	0.170
Expresión de las isoformas				
OCT4A				
Baja Expresión	58.33 (14)	33.33 (7)	1.0	
Alta Expresión	41.67 (10)	66.67 (14)	2.8 (0.8-9.5)	0.097
OCT4B				
Baja Expresión	62.50 (15)	38.10 (8)	1.0	
Alta Expresión	37.50 (9)	61.90 (13)	2.7 (0.8-9.1)	0.106
OCT4B1				
Baja Expresión	54.17 (13)	38.10 (8)	1.0	
Alta Expresión	45.83 (11)	61.90 (13)	1.9 (0.6-6.3)	0.283

IC, Intervalo de Confianza; OR, Odds Ratio; [‡]Frecuencia absoluta y relativas, % (n).

*Se consideró como significativo un valor de p<0.05.

Comparación de los perfiles de supervivencia entre los pacientes con alta y baja expresión del ARNm de las isoformas de OCT4 y otros factores de riesgo.

Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier se observaron con tasas diferentes entre los pacientes con LLA y no mostraron asociación significativa en la supervivencia de acuerdo al género (prueba de rango logarítmico; $p= 0.3983$; Fig. 5B), recaídas ($p= 0.3052$; Fig 5C), translocaciones ($p= 0.8016$; Fig. 5D) y número de leucocitos ($p= 0.2984$; Fig. 5E) aunque se observó una reducción de la supervivencia con aquellos factores de alto riesgo. Sin embargo, aquellos pacientes con LLA <1 y >10 años de edad presentaron una supervivencia más corta en comparación con aquellos >1 y >10 años (prueba de rango logarítmico; $p = < 0.0122$; Fig. 5A). No se encontró asociación significativa en la supervivencia entre aquellos niños con LLA con alta o baja expresión del mRNA de las isoformas de OCT4A ($p= 0.3441$; Fig. 5F), B ($p= 0.2066$; Fig. 5G) y B1 ($p= 0.3964$; Fig. 5H).



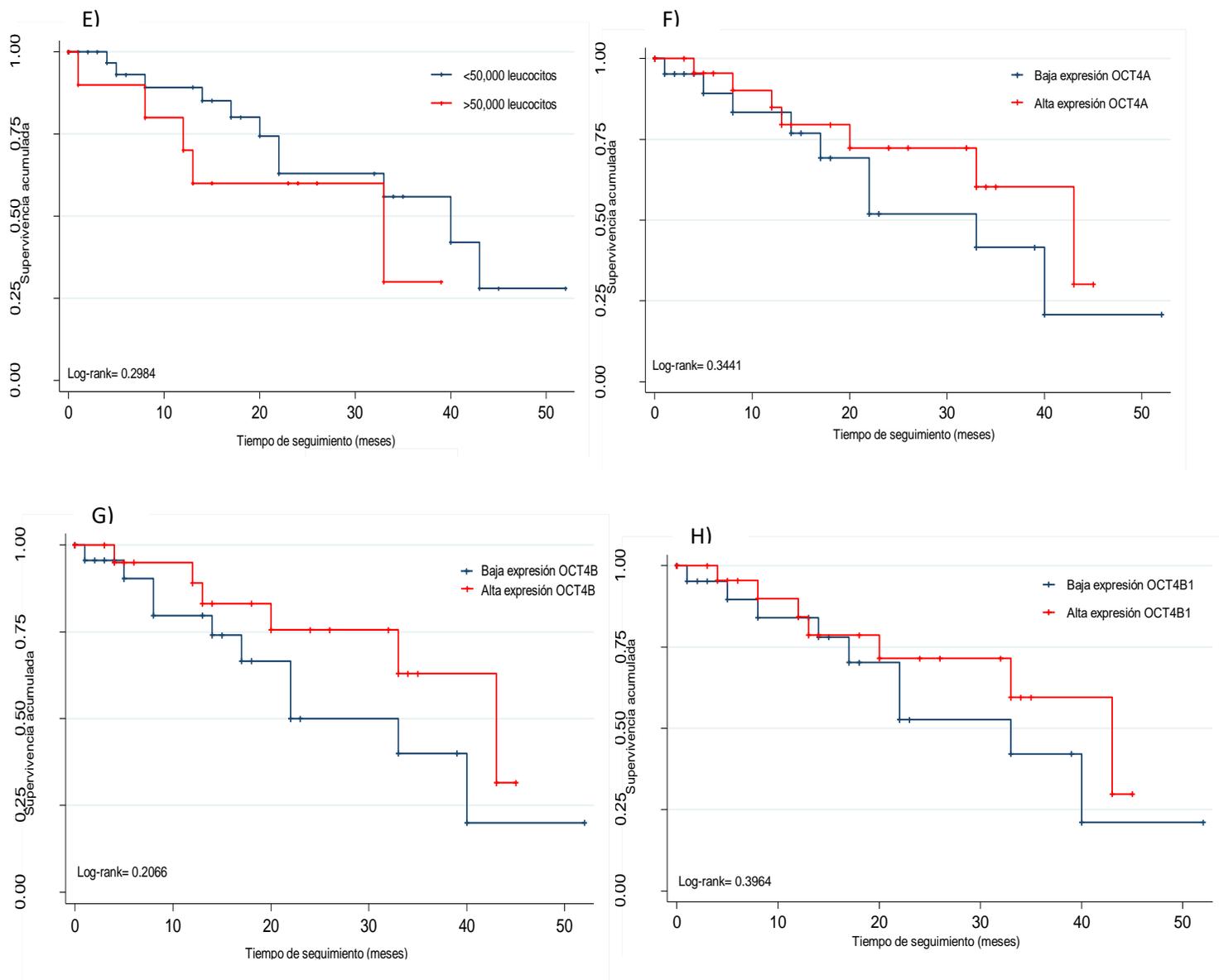


Figura 5. Curvas de Kaplan-Meier para el tiempo de supervivencia general considerando la influencia del riesgo por (A) edad, (B) genero, (C) recaídas, (D) translocaciones, (E) recuento de leucocitos al momento del diagnóstico y la alta o baja expresión del mRNA de las isoformas (F) OCT4A, (G) OCT4B y OCT4B1 en pacientes con LLA.

IV. DISCUSIÓN

Las leucemias agudas se caracterizan por la expansión y resistencia a la apoptosis de células indiferenciadas. La propagación a largo plazo y recaídas de la enfermedad se debe principalmente a un subconjunto de células denominadas células troncales leucémicas (LSC), que adquieren propiedades de auto-renovación, proliferación anormal y detención de la diferenciación (Chao *et al.*, 2017). La auto renovación y la falta de diferenciación también son características de las células troncales embrionarias (ESC), controladas por factores de transcripción conocidos como "factores de Yamanaka", incluido OCT4, el producto del gen POU5F1 (Picot *et al.*, 2017).

La investigación clínica estratifica a los pacientes en grupos de riesgo en función de las características de pronóstico como la edad, género, translocaciones cromosómicas, recuento de glóbulos blancos y la detección de enfermedad mínima residual (EMR). En la población del estudio la mediana de edad fue de 8.4 años, se ha observado que uno de los factores predictivos importantes de la tasa de remisión es la edad del paciente, debido a que en los pacientes más jóvenes se encuentran los tipos genéticos y celulares favorables, mientras que el riesgo de mortalidad relacionada con el tratamiento asociado con la quimioterapia aumenta considerablemente en pacientes de edad avanzada, sin embargo aquellos pacientes <1 año de edad tienen tasas de recaída más altas en comparación con otras edades (Rose-Inman & Kuehl, 2017).

Se ha observado en diversos estudios que el género masculino es el que más predomina en la LLA, concordando con nuestro estudio en donde el 53.85% corresponde a este género. En pacientes masculinos la LLA es biológicamente más agresiva, debido en parte a los riesgos que tienen de desarrollar cáncer testicular (Holmes *et al.*, 2012).

Se ha reportado que OCT4 se expresa en una variedad de tumores sólidos en los que induce pluripotencia y suprime la diferenciación, sin embargo, en pacientes con leucemia linfoblástica aguda la relación entre la expresión de las isoformas de

OCT4, los parámetros clínicos, el pronóstico y supervivencia ha sido poco explorado.

En este estudio, el mRNA de OCT4A mostró un incremento en su expresión en niños con LLA en comparación con el grupo sin LLA ($p= 0.0241$), algo similar se observó en la expresión del mRNA de la isoforma OCT4B en los niños con LLA ($p= 0.0256$) con diferencias significativas. OCT4A es la principal isoforma responsable de las propiedades de troncalidad en las células pluripotentes. Mientras que OCT4B se ha sugerido que podría tener un papel en la respuesta al estrés celular (Wang *et al.*, 2010), además, en el carcinoma de cuello uterino, Li *et al.*, (2015) demostraron que la isoforma OCT4B podría promover la angiogénesis a través de la regulación positiva de CD34 y VEGF, por otro lado, su silenciamiento inhibe significativamente el crecimiento celular, aumentando la apoptosis, estos hallazgos sugieren que OCT4B juega un papel oncogénico debido a su actividad antiapoptótica. En otro estudio demostraron que OCT4B, es estimulada por hipoxia a través de una vía dependiente de HIF2 α en células de cáncer de pulmón, también, induce la expresión de SLUG para facilitar la transición epitelio mesenquima, provocando invasión celular, migración y metástasis (Lin *et al.*, 2018).

En nuestro estudio la expresión del mRNA de OCT4B1 en los niños con LLA tuvo una alta expresión en comparación con los niños sin LLA ($p= 0.0421$). OCT4B1 se ha asociado tanto con la pluripotencia como con la tumorigénesis (mediante la inhibición de la apoptosis y la desregulación del ciclo celular) (Asadi *et al.*, 2011). Informes muestran una regulación positiva de la transcripción de OCT4B1 en cánceres como el gástrico, colorrectal y de vejiga, también se ha demostrado una mayor tasa de apoptosis en una línea celular de cáncer gástrico tratada con un siRNA de OCT4B1, lo que sugiere un papel potencial de OCT4B1 en la iniciación y progresión del tumor (E. Farashahi Yazd *et al.*, 2011).

Respecto a las leucemias, Zhao *et al.*, (2015) detectaron la expresión del mRNA de OCT4A y OCT4B en células nucleadas derivadas de medula ósea (MO) de 72 pacientes con distintos subtipos FAB de leucemia y 18 individuos sanos mediante

RT-PCR, sus resultados mostraron que OCT4A tiene una mayor expresión en las células leucémicas de pacientes con leucemia activa, en comparación con las de pacientes en fase crónica, remisión completa y su grupo control, sin embargo, no encontraron diferencias en la expresión del mRNA de OCT4B entre la fase activa, fase crónica, remisión completa y las células nucleadas de MO de los sujetos control. Por otro lado, Yin *et al.*, (2015) investigaron el estado de expresión de OCT4 en 87 pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA) mediante RTq-PCR, y demostraron que en comparación con los controles la expresión de OCT4 aumento significativamente en pacientes con LMA ($p=0.001$). Además, Picot *et al.*, (2017) demostraron la sobreexpresión de OCT4, NANOG y SOX2 en líneas celulares leucémicas y en células leucémicas de pacientes con LMA, afirmando que estos factores de transcripción pueden estar implicados en la patogenia de las leucemias. De acuerdo a lo reportado por Xiang *et al.*, (2018) determinaron también que, en comparación con los controles, la expresión del mRNA de OCT4 fue mayor en los pacientes con LMA ($p<0,001$). Todos estos resultados sugieren que la sobreexpresión de OCT4 probablemente sea un evento que contribuye en el crecimiento y el mantenimiento de las células leucémicas. Lo que indica que OCT4 puede desempeñar un papel importante en la patogénesis de la leucemia y podría servir como un blanco molecular para el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento de la leucemia (Zhao *et al.*, 2015).

En el presente estudio se observó que los pacientes con recaídas tuvieron una expresión mayor del mRNA de las isoformas de OCT4 en comparación con los que no tuvieron recaídas, (OCT4A $p= 0.1809$, OCT4B $p=0.1191$, OCT4B1 $p= 0.1138$). Lo que implica que OCT4 podría ser uno de los factores oncogénicos clave en la patogénesis de la leucemia y desempeñar un papel importante en el inicio y la progresión de la enfermedad (Zhao *et al.*, 2015). Son muchos los estudios en los que se ha observado que la alta expresión del mRNA o proteína de OCT4 se ha asociado con un mal resultado clínico y con quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer como el de vejiga, ovario, próstata, rectal, glioma, melanoma, meduloblastoma, leucemia mieloide aguda, carcinoma hepatocelular y carcinoma esofágico de células escamosas (Mohiuddin *et al.*, 2019). Se sugiere

que la alta expresión de OCT4 podría mejorar la tumorigénesis y la metástasis al inducir la proliferación celular, promover la invasión tumoral e inhibir la apoptosis mediante la activación de diferentes genes y vías (Yan *et al.*, 2018).

Por otro lado, al evaluar la relación entre la expresión del mRNA de las isoformas de OCT4 y la cantidad de leucocitos al diagnóstico, se observó que los pacientes con cuentas de <50,000 la expresión del mRNA de las isoformas era más alta en comparación con aquellos pacientes con cuentas de leucocitos >50,000, Resultado que se contrapone con lo observado por Yin *et al.*, (2015) donde informo que la cantidad de glóbulos blancos de los pacientes con alta expresión de OCT4 es mayor que la de los pacientes con baja expresión de OCT4 (18.2×10^9 versus 2.7×10^9 L - 1, $p = 0.001$), también observaron que la sobreexpresión de OCT4 se correlaciona con la presencia de cariotipos anormales y una mayor estratificación de riesgo en pacientes con LMA.

En cuanto a las translocaciones cromosómicas se pudo observar que la expresión del mRNA de las isoformas de OCT4 era más alta en pacientes sin translocaciones en comparación con aquellos pacientes con translocaciones. Picot *et al.*, (2017) mostró que OCT4 se sobreexpresa en líneas celulares leucémicas que muestran una variedad de anomalías y fenotipos oncogénicos. En células de meduloblastoma, la sobreexpresión de OCT4A indujo aberraciones en el número de copias cromosómicas, que variaban en frecuencia y tipo según la línea celular, se ha observado que la expresión aberrante de los genes de pluripotencia tiene efectos oncogénicos y puede contribuir a una mayor adquisición de aberraciones cromosómicas heterogéneas derivadas de células cancerosas de tipo troncal (Gonçalves da Silva *et al.*, 2017). En nuestro estudio no se observó una asociación significativa en la supervivencia general entre las expresiones altas del mRNA de las isoformas de OCT4. Se deben investigar más casos para confirmar aún más su importancia en el pronóstico de la LLA.

Los factores de transcripción como OCT4, SOX y NANOG que generalmente se expresan en células troncales embrionarias, tumores de células germinales y tumores sólidos también han sido detectados en células leucémicas, sin embargo,

hay menos datos disponibles en las neoplasias malignas hematológicas, pero se ha informado que estos pueden estar implicados en la patogenia de las leucemias. Por lo tanto, la expresión aberrante del gen OCT4 en las células leucémicas puede conducir a una activación inapropiada de los factores de crecimiento de las células troncales que promueven la proliferación celular y disminuyen la apoptosis.

V. CONCLUSIONES

- Las isoformas de OCT4 se expresan y se encuentran elevadas en casi todas las muestras de pacientes con LLA, siendo OCT4B1 el que mantiene los niveles más altos de expresión.
- Los pacientes que presentaron recaídas mostraron tendencia de altos niveles de expresión del mRNA de las isoformas de OCT4, sin embargo, no se encontró asociación significativa en la supervivencia en niños con LLA con alta o baja expresión del mRNA de las isoformas

VI. ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para teñir con anticuerpos monoclonales (BD, Biociencias, 2018).

Se utiliza el citómetro de flujo de 6 fluorescencias (BD FACS Canto II), en el cual se adquieren 100,000 eventos por tubo.

Panel de anticuerpos monoclonales para inmunofenotipo

FLUOROCROMOS						
TUBO	FITC	PE	PERCP	PECY7	APC	APCCY5
CT	-	-	-	-	-	-
ST	-	-	-	-	-	-
1	CD10	CD7	CD19	CD5	CD20	CD45
2	CD56	CD117	CD3	CD2	HLA-DR	CD45
3	CD15	CD33	CD34	CD11b	CD1a	CD45
4	CD41a	CD13	CD14	CD8	CD71	CD45
5	MPO	CD79a	CD3c	-	TdT	CD45

Panel alternativo de anticuerpos monoclonales para inmunofenotipo

FLUOROCROMOS						
TUBO	FITC	PE	PERCP	PECY7	APC	APCCY5
CT	-	-	-	-	-	-
ST	-	-	-	-	-	-
1	CD10	CD21	CD45	CD5	CD22	-
2	CD56	CD117	CD45	CD2	HLA-DR	-
3	CD15	CD33	CD45	CD11b	CD7	-
4	CD41a	CD13	CD45	CD8	CD1a	-
5	MPO	CD79a	CD45	CD3c	TdT	-
6	CD20	-	CD34	-	CD19	-

CD: cluster of differentiation, **CT:** control **ST:** sin teñir, **FITC:** isotiocianato de fluoresceína, **PE:** ficoeritrina, **PerCP:** peridina clorofila proteína, **PECY7:** tándem ficoeritina **APC:** alofocianina, **APCCY5:** alofocianina-cianina5

Procedimiento: BDBiociencias, (2018).

1. Agregar 5 μL de cada anticuerpo correspondiente a cada uno de los 6 tubos como se muestra en la tabla de arriba, a excepción del tubo # 5, al cual solo se le agregará CD45.
2. Agregar a cada uno de los tubos 50 μL de sangre periférica o médula ósea (cuenta de leucocitos de 5 a 10,000 / mm^3). Mezclar utilizando el vórtex.
3. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos en condiciones de oscuridad.
4. Agregar a los tubos 1 ml de solución de lisis, posteriormente mezclar dando vórtex.
5. Incubar a temperatura ambiente por 10 minutos en condiciones de oscuridad.
6. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
7. Decantar el sobrenadante, secar el exceso con papel absorbente.
8. Agregar 1 ml de solución FACSFlow, posteriormente mezclar dando vórtex.
9. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos, decantar el sobrenadante, secar el exceso con papel absorbente.

**PASOS PARA LOS TUBOS # 1, 2, 3,
4 Y 6.**

10. Adicionar 1 ml de solución FACSFlow, dar vórtex y posteriormente centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
11. Decantar el sobrenadante, secar el exceso con papel absorbente.
12. Repetir una vez más los pasos 10 y 11.
13. Agregar 500 μL de solución FACSFlow, adquirir la muestra en el citómetro de flujo.

PASOS PARA EL TUBO # 5.

10. Colocar 500 μL de solución permeabilizante al tubo # 5, incubar a temperatura ambiente por 10 minutos en condiciones de oscuridad.
11. Centrifugar a 3000 rpm por 5 minutos.
12. Decantar el sobrenadante, secar el exceso con papel absorbente.
13. Adicionar 1 ml de solución FACSFlow, centrifugar a 3000

rpm por 5 minutos.

14. Decantar el sobrenadante, secar el exceso con papel absorbente.
 15. Adicionar 5 μL de los anticuerpos citoplasmáticos correspondientes faltantes.
 16. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en condiciones de obscuridad.
 17. Agregar 500 μL de solución FACSFlow, adquirir la muestra en el citómetro de flujo.
-

VII. REFERENCIAS

Asadi, MH., Mowla, SJ., Fathi, F., Aleyasin, A., Asadzadeh, J., Atlasi, Y., (2011). OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. *Int J Cancer*. 128: 2645–2652.

Atlasi, Y., Mowla, SJ., Ziaee, SA., Gokhale, PJ., Andrews, PW. (2008). OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. *Stem Cells*. 26: 3068–3074.

BDBiociences, (2018). Support protocols of multicolor flow cytometry, 2018. <http://www.bdbiosciences.com>

Boulais, PE., and Frenette, PS. (2015). Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*. 125: 2621–2629.

Chao, MP., Gentles, AJ., Chatterjee, S., Lan, F., Reinisch, A., Corces, MR., *et al.* (2017). Human AMPL-iPSCs reacquire leukemic properties after differentiation and model clonal variation of disease. *Cell Stem Cell*. 20:329–344.

Di, J., Duiveman-de Boer, T., Zusterzeel, PL., Figdor, CG., Massuger, LF., Torensma, R. (2013). The stem cell markers Oct4A, Nanog and c-Myc are expressed in ascites cells and tumor tissue of ovarian cancer patients. *Cell Oncol*. 36(5):363–74.

El-Guindy, DM., Wasfy, RE., Ghafar, MA., Ali, DA., Elkady, AM. (2019). Oct4 expression in gastric carcinoma: association with tumor proliferation, angiogenesis and survival. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 31:3.

Ehsan Farashahi Yazd., Mahmood Reza Rafiee ., Masoud Soleimani ., Mahmood Tavallaei ., Maryam Kabir Salmani ., Seyed Javad Mowla. (2011). OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, generates a stable truncated protein with a potential role in stress response. *Cancer Lett*. 309 (2): 170-5.

Friedmann, AM and Weinstein, HJ. (2009). The role of prognostic features in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. 23(5):1033-42.

Gao, Y., Wang, X., Han, J., Xiao, Z., Chen, B., Su, G., *et al.* (2010) The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *J.Genet. Genomics*. 37:461–465.

Gonçalves da Silva, P., Teixeira dos Santos, MC., Oliveira Rodini, C., Kaid, C., Leite Pereira, MC., Furukawa, G., *et al.* (2017). High OCT4A levels drive tumorigenicity and metastatic potential of medulloblastoma cells. *Oncotarget*. 8(12): 19192–19204.

Guzel, E., Karatas, OF., Duz, MB., Solak, MI., Ozen, M. (2014). Differential expression of stem cell markers and ABCG2 in recurrent prostate cancer. *Prostate*. 74:1498–1505.

Holmes, L., Hossain, J., desVignes-Kendrick, M., Opara, F. (2012). Sex variability in pediatric leukemia survival: Large cohort evidence. *ISRN Oncology*. 1-9.

Hunger, SP., Mullighan, CG., Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* 373, 1541–1552

Jerabek, S., Merino, F., Scholer, HR., Cojocaru, V. (2014). OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. *Biochim Biophys Acta.* 1839:138–154.

Jiang, Z., Wu, D., Lin, S., Li, P. (2016). CD34 and CD38 are prognostic biomarkers for acute B lymphoblastic leukemia. *Biomark Res.* 4: 23.

Kong, D., Su, G., Zha, L., Zhang, H., Xiang, J., Xu, W., *et al.* (2014). Coexpression of HMGA2 and OCT4 predicts an unfavorable prognosis in human gastric cancer. *Med Oncol.* 31(8):130.

Lee, SH., Koo, BS., Kim, JM., Huang, YS., Bae, WJ., Kang, HJ., *et al.* (2014). Wnt/b-catenin signaling maintains self-renewal and tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma stem-like cells by activating Oct4. *J Pathol.* 234:99–107.

Li, SW., Wu, XL., Dong, CL., Xiem, XY., Wu, JF., Zhang, X. (2015) The Differential Expression of OCT4 Isoforms in Cervical Carcinoma. *PLoS ONE.* 10(3): e0118033.

Lin, SC., Chung, CH., Chung, CH., Kuo, MH., Hsieh, CH., Chiu, YF. (2018). OCT4B mediates hypoxia-induced cancer dissemination. *Oncogén.* 38 (7): 1093-1105.

Long, J., Liu, S., Li, K., Zhou, X., Zhang, P., Zou, L. (2014). High proportion of CD34+/CD38-cells is positively correlated with poor prognosis in newly diagnosed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 55(3):611–617.

Mirzaei, MR., Kazemi, AM., Asadi, MH., Mowla, SJ. (2016). Altered expression of high molecular weight heat shock proteins after OCT4B1 suppression in human tumor cell lines. *Cell J.* 17(4): 608-616.

Mohiuddin, IS., Wei, SJ., Kang, MH. (2019) Role of OCT4 in cancer stem-like cells and chemotherapy resistance. *BBA - Molecular Basis of Disease.*

Neelkamal, R.R., (2013). Acute lymphoblastic leukemia: characterization and its prognostic values. *IJPRR.* 2(11), pp.27–36.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., *et al.* (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription Factor Oct4. *Cell.* 95, 379-391.

Pan, GJ., Chang, ZY., Scholer, HR., Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 12 (5–6):321–9.

Panagopoulos, I., Möller, E., Collin, A., Mertens, F. (2008). The POU5F1P1 pseudogene encodes a putative protein similar to POU5F1 isoform 1. *Oncol. Rep.* 20: 1029–1033.

Pelayo., R, Enciso, J., and Mendoza., L. (2015). Normal vs. Malignant hematopoiesis: the complexity of acute leukemia through systems biology. *Front. Genet.* 6:290.

Picot, T., Aanei, CM., Fayard, A., Falandrin-Gresta, P., Tondeur, S., Gouttenoire, M., *et al.*, (2017). Expression of embryonic stem cells markers in acute myeloid leukemia. *Tumor Biol.* 39 (7).

Picot, T., Kesr, S., Wu, Y., Aanei, CM., Flandrin-Gresta, P., Tondeur, S., *et al.* (2017). Potential Role of OCT4 in Leukemogenesis. *Stem Cells Dev.*(22):1637-1647.

Pui, CH., Robison, LL and Look, AT. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 371:1030–43.

Rose-Inman, H & Kuehl, D (2017). Acute Leukemia. *Hematol Oncol Clin.* 31: 1011–1028.

Siegel, R., Naishadham, D., Jemal, A. (2012). Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* 62, 10–29.

Shen, L., Qin, K., Wang, D., Zhang, Y., Bai, N., Yang, S., *et al.* (2014). Overexpression of Oct4 suppresses the metastatic potential of breast cancer cells via Rnd1 downregulation. *BBA Mol. Basis Dis.* 1842: 2087–2095.

Short, NJ., Jabbour, E (2017). Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: How to Recognize and Treat It. *Curr Oncol Rep.* 19:6.

Takeda, J., Seino, S., Bell, GI. (1992). Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Res.* 20: 4613–4620.

Villodre, ES., Kipper, FC., Pereira, MB., Lenz, G. (2016). Roles of OCT4 in tumorigenesis, cancer therapy resistance and prognosis. *Cancer treatment reviews.* 51:1-9.

Wang, YD., Cai, N., Wu, XL., Cao, HZ., Xie, LL., Zheng, PS. (2013). OCT4 promotes tumorigenesis and inhibits apoptosis of cervical cancer cells by miR-125b/BAK1 pathway. *Cell Death Dis.* 4, e760.

Wang, X., Dai, J. (2010). Concise Review: Isoforms of OCT4 Contribute to the Confusing Diversity in *Stem Cells.* 28 (5): 885-893.

Wang, YJ., & Herlyn, M. (2015). The emerging roles of Oct4 in tumor-initiating cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 309(11):C709–18.

Xiang, Y., & Zhou, X. (2018): Octamer-binding transcription factor 4 correlates with complex karyotype, FLT3-ITD mutation and poorer risk stratification, and predicts unfavourable prognosis in patients with acute myeloid leukaemia. *Hematology.* 23 (10): 721-728.

Yan, Fu., Peizhun, Du., Jing, Zhao., Cheng'en, Hu., Yunyun, Qin., Guangjian Huang. (2018). Gastric Cancer Stem Cells: Mechanisms and Therapeutic Approaches. *Yonsei Med J.* 59(10): 1150–1158.

Yasuda, H., Tanaka, K., Okita, Y., Araki, T., Saigusa, S, Toiyana, Y., *et al.* (2011). CD133, OCT4 and NANOG in ulcerative colitis-associated colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2:1065–1071.

Yin, JY., Tang, Q., Zhai, LL., Zhou, LY., Quian, JL., Wen, JD., *et al.* (2015). High expression of OCT4 is frequent and may cause undesirable treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Tumor Biol.* 36:9711–9716.

Yi, J., Zhou, LY., Yi, YY., Zhu, X., Su, XY., Zhao, Q., *et al.* (2019). Low expression of pseudogene *POU5F1B* affects diagnosis and prognosis in AML (2019). *Med Sci Monit.* 25: 4952-4959

Zaehres, H., Lensch, MW., Daheron, L., Stewart, SA., Itskovitz-Eldor, J., Daley, GQ. (2005). High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 23:299–305.

Zhao, Q., Ren, H., Feng, S., Chi, Y., He, Y., Yang, D., *et al.* (2015). Aberrant expression and significance of OCT-4A transcription factor in leukemia cells. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 54(1), 90–96.