



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"EXPRESION DEL GEN MAGE-A Y HLA EN CELULAS DE
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA DEL HOSPITAL
GENERAL DE MEXICO."

T E S I S

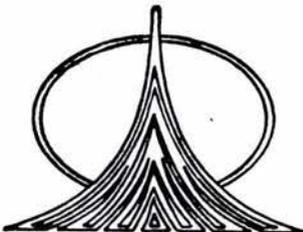
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MIGUEL ANGEL MERGOLD VILLASEÑOR

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE MIRANDA PERALTA



MEXICO, D. F.

2004.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mi hija:

ERATZIN IRERI

Por que se ha convertido en mi fuerza y motivo para luchar y seguir adelante. Con mucho amor y cariño.

A mis padres:

Porque sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y porque nunca podré pagar todos sus desvelos ni aún con las riquezas más grandes del mundo. Por lo que soy y por todo el tiempo que les robé pensando en mi... Gracias. Con amor y respeto.

A mi hermana:

Por las peleas, las platicas y consejos, por ser un gran apoyo y ejemplo en mi vida.

A mi hermano:

Por todos los momentos felices que pasamos juntos, por cada una de tus palabras que las llevo muy grabadas en el corazón, por cada lección que me enseñaste y por las que aun me continuas enseñando, y sin lugar a duda, la lección más grande y bella que me enseñaste fue: vivir, amar y luchar por lo que estabas dispuesto a dar la vida, TU TRABAJO Y TU FAMILIA. Ahora se que me acompañas en mis recuerdos y que me das una gran fortaleza para seguir adelante, te extraño.

A mi Abuela:

Mamita, donde estés, se que compartes mis triunfos y logros con gran felicidad, porque parte de este logro te lo debo a ti, porque siempre estuviste a mi lado. Siempre estarás en mi corazón y en mi mente, te extraño mucho.

A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, FES "Zaragoza" por la formación profesional que recibí.

Al Hospital General de México, Laboratorio de Biología Molecular U-204 por el uso de sus instalaciones para llevar a cabo la última etapa de mi preparación profesional.

Al Dr. Enrique Miranda Peralta por el asesoramiento y la dirección otorgada para la elaboración de este trabajo, consejos y amistad.

Al Dr. Edelmiro Santiago Osorio por aceptar ser mi tutor interno en el trabajo de investigación, por su apoyo, consejos y muy en especial por su amistad e impulsarme siempre hacia adelante.

Al M. en C. Adolfo Martínez Tovar por su gran apoyo, aportaciones y asesoramiento en la realización de este trabajo, por su amistad, confianza y dedicación, que fueron fundamentales para el trabajo de investigación.

Al comité evaluador Dr. Benny Weiss Steider, M. en B.E. Enrique Mendieta Márquez y a la Dra. María de Lourdes Mora García, por sus valiosos comentarios y aportaciones que sin lugar a duda enriquecieron y mejoraron este trabajo.

A todo el equipo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular: Dra. Etta Rozen, Irma, Berta y Josué, por todos los momentos alegres, por su compañía, consejos y comentarios para la realización de este trabajo.

A la M. en C. Ana Luisa por su gran apoyo en el asesoramiento en la técnica y metodología de secuenciación de genes.

A los profesores de biología de la FES Zaragoza que me dieron formación académica a lo largo de la carrera.

A todos y cada uno de mis compañeros y buenos amigos que a lo largo de la carrera estuvimos juntos : Claudia G, Inés, Yadira, Eloir, Iván, Miriam, Paula, Claudia P, Griselda y todos aquellos que de alguna manera me acompañaron a lo largo de la carrera y en las expediciones de campo.

A todos mis compañeros de la selección de Básquet Ball que sin saberlo me ayudaron en los momentos más difíciles de la carrera como en mi vida personal desahogándome y a la vez impulsándome a superarme.

A la Biol. Florencia Becerril por estar siempre conmigo, por los buenos y malos momentos, por los comentarios y consejos para mejorar este trabajo, pero sin lugar a duda por tu paciencia, cariño, amor y amistad.

A Eduardo (alias Lalitros), por ser un gran amigo durante toda la carrera y haber compartido juntos momentos buenos y sobre todo momentos malos, sin perder nunca el sentido del humor.

DURANTE EL DESARROLLO DE ESTE TRABAJO
GOCE DE LA BECA OTORGADA POR EL
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y
TECNOLOGIA "CONACyT" COMO PARTE DEL
APOYO AL PROYECTO 30759 EN EL PERIODO
DE SEPTIEMBRE 2002 A AGOSTO DEL 2003
POR LO CUAL HAGO PATENTE MI
AGRADECIMIENTO.

INDICE GENERAL

	Página
INDICE GENERAL	VI
INDICE DE FIGURAS	VIII
INDICE DE TABLAS	X
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1 CANCER	2
2.2 PRESENTACION DE ANTIGENOS	5
2.3 PEPTIDOS ANTIGENICOS	11
2.4 FAMILIA MAGE	13
2.4.1 EXPRESION DEL GEN	14
2.4.2 LOCALIZACION DE LA FAMILIA	18
2.4.3 DESCRIPCION DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA MAGE	19
2.4.4 EXPRESION DE LA FAMILIA MAGE EN NEOPLASIAS	21
2.5 LEUCEMIA	24
2.5.1 ETIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD	25
2.5.2 CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS	26
2.5.3 INCIDENCIA DE LAS LEUCEMIAS	27
2.5.4 LEUCEMIA AGUDA	28
2.5.5 FRECUENCIA EN LEUCEMIA AGUDA	28
2.5.6 CUADRO CLINICO Y TRATAMIENTOS ACTUALES	29
3. JUSTIFICACION	31
4. HIPOTESIS	33
5. OBJETIVOS	33
5.1 OBJETIVO GENERAL	33
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	33
6. METODOLOGIA	35
6.1 INCLUSION DE PACIENTES	35
6.2 SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA	35

	Página
6.3 ENSAYOS DE EXPANSION DE LINEAS CELULARES	36
6.4 EXTRACCION DE RNA	36
6.5 SINTESIS DE cDNA	37
6.6 PCR (REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA)	37
6.7 CONDICIONES DE AMPLIFICACION	38
6.7.1 MAGE-A	38
6.7.1 HLA-A, -B, -C	39
6.8 ANALISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	40
6.9 PURIFICACION DEL GEN MAGE-A1 Y MAGE-A3	41
6.10 SECUENCIA DEL GEN	41
6.11 INMUNOHISTOQUIMICA	41
6.12 ANALISIS POR CITOMETRIA DE FLUJO	42
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	43
8. RESULTADOS	44
8.1 ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN MAGE -A EN DONADORES NORMALES Y K-562	44
8.2 CARACTERISTICAS DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA	46
8.3 EXPRESION DE LOS GENES MAGE-A1 Y MAGE-A3 EN LEUCEMIA AGUDA	48
8.4 ANALISIS DE LA SECUENCIACION DEL GEN MAGE-A	51
8.5 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA MAGE EN LEUCEMIA AGUDA	55
8.6 ANALISIS DE LA EXPRESION DE HLA-I EN PACIENTES CON LEUCEMIA POR CITOMETRIA DE FLUJO	57
8.7 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOCUS ESPECIFICO DE HLA CLASE I EN MUESTRAS DE PACIENTE CON EXPRESION DE MAGE-A	61
9. DISCUSION	63
10. CONCLUSIONES	68
11. PERSPECTIVAS	69
12. APENDICES	70
12.1 APENDICE 1. DATOS CLINICOS	70
12.2 APENDICE 2. PROGRAMA BLASTn 2.2.9 (MAGE-A1)	72
12.3 APENDICE 3. PROGRAMA BLASTn 2.2.9 (MAGE-A3)	77
13. BIBLIOGRAFIA	81

INDICE DE FIGURAS.

	Página
FIGURA 1. PROCESO DE TRANSFORMACION DE CELULAS NORMALES	3
FIGURA 2. ESQUEMA MOLECULAR DE MHC CLASE I	7
FIGURA 3. PROCESAMIENTO DE ANTIGENOS ENDOGENOS POR LA RUTA CITOSOLICA	8
FIGURA 4. PROCESO DE UBIQUITINACION Y DEGRADACION VIA PROTEOSOMA	9
FIGURA 5. ESPERMATOGENESIS	15
FIGURA 6. REGULACION TRANSCRIPCIONAL DEL GEN MAGE-A1	16
FIGURA 7. LOCALIZACION DE LOS GENES DE LA FAMILIA MAGE	18
FIGURA 8. HEMATOPOYESIS	24
FIGURA 9. INTEGRIDAD DEL RNA DE NORMALES Y K-562	44
FIGURA 10. EXPRESION DEL GEN MAGE-A EN K-562 Y NORMALES	45
FIGURA 11. INTEGRIDAD DEL RNA DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA	48
FIGURA 12. EXPRESION DEL GEN MAGE-A1 Y MAGE-A3 EN LEUCEMIMA AGUDA	49
FIGURA 13. SECUENCIA DEL GEN MAGE-A1	53
FIGURA 14. SECUENCIA DEL GEN MAGE-A3	54
FIGURA 15. EXPRESION DE LA PROTEINA MAGE EN K-562	55
FIGURA 16. EXPRESION DE LA PROTEINA MAGE EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA	56
FIGURA 17. ANALISIS DE LA EXPRESION DE MOLECULAS HLA EN LA LINEA HL-60 IDENTIFICADAS POR CITOMETRIA DE FLUJO	58

	Página
FIGURA 18. ANALISIS DE LA EXPRESION DE MOLECULAS HLA-I EN LA LINEA K-562 IDENTIFICADAS POR CITOMETRIA DE FLUJO	59
FIGURA 19. HISTOGRAMA DE LOS NIVELES DE EXPRESION DE MOLECULAS HLA-1 EN LAS CELULAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA	60
FIGURA 20. EXPRESION DIFERENCIAL DE HLA-A, B, C	62

INDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1. PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD HOSPITALARIA	4
TABLA 2. CLASIFICACION DE ANTIGENOS TUMORALES	12
TABLA 3. EXPRESION DEL GEN MAGE EN NEOPLASIAS	23
TABLA 4. CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS	26
TABLA 5. CONDICIONES DE AMPLIFICACION PARA LA PCR	38
TABLA 6. DISTRIBUCION DE PACIENTES POR TIPO DE LEUCEMIA AGUDA	46
TABLA 7 DISTRIBUCION DE LAS EDADES EN LOS PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA	47
TABLA 8. RESULTADOS DE LA EXPRESION DE MAGE-A1 Y MAGE-A3 EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA	50
TABLA 9. RESULTADOS DE LAS SECUENCIAS DEL PRODUCTO AMPLIFICADO DE MAGE-A1	51
TABLA 10. RESULTADOS DE LAS SECUENCIAS DEL PRODUCTO AMPLIFICADO DE MAGE-A3	52

1. RESUMEN

Los tratamientos que en la actualidad se ofrecen a pacientes con cáncer no aseguran buenas expectativas de vida y es debido a este tipo de patología, que ocupa el cuarto lugar como causa de defunción en nuestro país. El tratamiento actual de la Leucemia Aguda consiste esencialmente en un complicado e intensivo régimen de quimioterapia, radiación y en la actualidad trasplante de médula ósea. Aún con estos esquemas de tratamiento el pronóstico de curación para los adultos es de tan solo un 20% y la mayoría de ellos fallecen. Lo anterior ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas de curación entre las que se encuentra la inmunoterapia, la cual tiene como objetivo estimular una respuesta inmune en el paciente evitando intolerancia a los tratamientos. Para poder llevar a cabo este proceso se requiere de la expresión de antígenos tumorales. Los antígenos MAGE tienen una alta frecuencia de expresión en neoplasias y están ausentes en tejidos normales, lo que asegura una respuesta inmune específica contra las células tumorales. En el caso de la leucemia, existe escaso conocimiento y controversia ya que sólo se cuenta con un reporte en el que se describe la expresión de *MAGE-A* en Leucemia Linfocítica Crónica, mientras que en otro estudio se reportó que *MAGE-A* no se expresa en ningún tipo de neoplasia hematológica. En el presente trabajo se encontró expresado el gen *MAGE-A1* en pacientes adultos con leucemia aguda con una frecuencia del 3.5% y *MAGE-A3* en un 41.2% de los pacientes, además se corroboró su ausencia en células normales y en algunas líneas oncohematológicas. Se detectó la expresión de moléculas HLA clase I en pacientes positivos para *MAGE-A* en 70-80% de las células de origen tanto linfoide como mieloide, con la excepción de dos LAM-M4 en donde la expresión fue menor al 10%. La expresión de la proteína MAGE en células de paciente con leucemia aguda se detectó y se visualizó en una muestra de LAM. Estos resultados se suman a las investigaciones hasta ahora realizadas sobre esta familia y no se descarta que estos genes o algunos otros de la familia *MAGE* puedan ser utilizados como candidatos en inmunoterapia.

2. INTRODUCCION

2.1 CANCER.

El término cáncer se usa para designar colectivamente alrededor de 300 tipos de desórdenes celulares, caracterizados todos, por multiplicación y crecimiento desmesurado de las células neoplásicas. Las células neoplásicas se desarrollan a partir de células normales por un proceso llamado "transformación". El primer paso en este proceso es la "iniciación", en el cual un cambio en el material genético de la célula la prepara para transformarse en neoplásica. Este cambio puede ser ocasionado por un agente carcinógeno (químicos, un virus, radiación, luz solar, etc). No todas las células son igualmente susceptibles a estos agentes, pero una alteración genética o el efecto de algún otro agente, conocido como promotor, puede aumentar la posibilidad de transformar células "normales". Estas células pueden desarrollarse a partir de cualquier tejido y órgano. El paso siguiente es la "promoción", donde una célula que ha iniciado su cambio se convierte en neoplásica (la promoción no tiene efecto sobre las células que no han pasado por el proceso de iniciación). De esta forma, a medida que las células neoplásicas crecen y se multiplican, forman una masa de tejido que puede invadir órganos adyacentes (metástasis) y propagarse así por el cuerpo por vía sanguínea o linfática (Fig. 1). Cuando los órganos vitales son afectados, la muerte del organismo es inevitable. (<http://www.cancerstop.net/entendiendo1.htm>).

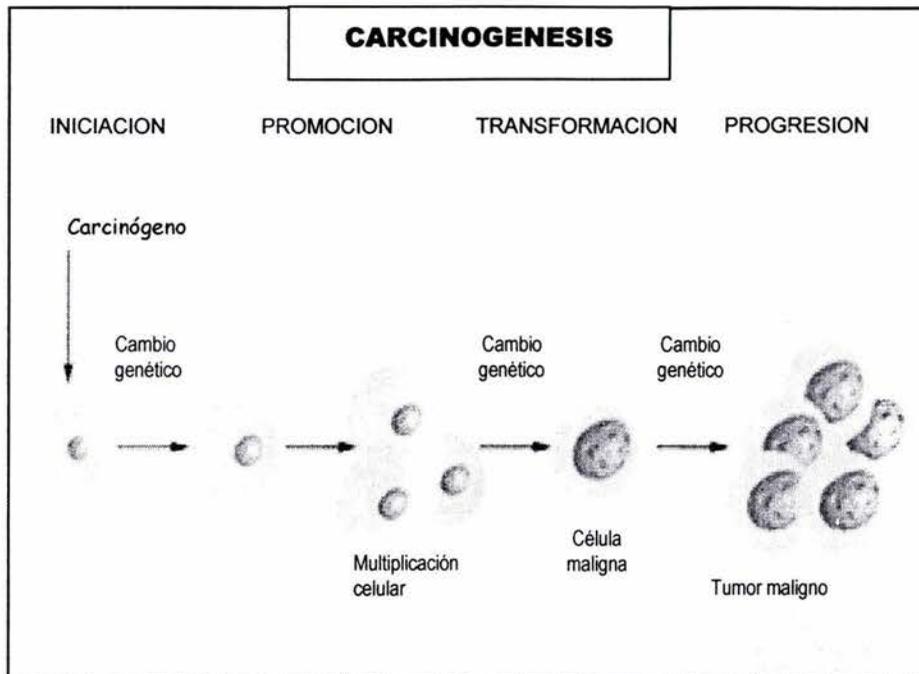


Figura 1. Proceso de transformación de células normales. (Tomada de http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/08_Proteolysis.htm)

El cáncer es uno de los principales problemas de salud pública, ya que a pesar de los avances en investigación y tratamiento, anualmente fallecen más de seis millones de personas en el mundo. Esta situación se torna crítica y de no implementarse estrategias de prevención, para el año 2025 se presentarán 15.5 millones de nuevos casos, advierte la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En México, la información más reciente sobre incidencia de cáncer corresponde al año 2000 recopilada por la Secretaría de Salud (SSA). En este periodo de tiempo, se diagnosticaron 46,178 personas con cáncer. De acuerdo a la SSA, el cáncer representa la cuarta causa de muerte en nuestro país con 3,444 defunciones en el año 2000 (476 defunciones por leucemia; 209 defunciones por tumores malignos de la tráquea, de los bronquios y del pulmón; 171 defunciones por tumores malignos de cuello uterino; y 2,588 defunciones se reparten entre otros tumores malignos) (Tabla 1).

Tabla1
PRINCIPALES CAUSAS DE MORTALIDAD HOSPITALARIA, SSA. MEXICO,
2000

No. de orden	Causa	egresos	%
1	Ciertas afecciones originadas en el periodo perinatal	7,086	19.4
	Dificultad respiratoria del recién nacido y otros trastornos respiratorios originados en el periodo perinatal.	2,755	7.5
2	Enfermedades del corazón.	3,145	8.6
	Enfermedades de la respiración pulmonar y Otras enfermedades del corazón.	1,275	3.5
3	Diabetes mellitus	2,741	7.5
4	Tumores malignos	2,588	7.1
	Leucemias	476	1.3
	Tumores malignos de la traquea, de los Bronquios y del pulmón.	209	0.6
	Tumores del cuello del útero	171	0.5

Salud pública de México/vol.43, no.5, septiembre-octubre de 2001

Las causas del cáncer no se conocen totalmente, en algunos casos se ha encontrado que ciertos factores genéticos, hereditarios y del medio ambiente aumentan la probabilidad de desarrollar esta enfermedad en algún momento de nuestra vida (<http://www.cancerstop.net/entendiendo1.htm>).

Entre las neoplasias más frecuentes diagnosticadas podemos mencionar al Cáncer de Cervix (10%) en la mujer, las leucemias en niños, jóvenes y adultos jóvenes (9.9%) y el cáncer de mama (9.4%). Aun cuando no hay estadísticas precisas, informes médicos apuntan que la tasa aproximada de este padecimiento en menores de 11 años es de 120 casos anuales, y de cada cuatro infantes, tres

son hombres y uno es mujer (Ciencia y Desarrollo, 2001). Empero, el cáncer en niños alcanza cifras de curación superiores al 70 por ciento, siempre y cuando se detecte a tiempo y se brinde tratamiento adecuado. En adultos las cifras de curación son mucho más reducidas, alcanzando un promedio por abajo del 20% y en la mayoría de los casos fallecen (<http://165.158.1.110/spanish/sha/prflmex.html/morbimortal>).

Las terapias para combatir el cáncer tienen un alto costo que ni los pacientes, familiares e institutos de atención sanitaria pueden cubrir en la mayoría de los casos, ya que la enfermedad no sólo se limita al pago de medicamentos, sino que el afectado además requiere integración familiar, rehabilitación, apoyo psicológico y estudios de seguimiento. Los tratamientos actuales van desde elevadas dosis de quimioterapia y radiación que, en la mayoría de los casos, llegan a alterar aun más a las células. Uno de los tratamientos que aun se encuentran en las primeras etapas de investigación y han tenido éxito en algunos de los tipos de tumores es la "inmunoterapia adoptiva", la cual consiste en la estimulación y activación del sistema inmune con el fin de destruir a la célula neoplásica.

2.2 PRESENTACION DE ANTIGENOS.

Las células neoplásicas no son reconocidas como tales por el aparato inmunológico, sino por la expresión de moléculas antigénicas en su membrana. Tal reconocimiento resulta en la generación de todos los efectores de la respuesta inmune que implica un mecanismo de reconocimiento y destrucción de células portadoras de antígenos tumorales.

La respuesta inmune es la forma en que el cuerpo reconoce y se defiende a sí mismo contra los microorganismos, virus y sustancias reconocidas como extrañas y que son potencialmente perjudiciales para el organismo (Zammatteo, 2002).

Las moléculas de histocompatibilidad están en el centro de la respuesta inmunológica, pues presentan los antígenos a los linfocitos T en forma de péptidos.

Un mecanismo importante de evasión del sistema inmune consiste en la pérdida de estas moléculas en la superficie de las células tumorales, lo que les permite escapar de la vigilancia de los linfocitos T (Janeway, 2001).

La característica clave o fundamental de la presentación de antígenos a las células T restringidas por el Complejo Principal de Histocompatibilidad (*MHC* ó *HLA* en humanos) es que los antígenos forman complejos físicos con las moléculas de HLA (Antígeno Leucocitario Humano) (Fig. 2a-b). Las moléculas *MHC* clase I contienen dos cadenas polipeptídicas separadas: una cadena α o cadena pesada, de unos 44kDa, codificada por *MHC*, y una cadena β de unos 12kDa no codificada por *MHC*, que interactúa de forma no covalente con la cadena α . La molécula de *MHC* de acuerdo a su estructura puede dividirse en un dominio amino-terminal de unión al péptido, que es polimórfico y localizado extracelularmente, un dominio extracelular tipo Ig, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. La región de unión al péptido de las moléculas de clase I esta formada por los segmentos $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de la cadena pesada. Ésta consiste en una hendidura que mide aproximadamente $2.5 \times 1.0 \times 1.1nm$, con hélices α a los laterales y en el cuello una lamina de ocho bandas antiparalelas β plegadas (Fig. 2c). El segmento $\alpha 3$ de la cadena pesada y la cadena β forma el dominio tipo Ig de las moléculas clase I del *MHC*. El segmento $\alpha 3$ contiene unos 90 aminoácidos extracelulares localizados entre el extremo carboxilo-terminal del segmento $\alpha 2$ y la inserción en la membrana plasmática (Abbas, 2000).

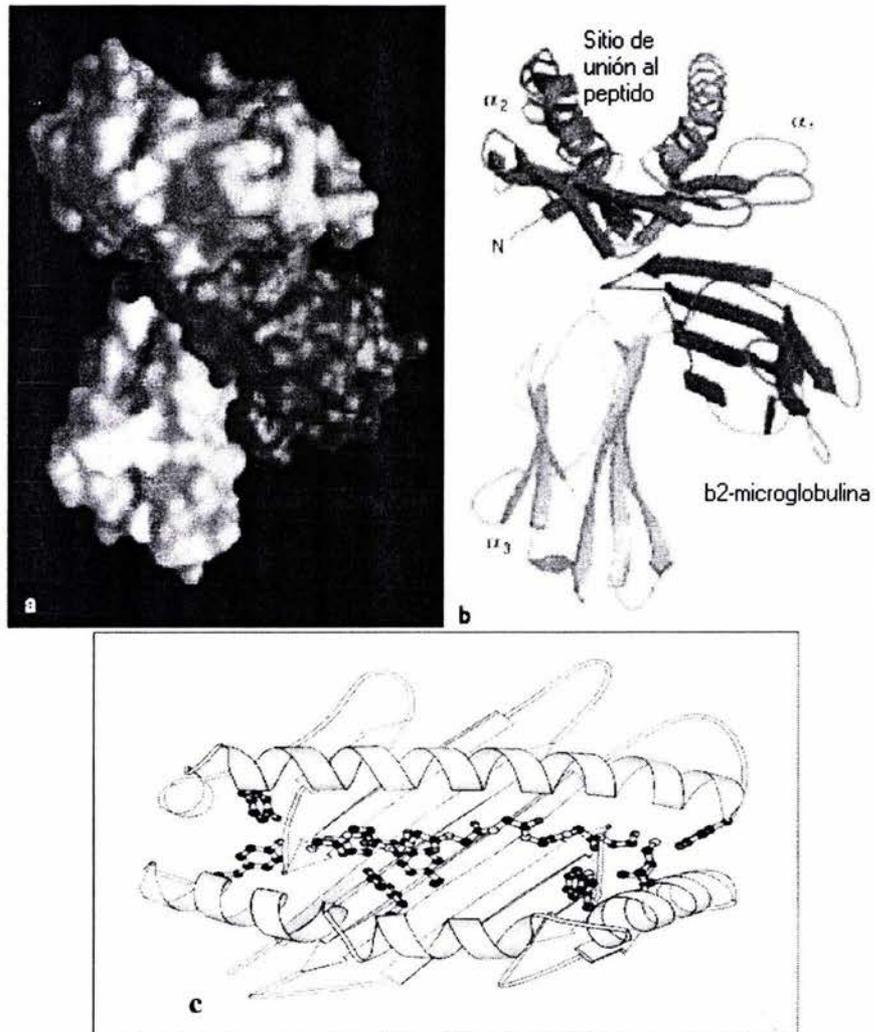


Figura 2. Esquema molecular de MHC clase I. En el recuadro a) se representa la estructura tridimensional de MHC de vista lateral, b) esquematiza los dominios así como el plegamiento adecuado de la molécula de la cadena pesada (α_1 ; α_2 ; α_3) y la interacción de la cadena β (β_2 -microglobulina), c) es una vista superior que muestra la hendidura de unión al péptido. (Tomada de Janeway, 2001).

La capacidad de generar esos complejos es una característica fundamental de las células presentadoras de antígenos (APC) y de las células diana de los linfocitos T citotóxicos (CTL's). Por lo tanto, las APC o las células diana de CTL's son capaces de convertir proteínas, en péptidos de un tamaño suficientemente pequeño y con una conformación adecuada para que establezcan una unión no-

covalente con la región ("cueva molecular" o "peptide-binding region") de las MHC presentes en las APC o dianas capaz de unir péptidos (Fig. 2c). La conversión de proteínas nativas en fragmentos peptídicos asociados al MHC ("péptidos inmunogénicos") es el proceso llamado procesamiento de antígenos.

El sistema inmune ha "previsto" dos rutas diferentes de procesamiento, según la amenaza sea un antígeno endógeno (intracelular) o exógeno (extracelular). En cada caso existe una respuesta inmune diferente: activación de CTL's para el antígeno endógeno, y producción de anticuerpos para el antígeno exógeno (Janeway, 2001).

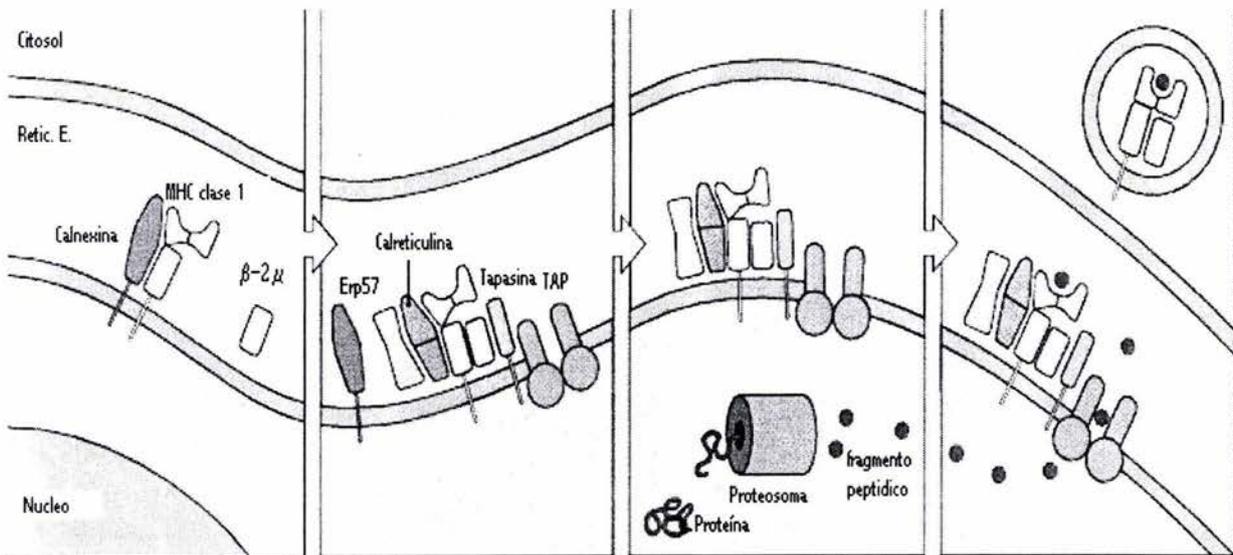


Figura 3. Procesamiento de antígenos endógenos por la ruta citosólica. La síntesis de novo de HLA-1 se ensambla a calnexina en el RE. Cuando al complejo se une β2-microglobulina (β2m) se disocia la calnexina y la molécula se pliega parcialmente, después se une a TAP por interacción con una proteína de asociación a TAP llamada tapsina. Las moléculas chaperonas Erp57 y calreticulina se asocian al complejo. La molécula HLA es retenida en el RE hasta que se une a su péptido y termina de plegarse adecuadamente. Una vez unido el complejo MHC/péptido deja el RE y es transportado a través del aparato de Golgi a la superficie celular. (Figura tomada de Janeway, 2001)

Los antígenos endógenos se degradan en el citoplasma de la célula enferma mediante la ruta citosólica (Fig. 3). Este proceso es iniciado por la degradación de la proteína sintetizada de novo, sometida a la actuación del complejo ubiquitinante donde la proteína queda "marcada" con varias ubiquitinas unidas a grupos amino

de lisinas. La proteína así marcada pasa por el interior del proteosoma que funciona como un complejo proteolítico (es un gran complejo multicatalítico, formado por 28 subunidades con peso molecular entre 20 y 30 kDa, que degrada proteínas marcadas por la ubiquitina) (Fig. 4). Su estructura es la de un cilindro hueco a base de 4 anillos, cada uno con 7 subunidades. Estos proteosomas lisan los péptidos intactos en péptidos más pequeños, de 8 a 9 aminoácidos que tienen tamaño óptimo para ligarse al MHC 1, son activamente transportados a través del retículo endoplásmico rugoso (RER) por complejos transportadores, denominados transportadores asociados con la presentación del antígeno (TAP-1 y TAP-2) (Janeway, 2001).

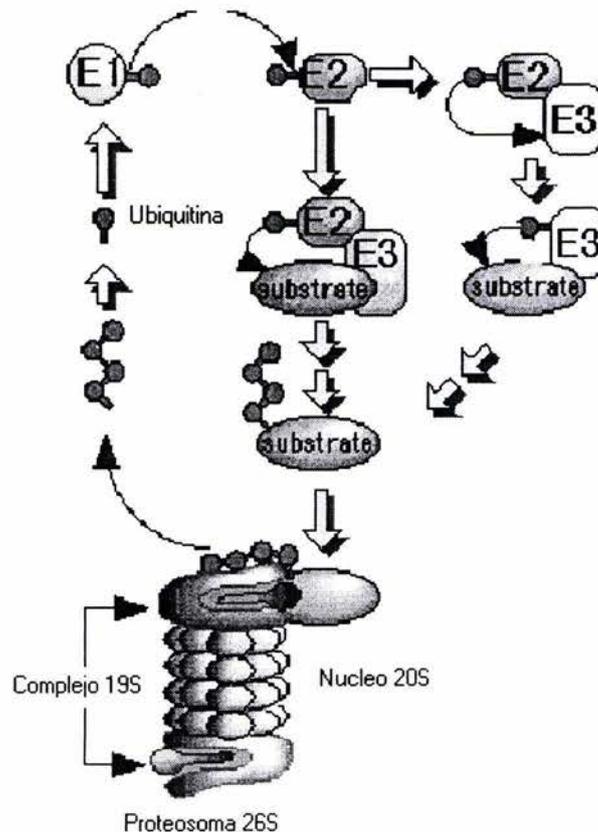


Figura 4. Proceso de ubiquitinación y degradación vía proteosoma. La degradación de proteínas vía proteosoma 26S es inducida por la adición de una cadena de poliubiquitinas (Tomada de <http://www.biomania.com.br/reproducao/gametogenese.php>)

Una vez colocados los péptidos tumorales en el RER se logra la estabilización definitiva del MHC I por asociación de la cadena α con la β_2 -microglobulina (de hecho, la ausencia del péptido inhibe la asociación de ambas cadenas).

El complejo formado por el MHC I unido al péptido abandona el RER, viajando por el sistema de vesículas que lo transportará a la superficie celular, de modo que finalmente quedará expuesto al exterior de la membrana de la célula tumoral donde es reconocido por CTL's activando la secreción de citocinas y la activación de las señales coestimuladoras con el fin de aumentar la respuesta inmune.

La restricción de las células T por el haplotipo propio del MHC da como resultado el que los linfocitos T (sean los CD4⁺ o los CD8⁺) sólo puedan reconocer al antígeno cuando viene presentado (como péptidos) en la membrana de una célula con MHC propio (de clase II para los linfocitos CD4⁺, y de clase I para los linfocitos CD8⁺) (Breckpot, 2003; http://fai.unne.edu.ar/inmunologia/cap_09.htm).

Sin embargo, las células cancerosas han desarrollado una serie de mecanismos para evitar la activación de los CTL's. Estos mecanismos incluyen mutaciones o deleciones del gen de β_2 -microglobulina o alteraciones que conducen a la expresión de moléculas transportadoras *TAP-1* y *TAP-2* que generan moléculas clase I inestables incapaces de ser reconocidas. En algunos casos se ha observado que la sobre expresión de ciertos genes como *N-myc* influye en la disminución de moléculas de clase I (Janeway, 2001).

2.3 PEPTIDOS ANTIGENICOS.

Los antígenos tumorales son péptidos de proteínas contenidas en células tumorales que son presentados a células T por moléculas MHC. Estos péptidos pueden ser blanco de una respuesta de células T específica a células tumorales porque no son expresados en la superficie de células normales (Abbas, 2000)

En los últimos años, se ha considerado la caracterización de antígenos tumorales codificados por genes asociados al tumor con el único objetivo de encontrar una terapia para obtener la regresión tumoral y posiblemente la respuesta completa (Rosenberg et al, 1996). Diversos tipos de inmunoterapia están basados, en el uso de estos péptidos con resultados positivos preliminares (Tanzarella, 1997; 1999). La caracterización e identificación de antígenos tumorales en diversos tejidos han permitido clasificarlos en seis categorías (Tabla 2). La primera categoría consiste en antígenos estrictamente específicos en tumores, esto es resultado de mutaciones puntuales o rearrreglo de genes que frecuentemente son parte del proceso de oncogénesis. La segunda categoría de antígenos tumorales esta comprendida por antígenos de diferenciación codificada por genes que sólo se expresan en tipos particulares de tejidos. La tercera categoría consta de antígenos que son fuertemente sobre-expresados en células tumorales comparado con su contraparte normal. La cuarta categoría de antígenos tumorales esta constituido por proteínas resultantes de translocaciones o fusiones con actividad tirosina-cinasa. Las proteínas codificadas por oncogenes virales comprende la quinta categoría de antígenos tumorales y la sexta categoría consta de proteínas codificadas por genes que son normalmente expresadas solo en células germinales que no expresan moléculas MHC y no inducen una respuesta inmune. Las células tumorales muestran generalmente anormalidades en la expresión de genes, incluyendo la actividad de estos genes y así la presentación de estas

Falta página

N° 12

2.4 FAMILIA MAGE.

Los genes de la familia *MAGE* (antígenos asociados a melanoma), pertenecen a la familia denominada Antígenos Testiculares de Cáncer (ATC), son de gran interés para la inmunoterapia antitumoral pues el gen *MAGE* codifica para antígenos tumorales (De Plaen, 1994, 1997,1999; McCurdy et al, 1998; Chambost, 2000^b; Bert et al, 2002). La expresión en testículo parece estar restringida a células germinales masculinas de la fase temprana de la espermatogénesis (De Smet et al, 1997; De Plaen, 1999; Chambost, 2000^b; Zammateo, 2002; Luo et al, 2002; Lorient et al, 2003). En otros estudios se ha localizado el gen *MAGE* en placenta y posiblemente en células de embriones pero en células normales se encuentra metilado. De acuerdo a De Plaen en 1999, los patrones de metilación de varios genes han sido estudiados por PCR en estadios tempranos de embriones de ratón. Las metilaciones se producen en secuencias específicamente reconocidas (5'--- m CpG ---3') que generalmente se agrupan en "islotos" ricos en GC, con frecuencia dentro o cerca de regiones reguladoras de la transcripción. La metilación puede inhibir la transcripción de los genes al interferir en la capacidad de los factores de transcripción para reconocer los sitios de unión al ADN o alterando las conformaciones del ADN dificultando la polimerización de la ARNpolimerasa.

(<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/expresion/Expresion.htm>; Strachan, 1999). Estos sitios CpG están completamente demetilados en los estados de mórula y blastocisto del desarrollo embrionario causando la activación de la expresión de genes.

La ausencia de la expresión del gen *MAGE* en tejidos normales asegura una estricta respuesta inmune contra el tumor (Lucas et al, 1998; McCurdy, 1998; De Plaen, 1999; Park et al, 2002^a).

El mecanismo de expresión de estos antígenos y su expresión en testículo aún no se conoce con exactitud. La activación de los genes *MAGE* está relacionada con

la hipometilación del genoma, mecanismo que ha sido observado en células testiculares (De Smet, 1997, 1999).

Los primeros avances en inmunoterapia con estos antígenos se iniciaron en melanoma, donde fueron descritos; principalmente se han realizado estudios con el antígeno *MAGE-A3* en pacientes con melanoma, induciéndose una significativa regresión del tumor al activar los CTL's después del tratamiento con una vacuna que contiene sólo el péptido antigénico específico contra el tumor (Carrel, 1996; Masaki, 1996; Kariyama et al, 1999; Bodey, 2002; Coulie, 2002; Reynolds et al, 2003; Vantomme, 2004). Para el cáncer de pulmón se han realizado investigaciones semejantes con el mismo antígeno, obteniéndose resultados favorables en la respuesta inmune contra el tumor (Atanackovic et al, 2004).

También se ha descrito que por sí solo, el CTL no es capaz de destruir a la célula tumoral. Se ha estudiado la estimulación de los CTL's utilizando APC; por ejemplo las células dendríticas, a las cuales se les utiliza para la presentación del antígeno acoplado al MHC clase I y así estimular y activar señales que permitan al CTL destruir a la célula cancerosa (Mukherji, 1995; Lotze, 1997; Graff, 2002; Schuler, 2002; Breckpot et al, 2003, 2004; Hersey et al, 2004).

2.4.1 EXPRESION DEL GEN.

Las células germinales masculinas de la fase temprana de la espermatogénesis, específicamente espermatogonias y espermatocitos primarios, carecen de MHC, por lo que no son reconocidos por CTL's (De Smet, 1997; De Plaen, 1999; Chambost, 2000^a; Luo, 2002; Zammattéo, 2002; Lorient, 2003) (Figura 5).

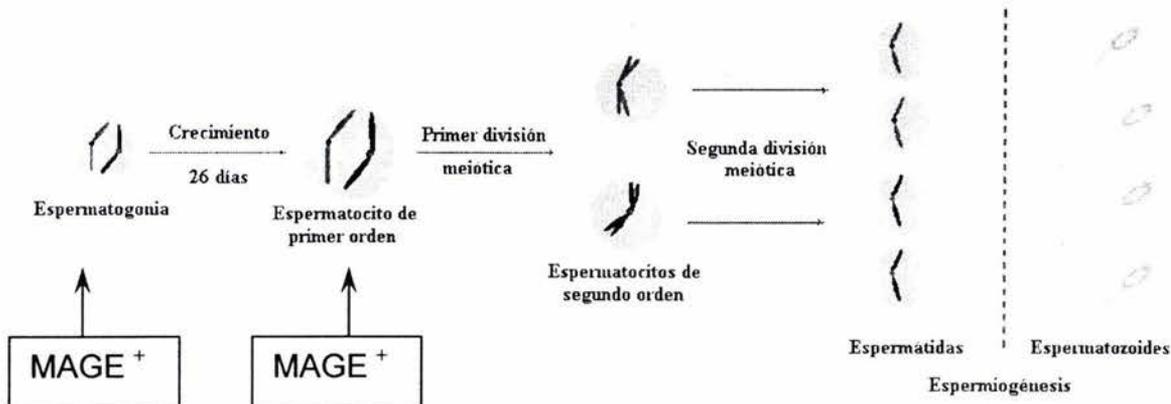


Figura 5. Espermatogénesis. En el diagrama se ilustran las fases de la espermatogénesis y se aprecia la fase en que la espermatogonia y el espermatocito primario se localizan en el proceso, siendo las únicas células en tejido normal donde se expresan los genes *MAGE*. Las flechas muestran el sitio donde se expresa el gen *MAGE* durante el proceso de espermatogénesis.

Las proteínas del gen *MAGE* fueron detectados en el núcleo y citoplasma de espermatogonias y en espermatocitos primarios, pero no en espermátides o células de Sertoli (Takahashi, 1995; Serrano, 1996; Coulie, 2002). La función de estas proteínas aún es desconocida (Barker y Salehi, 2002).

La forma en que se regula su expresión es a través de un mecanismo de metilación (Figura 6). Por ejemplo, el promotor *MAGE-A1* se describió en la línea celular de melanoma *MZ2-MEL*. La zona con una mayor actividad transcripcional fue encontrada en -55 a -42 , en la región B. Esta región promotora controla el 90% de la transcripción del gen. Los factores transcripcionales que interactúan específicamente en esta región pertenecen a la familia ETS (Figura 6a), cuyos miembros importantes reguladores de la hematopoyesis, angiogénesis, diferenciación celular y organogénesis. Estos factores están implicados en varias enfermedades como el Síndrome de Down, el Alzheimer y tumorigénesis (Jobling et al, 2002).

Los promotores *MAGE-A1* contienen al menos 5 regiones activadoras, aunque la actividad parece ser manejada por 2 segmentos ETS contenidos en la región B'B. La región B'B contienen dos puntos que son potencialmente susceptibles a metilación, ricos en CpG (la metilación en sitios CpG en los promotores es un mecanismo efectivo para silenciar genes) (Tureci, 1998; Suyama et al, 2002), de

forma tal que cuando estos genes son demetilados se activan y, cuando no se expresan, están fuertemente metilados (Figura 6b). Así, por ejemplo, la activación de genes *MAGE* en células cancerosas es consecuencia de un proceso de demetilación del genoma que ocurre en estas células. (Coulie, 2002; Ushijina et al, 2003).

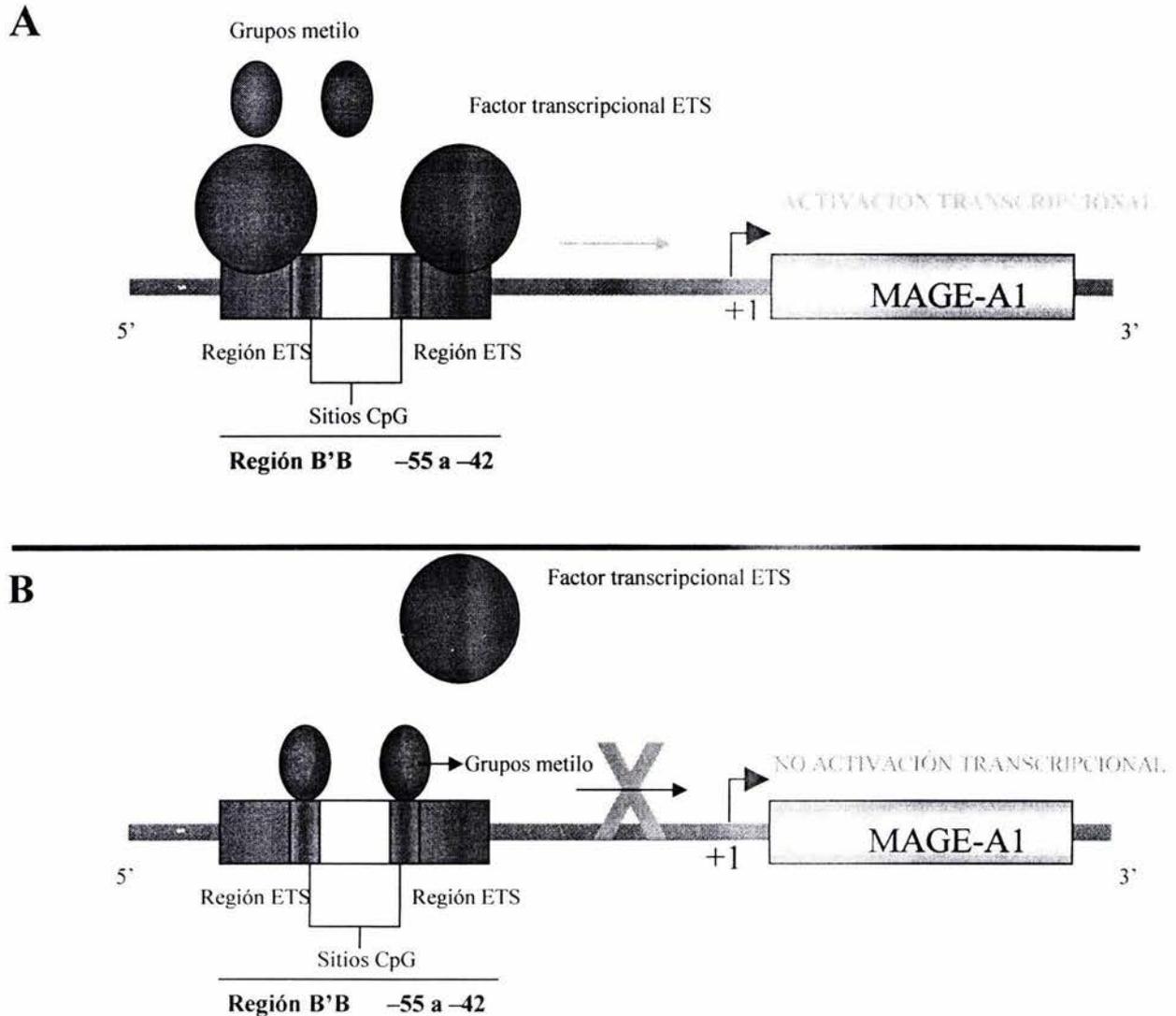


Figura 6. **Regulación transcripcional del gen MAGE-A.** A) Activación del gen por factores transcripcionales ETS en la región promotora B'B demetilada. B) La metilación de los sitios CpG en la región promotora inhibe la activación del gen por los factores ETS, silenciando el gen.

Se ha reportado que la expresión de los genes *MAGE* puede ser inducida por tratamiento con el agente demetilante 5'aza-2'deoxicitidina (DAC) y la activación de los genes *MAGE* en células tumorales se correlaciona con la demetilación de los nucleótidos CpG en la región promotora B'B (Serrano, 1996; Masaki, 1996; Suyama et al, 2002; Ushijina et al, 2003).

Serrano et al, 1996, identificaron un estado demetilado en DNA de espermatozoide y algunas líneas celulares tumorales de diferentes orígenes. En contraste, un estado hipermetilado fue encontrado en leucocitos y en otras células normales que no expresan *MAGE*. Ellos concluyeron que la metilación del gen *MAGE* en su región promotora B'B interfiere con la unión de factores que activan la transcripción del gen.

La función de los genes *MAGE* aún no se conoce con exactitud, pero se ha sugerido que los genes de esta familia participan en la regulación del ciclo celular, especialmente durante el desarrollo de las células germinales; se ha especulado que al metilarse el gen se detiene el ciclo celular (Ohmán, 2001).

Estudios más recientes han sugerido cierta función para la proteína de algunos miembros de la familia *MAGE*. La proteína *MAGE-D* es un regulador en la progresión del ciclo celular en la patogénesis del Síndrome Prader-Willi - un desorden neurogénico. Se ha identificado la unión de la proteína *MAGE* al receptor neurotrofina *p75* (un miembro de la superfamilia de los receptores TNF e interviene como un mediador de la apoptosis celular), a la proteína inhibitoria *XIAP*, a la proteína *Dlx/MSX* homeodominante y al factor transcripcional *E2F1*, lo que favorece el bloqueo de la progresión del ciclo celular y aumentando la apoptosis en células neurales. Así, la coexpresión de *p75* y *MAGE-D* aumenta la apoptosis y la sobreexpresión de *MAGE-D* puede inducir la apoptosis mediada por caspasas (Barker et al, 2002; Coulie et al, 2002; Tcherpakov et al, 2002; Kuwako et al, 2004).

2.4.2 LOCALIZACION DE LA FAMILIA

Los genes de la familia *MAGE* fueron descritos en 1991 en Melanoma en donde según reportes tiene una frecuencia de expresión del 60% para esta neoplasia y resulta tener un patrón específico exclusivo en tumores (van der Bruggen et al, 1991). La familia *MAGE* esta compuesta por 25 genes divididos en cuatro grupos localizados en la región q28 (genes *MAGE-A*), p21.3 (*MAGE-B*), q26 (*MAGE-C*), y p11 (*MAGE-D*) del cromosoma X. *MAGE-A*, *B*, y *C* son expresados en varios tipos de tumores pero no en tejido sano, con excepción de testículo y placenta. (Figura 7) (Lurquin, 1997; Barker, 2002; Zammateo, 2002; Bodey, 2002; Coulie, 2002).

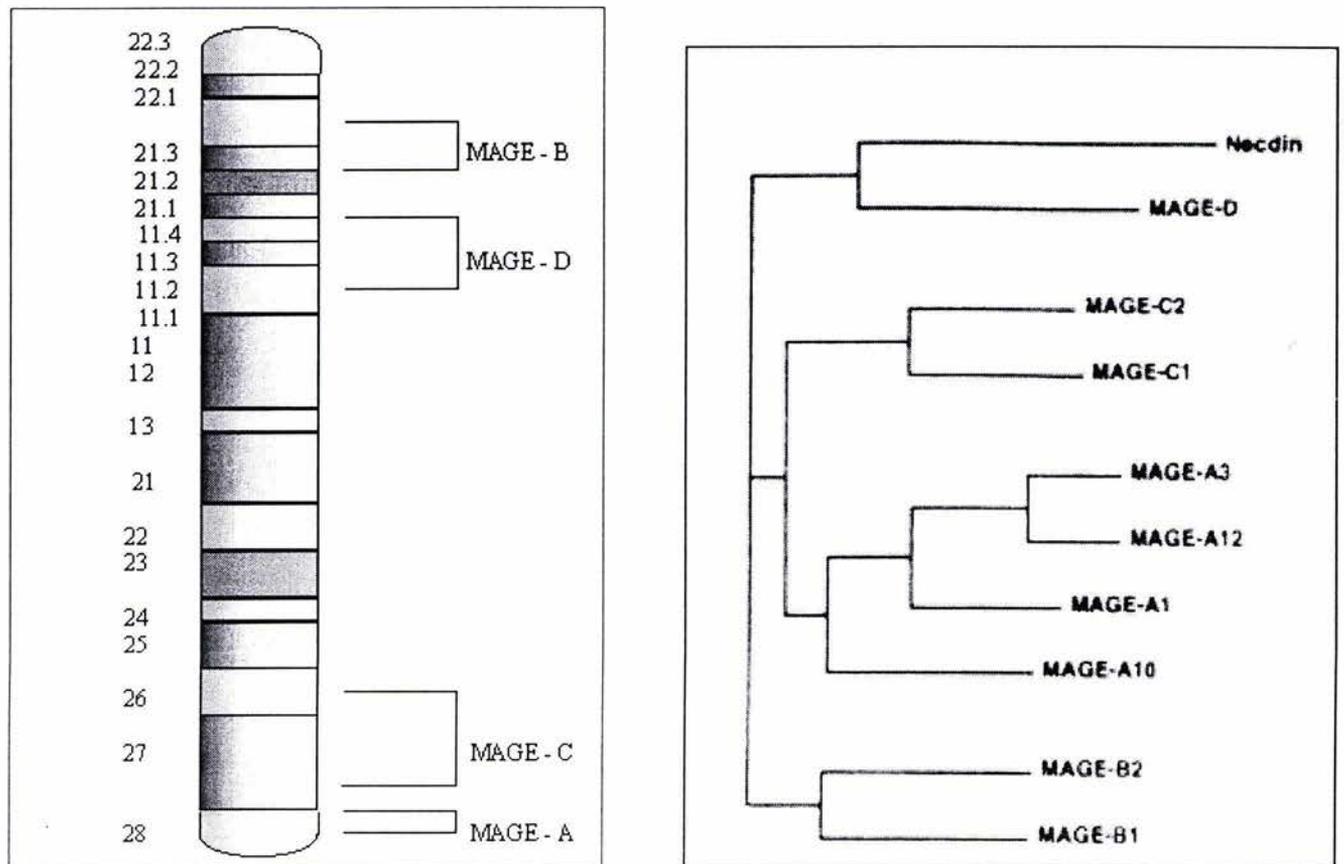


Figura 7. Localización de los genes de la Familia *MAGE* en el cromosoma X.

2.4.3 DESCRIPCION DE LOS MIEMBROS DE LA FAMILIA *MAGE*.

Subfamilia *MAGE-A*

La subfamilia *MAGE-A* comprende 12 genes que se distribuyen en una identidad de 60-98% en su secuencia codificante, localizados enteramente en el último exón. Codifican proteínas de 300 a 370 aminoácidos con un peso molecular de 46kDa. Siete genes *MAGE-A* (*MAGE-A1*, *A2*, *A3*, *A4*, *A6*, *A10* y *A12*) se encontraron transcribiendo fuertemente en una gran cantidad de tumores de varios orígenes histológicos (Barker et al, 2002). Los otros cinco genes *MAGE-A* no se expresan en tumores (tal como el pseudogen *MAGE-A7*) o son expresados en cantidades muy pequeñas. Los péptidos *MAGE-A1* y *MAGE-A3* fueron también reportados siendo reconocidos por CD4+ presentados por MHC-II (Masaki et al, 1996). Los antígenos *MAGE-A* son de particular interés para la inmunoterapia antitumoral por ser estrictamente específicos en tumores y estos antígenos son buenos candidatos para inmunización de un gran número de pacientes porque los genes codificables se expresan en un amplio rango de tumores. Tratamientos clínicos se han iniciado con inmunogenes derivados de *MAGE-A*. En uno de estos tratamientos 25 pacientes con melanoma fueron inmunizados con células dendríticas junto con un coctel de péptidos de antígenos asociados a tumores, incluyendo *MAGE-A1* y *A3* presentados por MHC clase I, y la regresión de la metástasis fue observada en siete pacientes; tres de estas regresiones fueron completas. Los pacientes elegibles para inmunización con un antígeno definido de *MAGE-A* son aquéllos que expresan en el tumor un gen *MAGE-A* relevante seguido del apropiado MHC específico (Wang et al, 1998; Kariyama, 1999; Chambost, 2000^a; Zammattéo, 2002; Coulie, 2002).

Los genes *MAGE* codifican péptidos que combinan con HLA. Recientemente se identificó un nonapéptido codificado por los genes *MAGE-A1* clonado de la línea celular de melanoma humano MZ2-MEL que expresan los antígenos MZ2-E presentados por CTL's en el contexto de HLA-A1 (Chambost, 2000; McCurdy,

1998; Traversari, 1997). El producto de *MAGE-A3* aunque estructuralmente similar a *MAGE-A1*, no contiene el mismo nonapéptido.

Subfamilias *MAGE B, C, D*

En la región XP21.3 se localiza el segundo grupo o familia *MAGE-B* comprende 6 genes (Lucas 2000). Los genes comparten homología alrededor del 65% con el *MAGE-A*, sin embargo, todavía existe muy poca información sobre la expresión de estos genes en el humano (Olarte, 2002).

Presentan cuatro exones cada uno, conteniendo un ORF (Open reading frame) marco de lectura abierto, en el último exón. El tamaño de las proteínas esta entre 313 y 347 aminoácidos. (De Plaen, 1994).

McCurdy en 1998 describe el gen *MAGE Xp-2* el cual fue aislado de pacientes con lupus eritematoso y es similar a su estructura de *MAGE-B2*.

Los genes de esta familia han sido detectados en una amplia variedad de padecimientos oncológicos (Lurquin, 1997).

La familia *MAGE-C* se compone también de cuatro exones y codifica para proteínas de 1000 a.a. esta localizado en Xq26, al igual que en las familias anteriores se expresan en varios tipos de tumores (Lucas, 2000).

A diferencia de las familias descritas anteriormente, *MAGE-D* se expresa a niveles basales en tejidos normales así como en diferentes líneas celulares de diferentes orígenes histológicos sin inducir ningún tipo de respuesta inmunitaria. Estos genes constan de 14 exones y su proteína es de 606 aminoácidos, es homóloga en la parte COOH-terminal de la proteína *MAGE-A1* (Pold, 1999).

Recientemente se reportó el gen *MAGE-F1* el cual se encuentra localizado en el cromosoma 3 y expresándose en diversas variedades de tumores y en la mayoría de tejidos fetales (Stone, 2001).

2.4.4 EXPRESION DE LA FAMILIA *MAGE* EN NEOPLASIAS.

Se ha observado que varios tipos de tumores presentan al menos uno de los genes de la Familia *MAGE*.

Varios antígenos asociados a tumores, incluyendo *MAGE*, *BAGE*, *GAGE*, *Melan-A/MART-1*, *tirosina*, *gp 100*, han sido identificados, usando clones citotóxicos de células T y líneas celulares T de pacientes con melanoma (Masaki, 1996). Estos antígenos asociados a tumores, por ejemplo, *MAGE-A1* y *A3*, son genes que se caracterizan por presentar la mayor inmunogenicidad de todos los miembros de las familias y, por lo tanto, adquieren relevancia clínica y son expresados en una considerable porción de melanomas como en otras malignidades (Dalerba, 1998; Kariyama, 1999).

La expresión de los genes *MAGE-A1* y *A3* se observa en tumores de varios orígenes histológicos tales como el carcinoma de hígado, el melanoma, carcinoma mamario y tumores neuroectodermales, así como también en tumores de cuello (Tabla 3) (Kuramoto et al, 1997; Lee et al, 1999).

MAGE-A1, *A2* y *A3* fueron expresados en el 41, 31 y 38% de los casos con carcinoma gástrico (Li, et al, 1997) y 62, 43 y 57% de los casos de carcinoma esofageal (Yamana, 2002). En carcinoma colorectal el 30% de las muestras tumorales y 50% de las líneas celulares expresan *MAGE-A1* y 20% de las muestras tumorales y 25% de las líneas celulares expresan *MAGE-A3* (Tabla 3) (Masaki, 1996; Nishimura et al, 1997; Kim, 2001; Park et al, 2002^c).

MAGE-1 y *MAGE-3* se expresan en líneas celulares de glándulas salivales (ACC-2 y ACC-M) y en un 50% y 61% en carcinomas malignos de glándulas salivales (Tabla 3). Ambos genes se expresan en líneas celulares cancerosas de glándulas salivales y carcinomas clínicamente relevantes, además en otros tumores malignos de distintos orígenes histológicos. El resultado sugiere la

posibilidad de inmunoterapia contra carcinomas de glándulas salivales por el uso de productos que codifican los genes *MAGE* como blancos antigénicos para la regresión de tumores (Liu, 2003; Nagel, 2003).

Se ha observado la transcripción constitutiva de RNAm de *MAGE-1* y *-3* en el 78 y 48% de carcinomas hepatocelulares, respectivamente (Kariyama et al, 1999; Kobayashi et al, 2000; Luo et al, 2002; Lu et al, 2002). *MAGE* se expresa también en carcinoma celular cervical escamoso en el 33% de los casos y en cáncer de ovario (Tabla 3) (Yamada, 1995; Hofmann, 2002; Resnick, et al, 2002; Sarcevic, 2003).

La expresión de RNAm de *MAGE-A1* es también detectado en 40% de las líneas celulares y melanomas metastásicos examinados, así como también en cáncer de mama (91%) (Scanlan et al, 2001), y otros tipos de tumores como carcinoma de vejiga, carcinomas de pulmón de células no pequeñas y carcinoma gástrico (Tabla 3) (Chen, 1994; Shichijo, 1995; Fujie, 1997; Park, 2002^b).

Entre otros *MAGE* también se expresa en cáncer de pulmón (Traversari, 1997; Sugita, 2002) osteosarcoma (Sudo, 1997) cáncer de próstata (Kufer, 2002) y mieloma (Pellat, 2000).

Tabla 3. Frecuencia de expresión de MAGE-A en cánceres humanos

Cancer	Frecuencia de expresión (%)			
	MAGE-1	MAGE-2	MAGE-3	^{a)} MAGE-A
Melanoma	16	^{b)} NE	36	64
Cabeza y cuello	25	42	33	^{c)} N
Vejiga	21	30	35	N
Mama	6	19	10	91
Colorectal	30	NE	20	N
Pulmón	21	30	46	75
Gástrico	41	31	38	N
Esofageal	62	43	57	N
Glándulas salivales	50	NE	61	N
Hepatocelular	78	NE	48	N
Cervical escamoso	N	N	N	33
Ovario	7	N	30	N
Osteosarcoma	62	75	62	N
Carcinoma Renal	22	16	76	N

Líneas celulares				
Carcinoma				
Colorectal.	50	N	25	N
Carcinoma de Glándulas Salivales				
ACC-2	N	N	N	50
ACC-M.	N	N	N	61
Melanoma				
MZ2-MEL.	N	N	N	40

^{a)} Identificación del gen MAGE-A por oligonucleotidos generales.

^{b)} NE. No expresa.

^{c)} N. No realizado.

(Chen, 1994; Shichijo, 1995; Yamada, 1995; Masaki, 1996; Fujie, 1997; Traversari, 1997; Nishimura et al, 1997; Kuramoto et al, 1997; Lee et al, 1999; Pellat, 2000; Kim, 2001; Sugita, 2002; Park et al, 2002^c; Hofmann, 2002; Park, 2002^b; Kufer, 2002; Resnick, et al, 2002 Liu, 2003; Nagel, 2003; Sarcevic, 2003).

2.5 LEUCEMIA.

En 1846 Virchow introdujo el término de leucemia para designar un cuadro clínico con un número elevado de glóbulos blancos en sangre; actualmente se le define como un tipo de cáncer que se caracteriza por un descontrol en la proliferación de cualquiera de las estirpes celulares del sistema hematopoyético (Figura 8). Este aumento permanente, anormal y desordenado de una estirpe celular, da lugar a la invasión de la médula ósea e impide el desarrollo normal de las células progenitoras hacia las estirpes hematopoyéticas. Esta situación produce que el cuerpo del afectado quede expuesto a un gran número de enfermedades sin la posibilidad de que el organismo luche contra ellas por la ausencia de células hematopoyéticas normales, desencadenando el mecanismo de defensa inmunológica.

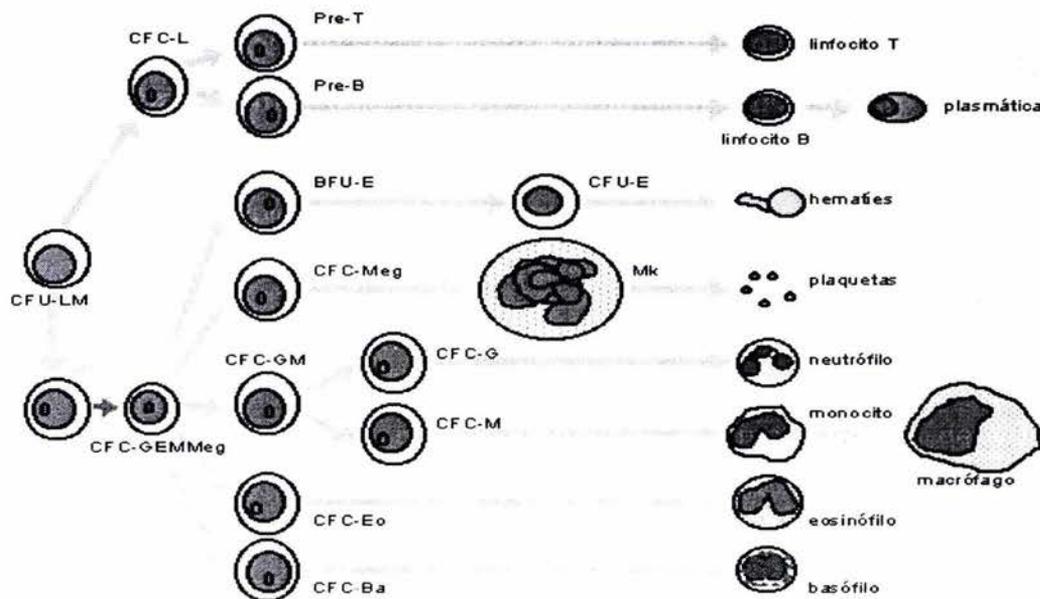


Figura 8. Diagrama de la hematopoyesis. La formación de las células sanguíneas recibe el nombre de **hematopoyesis**. En el adulto, la hematopoyesis se desarrolla en la médula ósea. Los progenitores de las plaquetas, hematíes, granulocitos y monocitos realizan todo su proceso de crecimiento y diferenciación en la médula ósea, recibiendo el nombre de **mielopoyesis**. La producción de linfocitos se llama **linfopoyesis** y, a diferencia de los que ocurre con los demás tipos celulares de la sangre, los linfocitos también se multiplican y diferencian fuera de la médula ósea.

Cualquiera de los progenitores y en cualquier nivel durante la hematopoyesis puede desarrollar algún tipo de leucemia. CFU-LM. Unidades Formadoras de Colonias Linfoides y Mieloides. CFC-L. Células Formadoras de Colonias Linfoides. CFC-GEMMeg. Células Formadoras de Colonias de Granulocitos, Eritrocitos, Monocitos, Megacariocitos. BFU-E. Unidades Formadoras de Brotes Eritroides. MK. Megacarioblasto (Tomada de <http://www.dhs.sa.gov.au/cancare/REFERENC/Blood/Hemo/NetIt4/22020x.htm>).

2.5.1 ETIOLOGIA DE LA ENFERMEDAD.

La causa precisa de la leucemia se desconoce. Es posible que la exposición a derivados de benceno desempeñe algún papel en el desarrollo de la leucemia, así como la exposición a radiaciones ionizantes. Los agentes que dañan al DNA, como los alquilantes, pueden causar leucemias. Algunos virus entre los que podemos mencionar retrovirus como HTLV-1 y HTLV-II, así como en los padecimientos donde hay inestabilidad cromosómica, tales como el Síndrome de Fanconi, pueden culminar en una leucemia aguda. (Miranda et al, 1996; Miranda et al, 2001).

La modificación genética conduce a la activación de oncogenes como: myc, abl, bcl-2 y ras, al igual que la formación de genes quiméricos como bcr-abl (leucemia aguda linfoblástica y mielocítica crónica) o pml-rar-alfa (leucemia aguda promielocítica) probablemente son algunos de los factores genéticos que contribuyen a la proliferación clonal anormal, dando origen a la leucemia (Rosas et al, 1999; Bleutler, 2001; Martínez et al, 2001; Miranda et al, 2001).

2.5.2 CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS.

Las diversas variedades de leucemia que existen se distinguen, según la estirpe celular involucrada en linfoide o mieloide y dependiendo de la evolución clínica en aguda o crónica (Lee, 1994).

TABLA 4. CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

LEUCEMIAS AGUDAS		LEUCEMIAS CRONICAS
LINFOBLÁSTICAS	L1 Leucemia Linfoblástica tipo infantil L2 Leucemia Linfoblástica tipo adulto L3 Leucemia Linfoblástica tipo Burkitt	LINFOCÍTICAS
MIELOBLÁSTICAS	M0 Leucemia Mieloblástica indiferenciada M1 Leucemia Mieloblástica poco diferenciada M2 Leucemia Mieloblástica bien diferenciada M3 Leucemia Promielocítica o Hipergranular M4 Leucemia Mielomonoblástica M4eo Leucemia Mielomonoblástica con eosinofilia M5a Leucemia Monoblástica pura poco diferenciada M5b Leucemia Promonocítica o Monoblástica bien diferenciadas M6 Eritroleucemia. Enfermedad de Di Guglielmo M7 Mielosis Megacariocítica. Leucemia Megacarioblastica.	MIELOCÍTICAS O GRANULOCÍTICAS (Tomada de Bleuter, 2001)

En 1976, con el fin de unificar el criterio de clasificación de esta enfermedad, se crea un sistema denominada FAB (Asociación Franco-Americana-Británica) la cual se basa en el diagnóstico morfológico, citoquímico, inmunológico y citogenético de los blastos medulares. Esta clasificación divide a las leucemias en: leucemias agudas (tres tipos de estirpe linfoide y ocho de estirpe mieloide) y en leucemias crónicas (Linfocíticas y mielocíticas o granulocíticas), donde sólo se han descrito dos tipos (Tabla 4) (Bleutler, 2001).

2.5.3 INCIDENCIA DE LA LEUCEMIA

Entre los diversos tipos de cáncer, las leucemias junto con los linfomas (tumores del tejido linfático), ocupan el primer lugar de incidencia en los pacientes pediátricos (Mejia, 2000). En adultos del sexo masculino ocupan el tercer lugar y en las mujeres adultas ocupan el sexto lugar. En los últimos años la frecuencia de la leucemia se ha triplicado en un 60%. Como en la mayoría de las alteraciones genéticas, la frecuencia varía de acuerdo al grupo étnico o raza. En México, las leucemias crónicas son menos comunes que las leucemias agudas, algo muy diferente a lo que ocurre en los países anglosajones, donde la leucemia linfocítica crónica es más frecuente (Pui, 1993).

Las leucemias crónicas se pueden observar a cualquier edad, pero en niños constituye sólo el 3 %; su frecuencia aumenta y predomina en adultos jóvenes o de edad mediana. Es más frecuente en varones que en mujeres (Pui, 1993). La evolución natural del padecimiento una vez que se detecta la forma clínica tienen una duración de aproximadamente 3 a 4 años en ocasiones más, pero siempre lleva al paciente a una fase final llamada blástica, muy similar a la leucemia aguda, y suele terminar con la vida del enfermo (Bleutler, 2001).

2.5.4 LEUCEMIA AGUDA.

La leucemia aguda, tanto linfoblástica como mieloblástica, está considerada como una enfermedad aún más grave que cualquiera de las leucemias crónicas.

Se caracteriza por la aparición en sangre periférica o médula ósea de un número elevado de blásts. Estas células malignas maduran con lentitud y de manera incompleta; el tiempo de su ciclo celular es prolongado y la proliferación desordenada surge como una falla en los mecanismos de control de cualquiera de las células hematopoyéticas. Los mecanismos responsables devastadores de esta enfermedad se deben a la infiltración de las células malignas en el resto de los órganos (Lee, 1994).

2.5.5 FRECUENCIA EN LEUCEMIA AGUDA.

La frecuencia de la Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL) es mayor en los primeros años de vida, disminuyendo en los grupos de edades más avanzadas. La frecuencia relativa de los subtipos varía con la edad; en el caso de LAL en pediátricos, el 70% es L1, el 18% L2 y el 3% L3. En adultos, el 76% de las LAL es L2 y esta frecuencia concuerda con la forma más agresiva en la enfermedad y un mal pronóstico.

En el caso de la Leucemia Aguda Mieloblástica (LAM), las variantes M0, M1, y M2 son responsables de cerca del 50% de los casos, la mielomonoblástica M4 y la promielocítica M3 del 25%; la monoblástica y la eritroleucemia el 10% y la megacarioblástica M7 del 3% o menos (Lee, 1995).

2.5.6 CUADRO CLINICO Y TRATAMIENTOS ACTUALES

El pronóstico de la enfermedad en un paciente se define con la edad, sexo, estado nutricional, raza y alteraciones cromosómicas, las cuales son útiles para determinar las posibilidades de supervivencia prolongada o curación. Clínicamente, las variedades de la leucemia difieren entre sí con respecto al origen celular, evolución y respuesta al tratamiento (Lee, 1995). Los cuadros clínicos varían de un caso a otro; no obstante, es frecuente que los primeros síntomas sean la sudoración, falta de apetito, fatiga, epistaxis o sangrado de encías, dolores agudos y difusos en extremidades, esplenomegalia y crecimiento de los ganglios linfáticos, además de la leucocitosis.

Los avances terapéuticos basados en radiaciones, quimioterapia y trasplante de médula ósea han permitido que en la actualidad obtengan la curación la mayoría de los niños (70%) logrando una remisión completa sostenida por más de 5 años (Fatih, 1998).

El tratamiento actual de las LAL en adultos consiste en un complicado e intensivo régimen de quimioterapias (por ejemplo, vincristina, prednisoma, metotrexato) radiaciones y trasplantes de médula ósea; sin embargo, las cifras de curación se encuentran por debajo del 20% y presentan bajos rangos de sobrevida (Larson, 1998).

En el caso de las LAM, los tratamientos actuales están acordes al tipo de LAM. Así, por ejemplo, es en el tipo M3 en donde los esquemas terapéuticos están basados en el ácido trans-retinoico (ATRA), el cual induce la diferenciación del promielocito, y este medicamento es capaz de inducir la remisión completa en el paciente. Las combinaciones de quimioterapia, incluyendo inhibidores de la topoisomerasa II como etopósido y tenipósido, parecen ser útiles para este tipo de leucemia. Aún con estos tratamientos el nivel de sobrevida en los pacientes con

leucemia aguda Mieloblástica es muy bajo (40%) (Larson, 1998, Montesinos et al, 2002).

Actualmente se están realizando investigaciones sobre distintas modalidades de tratamiento que podrían aumentar las defensas naturales del organismo. El objetivo es matar o impedir el crecimiento de células leucémicas. La radioinmunoterapia es un ejemplo de inmunoterapia. Esta modalidad combina el uso de anticuerpos con isótopos adosados que emiten radiación. Estos anticuerpos se pueden fabricar en el laboratorio. Se inyectan al paciente y destruyen las células cancerosas (Forero, 2003).

En leucemias crónicas, pero no en agudas, existen tratamientos inmunológicos con factores estimuladores o inhibidores de colonias de células como el interferón- γ . Estas sustancias químicas naturales se pueden fabricar comercialmente utilizando las técnicas de la biotecnología. Estas sustancias químicas se pueden usar para ayudar a devolver células sanguíneas normales durante el tratamiento o para mejorar el sistema inmune para que ataque a la leucemia. (Wierda y O'Brien, 2001)

Uno de los tratamientos con los que se han obtenido resultados preliminares en la utilización de antígenos tumorales para activar el sistema inmune o inmunoterapia adoptiva la cual ha tenido éxito en algunos tipos de cáncer; sin embargo en leucemia se tiene poco conocimiento sobre los antígenos tumorales involucrados. Se conocen algunos resultados preelminares de inmunoterapia utilizando células dendríticas con el antígeno bcr-abl (Pinilla, 2000), y éste ha sido utilizado en la inducción de CTL's, los cuales se ha visto son capaces de atacar *In Vitro* a las células de leucemia granulocítica crónica (Brossart, 2000).

3. JUSTIFICACION

En la actualidad, el cáncer ocupa el cuarto lugar en causa de defunción en nuestro país y la cifra sigue en aumento. Los tratamientos actuales de quimio y radioterapias la mayoría de las veces llegan a alterar aún más a las células. Uno de los tratamientos que ha tenido éxito en algunos tipos de tumores es la inmunoterapia adoptiva, la cual consiste en la estimulación y activación del sistema inmune utilizando APC a linfocitos T con la finalidad de destruir a la célula neoplásica.

Los genes de la familia *MAGE* son de gran interés para la inmunoterapia, pues su ausencia en tejidos normales y su expresión en tumores asegura una estricta respuesta inmune contra el cáncer (Loriot, 2003;Lucas, 1998). Se ha observado que varios tipos de tumores presentan al menos uno de los genes de la familia *MAGE*, pero en leucemia, existe controversia y escaso conocimiento a este respecto, ya que solo se encuentra un reporte que describe la expresión del gen *MAGE-A* en Leucemias Linfocíticas Crónicas (Shichijo, 1995), mientras que en otro estudio no se muestra la expresión en ningún tipo de neoplasias hematológicas (Chambost, 1993, 2001).

Los antígenos *MAGE-A* son de particular interés para la inmunoterapia antitumoral por ser estrictamente específicos en tumores, y la ausencia de moléculas *HLA* en testículo sobre la superficie de células germinales aseguran la ausencia de efectos adversos.

Las moléculas de histocompatibilidad están en el centro de la respuesta inmunológica pues presentan los antígenos a los linfocitos T en forma de péptidos. La activación de CTL's sería producida por una molécula *HLA- I* unida a péptidos derivados de la expresión de genes *MAGE-A*; sin embargo no se conoce bien la expresión del haplotipo de moléculas *HLA* unidas al péptido *MAGE-A* para el desarrollo de una respuesta inmune contra las células neoplásicas en los pacientes con Leucemia Aguda.

Las genes *MAGE-A1* y *-A3* estas descritos como los más frecuentes en cánceres sólidos y como los más inmunogénicos de entre la familia de *MAGE-A*; por lo tanto, el desarrollo de este trabajo se enfoca en analizar la expresión del gen *MAGE-A1* y *-A3* en pacientes con Leucemia Aguda, como también conocer la expresión de la molécula HLA-I en los pacientes que expresen el antígeno, de esta manera, es posible aportar información para realizar a un futuro un protocolo para seleccionar pacientes para tratamientos inmunológicos contra la leucemia de forma conjunta o separada de las radioterapias o quimioterapias permitiendo mayores posibilidades de vida al paciente afectado.

Con el desarrollo de este trabajo se amplía el conocimiento de la expresión del antígeno MAGE junto con la molécula HLA-I en leucemias agudas ya que existe controversia y escaso conocimiento al respecto.

4. HIPOTESIS

*El gen MAGE codifica para antígenos tumorales, por lo tanto, se espera que se exprese en células de paciente con leucemia aguda. La molécula HLA-I presenta antígenos tumorales por lo que se espera una coexpresión de los haplotipos de la molécula HLA-I con el antígeno tumoral MAGE.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL:

*Conocer la expresión de MAGE-A1, -A3 y HLA-I en células de pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda del Servicio de Hematología del HGM.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

*Confirmar la ausencia de expresión del gen MAGE-A1 y -A3 en linfocitos de donadores normales.

*Determinar la expresión y frecuencia del gen MAGE-A1 y -A3 en Leucemias Agudas Linfoblásticas (LAL) y Mieloblásticas (LAM) por RT-PCR.

*Analizar los niveles de expresión de moléculas HLA clase I en los diversos tipos de leucemia aguda por citometría de flujo.

*Evaluar la expresión diferencial de los loci HLA-A, B y C por medio de RT-PCR en aquellos pacientes que expresen algún antígeno tumoral.

*Confirmar la expresión de la proteína del gen MAGE en pacientes con Leucemia Aguda.

6. METODOLOGIA.

6.1 INCLUSION DE PACIENTES.

Se incluyeron 85 pacientes adultos con el diagnóstico de Leucemia Aguda, con edades desde los 12 años en adelante por un rango de tiempo de un año. El diagnóstico estuvo basado en el análisis citomorfológico, inmunológico y citogenético realizado en el Servicio de Hematología del Hospital General de México.

6.2 SEPARACION DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFERICA (PBMC)

Se obtuvieron 20 ml de sangre periférica con 0.5ml de heparina, de pacientes (internos del Hospital General de México) con diagnóstico de Leucemia Aguda aún sin tratamiento de quimioterapia para la separación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y de donadores normales o sanos.

Las muestras fueron procesadas mediante el método de separación de PBMC por centrifugación de gradientes de densidad con Ficoll-Hypaque (Lymphoprep, 1.077g/mL) a 1500 rpm por 30'. Las PBMC en la interfase fueron colectadas y se realizaron lavados con solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS). Posteriormente se guardaron las muestras disolviendo el paquete celular en Trizol (Gibco BRL), y se almacenaron a -85° C hasta su utilización (Martínez, 2001)

6.3 ENSAYOS DE EXPANSION DE LINEAS CELULARES.

Células de Leucemia Promielocítica HL-60 (LAM-M3) y K-562(eritroleucemia LAM-M6) se expandieron en un medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 1% de antibióticos (50u/ml penicilina y 50µg/ml estreptomina) y suero fetal bovino (SFB) al 15% inactivado (56° C por 30', libre de endotoxinas) en una atmósfera de CO₂ al 5% e incubados a una temperatura de 37° C.

6.4 EXTRACCION DE RNA.

La extracción de RNA se realizó mediante la técnica de TRIZOL (Gibco-BRL), (cloroformo, alcohol isopropil) siguiendo las indicaciones de proveedor para las líneas celulares, así como para las PBMC de pacientes con leucemia y para células normales.

Se homogenizó el paquete celular con 1ml TRIZOL (Gibco-BRL), y se incubó la muestra homogenizada por 15 minutos a temperatura ambiente. Se le adicionaron 0.2ml de cloroformo por ml de TRIZOL. La muestra se agitó por 15 segundos y se incubó de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a no más de 12,000 g durante 15 minutos a 4° C. Después de centrifugar la mezcla se separó en una fase roja y una fase fenol-cloroformo (RNA); la fase acuosa se recuperó y se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 0.5ml de isopropanol por ml de TRIZOL, incubando la muestra a temperatura ambiente por 10 minutos; después de la incubación se centrifugó a no más de 12,000 g por 10 minutos a 4°C. El pellet de RNA se lavó con 1ml etanol al 75% por ml de TRIZOL. La muestra se resuspendió mecánicamente y se centrifugó a no más de 7,000 g por 5 minutos a 4°C. El final del procedimiento, brevemente se dejó secar el pellet de RNA (al vacío o al aire libre por 5 o 10 minutos), sin dejar a sequedad total. La muestra de RNA se resuspendió en agua libre de RNAsas y se incubó por 10 minutos a 55-60°C, transfiriéndolos a hielo inmediatamente después de la incubación. Posteriormente, se determinó su pureza y concentración en un

espectrofotómetro de luz UV (lectura de la absorbancia a 260 y 280nm) y se almacenó a -85° C hasta su posterior uso.

6.5 SINTESIS DE cDNA.

La síntesis de cDNA se realizó por Retrotranscripción (RT) en la cual se utilizaron 2 μ g de RNA previamente extraído y cuantificado por espectrofotometría. Se incubó el RNAm con 1 μ l del primer Oligo d(T) (0.5 μ g/ μ l) (Invitrogen) y agua destilada estéril a 70 $^{\circ}$ C durante 10 minutos en un termociclador. Posteriormente se introdujo en hielo durante 5 minutos. La síntesis de cDNA se realizó adicionando 4 μ l 5x del amortiguador primera hebra [250mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15mM MgCl₂], 2 μ l dNTPs (10mM de cada dNTP), 2 μ l 0.1M DTT y se incubó a 42 $^{\circ}$ C por 50 minutos con 1 μ l de la enzima M-MLV RT (200unidades/:1) (SIGMA) en un termociclador. El volumen final fué de 20 μ l.

6.6 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

La amplificación del cDNA para observar la expresión del gen, se llevó a cabo con la técnica de PCR, analizando células de donadores normales, líneas celulares y muestras de pacientes con LAL y LAM.

Como control negativo se utilizaron células mononucleares de donadores normales y como control positivo las líneas celulares K562 (derivada de una LAM-M6) para MAGE-A1 y MAGE-A3 (Serrano et al, 1995) y HL-60 para HLA (Liu et al, 1999). El protocolo a seguir fue estandarizado previamente ajustando las concentraciones: 10 μ l amortiguador de 10X PCR [20mM Tris-HCl (pH 8) y 50mM KCl] ; 3 μ l MgCl₂ (2mM) , 4 μ l dNTP's (10mM de cada dNTP), 1 μ l (30pM) de cada oligo, cDNA 2 μ l, 0.5 μ l Taq DNA polimerasa (2.5 u/100 μ l), H₂O destilada estéril (80 μ l); el volumen final fué de 100 μ l. Se adicionó finalmente 50 μ l de aceite mineral para evitar perdida de muestra por evaporación (Tabla 5) (Olarte et al, 2002).

TABLA 5. CONDICIONES DE AMPLIFICACION PARA LA PCR DE LOS GENES MAGE-A1 Y -A3 (Martínez et al, 2001; Olarte et al, 2002)

REACTIVOS PCR	Cantidades
10X PCR buffer (Promega) 200mM Tris-HCl 500mM KCl	10µl 20mM 50mM
MgCl ₂ (Promega) 50mM	3µl 2mM
dNTPs (PerKin Elmer) 10mM	4µl 400µM
Oligonucleotido sentido	1µl 30pm
Oligonucleotido antisentido	1µl 30pm
Templado cDNA	2µl
Taq DNA polimerasa(Promega)	0.5µl 2.5u
Agua destilada	78.5µl
Volumen Final	100µl
Aceite Mineral	50µl

6.7 CONDICIONES DE AMPLIFICACION.

Los tubos se colocaron en un termociclador y se corrieron de acuerdo al siguiente ciclo: (Martínez et al, 2001)

6.7.1 MAGE-A

Se incubó la reacción a 94°C por 30 segundos, seguida de 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 58°C por 30 segundos (alineación) y 72°C por 1 minuto (extensión) durante 35 ciclo; después se incubó adicionalmente por 5 minutos a

72°C y la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos se guardaron a -20° C hasta su utilización. Los oligonucleótidos utilizados para el gen *MAGE-A1* y -A3 que amplifican un producto de 421pb y 725pb respectivamente, fueron los siguientes:

Secuencia del oligonucleótido de *MAGE-A1*:

Sentido (CHO 14) 5'-CGG CCG AAG GAA CCT GAC CCA G-3'

Antisentido (CHO 12) 5'-GCT GGA ACC CTA ACT GGG TTG CC-3'

Secuencia de oligonucleótidos de *MAGE-A3*:

Sentido (AB-1197) 5'-TGG AGG ACC AGA GGC CCC C-3'

Antisentido (BLE-5) 5'-GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTG C-3'

6.7.2 HLA-A, -B y -C

La reacción fue incubada a 94°C por 1 minuto, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos (desnaturalización), 60°C por 30 segundos (alineación) y a 72°C por 1 minuto (extensión) durante 30 ciclo, después se incubo a 72°C por 10 minuto durante 1 ciclo para completar la extensión y por último la reacción se mantuvo a 4°C. Los productos se guardaron a -20° C hasta su utilización . Los oligonucleótidos utilizados para el gen HLA-A, -B Y -C que amplifican un producto de 1082pb, 973pb y 1097pb respectivamente, fueron los siguientes:

Secuencia del oligonucleótido común para HLA-A, -B y -C.

Oligo común 5' (ABC01): 5' GATTCTCCCCAGACGCCGAG 3'

Secuencia de oligonucleótidos específicos 3':

HLA- B (B01): 5' GGACAGCCAGACCAGCAACA 3'

HLA-A (A01): 5' CCTGGGCACTGTCACTGCTT 3'

HLA-C (C01): 5' TCAGACCCCTGGGCACTGTT 3'

(Johnson, 2000).

Como control interno de integridad del RNAm se amplificó el gen β -2 *microglobulina* (producto de 397 pb) utilizando los siguientes oligonucleótidos:

Sentido 5' ATG TCT CGC TCC GTG GCC TTA GCT 3'

Antisentido 5' CCT CCA TGA TGC TGC TGC TTA CAT GTC 3'

6.8 ANALISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, a 100V durante un tiempo de 40 minutos a 1 hora. Los geles fueron visualizados en un trans-iluminador de luz UV tomando fotografías de los geles con equipo Polaroid.

6.9 PURIFICACION DEL GEN *MAGE-A1* Y *MAGE-A3*

Se realizaron 6 reacciones de amplificación para el gen *MAGE-A1* y *MAGE-A3*, y al producto de la reacción se le realizó una electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% teñido con bromuro de etidio, durante 30 minutos a 60 volts. La banda fue visualizada en el transiluminador, cortada y posteriormente purificada por medio del kit QIAEX gel extraction (500) y se guardó a 4°C.

6.10 SECUENCIA DEL GEN

Los productos amplificados por RT-PCR se secuenciaron con el kit de secuencias *BigDye/Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*. La secuencia fue alineada en el programa **BLASTn 2.2.9**. del **GENE-BANK** para verificar el gen amplificado.

6.11 INMUNOHISTOQUIMICA.

Para la inmunohistoquímica se colectan células de pacientes con leucemia aguda que se encuentran en suspensión y que hayan sido positivas para *MAGE-A*. Se ajusta una cantidad de 10,000 células en 100µl de PBS para llevar a cabo el citospín, usando laminillas silanizadas (500g X 8 minutos). Después de haber transcurrido el tiempo se fijan con etanol:acetona (1:1) durante 3 minutos a -20 grados centígrados. Posteriormente se permeabiliza con PBS-Triton (0.25%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para bloquear se adiciona peróxido de hidrógeno al 3% por 10 minutos. Se lava con PBS-Tween al 0.1% (3 veces en agitación) y se adiciona BSA al 10% incubando por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realiza la detección de la proteína *MAGE* incubando con el anticuerpo anti-*MAGE* [*MAGE* (FL-309) anticuerpo policlonal IgG, Santa Cruz Biotechnology, Inc] a una dilución de 1:25 por 2 horas a temperatura ambiente y se hacen tres lavados con PBS-Tween (el anticuerpo policlonal

identifica una región conservada de la mayoría de las proteínas MAGE, incluyendo MAGE-A1 y MAGE-A3). Se adiciona el anticuerpo secundario (LINK) y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente y se lava tres veces con PBS-Tween. Posteriormente se adiciona la marca de peroxidasa (LABEL) y por último se revela con DAB y se lava dos veces con PBS y un lavado con agua destilada. Se observa al microscopio en campo claro (Martínez et al, 2001).

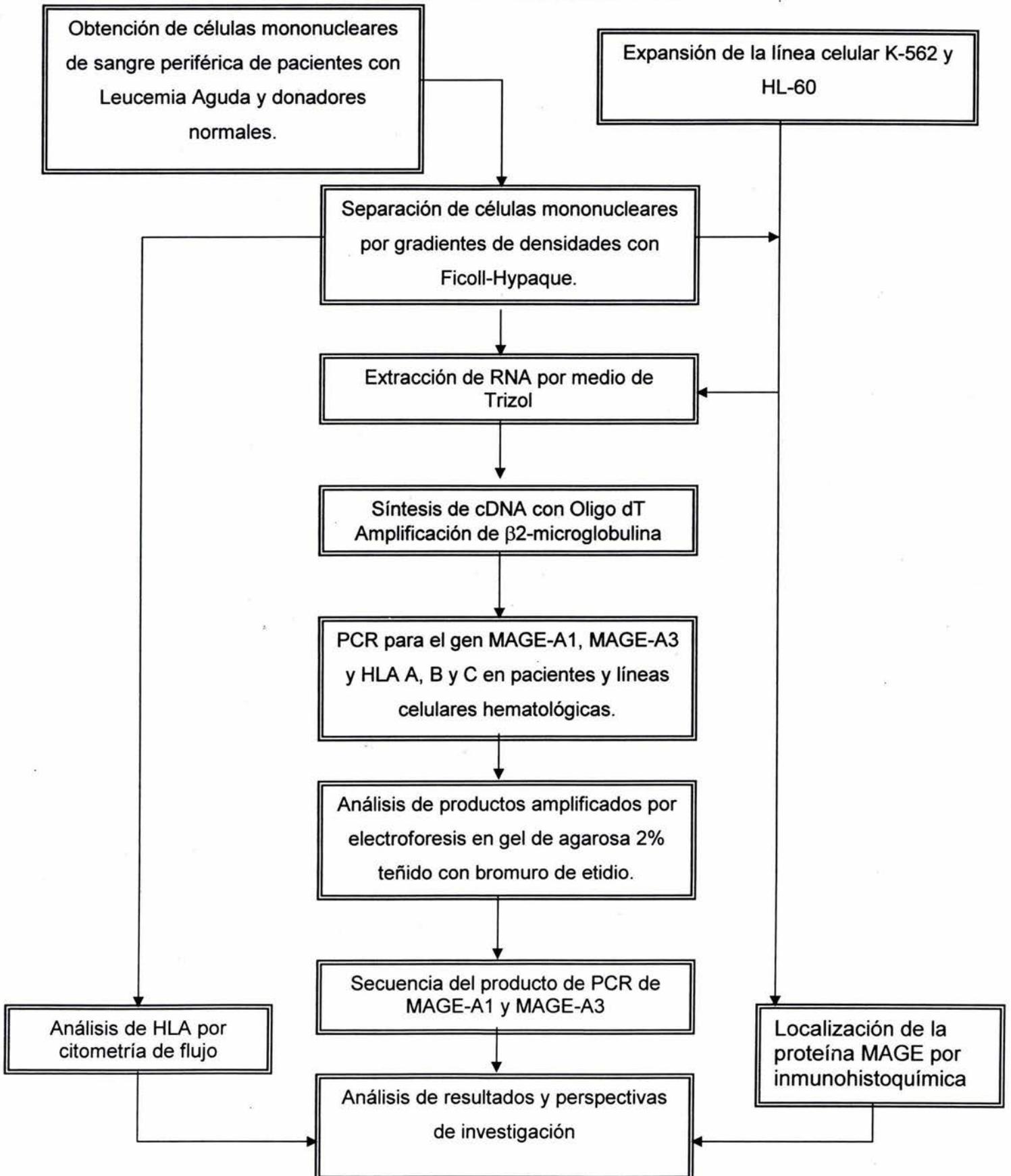
6.12 ANALISIS DE CITOMETRIA DE FLUJO.

Para el análisis de la expresión de HLA de clase I se utilizó el anticuerpo W6/32 el cual reconoce secuencias monomórficas de la molécula. Para su detección se utilizó un control positivo que expresa altos niveles de HLA, la línea celular HL-60 y como control negativo la línea celular K-562 la cual no expresa moléculas HLA de clase I.

El análisis se llevó a cabo en un citómetro de flujo el cual contabiliza diez mil células y detecta los niveles de fluorescencia, los cuales son representados en un histograma.

Se utilizaron 1×10^6 células, las cuales se lavaron 3 veces con PBS o bien solución salina. Posteriormente se incubaron con el primer anticuerpo W6/32 durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo las células se lavaron con solución salina o PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo (IgG biotinilado de ratón). Las células se lavaron y se incubaron con el complejo streptavidina-fluoresceína. Finalmente las células se fijaron con paraformaldehído 1 X en PBS recién preparado, hasta su lectura (Martínez et al, 2001).

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. RESULTADOS.

8.1 ANALISIS DE LA EXPRESION DEL GEN MAGE EN DONADORES NORMALES Y K-562.

Se analizaron muestras de sangre periférica de donadores normales (n=85), de las cuales se separaron los mononucleares por el método de separación de gradientes de Ficoll-Hypaque. Para corroborar la presencia de la expresión de los genes MAGE-A1 y MAGE-A3, se utilizó la línea celular derivada de eritroleucemia, K562, como control positivo para ambos genes.

Las dos bandas representativas del RNA 28S y 18S fueron visualizadas en un transiluminador de luz UV. Para comprobar la integridad del RNA, se amplificó el gen de la β -2 microglobulina (gen de expresión constitutiva) mediante la técnica de RT-PCR (Figura 9).

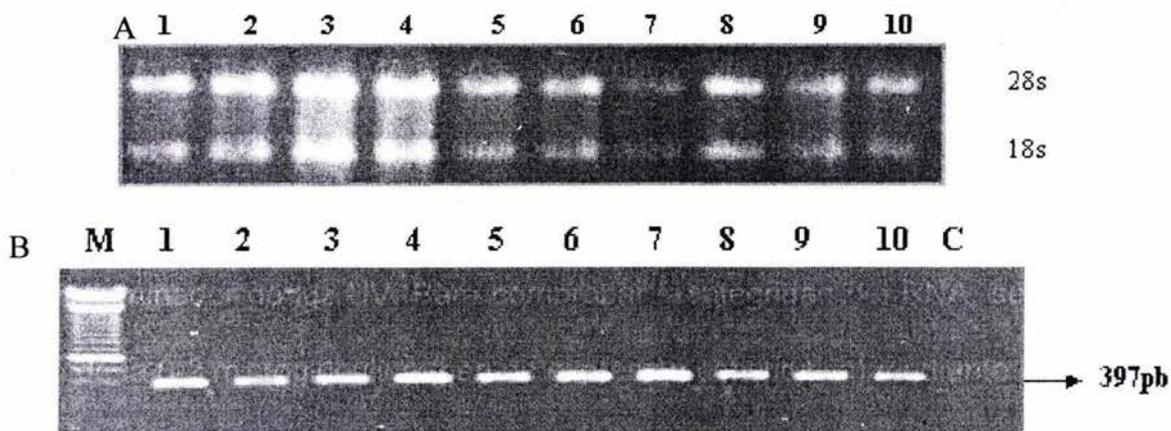


Figura 9. Integridad del RNA aislado de individuos normales y de la línea celular K-562. A. Carril 1) se muestra el RNA de K-562. Carriles 2-10) se muestra RNA de donadores sanos, visualizados en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. Se aprecia las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal. B. Expresión de β -2 microglobulina de células K-562 (carril 1) y en células de donadores sanos (carriles 2-10). M Marcador de peso; C control de agua.

Una vez comprobada la integridad del RNA, se realizó la búsqueda de la expresión de los genes MAGE-A1 y -A3, en los donadores sanos y en la línea K-562, utilizando los oligonucleótidos: CHO 14 como sentido y CHO 12 como antisentido para identificar MAGE-A1; y AB 1197 como sentido y BLE como antisentido para MAGE-A3, que amplifican un fragmento de 421pb y 725pb, respectivamente. Los productos fueron visualizados en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio (Figura 10). La expresión de los genes MAGE es ausente en individuos normales, con excepción de la línea K-562.

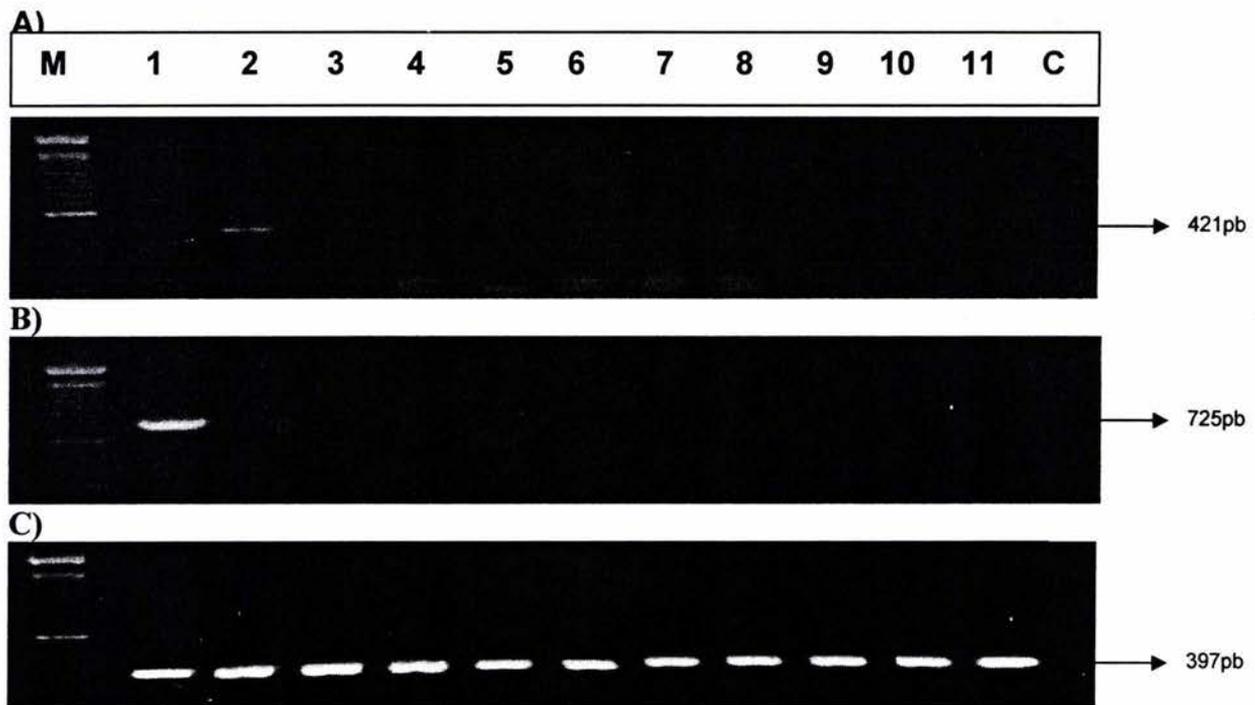


Figura 10. Expresión del gen MAGE-A en individuos normales y en la línea celular K-562.

A) Expresión del gen MAGE-A1 en células normales y en K-562. Carril 2 se muestra la banda amplificada del gen MAGE-A1 en la línea celular K-562, correspondiendo al peso esperado (421pb), carriles 1, 3-11, se muestran células de donadores normales negativas para el gen. B) Expresión del gen MAGE-A3 en células normales y K-562. Carril 1 se muestra la banda amplificada del gen MAGE-A3 en K-562, correspondiendo al peso esperado (725pb), carriles 2- 11 se muestran células normales negativas para el gen. C) Expresión de b-2 microglobulina de K-562 (carril 1 y 2) y en células normales (carriles 3-11).

8.2 CARACTERISTICAS DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.

Se obtuvieron un total de 85 muestras de pacientes con diagnóstico de Leucemia Aguda (52 pacientes LAL, 33 pacientes LAM).

La mayoría de las muestras colectadas pertenecen al tipo LAL (61.16%). Este grupo incluye 49 muestras de tipo L2, 2 de tipo L1, y 1 muestra de tipo L3. En el caso de LAM (38.79%) se incluyen 1 muestra de tipo M1, 8 muestras de tipo M2, 16 muestras de tipo M3, 6 muestras de tipo M4, 1 de tipo M5 y 1 de tipo M6. Para M7 no se obtuvieron muestras (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de pacientes por tipo de Leucemia Aguda.

LEUCEMIA AGUDA LINFOBLASTICA			LEUCEMIA AGUDA MIELOBLASTICA		
Variedad	%	No. Pac.	Variedad	%	No. Pac.
L1	2.35	2	M1	1.17	1
L2	57.64	49	M2	9.41	8
L3	1.17	1	M3	18.82	16
			M4	7.05	6
			M5	1.17	1
			M6	1.17	1
			M0	0	0
TOTAL	61.16			38.79	= 100%
		52			33 = 85pac

Encontramos mayor frecuencia de LA en pacientes de entre 20 y 29 años, por encima de esta edad la frecuencia disminuye (Tabla 7). La media de edad de la población fue de 33 años.

Tabla 7 .Distribución de las edades en pacientes con LA mediante intervalos de clase.

	Grupos de edad						
	10 a 19	20 a 29	30 a 39	40 a 49	50 a 59	60 a 69	70 y +
No. Pac.	13	30	17	9	6	3	3

El porcentaje de pacientes del sexo masculino fue del 54.7% y del sexo femenino fue del 45.3%. Se aprecia una ligera tendencia hacia el sexo masculino por padecer la enfermedad.

Se colectaron datos clínicos y moleculares para llevar un registro de pacientes para posteriores estudios relacionados con MAGE y posibles correlaciones con datos clínicos (Apéndice 1).

8.3 EXPRESION DE LOS GENES MAGE-A1 Y MAGE A3 EN LEUCEMIA AGUDA.

Se analizaron 85 muestras de pacientes con leucemia que fueron tratadas de igual forma que los donadores sanos, aislando el RNA y comprobando su integridad y concentración para posteriormente realizar el análisis por RT-PCR (Figura 11).

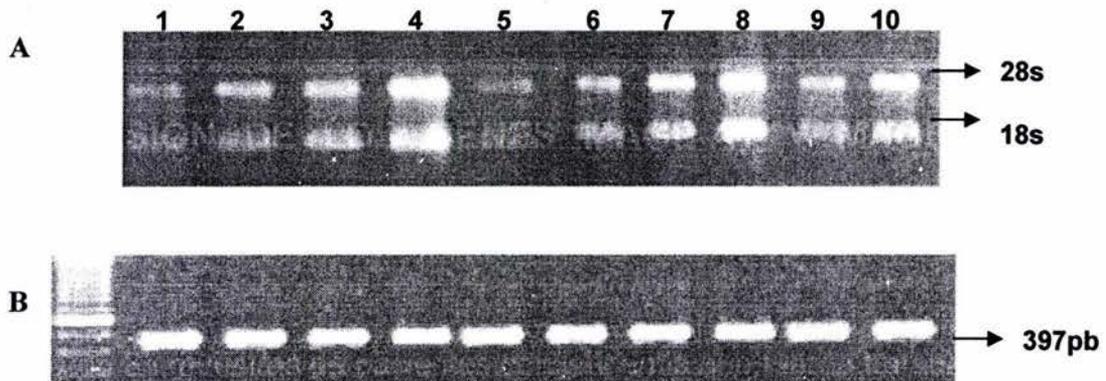


Figura 11. Integridad de RNA de pacientes con Leucemia aguda. Panel A) Carriles 1-10 se aprecia las bandas 18S y 28S del RNA ribosomal de células de pacientes. Panel B) Carriles 1-10 se muestra la expresión de $\beta 2$ -microglobulina de células de pacientes.

Se realizó el análisis de la expresión de los genes MAGE en pacientes con leucemia aguda por RT-PCR con los oligonucleótidos adecuados.

Para el caso de MAGE-A1 en LAL se observó expresión del gen en dos pacientes (carriles 14 y 17) y en el resto de ellos no se observó expresión alguna (Figura 12a1 y 12a2). La frecuencia del gen en pacientes con leucemia aguda de estirpe linfoide fue del 3.7% (Tabla 8 y Apéndice 1).

En LAM sólo se observó la expresión del gen en un solo caso de 33 pacientes (Figura 12a3, carril 30) presentando una frecuencia de 3.0% (Tabla 8).

Para MAGE-A3 el gen se expresó en 20/53 pacientes con LAL (37.7%) (Figura 12b1 y 12b2 carriles 3,7, 13-16, 20,21; y Tabla 8). La expresión del gen –A3 en leucemias agudas de estirpe mieloide presentó una frecuencia de 31.5% en relación a 10 casos positivos de 32 pacientes (Figura 12b3, carril 33; y Tabla 8). La frecuencia total de los pacientes con leucemia aguda para la expresión de los genes MAGE-A1 y –A3 fue del 38.73%. (Tabla 8)

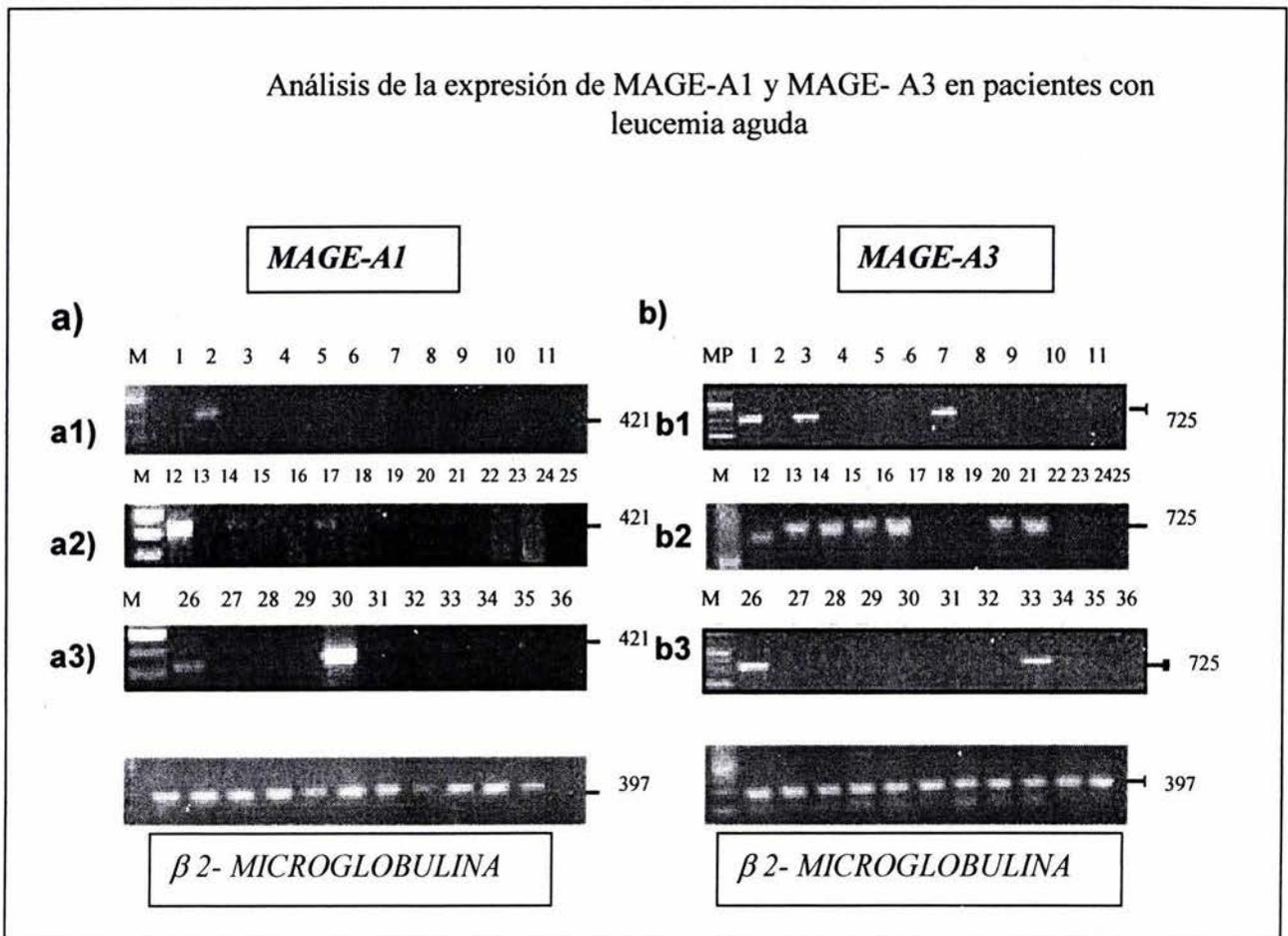


Figura 12. Foto representativa de la expresión del gen MAGE-A1 y MAGE-A3 en Leucemia Aguda. Análisis de la expresión de MAGE-A en pacientes con leucemia aguda. Panel a). Expresión del gen MAGE-A1 en pacientes con leucemia aguda. Carril MP marcador de peso molecular; carril 1 células normales, carriles 2, 12 y 26 línea celular K-562 que amplifica un fragmento de 421pb,

carriles del 3-11, 13-25, 27 al 36 muestras de pacientes con leucemia aguda. a1 y a2 se muestran leucemias del linaje linfoide (LAL). a3 se muestran leucemias del linaje mieloide (LAM). Panel b). Expresión del gen MAGE-A3 en pacientes con leucemia aguda. Carril MP marcador de peso molecular, carriles 1, 12 y 26 línea celular K-562, carril 2 células normales, carriles 3-11, 13-25, 27 al 36 muestras de pacientes con leucemia aguda. b1 y b2 muestran leucemias del linaje linfoide (LAL). b3 muestran leucemias del linaje mieloide (LAM). Parte inferior de ambos paneles la amplificación de β -2 *microglobulina*.

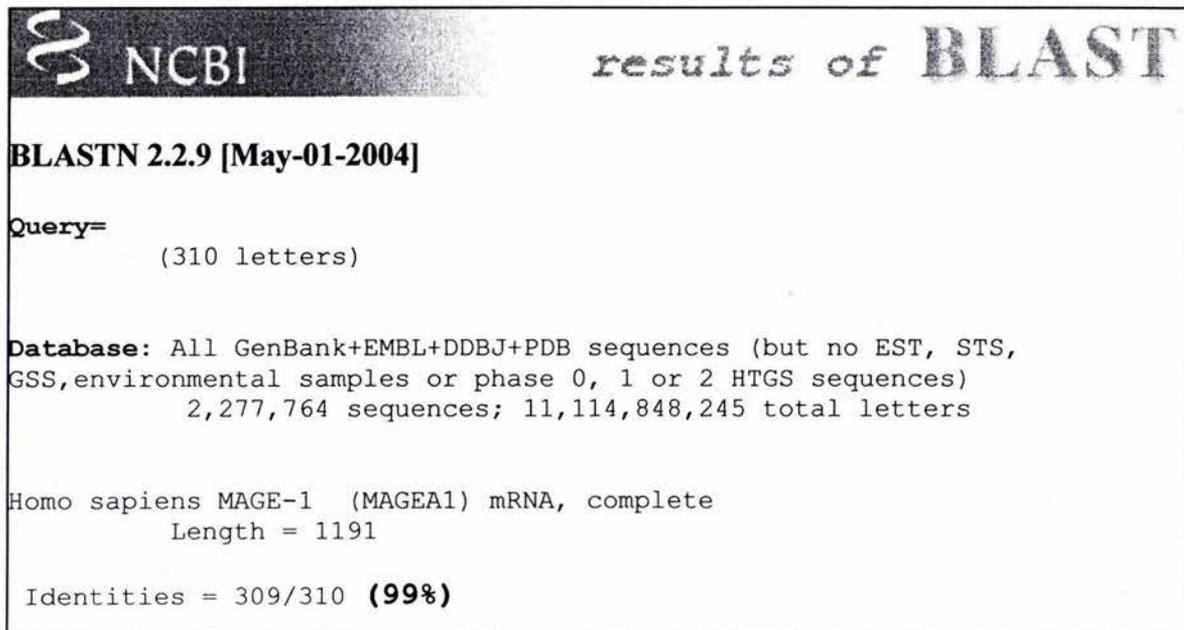
TABLA 8. RESULTADOS DE LA EXPRESION DE MAGE-A1 Y -A3 EN PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA.

Leucemias Agudas	variedad	Casos positivos <i>MAGE-A1</i>	Casos positivos <i>MAGE-A3</i>	%Total para <i>MAGE</i>
Linfoides	LAL-L1 LAL-L2	2/52 (3.8%)	23/52 (44.2%)	(38/85) 44.7%
	LAL-L3			
Mieloides	LAM-M1 LAM-M2 LAM-M3 LAM-M4 LAM-M5 LAM-M6	1/33 (3.0%)	12/33 (36.4%)	
	TOTAL	3/85 (3.5%)	35/85 (41.2%)	

8.4 ANALISIS DE SECUENCIACION DEL GEN *MAGE-A*.

Los fragmentos amplificados para *MAGE-A1* y *MAGE-A3* de pacientes fueron secuenciados (Figura 13 y Figura 14).

Las secuencias del producto amplificado por nuestro grupo se comparó con la secuencia del gen reportado. a través del programa BLASTn 2.2.9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org>). Para *MAGE A1* se encontró un 99% de identidad con la secuencia reportada (Tabla 9. Apéndice 2) y para *MAGE-A3* se encontró un 98% de identidad con la secuencia reportada (Tabla 10 . Apéndice 3).



NCBI results of BLAST

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Query=
(310 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
2,277,764 sequences; 11,114,848,245 total letters

Homo sapiens MAGE-1 (MAGEA1) mRNA, complete
Length = 1191

Identities = 309/310 (99%)

Tabla 9 . Programa BLASTn 2.2.9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org>). Muestra el ingreso de 310 nucleótidos obtenidos de la secuenciación del cDNA del RNAm de *MAGE-A1* (Query = 310) y compara la secuencia ingresada con los secuencias reportadas en un banco de datos (Database Gen Bank) y muestra el porcentaje de homología (99%) que guarda con respecto a la reportada.



results of **BLAST**

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Query=
(413 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
2,295,451 sequences; 11,209,307,333 total letters

Homo sapiens melanoma antigen, family A, 3 (MAGEA3), mRNA
Length = 1753

Identities = 408/413 **(98%)**

Tabla 10 . Programa BLASTn 2.2.9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org>). Muestra el ingreso de 413 nucleótidos obtenidos de la secuenciación del cDNA del RNAm de MAGE-A3 (Query = 413) y compara la secuencia ingresada con las secuencias reportadas en un banco de datos (Database Gen Bank) y muestra el porcentaje de homología (98%) que guarda con respecto a la reportada.

8.5 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LA PROTEINA MAGE EN LEUCEMIA AGUDA.

Se examinó la expresión de la proteína MAGE en pacientes con leucemia aguda, donadores normales y en la línea celular K-562 como control positivo. Los anticuerpos anti-MAGE contra células de individuos normales y la línea celular K-562 fueron usados como controles al examinar las muestras de pacientes con leucemia.

El protocolo a seguir fue estandarizado previamente con K-562 y se confirmó la expresión de la proteína MAGE (Figura 15).

EXPRESION DE LA PROTEINA MAGE EN K-562

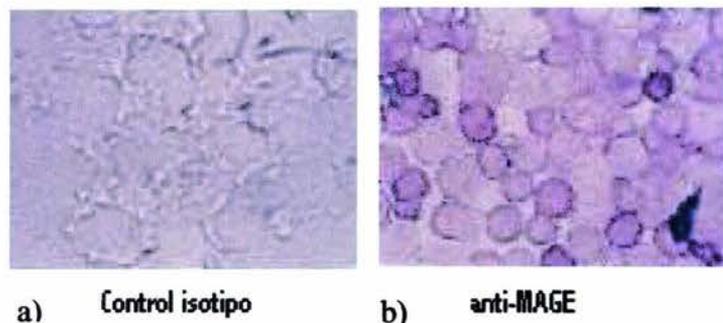


Figura 15. La expresión de la proteína MAGE en la línea K-562 como control positivo se confirmó con el Kit Super Sensitive Immunodetection System (Sistema de detección B-SA). Las muestras fueron visualizadas en un microscopio óptico a 40X a) Empleando un control isotipo para descartar falsos positivos en la determinación de la proteína en la línea celular. b) visualización de la proteína MAGE en células K-562 (La señal positiva para MAGE es café o rosa)

Las muestras que amplificaron un producto de 425 pb (MAGE-A1) ó 721pb (MAGE-A3) por el método de RT-PCR se seleccionaron cinco muestras para ser analizadas en la determinación de la proteína.

La expresión de la proteína MAGE en células de paciente con leucemia aguda se detectó y se visualizó en una LAM-M2 por medio del anticuerpo MAGE (FL-309) (Figura 16).

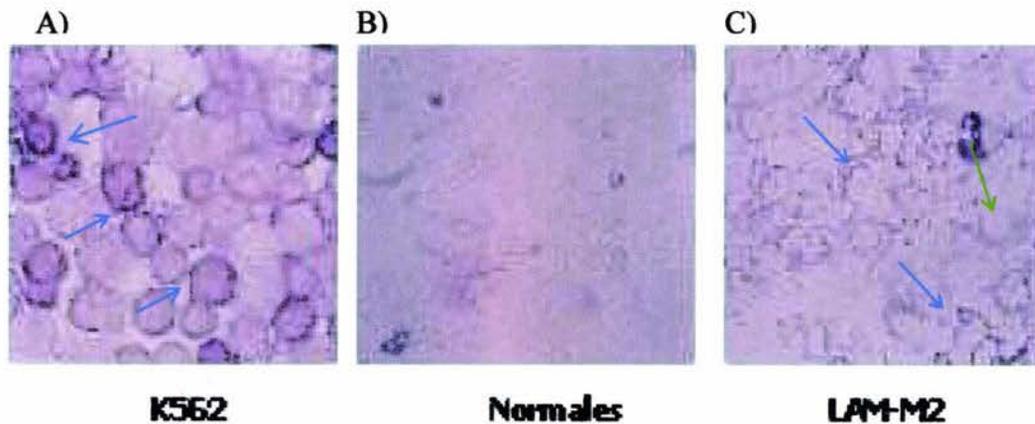


Figura 16. Expresión de la proteína MAGE en células de pacientes con leucemia aguda (40X). A) Amplificación positiva de la señal (color rosa) en la línea celular K-562. Se observa señales intensas a nivel de membrana celular (ver flechas azules) y señal menos intensa en el interior de la célula (región citoplasma). B) Células normales muestra señal negativa (Se observa el fondo rosa por motivos de la técnica, pero no se observa ninguna señal en el interior de las células). C) Células de paciente con LAM-M2 muestra amplificación de la señal principalmente en membrana celular (ver flechas azules) y menor intensidad en la región citoplasmática (ver flecha verde).

8.6 ANALISIS DE LA EXPRESION DE HLA EN PACIENTES CON LEUCEMIA POR CITOMETRIA DE FLUJO.

Una vez comprobada la expresión de antígenos tumorales en leucemia (*MAGE A1* y *A3*), se evaluaron los niveles de expresión de moléculas de HLA de clase I en la membrana de los blastos positivos para *MAGE*.

Se utilizó la línea celular HL-60 como control positivo, la cual expreso altos niveles de moléculas HLA de clase I en la superficie (Fig 17), y como control negativo la línea celular K562, la cual no expresó moléculas de HLA clase I en su membrana (Fig 18).

En la Figura 17a se muestra la gráfica de puntos (Dot-plot) (obtenida en el citómetro de flujo) de la población de las células HL-60 analizadas. En la Figura 17b se aprecia el perfil de fluorescencia de las células sin tratamiento con anticuerpo anti-HLA (autofluorescencia). En la Figura 17c se observa el perfil de fluorescencia de las células tratadas con un anticuerpo no relacionado (control de isotipo) y finalmente el perfil de fluorescencia de las células tratadas con el anticuerpo W6/32 (Figura 17d), observándose más de un 90% de expresión de moléculas HLA.

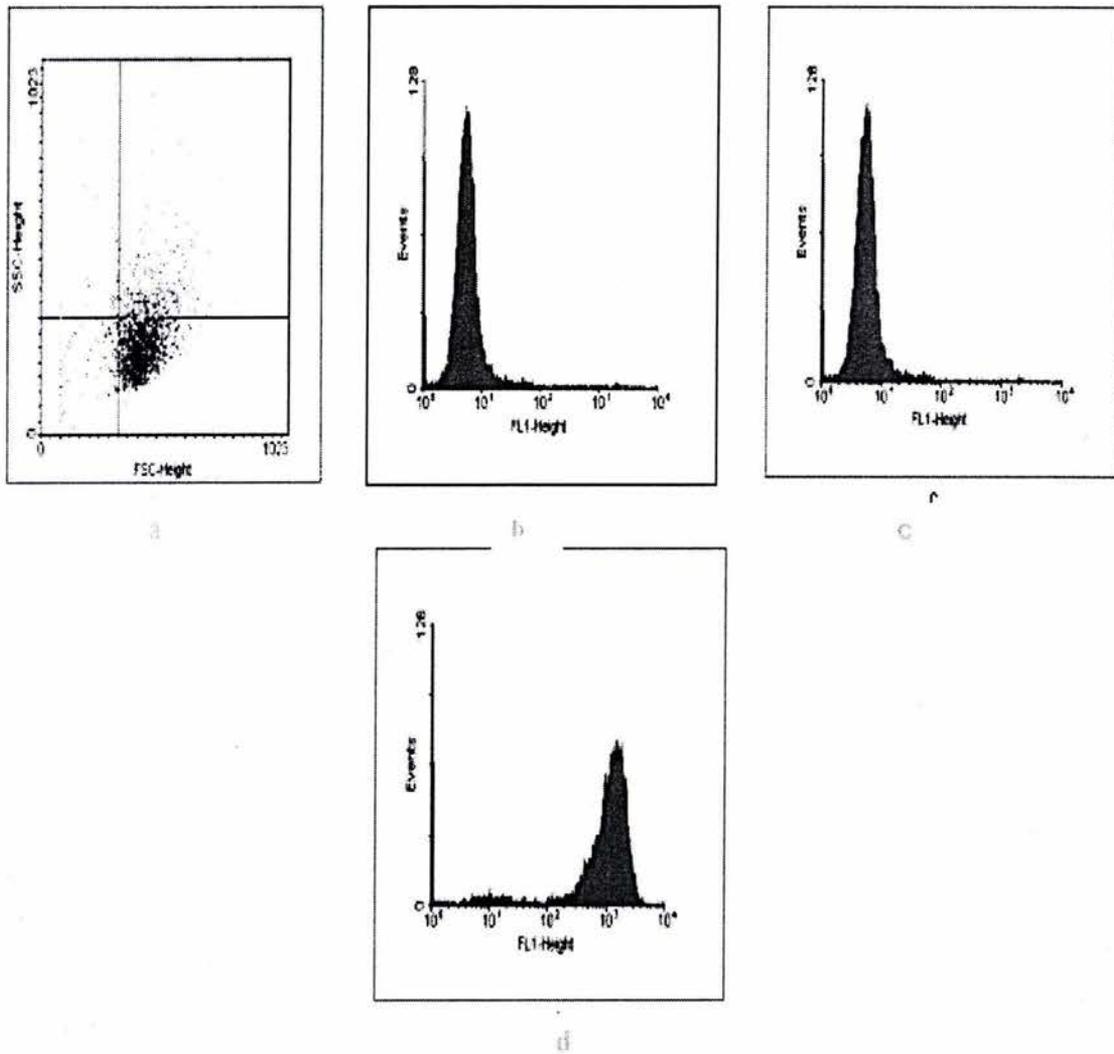


Figura 17. Análisis de la expresión de moléculas HLA -I en la línea HL-60 identificadas por citometría de flujo. En (a) Dot-plot, (b) Células sin teñir (c) Control de isotipo y (d) Células marcadas con el W6/32.

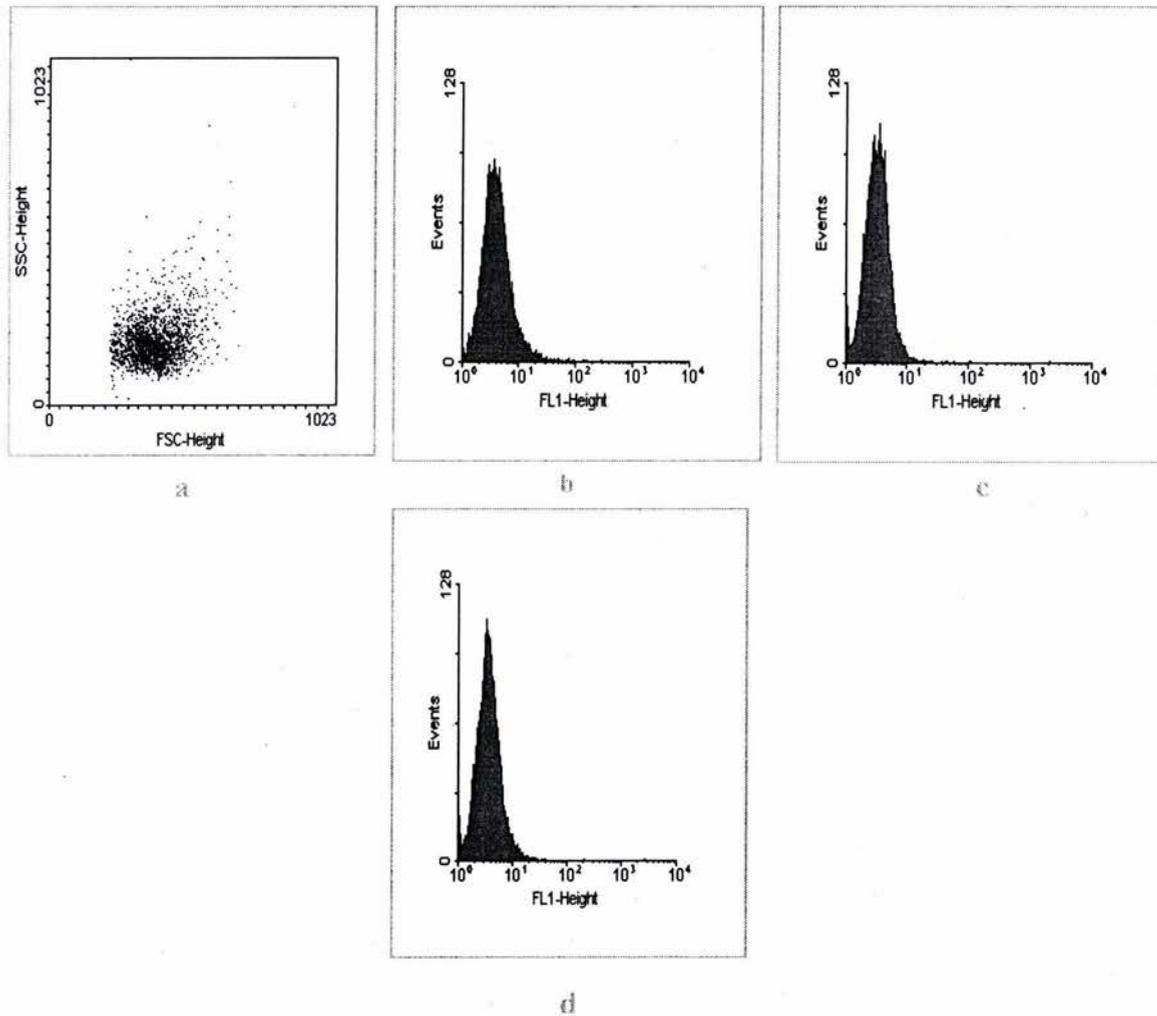


Figura 18. Análisis de la expresión de moléculas HLA-I en la línea K-562 identificadas por citometría de flujo. En (a) Dot-plot, (b) Células sin tefir (c) Control de isotipo y (d) Células marcadas con el W6/32.

De esta misma manera, las células mononucleares de 10 pacientes con diferentes tipos de leucemia y positivos para el gen MAGE, fueron tratadas con los anticuerpos específicos y analizadas por citometría de flujo: 2 LAL-L2, 2 LAM-M1, 1 LAM-M2, 1 LAM-M3 y 4 LAM-M4. Se detectó la expresión de moléculas HLA -I en el 70-80% de las células en casi todas las leucemias de origen tanto linfoide como

mieloide, con la excepción de 2 LAM-M4 en donde la expresión fue menor al 10% (Figura 19).

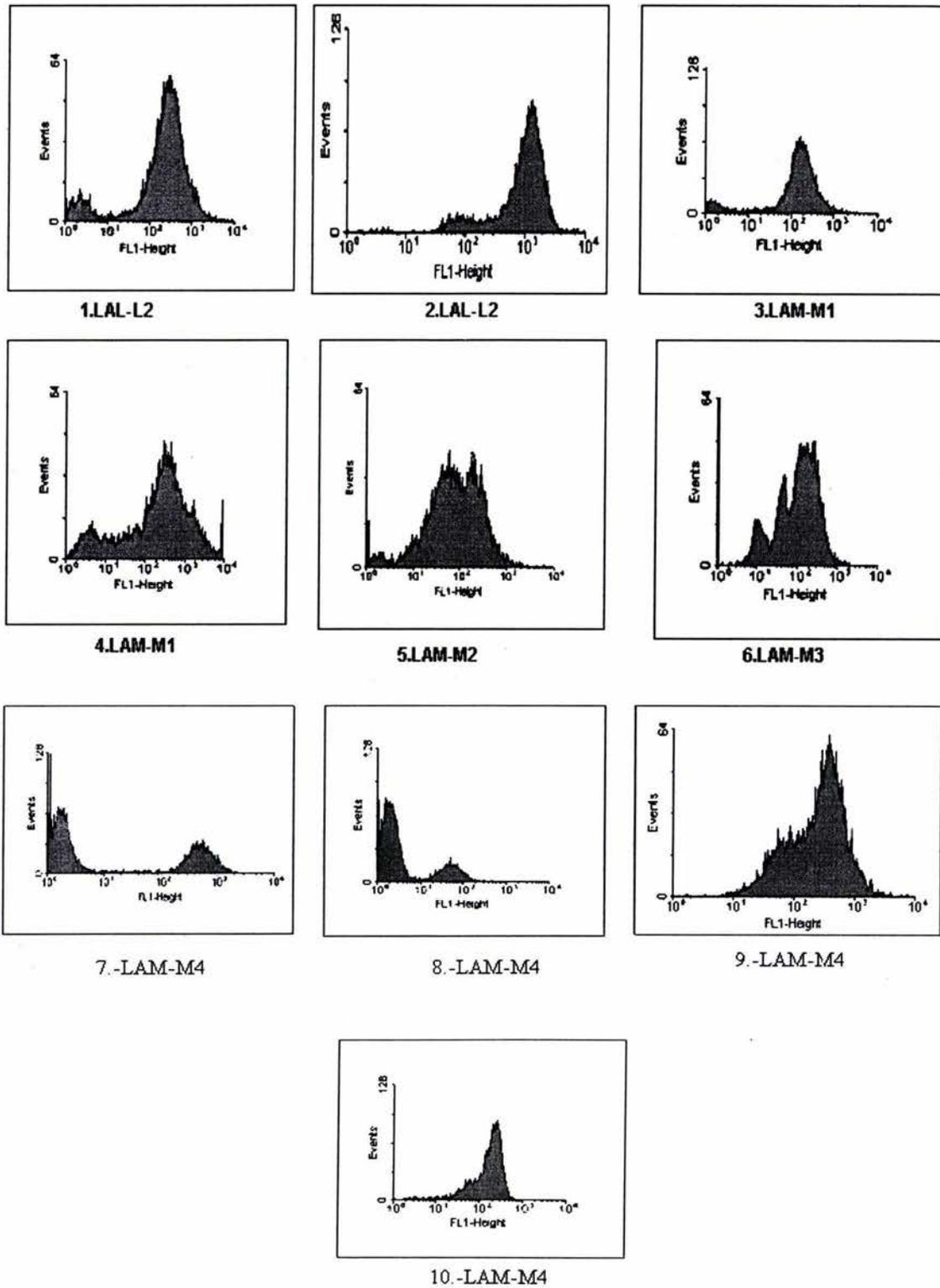


Figura 19. Histogramas de los niveles de expresión de moléculas HLA en las células de los pacientes con leucemia. Los datos muestran expresión en el 80% de las células, a excepción de dos LAM-M4 (histogramas 7 y 8).

8.7 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOCUS ESPECIFICOS DE HLA CLASE I EN MUESTRAS DE PACIENTES CON EXPRESION DE *MAGE A*.

Una vez demostrada la expresión de moléculas HLA-I en los diversos tipos de leucemia por citometría de flujo, se decidió llevar a cabo un análisis diferencial de la expresión de los loci HLA-A,B y C mediante RT-PCR en aquellos pacientes que fueron positivos para la expresión de los antígenos *MAGE A1* y *A3*. Se ajustaron las condiciones de amplificación utilizando la línea celular HL-60 como control positivo, ya que se ha reportado que expresa genes HLA-A, B y C, y como control negativo la línea celular K562, la cual es ausente en expresión de estos antígenos.

De los nueve pacientes analizados, ocho expresan un transcrito de 1082 pb correspondiente a HLA-A y un transcrito de 973 correspondiente a HLA-B, mientras que la expresión de HLA-C se observó en todos los pacientes analizados generando un transcrito de 1097pb (Figura 20).

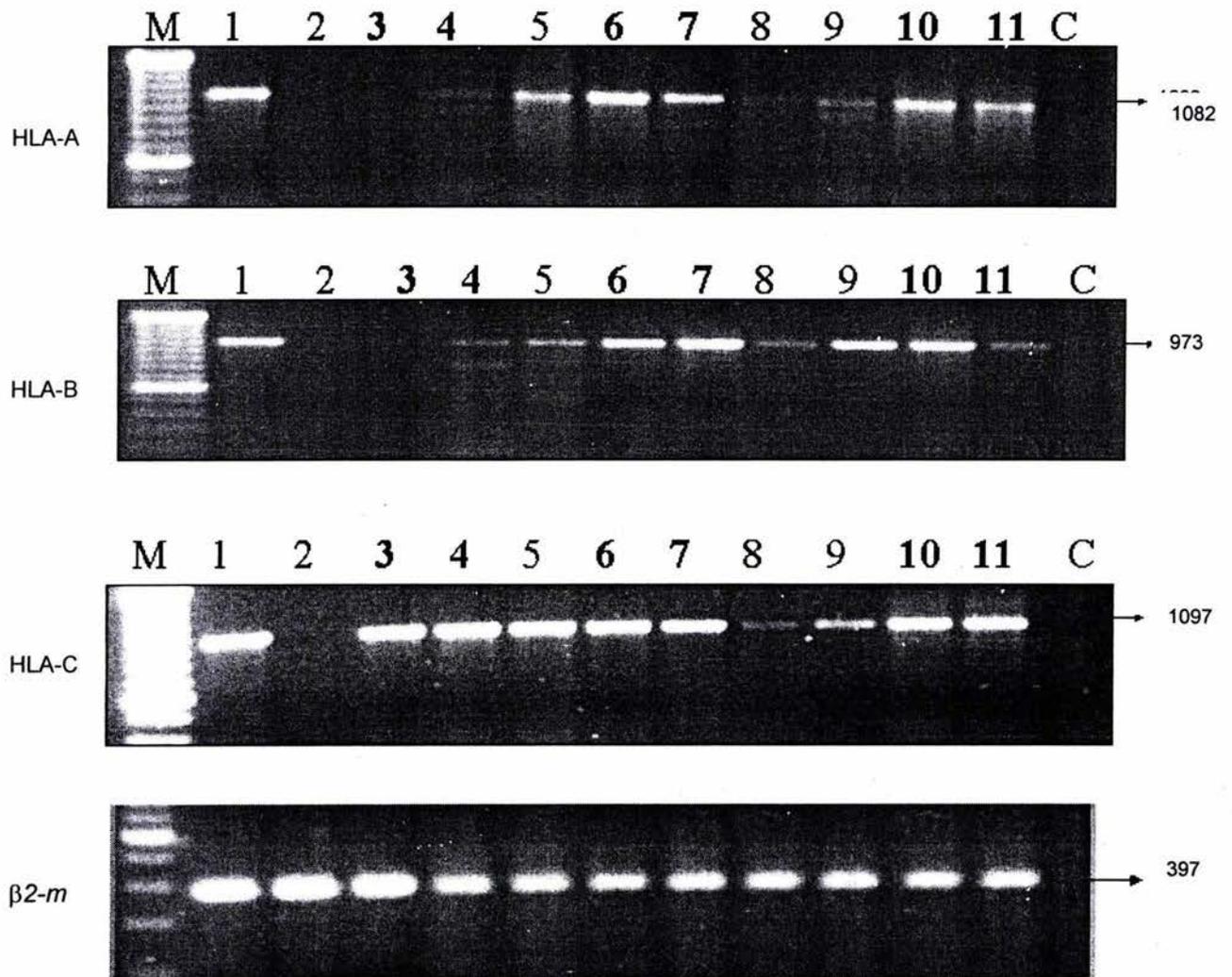


Figura 20. Expresión diferencial de los loci HLA-A, B, C por RT-PCR en pacientes con leucemia aguda que expresan *MAGE A1* y *A3*. Carril 1, HL-60 (control positivo que expresa los tres genes). Carril 2, K562 (control negativo en el cual se observa ausencia de expresión). Carriles 3 al 11, pacientes de los cuales solo uno carece de expresión de HLA-A y B. Ultimo carril (C) control sin cDNA.

9. DISCUSION.

Los genes de la familia MAGE-A codifican para antígenos contra tumores reconocidos por CTL's, son frecuentemente expresados en cánceres sólidos humanos, sin embargo, su expresión en leucemias no ha sido completamente investigada. Inicialmente se publicó que ninguna leucemia expresaba RNAm del gen MAGE-1. En un estudio se colectaron 48 muestras de pacientes con leucemia (28 leucemias agudas, 14 leucemias crónicas y 6 de otro tipo), se incluyeron 10 líneas celulares derivadas de blástos leucémicos. Todas las muestras examinadas fueron negativas para MAGE-1, excepto 3 líneas celulares de linaje mieloide (K-562, HEL y HL-60), y se confirmó la ausencia en tejido hematopoyético normal del gen MAGE-1 (Chambost, 1993).

Para el año 1995, se había publicado que el gen de la familia MAGE se expresaba en una cantidad substancial de pacientes con leucemia de células T. En el estudio se colectaron 51 muestras de pacientes con leucemia. Estos 51 pacientes fueron diagnosticados como: 23 leucemias de tipo T, 11 leucemias de tipo B y 17 leucemias monocíticas mieloides. En el estudio se examinó la expresión de varios genes de la familia MAGE-A (MAGE-1, -2, -3, -4 y -6). Los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: el gen MAGE se expresó en 19 pacientes de los 23 casos de leucemia de tipo T, en contraste con ningún caso positivo en leucemias de tipo B y cuatro casos positivos en leucemias monocíticas mieloides expresaron MAGE-6. Los genes de la familia MAGE se expresaron en una

cantidad importante de leucemias de tipo T pero no en leucemias mielomonocíticas (Shichijo et al, 1995).

A pesar de este último reporte, en 2001 Chambost et al, publicaron nuevamente la ausencia del gen MAGE en malignidades hematopoyéticas. En el estudio que realizó, aumentó el número de pacientes con leucemia y utilizó oligonucleótidos específicos a diferencia de su trabajo anterior. Nuevamente afirmó la ausencia del gen MAGE-A en leucemias. A pesar de los estudios realizados respecto a la expresión del gen MAGE en malignidades hematológicas, éste no ha sido completamente esclarecido. La controversia, aunado a la necesidad de mayor conocimiento en la expresión del gen MAGE en leucemias, nos impulsó a la realización de este trabajo con pacientes con leucemia aguda con la finalidad de aportar mayor conocimiento y abrir perspectivas a ser utilizado como un gen pronóstico en el diagnóstico clínico y su posible uso en inmunoterapia.

En este trabajo se analizó la expresión del gen MAGE-A1 y MAGE-A3 en células de pacientes con leucemia aguda y células de donadores normales.

Mediante la técnica de RT-PCR se observó la expresión del gen MAGE-A1 y -A3 en una población de 85 pacientes con leucemia aguda en una frecuencia de 44.7% (38/85). De acuerdo con Shichijo, 1995 la expresión del gen MAGE-A es del 82.6% (19/23) en las leucemias analizadas, de las cuales el 52.2% (12/23) se expresó el gen MAGE-A1 en leucemias de tipo T; sin embargo, en su reporte no muestra una clasificación de acuerdo a la FAB por lo que no es posible realizar una comparación con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio.

Los resultados que obtuvimos para la expresión del RNAm de MAGE-A1 y -A3 en LAL fue del 3.8% (2/52) y 44.2% (23/52) respectivamente. En estos resultados se

muestra una clara diferencia en la frecuencia de -A3 en LAL respecto a -A1. En el caso de LAM, a pesar de ser un número más reducido a LAL, sucedió un caso semejante. La frecuencia de -A1 fue de 3.0% (1/33) y de -A3 fue de 36.4% (12/33). Claramente se observa una diferencia en la expresión de -A1 y -A3 en leucemias agudas, las frecuencias generales por cada linaje fueron de 3.5% y 41.2% respectivamente. De acuerdo a estos resultados, no se puede hacer una relación entre la presencia del antígeno y el linaje, pero sí se puede asegurar que el RNAm de MAGE-A3 se expresa preferencialmente en leucemias agudas linfoblásticas y mieloblásticas que MAGE-A1.

En nuestro estudio se utilizaron oligonucleótidos específicos para MAGE-A1 (CHO 12 y CHO 14) y MAGE-A3 (BLE 5 y AB 1197) a diferencia de Shichijo, 1995 donde se utilizó un par de oligonucleótidos generales para identificar toda la familia MAGE-A. El protocolo de la PCR para amplificar el cDNA de MAGE-A implicó 35 ciclos en nuestro análisis a diferencia de Chambost (1993 y 2001) donde utilizó 30 ciclos. A pesar de la diferencia en la metodología, se confirmó en todos los casos la ausencia del gen MAGE en tejido normal y la expresión en la línea celular K-562 incluyendo nuestros resultados. El conflicto de resultados no puede ser debido a la diferencia en la metodología usada para cada estudio. Probablemente puede ser debido a las diferentes leucemias usadas para los diferentes estudios.

Nuestros resultados se confirmaron al secuenciar la banda amplificada por PCR de pacientes que expresaron el gen MAGE-A y se encontró un 99% de homología para el gen MAGE-A1 y un 98% de homología para MAGE-A3, de esta manera, corroboramos que el producto obtenido por PCR con oligonucleótidos específicos para cada gen eran los correctos transcritos de MAGE-A expresados en células

de pacientes con leucemia aguda. Estos resultados fueron fundamentales para continuar con la búsqueda de la proteína ya que ninguno de los autores anteriores realizaron secuenciación de sus productos.

Comprobado la expresión del transcrito del gen MAGE-A se buscó la proteína del gen por inmunohistoquímica. El anticuerpo policlonal usado en este trabajo reconoce una secuencia conservada de aminoácidos 1-309 de la proteína MAGE. Se analizó la presencia de la proteína en células de paciente con leucemia aguda y en la línea celular K-562, confirmando también la ausencia de la proteína en células normales. La detección de la proteína se identificó sólo en una muestra de cinco realizadas. Principalmente se observó en membrana celular y citoplasma de células de paciente con leucemia.

Comprobado ya la expresión del gen MAGE-A en células de paciente con leucemia aguda se evaluó los niveles de la molécula HLA-I en estos pacientes. Los datos mostraron la expresión de la molécula en células de paciente con LAL-L2, LAM-M1, LAM-M2, LAM-M3 en un 80%, a excepción de dos LAM-M4 que se analizaron, expresando niveles de la molécula en un 10%. Los niveles de la molécula HLA-I en la mayoría de las leucemias agudas, casi igualaron los niveles del control positivo (HL-60). En el análisis diferencial de cada molécula de HLA no se mostró ninguna preferencia por la expresión de algún haplotipo, sin embargo, todos los pacientes analizados amplificaron la banda para HLA-C y solo uno se observó una banda amplificada muy tenue (figura 20, carril 8), pero un solo paciente carece de la expresión de HLA-A y HLA-B y dos pacientes amplifican una banda muy tenue de los mismas moléculas (figura 20, carril 3 y carriles 4 y 8). Este resultado proporcionó indicios, muy probablemente, de que los antígenos

están siendo procesados y muy probablemente transportados a la superficie de las células leucémicas, sin embargo, con estos resultados no podemos confirmar si se está transportando el antígeno con algún haplotipo preferencialmente.

Nuestros resultados se suman a las investigaciones hasta ahora realizadas sobre esta familia de antígenos tumorales con el fin de utilizarlos en diversas terapias contra el cáncer. La frecuencia del gen MAGE-A3, pero no de MAGE-A1, permite la opción de ser un candidato en inmunoterapia adoptiva contra la leucemia, y abre nuevas opciones de investigación con la posibilidad de ser un marcador pronóstico ó durante la evolución de la enfermedad.

10. CONCLUSIONES

1. Con este estudio se comprueba la expresión del gen MAGE-A en leucemia Aguda (44.7%) y se confirma su ausencia en células normales.
2. La mayor frecuencia de Leucemia Aguda en pacientes se observó de entre 20 y 29 años, por encima de esta edad la frecuencia disminuye.
3. El RNAm del gen MAGE-A3 fue expresado en mayor frecuencia (41.2%) que - A1 (3.5%) en pacientes con leucemia aguda.
4. La proteína MAGE es expresada en células de pacientes con leucemia aguda, localizando su ubicación en membrana celular y en la región citoplasma .
5. Se confirmó que la expresión de moléculas HLA-I en la membrana de blastos leucémicos tanto linfoblásticos como mieloblásticos positivos para MAGE-A (70-80%) .
6. De los nueve pacientes analizados en la expresión diferencial de HLA-I todos expresaron HLA-C y sólo un caso no expresó HLA-A y HLA-B.

11. PERSPECTIVAS

- Los resultados abren nuevas expectativas en cuanto al uso del antígeno MAGE en pacientes con leucemia aguda que sean candidatos a inmunoterapia adoptiva.
- Aumentar el mayor número de pacientes con LAM y adicionar pacientes con Leucemia Crónica para investigar la expresión del gen.
- Buscar la expresión de otros miembros de la familia MAGE en leucemia que sean buenos candidatos inmunogénicos para ser usados como posibles antígenos pronóstico en el diagnóstico clínico o para ser usados en inmunoterapia adoptiva.
- Realizar el seguimiento de los pacientes durante el desarrollo de su enfermedad para observar su relación que pueda existir entre la expresión del antígeno y el avance de la neoplasia.
- Se abre la posibilidad de estudiar células de pacientes con Leucemia que no expresan el antígeno MAGE sean tratadas con un agente demetilante y observar la posibilidad de inducir la expresión del antígeno y, por consecuencia, activar la respuesta inmune.
- Los genes MAGE-A pueden ser importantes moléculas que ayuden a entender la inmunidad específica contra las leucemias agudas.
- Nuestros resultados se suman a las investigaciones hasta ahora realizadas sobre esta familia de antígenos tumorales con el fin de utilizarlos en diversas terapias contra el cáncer.

12. APENDICE

12.1 APENDICE 1 DATOS CLINICOS

DATOS CLINICOS Y MOLECULARES DE PACIENTES CAPTADOS CON LEUCEMIA AGUDA.

Paciente	Edad	Sexo	Dx	Leucos	Bcr-Abl	Aml-mtg	Pml-rar	MAGE-A1	MAGE-A3
1	29	F	LAL-L1	15,000	NEG			POS	POS
2	42	F	LAL-L2	12000	NEG			NEG	POS
3	68	M	LAL-L2					NEG	NEG
4	19	M	LAL-L2					NEG	NEG
5	21	M	LAL-L2	125000	NEG			NEG	POS
6	27	F	LAL-L2	32600	NEG			NEG	POS
7	22	M	LAL-L2					NEG	POS
8	25	M	LAL-L2	1000	NEG			NEG	POS
9	51	F	LAL-L2					NEG	POS
10		F	LAL-L2	102000	NEG			NEG	POS
11	36	M	LAL-L2	50000	NEG			NEG	POS
12	15	M	LAL-L2					NEG	POS
13	44	F	LAL-L2	23200	NEG			NEG	POS
14	32	F	LAL-L2	29600	NEG			NEG	POS
15	29	M	LAL-L2		POS			NEG	POS
16	55	F	LAL-L2					NEG	POS
17	17	F	LAL-L2	159000	NEG			NEG	POS
18	16	F	LAL-L2	1800	NEG			NEG	NEG
19		F	LAL-L2	119100	NEG			NEG	POS
20	39	M	LAL-L2	5000	NEG			NEG	POS
21	28	M	LAL-L2	88600	NEG			NEG	POS
22	13	F	LAL-L2		POS			NEG	POS
23	17	F	LAL-L2		NEG			NEG	POS
24	26	F	LAL-L2	35600	NEG			NEG	NEG
25	22	M	LAL-L2	13700	NEG			NEG	NEG
26	50	F	LAL-L2	19800	NEG			NEG	NEG
27	51	F	LAL-L2		NEG			NEG	NEG
28	50	M	LAL-L2		NEG			NEG	POS
29	28	F	LAL-L2		NEG			NEG	NEG
30	55	F	LAL-L2	1300	NEG			NEG	POS
31		F	LAL-L2		NEG			NEG	NEG
32	16	M	LAL-L2		NEG			NEG	NEG
33	36	M	LAL-L2	170000	NEG			NEG	NEG
34	27	F	LAL-L2	48240	NEG		NEG	NEG	NEG
35	18	M	LAL-L2		NEG			NEG	NEG
36	25	M	LAL-L2	54700	POS			NEG	POS
37	19	F	LAL-L2	27400	NEG			NEG	NEG
38	22	M	LAL-L2		NEG			NEG	NEG
39	22	M	LAL-L2		NEG			NEG	NEG

40	36	F	LAL-L2	66000	NEG		NEG	NEG
41	25	M	LAL-L2	3000	NEG		NEG	NEG
42	35	M	LAL-L2	56, 300	NEG		POS	NEG
43	41	F	LAL-L2	3600			POS	NEG
44	52	M	LAL-L2	1300		POS	NEG	NEG
45	54	M	LAL-L2	10,000			POS	NEG
46	43	F	LAL-L2	2800			POS	NEG
47	19	M	LAL-L2	121000	POS		NEG	NEG
48	35	M	LAL-L2	99600	POS		NEG	NEG
49	28	M	LAL-L2		NEG		NEG	NEG
50	37	F	LAL-L2		NEG		NEG	NEG
51		M	LAL-L2		POS		NEG	NEG
52	73	F	LAL-L3	11300	NEG		NEG	NEG
53	26	M	LAM-M1	25000		NEG	NEG	NEG
54		M	LAM-M2			POS	NEG	NEG
55	90	M	LAM-M2			POS	NEG	NEG
56	42	F	LAM-M2			POS	NEG	NEG
57	61	M	LAM-M2				NEG	POS
58	65	F	LAM-M2	700	NEG		NEG	NEG
59	19	F	LAM-M2	1400	NEG		NEG	NEG
60	45	F	LAM-M2	600	NEG		NEG	NEG
61	22	M	LAM-M2	3360	POS		NEG	NEG
62	28	F	LAM-M3				NEG	POS
63		M	LAM-M3				NEG	POS
64	27	M	LAM-M3				NEG	NEG
65	28	M	LAM-M3				NEG	POS
66	38	F	LAM-M3				NEG	POS
67		F	LAM-M3				NEG	NEG
68	42	M	LAM-M3				POS	NEG
69	23	F	LAM-M3				NEG	NEG
70	28	F	LAM-M3				NEG	POS
71	35	F	LAM-M3	700	NEG		NEG	POS
72	26	M	LAM-M3	61100			POS	NEG
73	24	F	LAM-M3	1400		NEG	NEG	POS
74		M	LAM-M3				POS	NEG
75	39	M	LAM-M3				NEG	NEG
76	20	F	LAM-M3				NEG	NEG
77	23	F	LAM-M3				NEG	NEG
78	46	M	LAM-M4				NEG	POS
79	18	F	LAM-M4			POS	NEG	POS
80	24	M	LAM-M4			NEG	NEG	NEG
81		M	LAM-M4				NEG	NEG
82	63	F	LAM-M4	171000		POS	NEG	NEG
83	20	F	LAM-M4		NEG		NEG	NEG
84		M	LAM-M5				NEG	POS
85	12	F	LAM-M6			NEG	NEG	POS

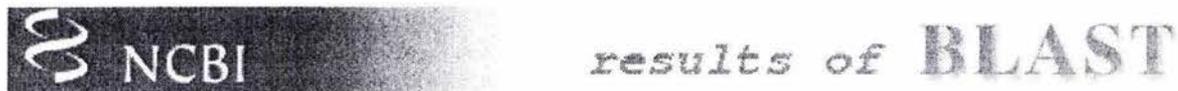
12.2 APENDICE 2.

PROGRAMA BLASTn 2.2.9

Datos obtenidos del programa BLASTn 2.2.9 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org>) en la comparación con la secuencia obtenida de los productos de PCR de MAGE-A1 y MAGE-A3.

Para ambos casos en el apéndice 2 y 3 en la sección 1A y 1B, se muestra el ingreso de la secuencia obtenida del producto de amplificación por PCR, purificado y secuenciado, al programa BLASTn 2.2.9 del NCBI y muestra el porcentaje de homología de la secuencia ingresada con la secuencia mas parecida a ella, haciendo una comparación con ambas secuencias. En la sección 2A Y 2B siguientes de cada apéndice se muestra una descripción del gen al cual corresponde la secuencia con mayor homología y muestra la secuencia completa ya reportada del gen. En rojo se distingue la secuencia problema que se ingreso al programa BLASTn.

SECCION 1A



MAGE-A1

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1090380248-1216-41856135136.BLASTQ4

Query=

(310 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 2,277,764 sequences; 11,114,848,245 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

Homo sapiens MAGE-1 (MAGEA1) mRNA, complete
 Length = 1191

Identities = 309/310 (99%)

Query: 1 gaggagcaccaaggagaagatctgcctgtgggtcttcattgccagctcctgccacact
 60

|||||
 Sbjct: 91 gaggagcaccaaggagaagatctgcctgtgggtcttcattgccagctcctgccacact
 150

Query: 61 cctgcctgctgccctgacgagagtcacatgtctcttgagcagaggagtctgcactgcaa
 120

|||||
 Sbjct: 151 cctgcctgctgccctgacgagagtcacatgtctcttgagcagaggagtctgcactgcaa
 210

Query: 121 gcctgaggaagcccttgaggccaacaagaggccctgggctgggtgtgtgtgcaggctgc
 180

|||||
 Sbjct: 211 gcctgaggaagcccttgaggccaacaagaggccctgggctgggtgtgtgtgcaggctgc
 270

Query: 181 cacctcctcctcctctcctctggtcctgggaccctggaggaggtgccactgctgggtc
 240

| |||||
 Sbjct: 271 cgctcctcctcctcctctcctctggtcctgggaccctggaggaggtgccactgctgggtc
 330

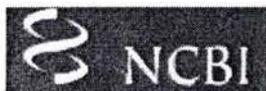
Query: 241 aacagatcctcccagagtcctcagggagcctccgccttcccactaccatcaacttcac
 300

|||||
 Sbjct: 331 aacagatcctcccagagtcctcagggagcctccgccttcccactaccatcaacttcac
 390

Query: 301 tcgacagagg 310

|||||
 Sbjct: 391 tcgacagagg 400

SECCION 2A



Entrez
Nucleotide

NM_004988. Homo sapiens mela...[gi:29029615]

Links

LOCUS NM_004988 722 bp mRNA linear PRI 21-DEC-2003
DEFINITION Homo sapiens melanoma antigen, family A, 1 (directs expression of antigen MZ2-E) (MAGEA1), mRNA.

SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM Homo sapiens
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini;
Hominidae; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1722)
AUTHORS Suyama,T., Ohashi,H., Nagai,H., Hatano,S., Asano,H., Murate,T., Saito,H. and Kinoshita,T.
TITLE The MAGE-A1 gene expression is not determined solely by methylation status of the promoter region in hematological malignancies
JOURNAL Leuk. Res. 26 (12), 1113-1118 (2002)
PUBMED 12443884
REMARK GenerIF: The MAGE-A1 gene expression is not determined solely By methylation status of the promoter region in hematological malignancies.

REFERENCE 2 (bases 1 to 1722)
AUTHORS Mallon,A.M., Platzer,M., Bate,R., Gloeckner,G., Botcherby,M.R., Nordsiek,G., Strivens,M.A., Kioschis,P., Dangel,A., Cunningham,D., Straw,R.N., Weston,P., Gilbert,M., Fernando,S., Goodall,K., Hunter,G., Greystrom,J.S., Clarke,D., Kimberley,C., Goerdes,M., Blechschmidt,K., Rump,A., Hinzmann,B., Mundy,C.R., Miller,W., Poustka,A., Herman,G.E., Rhodes,M., Denny,P., Rosenthal,A. and Brown,S.D.
TITLE Comparative genome sequence analysis of the Bpa/Str region in mouse and Man
JOURNAL Genome Res. 10 (6), 758-775 (2000)
PUBMED 10854409

REFERENCE 3 (bases 1 to 1722)
AUTHORS Rogner,U.C., Wilke,K., Steck,E., Korn,B. and Poustka,A.
TITLE The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28
JOURNAL Genomics 29 (3), 725-731 (1995)
PUBMED 8575766

REFERENCE 4 (bases 1 to 1722)
AUTHORS Celis,E., Fikes,J., Wentworth,P., Sidney,J., Southwood,S., Maewal,A., Del Guercio,M.F., Sette,A. and Livingston,B.
TITLE Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles
JOURNAL Mol. Immunol. 31 (18), 1423-1430 (1994)
PUBMED 7823968

REFERENCE 5 (bases 1 to 1722)

AUTHORS Schultz-Thater,E., Juretic,A., Dellabona,P., Luscher,U., Siegrist,W., Harder,F., Heberer,M., Zuber,M. and Spagnoli,G.C.

TITLE MAGE-1 gene product is a cytoplasmic protein

JOURNAL Int. J. Cancer 59 (3), 435-439 (1994)

PUBMED [7927954](#)

REFERENCE 6 (bases 1 to 1722)

AUTHORS Ding,M., Beck,R.J., Keller,C.J. and Fenton,R.G.

TITLE Cloning and analysis of MAGE-1-related genes

JOURNAL Biochem. Biophys. Res. Commun. 202 (1), 549-555 (1994)

PUBMED [8037761](#)

REFERENCE 7 (bases 1 to 1722)

AUTHORS Chen,Y.T., Stockert,E., Chen,Y., Garin-Chesa,P., Rettig,W.J., van der Bruggen,P., Boon,T. and Old,L.J.

TITLE Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies

JOURNAL Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91 (3), 1004-1008 (1994)

PUBMED [8302824](#)

REFERENCE 8 (bases 1 to 1722)

AUTHORS Wang,M.G., Zakut,R., Yi,H., Rosenberg,S. and McBride,O.W.

TITLE Localization of the MAGE1 gene encoding a human melanoma antigen to chromosome Xq28

JOURNAL Cytogenet. Cell Genet. 67 (2), 116-119 (1994)

PUBMED [8039421](#)

REFERENCE 9 (bases 1 to 1722)

AUTHORS De Plaen,E., Arden,K., Traversari,C., Gaforio,J.J., Szikora,J.P., De Smet,C., Brasseur,F., van der Bruggen,P., Lethe,B., Lurquin,C. et al.

TITLE Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family

JOURNAL Immunogenetics 40 (5), 360-369 (1994)

PUBMED [7927540](#)

REFERENCE 10 (bases 1 to 1722)

AUTHORS van der Bruggen,P., Traversari,C., Chomez,P., Lurquin,C., De Plaen,E., Van den Eynde,B., Knuth,A. and Boon,T.

TITLE A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma

JOURNAL Science 254 (5038), 1643-1647 (1991)

PUBMED [1840703](#)

COMMENT REVIEWED [REFSEQ](#): This record has been curated by NCBI staff. The reference sequence was derived from [BC017555.1](#). On Mar 18, 2003 this sequence version replaced [gi:21359868](#).

COMPLETENESS: complete on the 3' end.

FEATURES

 source

 Location/Qualifiers

 1..1722

 /organism="Homo sapiens"

 /mol_type="mRNA"

 /chromosome="X"

 /map="Xq28"

 gene

 1..1722

 /gene="MAGEA1"

 /note="synonyms: MAGE1, MGC9326"

 /gene="MAGEA1"

 /note="melanoma-associated antigen 1; melanoma-associated antigen MZ2-E; melanoma antigen MAGE-1; go_component: plasma membrane [goid [0005886](#)]"

```

go_function: tumor antigen [goid 0008222]
/codon_start=1
/product="melanoma antigen, family A, 1"
/gene="MAGEA1"
tumor-rejection antigen MAGE in humans) [Function
unknown]"

```

ORIGIN

```

1  cgtagagttc  ggccgaagga  acctgacca  ggctctgtga  ggaggcaagg
ttttcagggg
61  acaggccaac  ccagaggaca  ggattccctg  gaggccacag  aggagcacca
aggagaagat
121  ctgctctgtg  gtcttcattg  cccagctcct  gccacacctc  ctgctctgtg
ctctgacagc
181  agtcacatcg  tctcttgagc  agaggagctc  gcaclgcaag  cctgaggaag
cccttgaggc
241  ccaacaagag  gccctgggac  tgggtgtgtg  gcaggctgac  gccctcctct
cctctcctct
301  ggtctctggc  acccttgagc  aggtctccac  tctctgggac  acagatctct
cccagaqlcc
361  tcagggagcc  tcgcctttc  ccactaccat  caacttcaat  cgacagaggc
aaccagtgga
421  gggttccagc  agccgtgaag  aggaggggcc  aagcacctct  tgtatcctgg
agtcttgtt
481  ccgagcagta  atcactaaga  agtggtctga  tttggttgg  tttctgctcc
tcaaatatcg
541  agccagggag  ccagtcacaa  aggcagaaat  gctggagagt  gtcacaaaa
attacaagca
601  ctgttttct  gagatcttcg  gcaaagctc  tgagtcttg  cagctggtct
ttggcattga
661  cgtgaaggaa  gcagacccca  ccggccactc  ctatgtcctt  gtcacctgcc
tagtctctc
721  ctatgatggc  ctgctgggtg  ataatcagat  catgccaag  acaggcttcc
tgataattgt
781  cctggtcatg  attgcaatgg  agggcggcca  tgctcctgag  gaggaaatct
gggaggagct
841  gagtgtgatg  gaggtgtatg  atgggagga  gcacagtgcc  tatggggagc
ccaggaagct
901  gtcaccccaa  gatttgggtc  aggaaaagta  cctggagtac  cggcaggtgc
cggacagtga
961  tcccgcacgc  tatgagttcc  tgtgggtcc  aaggccctt  gctgaaacca
gctatgtgaa
1021  agtccttgag  tatgtgatca  aggtcagtgc  aagagttcgc  tttttcttcc
catccctgcg
1081  tgaagcagct  ttgagagagg  aggaagaggg  agtctgagca  tgagttgag
ccagggccag
1141  tgggaggggg  actgggccag  tgcaccttcc  agggccgcgt  ccagcagctt
cccctgcctc
1201  gtgtgacatg  aggcccatc  ttcactctga  agagagcgg  cagtgttctc
agtagtaggt
1261  ttctgttcta  ttgggtgact  tggagattta  tctttgttct  cttttggaat
tgttcaaag
1321  ttttttttta  agggatggtt  gaatgaactt  cagcatcaa  gtttatgaat
gacagcagtc
1381  acacagttct  gtgtatatag  ttaagggtta  agagtcttgt  gttttattca
gattgggaaa
1441  tccattctat  tttgtgaatt  gggataataa  cagcagtgga  ataagtactt
agaaatgtga

```

```

1501 aaaatgagca gtaaaataga tgagataaag aactaaagaa attaagagat
agtcaattct
1561 tgccttatac ctcagtctat tctgtaaaat ttttaaagat atatgcatac
ctggatttcc
1621 ttggcttctt tgagaatgta agagaaatta aatctgaata aagaattctt
cctgttaaaa
1681 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa
//

```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

12.3 APENDICE 3

SECCION 1B



results of **BLAST**

MAGE-A3

BLASTN 2.2.9 [May-01-2004]

Reference:

Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schäffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402.

RID: 1090978128-28069-137045952288.BLASTQ4

Query=

(416 letters)

Database: All GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences (but no EST, STS, GSS, environmental samples or phase 0, 1 or 2 HTGS sequences)
 2,295,451 sequences; 11,209,307,333 total letters

If you have any problems or questions with the results of this search please refer to the [BLAST FAQs](#)

[gi|29029622|ref|NM_005362.3|](#)

Homo sapiens melanoma antigen, family A, 3 (MAGEA3), mRNA
 Length = 1753

Identities = 408/413 (98%)

Query: 4 tcgtaggagaggcccaggcaggtggcaaagatgtacaagtggccgatgggggtccacttcc
63

|||||
Sbjct: 769 tcgtaggagaggcccaggcaggtggcaaagatgtacaagtggccgatgggggtccacttcc
710

Query: 64 atcaggtcgatgccaaataccagctgcaaggaactggaagctttgctgaagatcacagga
123

|||||
Sbjct: 709 atcagctcgatgccaaagaccagctgcaaggaactggaagctttgctgaagatcacagga
650

Query: 124 aagaaatactgccaatttccgacgacactcccagcatttctgcctttgtgaccggctcc
183

|||||
Sbjct: 649 aagaaatactgccaatttccgacgacactcccagcatttctgcctttgtgaccggctcc
590

Query: 184 ctggctcgataacttgaggagcagaaaatgaaccaactcggccaccttctactgagtgct
243

|||||
Sbjct: 589 ctggctcgataacttgaggagcagaaaatgaaccaactcggccaccttctactgagtgct
530

Query: 244 gcttggaaactcggactccaggtcaggaaggtgcttggcccctcctcttcttggttgctg
303

|||||
Sbjct: 529 gcttggaaactcggactccaggtcaggaaggtgcttggcccctcctcttcttggttgctg
470

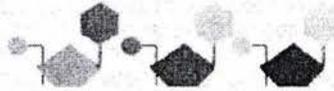
Query: 304 gagtccctcataggattggctccagagagggtagttcatggtagtggggaggctggaggc
363

|||||
Sbjct: 469 gagtccctcataggattggctccagagagggtagttcatggtagt-ggggaggctggaggc
411

Query: 364 tccctgaaggactctggggaggatctggtgaactcggcagcaggcacctcccc 416

|||||
Sbjct: 410 tccctg-aggactctggggaggatctggtg-actcggcagcaggcacctcccc 360

SECCION 2B



Nucleotide

1: NM_005362. Homo sapiens mela...[gi:29029622]

[Links](#)

LOCUS NM_005362 1753 bp mRNA linear PRI 21-DEC-2003
 DEFINITION Homo sapiens melanoma antigen, family A, 3 (MAGEA3), mRNA.
 SOURCE Homo sapiens (human)
 ORGANISM Homo sapiens
 Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
 Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini;
 Hominidae; Homo.
 REFERENCE 1 (bases 1 to 1753)
 AUTHORS Guo, J., Wen, D.R., Huang, R.R., Paul, E., Wunsch, P., Itakura, E.
 and Cochran, A.J.
 TITLE Detection of multiple melanoma-associated markers in melanoma
 cell lines by RT-PCR
 JOURNAL Exp. Mol. Pathol. 74 (2), 140-147 (2003)
 PUBMED [12710945](#)
 REMARK GeneRIF: This melanoma-associated marker was detected in
 melanoma cell lines.

COMPLETENESS: complete on the 3' end.
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..1753
 /organism="Homo sapiens"
 /mol_type="mRNA"
 /chromosome="X"
 /map="Xq28"
 gene 1..1753
 /gene="MAGEA3"

ORIGIN
 1 gagattctcg cctgagcaa cgagcgacgg cctgacgtcg gcgaggaggaa
 gccggcccag
 61 gctcgggtgag gaggcaaggt tctgagggga caggctgacc tggaggacca
 gaggcccccg
 121 gaggagcact gaaggagaag atctgccagt gggctctccat tgcccagctc
 ctgcccacac
 181 tcccgcctgt tgccctgacc agagtcacatca tgccctttga gcagaggagt
 cagcaactgca
 241 agcctgaaga aggccttgag gcccgaggag aggccttggg cctggtgggt
 gcgcaggctc
 301 ctgctactga ggagcaggag gctgctctct cctctttctac tetagttgaa
 gtcaccctg
 361 gggagggtgag tgcctgacagag tcaccagatc ctcccagagag tccctcaggga
 gctccagcc
 421 tcccacactac caagcaactac cctctcttga gcccaactca tgaggactcc
 tgcacccag

ESTA TESIS NO SALE
 DE LA BIBLIOTECA

```

481 aagaggaggg gcccaagcacc ttccctgacc tggagtcoga gttccaagca
gcactcagta
541 gyaagytggc egagttggtt cttttctgc tctcaagta tccagccagg
gagccggtae
601 caaaggcaga aatgctgggg agtgtctcg gaaattggca gtattctct
ctctgatch
661 tcagcaagc ttccagttcc ttgcagctgg tctttggcat egagctgatg
gaagtggacc
721 ccataggcca ctgtacata ttgccaact gctggggct cccctacgat
ggcctgctgg
781 gtgacaatca gatcatgcc aaggcaggcc tctgataat cgtcctggcc
ataatcgcaa
841 gagagggcga ctgtcccct gaggagaaa tctgggagga gctgagtgtg
ttagaggtgt
901 ttgaggggag ggaagacagt atcttggggg atcccaagaa gctgctcacc
caacatttcg
961 tgcaggaaaa ctacctggag taccggcagg tccccggcag tgatcctgca
tgttatgaat
1021 tctgtgggg tccaagggcc ctcttgaaa ccagctatgt gaaagtctg
caccatattg
1081 taaagatcag tggaggacct cacatttct accaccct gcatgagtgg
gtttgagag
1141 aggggaaga gtgagtctga gcacgattg cagccagggc cagtgggagg
gggtctggc
1201 cagtgcacct tccggggccg catcccttag tttccactgc ctctgtgac
gtgaggcca
1261 ttcttactc tttgaagcga gcagtcagca ttcttagtag tgggtttctg
ttctgttga
1321 tgactttgag attattctt gtttctgtt ggagttgtc aaatgttct
ttaaaggat
1381 ggttgaatga gcgtcagcat ccaggttat gaatgacagt agtcacacat
agtgtgttt
1441 atatagtta ggagtaagag tcttgtttt tactcaaatt gggaaatcca
ttccattttg
1501 tgaattgtga cataataata gcagtgtaa aagtatttc ttaaattgt
gagcgaatta
1561 gcaataacat acatgagata actcaagaaa tcaaagata gttgattctt
gccttgacc
1621 tcaatctatt ctgtaaatt aaacaaat gcaaccagg atttcttga
cttctttgag
1681 aatgcaagc aaattaaat tgaataata atttctctc ttcaaaaaa
aaaaaaaaa
1741 aaaaaaaaa aaa
//

```

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

13. BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, et al. Cellular and Molecular Immunology. ED. Paperback, Fifth Edition. 2000.
- Atanackovic D, Altorki NK, Stockert E, Williamson B, Jungbluth AA, Ritter E, Santiago E, Ferrara CA, Matsuo M, Selvakumar A, Dupont B, Chen YT, Hoffman EW, Ritter G, Old LJ and Gnjatic S. Vaccine-induced CD4⁺ T cell responses to MAGE-3 protein in lung cancer patients. *J Immunol*, 172: 3289-3296, 2004.
- Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosoci Res*, 67: 705-12, 2002.
- Bert T, Lubomierski N, Gangsaug S, Munch K, Printz H, Prasnikar N, Robbel C, Simon B. Expression spectrum and methylation-dependent regulation of melanoma antigen-encoding gene family members in pancreatic cancer cells. *Pancreatology*, 2:146-54, 2002.
- Bleutler E, Lichtman M, Collier B, Kipps T, Seligsohn U. Williams Hematology Sixth Edition. McGraw-Hill, NY, 2001.
- Breckpot K, Heirman C, De Greef C, van der Bruggen P and Thielemans K. Identification of new antigenic peptide presented by HLA-Cw7 and encoded by several MAGE genes using dendritic cells transduced with lentiviruses. *J Immunol*, 172: 2232-2237, 2004.
- Breckpot K, Dullaers M, Bonehill A, Van Meirvenne S, Heirman C, De Greef C, Van Der Bruggen P, Thielemans K. Lentivirally transduced dendritic cells as a tool for cancer immunotherapy. *J Gene Med*, 5: 654-67. 2003.
- Brossart P, Wirths S, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Induction of cytotoxic T-lymphocyte responses in vivo after vaccinations with peptide-pulsed dendritic cells. *Blood*, 96:3102-8, 2000.

- Bodey B. Cancer-testis antigens: promising targets for antigen directed antineoplastic immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*, 2: 577-84, 2002.
- Carrel S, Schreyer M, Spagnoli G, Cerottini JC and Romoldí D. Monoclonal antibodies against recombinant MAGE-1 protein identify cross-reacting 72-kDa antigen which is co-expressed with MAGE-1 protein in melanoma cells. *Int J. Cancer*, 67: 417-422, 1996.
- Castelli C, Rivoltini L, Andreola G, Carrabba M, Renkvist N, Parmiani G. T-cell recognition of melanoma-associated antigens. *J Cell Physiol*, 182: 323-31, 2000.
- Chambost H, van Baren N, Brasseur F, Olive D: MAGE-A genes are not expressed in human leukemias. *Leukemia*, 15: 1769-71.2001.
- Chambost H, Collette Y, Dutartre H, Thuret I, Olive D. Parameters involved in the recognition of fresh human leukemic blasts by tumor-specific cytolytic T cell clones: a model study. *Leuk Res*, 24: 823-30. 2000^a.
- Chambost H, Van Baren N, Brasseur F, Godelaine D, Xerrí L, Landí SJ, Theate Y, Plumas J, Spagnoli GC, Michael G, Coulie PG and Olive D. Expression of gene MAGE-A4 in reed-sternberg cells. *Blood*, 95: 3530-3533.2000^b.
- Chambost H, Brasseur F, Coulie P, de Plaen E, Stoppa AM, Baume D, Mannoni P, Boon T, Olive D: A tumor-associated antigen expression in human hematological malignancies. *Br J Haematol*, 84: 524-526, 1993.
- Chen YT, Stockert E, Chen Y, Garin-Chesa P, Rettig WJ, Van Der Bruggen P, Boon T and Old LJ. Identification of the MAGE-1 gene product by monoclonal and polyclonal antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 91, 1004-1008, 1994.
- Chen J, Ali O, GüreSolam T, Stockert EE, Knuth A and Lloyd J Old. Identification of multiple cancer/testis antigens by allogeneic antibody screening of a melanoma cell line library. 95: 6919-23, 1998.

- Coulie PG, Karanikas V, Colau D, Lurquin C, Landry C, Marchand M, Dorval T, Brichard V and Boon T. A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigen peptide encoded by gene MAGE-3. *PNAS*. 98: 10290-10295, 2002.
- Dalerba P, Ricci A, Russo V, Rigatti D, Nicotra M, Mottolese M. High homogeneity of MAGE, GAGE, BAGE, Tyrosinase and Melan-A/Mart-1 gene expression in clusters of multiples simultaneous metastases of human melanoma: implications pour protocol desing of therapeutic antigen-specific vaccination strategies. *Int. J. Cancer*, 77: 200-204, 1998.
- De Baker O, Arden KC, Boretti M, Vantomme V. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res*, 59:3157-65, 1999.
- De Plaen E, De Backer O, Arnaud D, Bonjean B, Chomez P, Martelange V, Avner P, Baldacci P, Babinet C, Hwang SY, Knowles B and Boon T. A new family of mouse homologous to the human MAGE genes. *Genomics*, 55: 176-184, 1999.
- De Plaen E, Lurquin C, Lethé B, Van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods: Comp Method Enzymol*, 12: 125-142, 1997.
- De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, Van der Bruggen P, Lethé B, Lurquin C, Brasseur R, Chomez P, De Backer O, Cavenee W and Boon T. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogen*, 40: 360-369, 1994.
- De Smet C, Lurquin C, Lethé B, Martelange V, Boon T. DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line-and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol*, 19: 7327-35, 1999.
- De Smet C, Martelange V, Lucas S, Brasseur F, Lurquin C, Boon T: Identification of human testis-specific transcripts and analysis of their expression in tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 241: 653-7, 1997.

- Fatih MU, Sensel MG, Sun L, Steinherz PG, Trigg ME, Heerema NA, Sather HN, Reaman GH and Gaynon PS. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 93: 735-46, 1998.
- Forero A, Meredith RF, Khazaeli MB. Analizan la utilidad de un nuevo diseño de anticuerpo monoclonal para radioinmunoterapia. *Cancer Bioth & Radiopharm*, 18:751-759, 2003.
- Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese Breast cancers. *Ann Oncol*, 8: 369-372, 1997.
- Gnjatic S, Nagata Y, Jäger E, Stockert E, Shankara S, Roberts BL, Mazzara GP, Lee SY, Dunbar PR, Dupont B, Cerundolo V, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ. Strategy for monitoring T cell responses to NY-ESO-1 in patients with any HLA class I allele. *Proc Natl. Acad. Sci*, 130:10917-22, 2000.
- Gnjatic S, Cai Z, Viguer M, Chouaib S, Guillet JG, Chopping J. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope present by breast carcinoma and melanoma. *J Immunol*, 160: 328-333, 1998.
- Graff-Dubois S, Faure O, Gross DA, Alves P, Scardino A, Chouaib S, Lemonnier FA, Kosmatopoulos K. Generation of CTL recognizing an HLA-A*0201-restricted epitope shared by MAGE-A1, -A2, -A3, -A4, -A6, -A10, and -A12 tumor antigens: Implication in a broad-spectrum tumor immunotherapy. *J Immunol*, 169:575-80, 2002.
- Hersey P, Menzies SW, Halliday GM, Nguyen T, Farrelly ML, DeSilva C, Lett M. Phase 4I/II study of treatment with dendritic cell vaccines in patients with disseminated melanoma. *Cancer Immunol Immunother*, 53:125-34, 2004.
- Hofmann M, Ruschenburg I. MRNA detection of tumor-rejection genes BAGE, GAGE, and MAGE in peritoneal fluid from patients with ovarian carcinoma as a potential diagnostic tool. *Cancer*, 96: 187-93. 2002.

-
- Jager E, Jager D, Knuth A. Peptide vaccination in clinical oncology. *Onkologie*, 23:410-415, 2000.
 - Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*. 5th Ed. New York and London. Garland Publishing. 2001.
 - Jobling AI, Fang Z, Koleski D and Tymms MJ. Expression of the ETS transcription factor elf3 in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43:3530-3537, 2002.
 - Johnson DR, Biedermann BC, Mook-Kanamori B. Rapid cloning of HLA class I cDNA by locus specific PCR. *J Immunol Method*, 223: 119-129, 2000.
 - Kariyama K, Higashi T, Kobayashi Y, Nouse K, Nakatsukasa H, Yamano T, Ishizaki M, Kaneyoshi T, Toshikuni N, Ohnishi T, Fujiwara K, Nakayama E, Terreacciano L, Spagnoli GC and Tsuji T. Expression of MAGE-1 and MAGE-3 genes and gene products in human hepatocellular carcinoma. *Brit J Cancer*, 81: 1080-1087 1999.
 - Kim YM, Lee YH, Shin SH, Kim EH, Choi YW, Lee KM, Park JH, Lee YU, Seel DJ, Kim MC. Expression of MAGE-1, -2, and -3 genes in gastric carcinomas and cancer cell lines derived from Korean patients. *J Korean Med. Sci*, 16:62-8, 2001.
 - Kobayashi Y, Higashi T, Nouse K, Nakatsukasa H, Ishizaki M, Kaneyoshi T, Toshikuni N, Kariyama K, Nakayama E, Tsuji T. Expression of MAGE, GAGE and BAGE genes in human liver diseases: utility as molecular markers for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, 32:612-7, 2000.
 - Kufer P, Zippelius A, Lutterbuse R, Mecklenburg I, Enzmann T, Montag A, Weckermann D, Passlick B, Prang N, Reichardt P, Dugas M, Kollermann MW, Pantel K, Riethmuller G. Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res*, 62: 251-61, 2002.

- Kuramoto T. Detection of MAGE-1 antigen in brain tumor. *Kurume J Med*, 44: 43-51, 1997.
- Kuwako K, Taniura H, Yoshikawa K. Necdin-related MAGE proteins differentially interact with the E2F1 transcription factor and the p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem*, 16; 279:1703-12, 2004.
- Larson RA, Dodge RK, Linker CA, Stone RM, Powell BL, Lee EJ, Schulman P, Davey FR, Sobol SR, Bloomfield CD, George SL, Schiffer CA. A randomized controlled trial of filgrastim during remission induction and consolidation chemotherapy for adults with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 92: 1556-63, 1998.
- Lee KD, Chang HK, Jo YK, Kim BS, Lee BH, Lee YW, Lee HK, Huh MH, Min YG, Spagnoli GC, Yu TH. Expression of the MAGE-3 gene product in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res*, 19: 5037-42, 1999
- Lee JH, Miraglia CC, Grosh WW, Mintz PD. Peripheral blood stem cell collection in a patient with chronic myelogenous leukemia and a high circulating nucleated red cell fraction. *J Clin Apheresis*, 10:87-9, 1995.
- Lee R, Bithell T, Foerster J, Athens J, Lukenks J, Wintrobe Hematología Clínica. 9 edición. Interamericana. Buenos Aires, Argentina. 1994.
- Li J, Yang Y, Fujie T, Tanaka F, Mimori K, Haraguchi M, Ueo H, Mori M, Akyoshi T. Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma. *Anticancer Res*, 17: 3559-3563, 1997.
- Lim SH, Austin S, Owen JE, Robinson L, Liu BB, Ye SL, He P, Liu YK, Tang ZY, Liu X, Peralta E, Ellenbord J, Diamond DJ. Targeting of human p53-overexpressing tumor cells by an HLA A*0201-restricted murine T-Cell receptor expressed in Jurkat T cell. *Cancer Res*, 60: 693-701, 2000.
- Lim SH, Austin S, Owen JE, Robinson L. Expression of testicular genes in hematological malignancies. *Br J Cancer*, 81: 1162-4, 1999.

- Liu J, Wang G, Okutomi T, Chen Z. Expression of MAGE-A1 and MAGE- A3 genes in human salivary gland carcinomas. *Chin Med J*, 116: 897-900, 2003.
- Liu A, Takahashi M, Toba K, Zheng Z, Hashimoto S, Nikkuni K, Furukawa T, Koike T, and Aizawa Y. Regulation of the expression of MHC class I and II by class II transactivator (CIITA) in hematopoietic cells. *Hematol Oncol*, 17: 149-160, 1999.
- Loriot A, Boon T, De Smet C. Five new human cancer-germline genes identified among 12 genes expressed in spermatogonia. *Int J Cancer*, 105: 371-6. 2003.
- Lotze MT, Storkus WJ, Falo L, Baar J, Davis L, Tueting T, Paradise and Kirkwood JM. Dendritic cells (DC) and the immunotherapy of melanoma. *Melanoma Res*, 7: 54-62, 1997.
- Lu J, Leng X, Peng J, Et Al. Induction of citotoxic T lymphocytes from the peripheral blood of a hepatocellular carcinoma patient using melanoma antigen-1 (MAGE-1) peptide. *Chin Med J*, 115:1002-5, 2002.
- Lucas S, De Plaen E, Boon T. MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2 and MAGE-C: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer*, 87: 55-60, 2000.
- Lucas S, De Smet C, Arden KC. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representation difference analysis. *Cancer Res*, 58: 743-752, 1998.
- Luo G, Huang S, Xie X, Stockert E, Chen YT, Kubuschok B, Pfreundschuh M. Expression of cancer-testis genes in human hepatocellular carcinomas. *Cancer Immun*, 2:11. 2002.
- Lurquin C, De Smeth C, Brasseur F, Muscatelli F, Martelange V, De Plaen E, Brasseur R, Monaco AP, Boon T. Two members of the human MAGE-B histological origins. *Genomics*, 46: 397-408, 1997.

- Martínez A. Expresión de antígenos tumorales en Leucemia Aguda y su posible uso en la inmunoterapia adoptiva. Tesis de Maestría. Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav). Departamento de Genética y Biología Molecular, 2001.
- Masaki Y, Oka M. Adoptive immunotherapy for pancreatic cancer, using MUC1 specific CTL. *Gan To Kagaku Ryoho*, 23:1679-80, 1996.
- Mc Curdy DK, Tai Lo, Nguyen J, Wang Z, Yang HM, Udar N, Naiem F, Concannon P, Gatti RA. MAGE Xp-2: a member of the MAGE gene family isolated from an expression library using systemic lupus erythematosus sera. *Mol Genet Metab*, 63: 3-13, 1998.
- Mejia-Arangure JM, Fajardo-Gutiérrez A, Bernaldez-Rios R, Paredes-Aguilera R, Flores-Aguilar H, Martínez-García MC. Incidence of acute leukemia in children in México City, from 1982 to 1999. *Salud Publica Méx*, 42: 431-7, 2000.
- Mims C. Interactions of viruses with the immune system. *Clin Exp Immunol*, 66: 134-46, 1996.
- Miranda EI, Santana C, Rojas E, Hernandez S, Ostrosky-Wegman P, Garcia-Carranca A. Induced mitotic death of HeLa cells by abnormal expression of c-H-ras. *Mutat Res*, 349:173-82, 1996.
- Montesinos JJ y Mayani H. Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. *Gac Méd Méx*, 138: 67-77, 2002
- Murkherji B, Chakraborty NG, Yamasaki S, Okino T, Yamase H, Sporn JR, Kurtzman SK, Ergin MT, Ozols J, Meehan J. Induction of antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells. *Proc Natl Acad Sci*, 92: 8078-82, 1995.
- Nagel H, Laskawi R, Eiffert H, Schlott T. Analysis of the tumour suppressor genes, FHIT and WT-1, and the tumor rejection genes, BAGE, GAGE-1/2, HAGE, MAGE-1, and MAGE-3, in benign and malignant neoplasms of the salivary glands. *Mol Pathol*, 56: 226-31. 2003.

-
- Nishimura S, Fujista M, Terata N, Tani T, Kodoma M; Itoh K. Expression of Mage genes in colorectal carcinomas. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*, 20: 95-101, 1997.
 - Ohman FK, Nordqvist K. The melanoma antigen genes any clues to their functions in normal tissues. *Exp Cell Res*, 265: 185-94, 2001.
 - Olarte I. Estudio de la expresión del gen MAGE B-2 en pacientes adultos con Leucemia Aguda del Hospital General de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. (UNAM). Facultad de Ciencias, 2002.
 - Park JH, LeeSW. Hypertonicity induction of melanoma antigen, a tumor-associated antigen. *Mol Cells*, 13: 288-95, 2002 ^a.
 - Park JW, Kwon TK, Kim IH, Sohn SS, Kim CI, Bae OS, Lee KS, Lee KD, Lee CS, Chang HK, Choe BK, Ahn SY, Jeon CH. A new strategy for the diagnosis of MAGE-expressing cancers. *J Immunol Methods*, 266: 79-86, 2002 ^b.
 - Park MS, Park JW, Jeon CH, Lee KD, Chang HK. Expression of melanoma antigen-encoding genes (MAGE) by common primers for MAGE-A1 to -A6 in colorectal carcinomas among Koreans. *J Korean Med Sci*, 17: 497-501. 2002 ^c.
 - Pellat-Deceunynck C, Medellin MP, Labarriere N, Jego G, Moreau-Aubry A, Harousseau JL, Jotereau F, Bataille R. The cancer germ-line genes MAGE-1, MAGE-3 and PRAME are commonly expressed by human melanoma cell. *Eur J Immunol*, 30: 803-9, 2000.
 - Pinilla I, Cathcart K, Korontsvit T, Soignet S, Bocchia M, Caggiano J, Lai L, Jimenez J, Kolitz J and Scheinberg DA. Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood*, 95: 1781-87, 2000.
 - Pold M, Zhou, Chen G, Hall J, Vescio R, Berenson J. Identification of a new unorthodox member of the MAGE gene family. *Genomics*, 59: 161-167, 1999.

- Pui CH, Behm FG, Crist WM. Clinical and biologic relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 82: 343-52, 1993.
- Resnick MB, Sabo E, Kondratev S, Kerner H, Spagnoli GC, Yakirevich E. Cancer-testis antigen expression in uterine malignancies with an emphasis on carcinosarcomas and papillary serous carcinomas. *Int J Cancer*, 101:190-5.2002.
- Reynolds SR, Zeleniuch-Jacquotte A, Shapiro RL, Roses DF, Harris MN, Johnston D, Bystryn JC. Vaccine-induced CD8+ T-cell responses to MAGE-3 correlate with clinical outcome in patients with melanoma. *Clin Cancer Res*, 9: 657-62. 2003.
- Rivoltini L, Kawakami Y, Sakaguchi K, Southwood S, Sette A, Robbins PF, Marincola FM, Salgaller ML, Yanneli JR, Appella E. Introduction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1. *Int Rev Immunol*, 21: 73-80, 1998.
- Rosas A, Ayala M, Miranda E I. Analysis of the clinical relevance of the type of chimeric mRNA in chronic myeloid leukemia in the one Mexican population. *Cancer Res Ther Control*, 10. 73-80, 1999.
- Rosenberg SA, Kawakami Y, Robbins PF and Wang RF. Identification of the genes encoding cancer antigens: implications for cancer immunotherapy. *Adv. Cancer Res*, 70: 145-177, 1996.
- Salud Pública de México/ vol. 43, no.5, septiembre-octubre de 2001. Estadística de egresos hospitalarios de la Secretaria de Salud, 2000.
- Sarcevic B, Spagnoli GC, Terracciano L, Schultz-Thater E, Heberer M, Gamulin M, Krajina Z, Oresic T, Separovic R, Juretic A. Expression of cancer/testis tumor associated antigens in cervical squamous cell carcinoma. *Oncol*, 64: 443-9. 2003.

-
- Scanlan MJ, Gout I, Gordon CM, Williamson B, Stockert E, Gure AO, Jager D, Chen YT, Mackay A, O'Hare MJ, Old LJ. Humoral immunity to human breast cancer: antigen definition and quantitative analysis of mRNA expression. *Cancer Immun*, 1:4. 2001.
 - Schuler-Thurner B, Schultz ES, Berger TG, Weinlich G, Ebner S, Woerl P, Bender A, Feuerstein B, Fritsch PO, Romani N, Schuler G. Rapid induction of tumor-specific type 1 T helper cells in metastatic melanoma patients by vaccination with mature, cryopreserved, peptide-loaded monocyte-derived dendritic cells. *J Exp Med*, 195: 1279-88, 2002.
 - Serrano A, Garcia A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Differential MAGE-1 gene expression in two variants of an erythroleukemic cell line (K562). *Immunobiol*, 194:449-56, 1995.
 - Serrano A, García A, Abril E, Garrido F and Ruiz Cabello F. Methylated CpC points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J. Cancer*, 68: 464-470, 1996.
 - Shichijo S, Tsunosue R, Masuoka K, Natori H, Tamai M, Maiyajima J, Sagawa K, Itoh K. Expression of the MAGE gene family in human lymphocytic leukemia. *Cancer immunol Immunother*, 41: 90-103, 1995.
 - Smith G. Virus strategies for evasion of the host response to infection. *Trends Microbiol*, 2: 181-88, 1994.]
 - Stone B, Schummer M, Paley PJ, Crawford M, Urban N, Nelson BH. MAGE-F1, a novel ubiquitously expressed member of the MAGE superfamily. *Gene*, 267: 173-82. 2001.
 - Strachan T, and Read AP. Human Molecular Genetics 2. 2nd ed. Oxford, UK. 1999.
 - Sudo T, Kuramoto T, Komiya S, Inoue A, Itoh K. Expression of MAGE genes in osteosarcoma. *J Orthop Res*, 15: 128-132, 1997.
 - Sugita M, Geraci M, Gao B, Powell RL, Hirsch FR, Johnson G, Lapadat R, Gabrielson E, Bremnes R, Bunn PA, Franklin WA. Combined use of oligonucleotide and tissue

- microarray identifies cancer/testis antigens as biomarkers in lung carcinoma. *Cancer Res*, 62: 3971-9, 2002.
- Suyama T, Ohashi H, Nagai H, Hatano S, Asano H, Murate T, Saito H, Kinoshita T. The MAGE-A1 gene expression is not determined solely by methylation status of the promoter region in hematological malignancies. *Leuk Res*, 12: 1113-8. 2002.
 - Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, Hirochata M and Itoh K. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res*, 55 :3478-3482, 1995.
 - Tanzarella S, Russo V, Lionello I, Dalerba P, Rigatti D, Bordignon C. Identification a promiscuous T-cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res*, 59: 2668-74, 1999.
 - Tanzarella S, et al. Characterization of antigenic peptide epitopes by reverse immunology: induction of cytotoxic T lymphocytes specific for exogenous peptide only. *Int J Cancer*, 72: 912-915, 1997.
 - Tcherpakov M, Bronfman FC, Conticello SG, vaskovsky A, Levy Z, Niinobe M, Yoshikawa K, Arenas E, Fainzilber M. The p75 neurotrophin receptor interacts with multiple MAGE proteins. *J Biol Chem*, 277: 49101-4. 2002.
 - Traversari C, Meazza R, Copolecchia M, Basso S, Verrecchia A, Vander Bruggen P, Ardizzoni A, Gaggero A, Ferrini S. IFN- Gamma gene transfer restores HLA-Class I expression and MAGE-3 antigen presentation to CTL in HLA- deficient small cell lung cancer. *Gene ther*, 4: 1029-1035, 1997.
 - Türeci Ö, Sahim U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G and Pfreundschuh M. Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Immuno*, 95: 521 1-5216, 1998.
 - Ushijina T, Watanabe N, Okochi E, Kaneda A, Sugimura T, Miyamoto K. Fidelity of the methylation pattern and its variation in the genome. *Genome Res*, 13: 868-74. 2003.

- Vantomme V, Dantinne C, Amrani N, Permanne P, Gheysen D, Bruck C, Stoter G, Britten CM, Keilholz U, Lamers CH, Marchand M, Delire M, Gueguen M. Immunologic Analysis of a phase I/II study of vaccination with MAGE-3 protein combined with the AS02B adjuvant in patients with MAGE-3-positive tumors. *J Immunother*, 27: 124-135, 2004.
- van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*, 254:1643-7, 1991.
- Yamada A, Kataoka A, Shichio S, Kamura t, Imai Y, Nishida T, Itoh K. Expression of MAGE-1, MAGE-2, MAGE-3/-6 and MAGE-4a /-4b genes in ovarian tumors. *Int J Cancer*, 64: 388-393, 1995.
- Yamana H. Immunotherapy for esophageal carcinoma. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*, 103:376-80, 2002.
- Wang J, Saffold S, Cas X, Krauss J, Chen W: Eliciting T cell immunity against poorly immunogenic tumors by immunization with dendritic cell-tumor fusion vacunes. *J Immunol*, 161: 5516-24, 1998.
- Wierda W and O'Brien, Immunotherapy of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther*, 1: 73-83, 2001.
- Zammateo N, Lockman L, Brasseur F, De Plaen E, Lurquin C, Lobert PE, Hamels s, Boon T and Remacle J. DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clín Chemis*, 48:1, 25-34, 2002.

DIRECCIONES DE PAGINAS DE INTERNET CONSULTADAS.

(<http://www.cancerstop.net/entendiendo1.htm>).

(<http://165.158.1.110/spanish/sha/prflmex.html/morbimortal>).

(http://fai.unne.edu.ar/inmunologia/cap_09.htm).

(<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/expresion/Expresion.htm>)

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.org>)

(<http://www.biomania.com.br/reproducao/gametogenese.php>)

(http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biology/08_Proteolysis.htm)

(<http://www.dhs.gov.au/cancare/REFERENC/Blood/Hemo/NetIt4/22020x.htm>)

(<http://www.yahoo.com>)

(<http://www.google.com>)