



**Rol de las isoformas de splicing del oncogén Musashi 2 en la progresión en la
Leucemia Linfoide Crónica**

Bioq. Magalí Torres

Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica

Orientación: Hematología

Unidad Académica Escuela de Ciencias de la Salud

Instituto Universitario CEMIC

Buenos Aires – Argentina

2023

**Rol de las isoformas de splicing del oncogén Musashi 2 en la progresión en la
Leucemia Linfoide Crónica**

Bioq. Magalí Torres

Trabajo Final Integrador presentado al Programa de Posgrado
de la Carrera de Especialización en Bioquímica Clínica,
Unidad Académica de la Escuela de Ciencias de la Salud,
Instituto Universitario CEMIC, como parte de los requisitos necesarios
para la obtención del título de Especialista en Bioquímica Clínica,
Orientación en Hematología.

Coordinador de la carrera: Dr. Alfredo Martínez

Directora Académica de tesis: Dra. Florencia Palacios

Lugar de trabajo: Laboratorio de investigación en Leucemia Linfoide
Crónica. Institut Pasteur de Montevideo. Montevideo, Uruguay

Buenos Aires - Argentina

2023

Dedicatoria

A mis padres, Mari y Coco. Por su apoyo incondicional, por creer siempre en mí,
por ser quienes son. Gracias, los amo profundamente.

A mi hermana, Belu. Por alentarme siempre a cumplir mis sueños, por enseñarme
que no perdemos nada con intentar y por su sincera alegría de mis logros.

A Francisco, por ser mi amor y acompañarme en este camino de formación infinito.

Agradecimientos

A mi tutora, la Dra. Florencia Palacios, por toda la confianza que depositó en mí desde el primer momento, por todo lo que me ha enseñado e incentivado durante este proyecto. Por su paciencia, por brindarme todo su conocimiento. No podría haber realizado este trabajo sin su apoyo y dedicación.

Al Dr. Pablo Oppezzo, por permitirme realizar este trabajo y ser parte de su gran laboratorio.

A todo el equipo de iLLC del Institut Pasteur, por su generosidad y por ser tan buenos compañeros conmigo siempre.

A Paula, que me abrió las puertas de su casa con su maravillosa familia y me adoptaron estos 3 meses como si fuera una más.

Al Departamento de Análisis Clínicos de CEMIC, que fue mi casa durante estos 4 años de Residencia. En especial a mis queridos sectores de Hematología y Citometría de Flujo, que me posibilitaron formarme, aprender y crecer en esta increíble profesión.

A todos mis compañeros de Residencia durante estos años. Me llevo aprendizajes enormes de cada uno y mil anécdotas juntos.

A mis compañeras de año, Anto, Gri y Lu, por todos estos años compartidos. Por su apoyo, firmes en las horas y días más difíciles. Gracias por estar siempre ahí, para mí ha sido un placer y un orgullo ser su compañera.

Índice

Dedicatoria	1
Agradecimientos.....	2
Índice.....	3
Lista de figuras.....	5
Abreviaciones.....	6
Introducción.....	10
Leucemia Linfoide Crónica	10
Generalidades	10
Epidemiología.....	11
Diagnóstico.....	11
Estadificación de los pacientes con LLC	13
Mortalidad, morbilidad y pronóstico	15
Tratamiento	19
Proteínas de unión a ARN y su papel en la regulación de la expresión de genes ...	21
Objetivos	27
Objetivo general.....	27
Objetivo específico.....	27
Materiales.....	28
Muestras de pacientes con LLC.....	28
Métodos	28
Extracción y cuantificación de ARN	28
Síntesis de ADNc.....	29
Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa y en tiempo real	30
Resultados y discusión.....	41
ANEXO 1.....	54
ANEXO 2.....	57
Bibliografía.....	60

Lista de tablas

Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de estratificación en la LLC

Tabla 2. Biomarcadores pronósticos para LLC

Tabla 3. Índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI)

Tabla 4. Condiciones de reacción para PCR semicuantitativa

Tabla 5. Máster Mix de la reacción de PCR semicuantitativa

Tabla 6: Cebadores específicos para la amplificación de las diferentes isoformas de MSI2

Tabla 7: Tamaño del producto de amplificación para cada par de oligos

Tabla 8: Máster Mix de reacción de PCR Real Time

Tabla 9: Condiciones de reacción de la PCR real time

Tabla 10: ANEXO 1. Características de los pacientes con LLC utilizados en este trabajo

Tabla 11: ANEXO 2. Determinación de la expresión relativa de MSI2 y sus isoformas

Lista de figuras

Figura 1: Representación esquemática de la función de Musashi 1

Figura 2: Esquema gráfico de las 4 isoformas MSI2

Figura 3: Secuencia nucleotídica de cada variante de MSI2 (ARNm)

Figura 4: Alineación de isoformas de la proteína MSI2

Figura 5: Evaluación para la estandarización de la expresión de las isoformas de MSI2 por PCR semicuantitativa

Figura 6: Evaluación de la expresión de ARNm de MSI2 total por PCR en tiempo real en pacientes con LLC y donantes sanos

Figura 7: Evaluación de la expresión de ARNm de MSI2 total por PCR en tiempo real en pacientes con LLC con respecto al perfil mutacional de los genes VH

Figura 8: Evaluación de la distribución de ARNm por PCR en tiempo real de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC y donantes sanos.

Figura 9: Evaluación de la distribución de ARNm por PCR en tiempo real de la distribución de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC

Figura 10: Evaluación de la distribución de ARNm por PCR en tiempo real de la de la expresión de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC con respecto al perfil mutacional de los genes VH

Abreviaciones

μM - micromolar

μg - microgramo

μL - microlitro

$^{\circ}\text{C}$ - grados Celsius

ADNc – ADN copia

AID – Deaminasa de Citosina Inducida por Activación (del inglés, activation-induced cytidine deaminase)

ARN - Ácido ribonucleico

ARNm - ARN mensajero

DS – Donante sano

Fw - primer forward

g – gramos

LLC – Leucemia linfocítica crónica

M – Molar

mL - mililitro

mg - miligramo

mM – milimolar

MSI - Musashi

ng – nanogramo

pb - par de bases

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés, polymerase chain reaction)

Rv - primer reverse

SP – Sangre periférica

Resumen

La regulación de la expresión génica es un mecanismo molecular esencial donde las células controlan la expresión de genes. Debido a la relevancia de su función, existen varios puntos de control en este proceso. Puntualmente, en la regulación postranscripcional, las proteínas de unión al ARN regulan la dinámica temporal, espacial y funcional de las moléculas de ARN. Una desregulación de estas proteínas puede contribuir al desarrollo de cáncer. Concretamente, la oncoproteína Musashi 2 (MSI2), controla la diferenciación de las células madre y regula la traducción de proteínas. Curiosamente, altos niveles de MSI2 se asocian con mal pronóstico en varios cánceres, incluida la leucemia linfocítica crónica (LLC).

La LLC es la leucemia más frecuente en la población adulta occidental y presenta un curso clínico muy variable, por ello grandes esfuerzos se han centrado en el estudio de marcadores pronóstico que puedan predecir su evolución. En este sentido, nuestro grupo ha descrito una elevada expresión de MSI2 en el linfocito B tumoral de pacientes con LLC con respecto a donantes sanos (DS). A su vez, altos niveles de MSI2 se correlacionan con menor tiempo libre de tratamiento. Dado que bajar la expresión o inhibir su función reduce la viabilidad de las células tumorales, es que creemos que MSI2 juega un rol en la supervivencia del clon y contribuye a la progresión de la enfermedad.

MSI2 presenta cuatro variantes de isoformas (a, b, c y d) de splicing, que no han sido previamente estudiadas en LLC. Debido a que en cáncer de mama se ha descrito que la isoforma MSI2a parece estar asociada a la progresión del tumor, es que nos

preguntamos si hay expresión diferencial de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC y si las misma se encuentran asociadas a la progresión de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la distribución de las variantes de isoformas de splicing de MSI2 en pacientes con LLC de buen y mal pronóstico, para ello, previa aprobación del comité de ética y firma del consentimiento informado, se utilizaron muestras de sangre de pacientes con LLC atendidos en el servicio de Hematología del Hospital Maciel de Montevideo, Uruguay. La evaluación de la expresión de las distintas isoformas de MSI2 se realizó a nivel de ARN mensajero por PCR en tiempo real. Se determinaron las isoformas a, b y c. Debido a la similitud de secuencia entre la a y la d, ambas fueron evaluadas en conjunto a-d. Se incluyeron 35 pacientes con LLC, 15 de mal pronóstico, con perfil mutacional de genes de inmunoglobulinas de cadenas pesadas (IgVH) No Mutado y 20 de buen pronóstico, con perfil IgVH Mutado. Se utilizaron además 3 muestras de donantes sanos (DS).

Los resultados muestran que las células B tumorales expresan el doble de los niveles de MSI2 que las de DS. Curiosamente los linfocitos B tumorales y los no tumorales expresan MSI2a y MSI2b, no así MSI2c. Dado que no hay cambios entre MSI2a y MSI2a-d, asumimos que MSI2d no se expresa en las células estudiadas. La isoforma mayoritaria en las muestras evaluadas es la a (MSI2a), donde determinamos que las células B de LLC expresan 4,6 más MSI2a que MSI2b.

Por último, comparando pacientes de buen y mal pronóstico, observamos que no hay diferencia en la expresión de MSI2b en ambos grupos. Sin embargo, MSI2a se expresa 4,3 veces más en los pacientes de mal pronóstico comparado con los de buen pronóstico, sugiriendo un posible rol de MSI2a en la progresión de la LLC.

Palabras clave: Leucemia Linfoide Crónica, Musashi 2, isoformas

Introducción

Leucemia Linfoide Crónica

Generalidades

La leucemia linfoide crónica (LLC) es la forma de leucemia más frecuente en los países occidentales, se caracteriza por la proliferación clonal y acumulación de pequeños linfocitos B maduros, clonales, CD5 positivos en sangre periférica (SP), médula ósea, ganglios linfáticos y bazo. La mediana de edad de los pacientes al momento del diagnóstico es de 65 años, con solo 10 a 15% menores de 50 años. En la mayoría de los casos, más hombres que mujeres se ven afectados (1).

El curso de la enfermedad es variable, alrededor de un tercio de los pacientes nunca requieren tratamiento, tienen una supervivencia prolongada y mueren por causas no relacionadas con la enfermedad; en otro tercio, una fase indolente inicial es seguida por una progresión de la enfermedad; el tercio restante de los pacientes tiene una enfermedad agresiva al inicio y requiere un tratamiento temprano (2). Los dos últimos grupos de pacientes presentan mayores desafíos para el equipo de salud, por lo tanto, es importante identificar los casos de mayor riesgo de manera temprana y tener factores pronósticos que ayuden a seleccionar el tratamiento más adecuado para cada paciente en particular.

Si bien durante los últimos años se han hecho importantes avances en la comprensión de la biología, la historia natural y el tratamiento, la LLC continúa siendo una enfermedad incurable y no existe tratamiento que permita la remisión completa de la enfermedad.

Epidemiología

La LLC es la leucemia en adultos más prevalente en las sociedades occidentales, la incidencia 5-6 individuos por cada 100.000 habitantes por año. Es poco común antes de los 40 años y es extremadamente rara en niños o adultos jóvenes. Aun así, no son infrecuentes los diagnósticos en la cuarta y quinta década de la vida.

La LLC es poco común en los países asiáticos y en los inmigrantes asiáticos en las Américas o Europa (3).

Diagnóstico

La mayoría de los pacientes es asintomático al momento del diagnóstico, la enfermedad se detecta en forma incidental durante un recuento hematológico de rutina que muestra linfocitosis o un examen físico que confirma el agrandamiento de ganglios linfáticos.

Las manifestaciones clínicas de la LLC incluyen (3,4):

- Linfadenopatías pequeñas y simétricas (50-90% de los casos) cervicales, supraclaviculares y/o axilares frecuentemente.
- Esplenomegalia, moderada, no dolorosa (25-54% de los casos).
- Hepatomegalia, moderada, no dolorosa (10-20% de los casos).
- Inmunodeficiencia adquirida: Hipogammaglobulinemia. Predisposición a las infecciones repetidas, como neumonía, herpes simple labial y el herpes zóster.

- Astenia y fatiga.
- Fiebre, escalofríos, sudores nocturnos y pérdida de peso (síntomas B).
- Anemia hemolítica y/o trombocitopenias autoinmunes.

El diagnóstico se basa en (3,4):

- Linfocitosis absoluta mayor a 5000 linfocitos B clonales/ μ L, sostenida al menos durante 3 meses.
- Morfología: El examen microscópico del frotis de sangre periférica es esencial para el diagnóstico. Son células morfológicamente similares a los linfocitos maduros, de tamaño pequeño, un núcleo con cromatina densa regularmente descrita como en “damero” y nucléolo difícilmente distinguible. El citoplasma es levemente basófilo y no contiene gránulos.
- Citometría de flujo: El inmunofenotipo es la prueba para confirmar el diagnóstico, y se puede ver la presencia de linfocitos B clonales que expresan CD5, CD19, CD20 (tenue) y CD 23. Opcionalmente se considera a la expresión de CD79b-/+ tenue, CD43 + tenue, CD200 + +, e Igs κ o λ tenues como una ayuda diagnóstica. La infiltración clonal de la médula ósea (>30%) es diagnóstico de LLC independientemente del recuento de células B periféricas.

El inmunofenotipo es capaz de excluir otros desórdenes linfoproliferativos B, específicamente Linfoma del Manto, Tricoleucemia, Linfoma de la zona marginal y Linfoma linfoplasmocítico.

Estadificación de los pacientes con LLC

Luego del diagnóstico de la LLC, el estadio clínico se asigna de acuerdo a sistemas de estadificación. Son de uso común el sistema de Rai et al, 1975 (5) (Estados Unidos) y el de Binet et al, 1981 (6) (Europa). Hoy en día estas clasificaciones siguen siendo los pilares de la atención clínica y son usadas ampliamente, siendo dos sistemas simples, económicos que se basan en hallazgos físicos y resultados del hemograma completo, permitiendo al médico hematólogo orientar mejor la estrategia terapéutica a seguir.

Debido a su amplio uso, el sistema de Rai-Sawitsky se describe en primer lugar, seguido por el de Binet.

Tabla 1. Sistemas Rai y Binet de estratificación en la LLC

Rai

Estadíos	Criterios
0. Bajo riesgo	Linfocitosis en sangre y médula ósea solamente.
I y II. Riesgo intermedio	Linfocitosis con adenomegalias en cualquier sitio, esplenomegalia, hepatomegalia.

III y IV. Alto riesgo	Linfocitosis con anemia relacionada a la enfermedad (Hb<11g/dL) o trombocitopenia (<100 x 10 ⁹).
-----------------------	--

Binet

Estadio A	Hemoglobina > 10 g/dL, plaquetas > 100.000/uL, y menos de 3 áreas ganglionares afectadas*.
Estadio B	Hemoglobina y plaquetas como en A y 3 o más áreas ganglionares afectadas*.
Estadio C	Hemoglobina < 10 g/dL o plaquetas < 100.000/uL, o ambas cosas.

* ganglios linfáticos de cabeza y cuello (sitios múltiples cuentan como un área), los ganglios linfáticos de la axila (bilateral cuenta como un área), los ganglios linfáticos inguinales (bilaterales cuenta como un área), esplenomegalia y hepatomegalia (1 área cada uno).

La clasificación de Rai permite dividir entre pacientes de bajo riesgo (estadio 0), pacientes con riesgo intermedio (estadio I o II) y pacientes de alto riesgo (estadio III o IV), mientras que la clasificación de Binet nos permite dividir los pacientes en tres grupos pronósticos: bueno (estadio A), intermedio (estadio B) y severo (estadio C). Ambas clasificaciones se basan en la evaluación de la linfocitosis, tamaño de los nódulos linfáticos, detección de organomegalia y presencia o ausencia de anemia o

trombocitopenia. Asimismo, se relacionan directamente con la sobrevida de los pacientes. Aquellos con estadio Binet A o Rai 0 presentan una sobrevida media de más de 10 años. Los pacientes con estadio Binet B o Rai I/II presentan una sobrevida media de entre 5 a 7 años, por último, aquellos con estadio Binet C o Rai III/IV una menor sobrevida, de aproximadamente 3 años (7).

Mortalidad, morbilidad y pronóstico

Como ya se mencionó anteriormente, la historia natural de la LLC es heterogénea. Debido a esto, saber si un paciente progresa rápidamente o no, permite a los médicos elegir la estrategia de tratamiento más adecuada a tiempo.

El sistema de estadificación clínica actualmente disponible para la LLC es simple y barato, pero lamentablemente carece de precisión para predecir la progresión de la enfermedad en las primeras etapas de la misma.

Aunque los estudios biológicos no son necesarios para el diagnóstico o estadificación de la LLC, se recomienda realizar pruebas moleculares adicionales, ya que pueden ayudar a predecir el pronóstico o el curso clínico de la enfermedad. Los factores pronósticos se pueden clasificar en 4 categorías y se describen a continuación en la tabla 2.

Tabla 2. Biomarcadores pronósticos para LLC.

Categoría	Biomarcador
Factores intrínsecos de cada paciente	Edad, sexo, etnia, comorbilidades
Marcadores de la enfermedad	Ganglios linfáticos comprometidos (tamaño, sitio/s comprometidos), hepatomegalia, esplenomegalia, LDT, conteo de GB, ALC, Anemia, Trombocitopenia.
Anormalidades bioquímicas y marcadores celulares	β 2M, LDH, IL-8, CD38, ZAP70, CD49d/VLA-4
Anomalías genéticas	del12p, del17p, mutación TP53, del11q, del13q, metilación de ADN, cariotipo complejo, mutación BIRC3, mutación BRAF, mutación IGHV, estructura BCR

Abreviaciones: LDT, tiempo de duplicación de linfocitos; GB, glóbulos blancos; ALC, recuento absoluto de linfocitos; ZAP70, proteína asociada a la cadena zeta 70; VLA-4, molécula de adhesión de leucocitos vasculares-4; β 2M, Beta-2 microglobulina; LDH, lactato deshidrogenasa; IL-8, interleucina 8; IGHV, cadena pesada variable de inmunoglobulina; BCR, receptor de células B.

De los predictores mencionados, uno de los más confiables hasta la fecha es el "estado de mutación de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina

(IGHV)", que se refiere a la presencia o ausencia de un número significativo de mutaciones somáticas en el gen IGHV expresado por el clon leucémico.

Esto permite estratificar a los pacientes en dos categorías diferentes: aquellos con regiones IGHV mutadas (M-LLC, porcentaje menor a 98% con respecto a la contrapartida germinal) y pacientes con regiones no mutadas (NM-LLC, porcentaje igual o mayor al 98% con respecto a su contrapartida germinal) (8,9). Identificar si el paciente presenta o no mutaciones en IGHV es crucial, puesto que tiene un importante valor pronóstico. Ya que, aquellos pacientes con un NM-LLC se asocian a un mal pronóstico y una enfermedad progresiva. Por el contrario, los pacientes M-LLC, presentan un mejor pronóstico y en su mayoría una enfermedad indolente (9).

Por otro lado, las alteraciones citogenéticas estudiadas mediante la técnica de FISH (hibridación fluorescente in situ) permiten también evaluar pronóstico de la enfermedad. Aquellos pacientes en los cuales el clon tumoral muestra una citogenética normal o la del-13q14 muestran un mejor pronóstico que aquellos en donde el clon leucémico presenta las deleciones del gen TP53 (del-11q) y deleciones del gen ATM (del-17p). Finalmente, la otra aberración cromosómica es la trisomía del cromosoma 12, la cual muchas veces también está asociada a un mal pronóstico (10).

Por último, los marcadores séricos como lactato deshidrogenasa (LDH) y, β 2-microglobulina (B2M) indican alta carga tumoral cuando se encuentran elevados. No son específicos de la LLC ya que se elevan también en otros procesos neoplásicos, pero son sencillos de determinar en la práctica clínica habitual (11).

En busca de un índice pronóstico más adecuado que sea clínicamente significativo, fácil de usar, orientado a la toma de decisiones terapéuticas y aplicable en la práctica

clínica habitual, se ha propuesto el índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI, del inglés Chronic Lymphocytic Leukemia-International Prognostic Index). Este incluye la edad del paciente, el estadio de la enfermedad (sistemas Rai o Binet), la delección y/o mutaciones con pérdida de función del gen TP53, el estado mutacional IGHV y los niveles séricos de β 2-microglobulina. Estos cinco parámetros se ponderan individualmente y se determina una puntuación compuesta que asigna a los pacientes a uno de los cuatro grupos de riesgo con diferente supervivencia global (SG) a 5 años (12).

Tabla 3. Índice internacional de pronóstico de leucemia linfocítica crónica (CLL-IPI)

Valor CLL-IPI	Categoría CLL-IPI	SG (5 años)	Tratamiento indicado
0-1	Bajo riesgo	93,2%	Watch-and-wait, Enfoque no tratar y vigilar al paciente
2-3	Riesgo intermedio	79,3%	No tratar, excepto cuando la enfermedad es sintomática

4-6	Alto riesgo	63,3%	Tratar, excepto cuando la enfermedad es asintomática
7-10	Muy alto riesgo	23,3%	Si es posible tratar con drogas no citotóxicas (quimioterapia y quimio inmunoterapia)

Dentro de los parámetros estudiados el que representa mayor puntaje es la presencia de delección o mutación en TP53, a cuál se le asigna 4 puntos, mientras que aquellos pacientes con un perfil IGHV No mutado o un valor de β 2-microglobulina >3.5 mg/L reciben 2 puntos, por último, una edad > 65 años o estadio RAI o Binet intermedio o alto recibe 1 punto (12).

Tratamiento

Considerando todo lo detallado hasta aquí, la decisión de iniciar el tratamiento depende de la presencia o ausencia de enfermedad activa y riesgo de progresión. El uso de anticuerpos monoclonales anti-CD20 como el Rituximab cambió el enfoque del tratamiento. Este anticuerpo se une a la molécula CD20 en la superficie de los linfocitos B, permitiendo su eliminación a través de los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, citotoxicidad dependiente del complemento y por inducción directa de apoptosis (13). Posteriormente se desarrolló obinutuzumab, un anti-CD20 de segunda generación. Ambos anticuerpos están actualmente aprobados

en combinación con otros medicamentos para tratar la LLC (14,15). La adición de estos anticuerpos a la quimioterapia condujo a un aumento en la supervivencia, y ha sido durante mucho tiempo la primera línea de tratamiento para la LLC. Sin embargo, no es aplicable en todos los casos porque muchos pacientes, especialmente los pacientes de edad avanzada o con comorbilidades, sufren una recaída temprana o una mala respuesta al tratamiento. Por lo tanto, existió la necesidad de desarrollar terapias adicionales con mecanismos de acción alternativos que sean efectivos y tengan un perfil de efectos secundarios aceptable.

Estas terapias incluyen la tirosina quinasa de Bruton (BTK), la proteína anti apoptótica BCL-2 (leucemia/linfoma 2 de células B reguladoras de la apoptosis), inhibidores de la subunidad catalítica 3-quinasa del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato delta (PI3K δ). Estos agentes son más específicos y sin duda se han convertido en valiosas herramientas en el manejo de la LLC en la última década (16,17). El primero de estos inhibidores en ser aprobado como fármaco de primera línea y actualmente el más utilizado es el inhibidor irreversible de BTK ibrutinib. Otro fármaco que ha mostrado buena eficacia terapéutica y muy buena respuesta es el venetoclax, un inhibidor oral de la proteína BCL2 (B-cell lymphoma 2). BCL2 se sobre expresa y es importante para evadir la apoptosis en clones leucémicos, por lo que su inhibición promueve la muerte de células tumorales. Debido a que este es un mecanismo río abajo de p53, esta terapia ha tenido mucho éxito en pacientes con deficiencia o mutación de TP53 (18). Además de su uso como monoterapia, estos nuevos agentes también se están evaluando en combinación con otros agentes terapéuticos. Un ejemplo es la terapia combinada con anticuerpos monoclonales anti-CD20 (rituximab, ofatumumab u obinutuzumab) (19,20). Por último, otra de las drogas de importancia en las terapias

dirigidas es Idelalisib, un inhibidor de PI3K δ , proteína expresada selectivamente en células hematopoyéticas. Al inhibir esta proteína, Idelalisib bloquea varias vías de señalización celular involucradas en el mantenimiento de la viabilidad y proliferación de la célula B leucémica (21). A pesar de la eficacia clínica de estos inhibidores, tanto la resistencia primaria como la adquirida se han descrito en ensayos clínicos y en pacientes. Esto nos muestra que, aunque los inhibidores han mostrado ser un tratamiento eficaz para los pacientes con LLC, existe la necesidad de mejorar aún más los problemas de tolerabilidad y el desarrollo de resistencia (22,23).

Proteínas de unión a ARN y su papel en la regulación de la expresión de genes

La regulación postranscripcional controla la expresión génica y el comportamiento celular. Las proteínas de unión al ARN (RBP, del inglés RNA binding proteins) son moléculas clave del metabolismo celular, regulando la dinámica temporal, espacial y funcional mediante su unión a través de uno o varios dominios de unión al ARN (RBD del inglés, RNA binding domains) cambiando el destino o la función de los ARN unidos (24,25). Estas proteínas juegan un papel fundamental en la homeostasis celular al controlar la expresión génica de manera postranscripcional. Participan en interacciones altamente dinámicas con otras proteínas, así como con ARN codificantes y no codificantes, creando unidades funcionales capaces de regular prácticamente todos los pasos del procesamiento del ARNm; el empalme, poliadenilación, localización, estabilidad, exportación, traducción y descomposición (25,26). Debido a su importante papel en la regulación de la expresión génica, la desregulación de RBP se ha relacionado con varios tipos de cáncer humano (27–29).

Por esta razón, descifrar el papel de las RBP y de sus ARN diana relacionados con el cáncer conducirá a una mejor comprensión de la biología tumoral y potencialmente descubrirá nuevos objetivos para la terapia del cáncer.

La proteína de unión al ARN Musashi 2 en cáncer y LLC

La familia de proteínas Musashi (MSI), parte de las RBP, regula las decisiones sobre el destino de las células durante el desarrollo embrionario y desempeña un papel clave en el mantenimiento de la autorrenovación y la diferenciación de las células madre. MSI se identificó por primera vez en *Drosophila melanogaster* como importante para el desarrollo de las neuronas sensoriales; necesaria para la división celular asimétrica de la célula progenitora del órgano sensorial (30).

La familia de genes MSI se conserva evolutivamente compartiendo ~75% de homología de las secuencias aminoacídicas y codifica dos proteínas estrechamente relacionadas en vertebrados e invertebrados, MSI1 y MSI2 (31). Ambas proteínas tienen dos sitios de reconocimiento al ARN capaces de unirse a motivos de consenso (G / A) U1-3AGU) en las regiones no traducidas (UTR) 3', 5' e incluso en la secuencia codificante de ARNm y regula tanto positiva (32–34) como negativamente la traducción de proteínas (35,36).

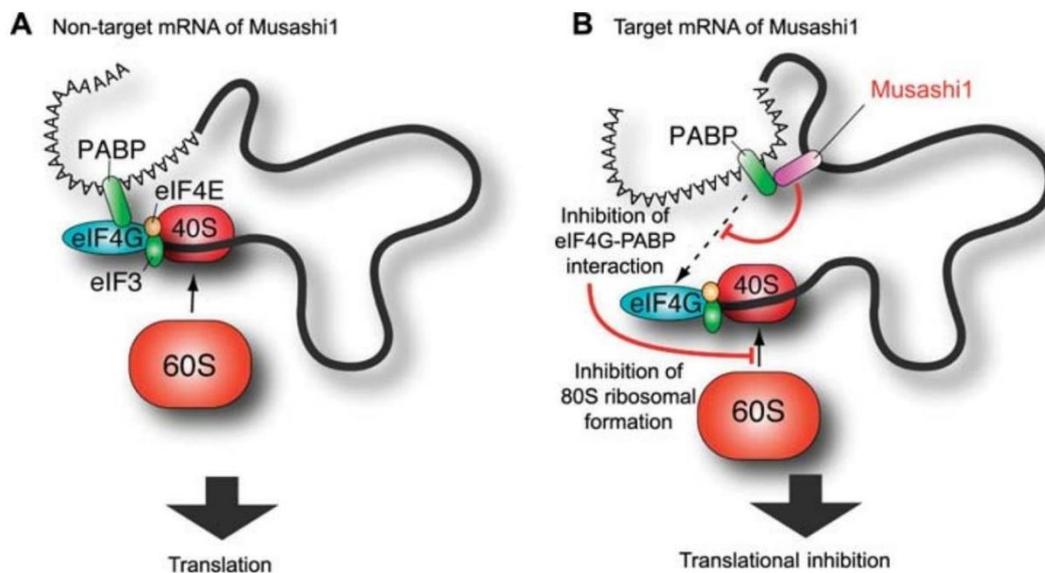


Figura 1. Representación esquemática de la función de MSI1. MSI1 interactúa con el 3'UTR de su ARNm blanco y PABP. Posteriormente, inhibe el inicio de la traducción al competir con eIF4G por PABP. Estos eventos secuenciales inhiben la formación del complejo ribosómico 80S. Adaptado de Horisawa et al. 2010 (37).

Debido a esto, las proteínas MSI pueden desempeñar un papel central en la regulación génica postranscripcional. MSI1 está asociado y se expresa principalmente en el sistema nervioso, más específicamente en células madre neuronales y precursoras indiferenciadas influyendo en el desarrollo neuronal (38). En tumores sólidos también se ha visto una alta expresión de esta proteína. Por otro lado, MSI2 se expresa primeramente en el sistema hematopoyético, influyendo en la proliferación y el destino celular de las células madre hematopoyéticas y neoplasias malignas hematopoyéticas (39,40). Su vinculación con el cáncer se describió inicialmente al identificarla como una proteína de fusión de la proteína homeobox HOX-A9 en leucemia mieloide crónica (LMC). Estudios más recientes, sugieren intensamente que MSI2 interviene en la proliferación tumoral, migración, invasión,

autofagia, entre otros (41). Curiosamente, MSI2 se expresa altamente en diversos tipos de cáncer como el glioma, cáncer de mama, páncreas, colon, pulmón, ovario, próstata y vejiga (40,42–46). Estos niveles de expresión de MSI2 en tumores son más altos que en los tejidos sanos correspondientes y están relacionados tanto con el origen de la neoplasia, como el nivel de diferenciación tumoral y el mal pronóstico de los pacientes. Además, se han descrito altos niveles de MSI2 no solo en tumores sólidos, sino también en distintos tipos de leucemias ((39,47–50), como LMC (51), leucemia mieloide aguda (LMA) (47), leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) (49), así como la leucemia linfocítica crónica (LLC) (48–53).

Particularmente en LLC, nuestro grupo describió que al comparar la expresión génica global de células de LLC recientemente divididas con la de células previamente divididas, hay niveles más altos de genes involucrados en la regulación de la expresión génica, y uno de ellos fue el oncogén MSI2. Se reportó por primera vez en experimentos ex vivo e in vitro que los niveles de proteína MSI2 son más altos en células leucémicas en división y recientemente divididas. Y, por otro lado, también se reportó que bajar la expresión de MSI2 o bloquear su función elimina las células de pacientes con LLC en humanos y modelos murinos. Llamativamente, las células T maduras y las células madre y progenitoras hematopoyéticas no se ven afectadas. También confirmaron que los niveles más altos de MSI2 se correlacionan con marcadores de resultados deficientes, tiempo más corto hasta el primer tratamiento y supervivencia general. Por lo tanto, estos datos destacan un papel importante para MSI2 en la supervivencia y proliferación de células de LLC y asocian a MSI2 con un mal pronóstico en pacientes con LLC (53). Por esta razón y debido a que MSI2 regula varios procesos biológicos asociados con el cáncer, esta proteína representa un

blanco terapéutico prometedor no sólo para las neoplasias linfoides como lo es la LLC, sino también para tumores sólidos.

Interesantemente MSI2 tiene cuatro isoformas de splicing (MSI2a, MSI2b, MSI2c y MSI2d) que no han sido previamente estudiadas en LLC. Todas las cuales contienen dos motivos de reconocimiento de ARN (RRM) conservados para unirse a los ARNm objetivo, pero difieren en el extremo amino (N) o carboxilo (C) terminal (54).

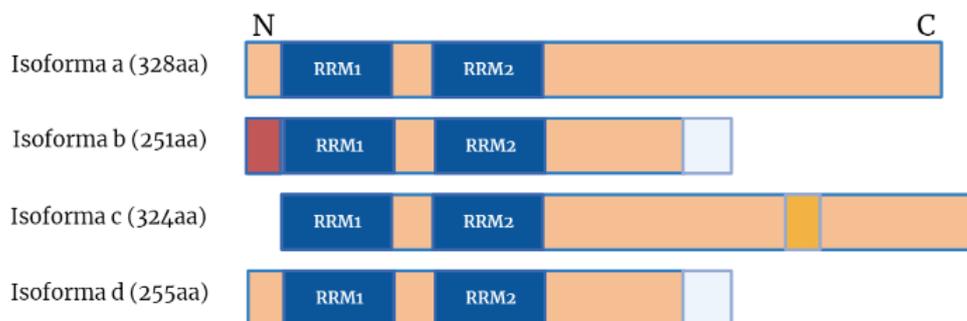


Figura 2. Esquema gráfico de las 4 isoformas MSI2. Adaptado de Li et al. 2020 (55).

Curiosamente a pesar de todas presentan ambos sitios de unión al ARNm se ha descrito que las diferentes isoformas de splicing alternativo de MSI2 tienen funciones específicas. Se informó que la isoforma MSI2a activa la traducción del ARNm blanco durante la maduración de los ovocitos de *Xenopus* durante la diferenciación de células de mamíferos en cultivo a través de la fosforilación de dos residuos de serina conservados, mientras que la isoforma MSI2b truncada que carece de los dos sitios

no logró promover la traducción del ARNm blanco y no fue permisivo para la maduración de los ovocitos de *Xenopus* (54).

En cáncer de mama se ha descrito que la isoforma MSI2a parece estar asociada a la progresión del tumor (55). En dicho trabajo, *Li et al.*, investigaron la expresión y las funciones fenotípicas de dos de las isoformas de splicing alternativo de MSI2 (MSI2a y MSI2b) y los posibles mecanismos moleculares implicados en la progresión del cáncer de mama triple negativo (CMTN). El estudio demostró que MSI2a es la isoforma funcional predominante de las proteínas MSI2 en CMTN, que su regulación negativa está asociada con la progresión del cáncer y el mal pronóstico de los pacientes. Y también describieron que la expresión de MSI2a inhibió la invasión de CMTN al estabilizar el ARNm de TP53, proteína supresora de tumores fundamental en el ciclo celular.

Es por esto que nos preguntamos si efectivamente hay una expresión diferencial de las isoformas de MSI2 en muestras de pacientes de LLC y si las mismas se encuentran asociadas a la progresión de la enfermedad.

Objetivos

Objetivo general

Contribuir al conocimiento del rol de la oncoproteína MSI2 en la progresión de la Leucemia Linfocítica Crónica.

Objetivo específico

Evaluación de la distribución de las variantes de isoformas de splicing de MSI2 en donantes sanos y pacientes con LLC. Por PCR en tiempo real nos proponemos determinar la distribución de las variantes de isoformas de MSI2 en una cohorte de pacientes de LLC y compararlo con donantes sanos. A su vez determinar si existe alguna diferencia en dicha distribución comparando muestras de pacientes de mal pronóstico, progresores con los de buen pronóstico indolentes.

Materiales

Muestras de pacientes con LLC

Las muestras utilizadas en el presente trabajo final de carrera provienen de pacientes atendidos en el servicio de Hematología del Hospital Maciel en Montevideo, contando con la aprobación del comité de ética de investigación del Hospital Maciel. Todos los pacientes proporcionaron un consentimiento informado, de acuerdo con las regulaciones éticas de Uruguay y de la Declaración de Helsinki. El diagnóstico de LLC se basó en características celulares e inmunofenotípicas, de acuerdo con las guías de diagnóstico vigentes. Las características clínicas específicas de cada paciente se encuentran en el ANEXO 1.

Dichas células se encuentran en el biobanco de LLC del Institut Pasteur de Montevideo.

Métodos

Extracción y cuantificación de ARN

La extracción de ARN a partir de las células se realiza con el reactivo Trizol. Dicha técnica debe realizarse en campana de gases. Se llevó a cabo a partir del pellet de células seco luego de reiterados lavados con PBS y posterior centrifugación por 5 min a 400 g y 4°C de forma de eliminar por completo el medio de cultivo.

A dicho pellet se le añade Trizol en una relación de 1 mL para 5 millones de células y homogeneizando vigorosamente mediante el uso de vortex. Luego se añaden 200µL de cloroformo, se vortexea la muestra y se la incuba 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga a 12.000 g por 15 minutos a 4°C. La fase acuosa obtenida se pasa a un tubo limpio y se precipita el ARN añadiendo 0,5mL de isopropanol, mezclando por inversión e incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a esto se centrifuga nuevamente en las mismas condiciones por 10 minutos y se descarta el sobrenadante de manera de quedarse solo con el ARN que se encuentra en el pellet. Para lavar el pellet, se añade 1mL de etanol 75% y se centrifuga a 7.500g por 5 minutos a 4°C. Se descarta el etanol y se deja secar el pellet. Como último paso se resuspende el pellet en H₂O libre de ARNasas y se incuba por 10 min a 60°C.

Una vez realizada la extracción se debe mantener en hielo o se guarda a -20°C.

Para la cuantificación y evaluación del ARN de calidad, se mide la absorbancia a 260nm y la relación 260/280 para la pureza del mismo. En este caso se utilizó el equipo de cuantificación de ARN Nanodrop.

Síntesis de ADNc

Luego de la extracción de ARN se procede a la obtención de ADNc a partir del mismo. Para dicha síntesis se realizan dos mix. El mix 1 consta de entre 200 - 500 ng de ARN, 2µL de dNTPs 10 mM (Sigma Aldrich, D7295), 2µL de Oligo dTs y 10µL de H₂O libre de ARNasas. Dicho mix se incuba a 65°C por 5 minutos y posteriormente se deja en

hielo. El mix 2 consta de 8 μ L de 5X First Strand Buffer (Invitrogen), 4 μ L de DTT 0,1M (Invitrogen), 2 μ L de H₂O libre de ARNasas. Se mezcla el mix 1 con el mix 2 e incuba a 37°C por 2 minutos. Posteriormente, se agrega 1 μ L de enzima M-MLV (NZYTECH) y se realizan dos incubaciones. La primera de 50 minutos a 37°C y la segunda 15 minutos a 70°C. El ADNc obtenido se guarda a -20°C para su posterior uso en los estudios de PCR semicuantitativa y en tiempo real.

Reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa y en tiempo real

Las diferentes PCR se realizaron a partir del ADNc obtenido en el paso anteriormente mencionado. Para ello, en el caso de la semicuantitativa se realiza el ciclado que se detalla en la siguiente tabla.

Tabla 4. Condiciones de reacción para PCR semicuantitativa

Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Inicial	95°C	5 minutos	
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30 ciclos
Annealing	59°C	30 segundos	
Extensión	72°C	1 minutos	

Extensión final	72°C	10 minutos	
-----------------	------	------------	--

En cuanto a la mix de PCR se realizó de manera de tener una reacción de volumen final de 25 μ L. La enzima utilizada fue la Taq DNA Polymerase (NZYTECH).

Tabla 5. Máster Mix de la reacción de PCR semicuantitativa

Reactivos	Volúmenes
Buffer 10X	2.5 μ L
MgCl ₂ 50mM	1.25 μ L
dNTPS 10mM	0.75 μ L
Primer FOR 10 μ M	1.25 μ L
Primer REV 10 μ M	1.25 μ L
Taq DNA polimerasa NZYTECH	0.25 μ L
ADNc	1.00 μ L
H ₂ O libre de DNasas	16.75 μ L
Volumen final	25 μ L

Los cebadores utilizados para las distintas amplificaciones de las proteínas son los siguientes.

Tabla 6: Cebadores específicos para la amplificación de las diferentes isoformas de MSI2

Cebador	Tipo	Secuencia 5'-->3'	Tamaño del producto
MSI2 Total	Forward	GGTCATGAGAGATCCCACTACG	75 pb
	Reverse	TCTACACTTGCTGGGTCTGC	
MSI2 a	Forward	TTCATGCTTGGCATGGGGAT	174 pb
	Reverse	CGGGTTGGAGCCTGATCCT	
MSI2 b	Forward	TGACATCGGTGCTCACTTCT	191 pb
	Reverse	GTCTGCGAACGTGACGAAAC	
MSI2 c	Forward	AGGAGCGCCAGGGTTAAAAT	160 pb
	Reverse	CGAACGTGACGAAACCGAAG	
MSI2 a-d	Forward	TATGGAGGCAAATGGGAGCC	109 pb
	Reverse	GCTATCTGGTGAGGTCTGCC	
β-actina	Forward	AGTCATTCCAAATATGAGATGCGTT	123 pb
	Reverse	TGCTATCACCTCCCCTGTGT	

A continuación, se muestra donde se unen los pares de cebadores mencionados anteriormente en cada una de las secuencias nucleotídicas.

Homo sapiens musashi RNA-binding protein 2 (MSI2), transcript variant 1, mRNA
(isoforma a)

CTCGCCGCTGCCCCGGCTCCGCCGCTCGCAGAGAGATTTCGGAGGAGCCCCGGGCGGGGGGAGGAGGAGGGG
GAGGAGGGAGCGGAGATCTCGGGGCTCGGAGCCGGCCGCGCTCCGCTCCGATCGCTGTGGGGCTTGTTTT
TTTTGGGGTGGGGGGCGGGGGGGCTCAGATATGGAGGCAAATGGGAGCCAAAGGCACCTCGGGCAGCGCCA
ACGACTCCCAGCACGACCCCGGTAAAATGTTTATCGGTGGACTGAGCTGGCAGACCTCACCAGATAGCCTT
AGAGACTATTTTAGCAAATTTGGAGAAATTAGAGAATGTATGGTCATGAGAGATCCCCTACGAAACGCTC
CAGAGGCTTCGGTTTCGTCACGTTCCAGACCCAGCAAGTGTAGATAAAGTATTAGGTCAGCCCCACCATG
AGTTAGATTCCAAGACGATTGACCCCAAAGTTGCATTTCTCGTCGAGCGCAACCCAAAGATGGTCACAAGA
ACAAAGAAAATATTTGTAGGCGGGTTATCTGCGAACACAGTAGTGGAAGATGTAAAGCAATATTTTCGAGCA
GTTTGGCAAGGTGGAAGATGCAATGCTGATGTTTGATAAACTACCAACAGGCACAGAGGGTTTGGCTTTG
TCACTTTTGAGAATGAAGATGTTGTGGAGAAAGTCTGTGAGATTCATTTCCATGAAATCAATAATAAAATG
GTAGAATGTAAGAAAGCTCAGCCGAAAGAAGTCATGTTCCACCTGGGACAAGAGGCCGGGGCCCGGGGACT
GCCTTACACCATGGACGCGTTTCATGCTTGGCATGGGGAATGCTGGGATATCCCAACTTCGTGGCGACCTATG
GCCGTGGCTACCCCGATTTGCTCCAAGCTATGGCTATCAGTTCACAGGCTTCCCAGCAGCGGCTTATGGA
CCAGTGGCAGCAGCGCGGTGGCGGCAGCAAGAGGATCAGGCTCCAACCCGCGCGGCCCGGAGGCTTCCC
GGGGCCAACAGCCCAGGACCTGTCGCCGATCTCTACGGCCCTGCCAGCCAGGACTCCGGAGTGGGGAATT
ACATAAGTGGCGCCAGCCCACAGCCGGGCTCGGGCTTCGGCCACGGCATAGCTGGACCTTTGATTGCAACG
GCCTTTACAAATGGATAACCATTGAGCAGGTGCTTTTCGTTGCCATCTCACTCTGAGAGCATACTGGATGTC
CAGGCAAGACTGGGCGAAGTTTCTGAGTGGCCCTTTGTTTAGGTGATGTCCTCAGACCTGGACCCCCACCA
GCCTCACTCCCCATCCCAACCAGAGATGGCTCACTTCGGATCGAGGGTTGACTACATCTCATCATCTCACG
AATCTGCTGTAATATAAGACAACAGCTTTTAAATGTGTATATAACCCATGATTTCCGTTTTGTTTTGTTTT
GTTTTTCTTGATGGTTTTCCCTCTCCCTCCCTCTCTTCCATTCTCCTTTTAAATCTCTTTGAATCACATTT
GGTAGTGAATTTGACTTAGTCCAGTAGTCACATAGCTTTAATATCTAGTTCAAAGCTAACCATAGTATAAT
TGTTATATTAAGGAGTTAT

Homo sapiens musashi RNA-binding protein 2 (MSI2), transcript variant 2, mRNA
(isoforma b)

GCTTTCCTTTTAGCTTTTGTAAAGTTACACGTCAAATGGCCGATCTGACATCGGTGCTCACTTCTGTTATG
TTTTCTCCCTCTAGTAAAATGTTTATCGGTGGACTGAGCTGGCAGACCTCACCAGATAGCCTTAGAGACTA
TTTTAGCAAATTTGGAGAAATTAGAGAATGTATGGTCATGAGAGATCCCCTACGAAACGCTCCAGAGGCT
TCGGTTTCGTCACGTTTCGCAGACCCAGCAAGTGTAGATAAAGTATTAGGTCAGCCCCACCATGAGTTAGAT
TCCAAGACGATTGACCCCAAAGTTGCATTTCTCGTCGAGCGCAACCCAAAGATGGTCACAAGAACAAGAA
AATATTTGTAGGCGGGTTATCTGCGAACACAGTAGTGGAAGATGTAAAGCAATATTTGAGCAGTTTGGCA
AGGTGGAAGATGCAATGCTGATGTTTGATAAACTACCAACAGGCACAGAGGGTTTGGCTTTGTCACTTTT
GAGAAATGAAGATGTTGTGGAGAAAGTCTGTGAGATTCATTTCCATGAAATCAATAATAAAATGGTAGAATG
TAAGAAAAGCTCAGCCGAAAGAAGTCATGTTCCACCTGGGACAAGAGGCCGGGGCCCGGGGACTGCCTTACA
CCATGGACGCGTTTCATGCTTGGCATGGGGATGCTGGGATATCCCAACTTCGTGGCGACCTATGGCCGTGGC
TACCCCGGATTTGCTCCAAGCTATGGCTATCAGTTCCCAGACTATTTGCCGGTTTTACAAGACATAATTTT
TATCAACTAGCTCTTAAGAGAGGCATAGCAAAGTGGGGTTGCTACCATTTCTAGAGAGAGAGGACACAGT
CCCGGCTGGGCTGCCCCGCTCCAGTCAATGCTCACTGAAAGTCTGTCTTAGCTGCCTGTTTGAATGACT
GTTCTTTTTCTCATTTTTAATTTCTGGACTCATGTCTCATGCTTCACTCAATTAATAAAAAAATTTATTCT
CCAGTCCCCCTCCACTTTGCTTCTTGTATGCATTTGTGACCGACCCCACTTCCCTCAGAATGTAACGGGGCCA
GAGGGAAACTTCTCACAAACTTCGTAGAGCCTCCTCAGGGGAAGCTAGGAAGAAGACATCAAATGTTTTTA
AGTCATGACCAAACAGGCTTGTGGGGACATATCATGGGGTGGGCTTTGAAGTGTGGTGGTCCAGAGGGG
TTGCAGATACGTGACTTGGAGCACCCGTGTCTTACGATGGACAGTGATAAAGGTGAACACACAGAGACAGA
CTATTCTTAAGAATGTGAGAAACCTGATCTGGAAGAGGAGCTATATAAACACTATCTGACTATCTTTGTC

TTTTGGGGCCAGTGGCTGTTGGCATAATCACAAGCCTGTCTGTCTTCGAGAAGGGACAGTGGAGTCATCCA
 GGTGCTGCCACATGACAGGCACGGTGGGCACCGATCCACAGTGGGCCCCGCCTTCCCCAGCTCGCCTCCCT
 GCCTGTGCTGGCCTGGCCTTGCTGCTGGCACCATTGGAGTAGGAGGGGGTGGAAACACAGGGGGCCATCC
 TGATCAGGCCCCATCTCAAGGTTGGCACTCCTGCCCATCACCTTAGAAGGATCTTTCCCATGGCTTGAC
 TTCTTCATTTCCCTAACTGAAAACACCCACTCTCTTGGAAATAATGACGTACCACTCAGTTGGACCCTCA
 AGAGTCACTGCTTTGTCTGTGCTGGTAGTTTGTGAGAAGTGACCCGCACGCTTCCATTTGATGCATTTGAT
 GTGAGTGAATCCATACATTTGAATGTCATTGTCCTTGAGACCCTACATGTGCAGTTTGGCTCATCTCATT
 AAGATGCTTGATGTAATAATTGGTAGTTTCCTTTTATTTTCTGCAGGCTTTTCCATGAGTATTATTTTT
 TTCAAAGAACAAATCTGTATGGCTTTTCCCATCTCCATATTTTGTGTTTGTATGAATTGCTTTGCTTTGG
 TGAACCTGTCCTAGTATGCTTGCCTCACAAACGTTTTAGCCATTGTGAATTTTCTTCATCTCTGAAATAG
 TTCATCTGTGCTTCTCCCTGATGACGTTTTATTTTTTTTCCCCTGTAAGCAACCGAGGTAGAAAAATAAT
 TGTTTACCATGGAAAAAAA

Homo sapiens musashi RNA binding protein 2 (MSI2), transcript variant 3, mRNA (isoforma c)

AGAGCCAGAGAGAACTTCCAGCGCAAAGGAAAATAAACTTGTGGCTGGTGTGTTGTGCAGGAGGGTCTCC
 GCCATCCTGAAGCCCCCGATCCTGGGGCGTCTCGGGGGCCGCCAAAGGAGCGCCAGGGTTAAAAATGTTTA
 TCGGTGGACTGAGCTGGCAGACCTCACCAGATAGCCTTAGAGACTATTTTAGCAAATTTGGAGAAATTAGA
 GAATGTATGGTCATGAGAGATCCCACTACGAAACGCTCCAGAGGCTTCGGTTTCGTCACGTTCCGAGACCC
 AGCAAGTGTAGAATAAAGTATTAGGTCAGCCCCACCATGAGTTAGATTCCAAGACGATTGACCCCAAAGTTG
 CATTTCCCTCGTCGAGCGCAACCCAAGATGGTCACAAGAACAAGAAAATATTTGTAGGCGGGTTATCTGCG
 AACACAGTAGTGGAAGATGTAAAGCAATATTTGAGCAGTTTGGCAAGGTGGAAGATGCAATGCTGATGTT
 TGATAAAACTACCAACAGGCACAGAGGGTTTGGCTTTGTCACTTTTGGAGAATGAAGATGTTGTGGAGAAAG
 TCTGTGAGATTCATTTCCATGAAATCAATAATAAAATGGTAGAATGTAAGAAAGCTCAGCCGAAAGAAGTC
 ATGTTCCCACCTGGGACAAGAGGCCGGGCCGGGGACTGCCTTACACCATGGACCGGTTTATGCTTGGCAT
 GGGGATGCTGGGATATCCCAACTTCGTGGCGACCTATGGCCGTGGCTACCCCGGATTTGCTCCAAGCTATG
 GCTATCAGTTCCCAGGCTTCCCAGCAGCGGCTTATGGACCAGTGGCAGCAGCGGCGGTGGCGGCAGCAAGA
 GGATCAGTCCGTAATAGCTACAGTGTCAACCGAATTTTGGCGCGCCGCTTCCCCGGCAGGCTCCAACCC
 GCGCGGCCCGGAGGCTTCCCCGGGGCCAACAGCCCAGGACCTGTCGCCGATCTCTACGGCCCTGCCAGCC
 AGGACTCCGGAGTGGGAATTACATAAGTGCGGCCAGCCCACAGCCGGGCTCGGGCTTCGGCCACGGCATA
 GCTGGACCTTTGATTGCAACGGCCTTTACAAATGGATAACCATTGAGCAGGTGCTTTTCGTTGCCATCTCACT
 CTGAGAGCATACCTGGATGTCCAGGCAAGACTGGGCGAAGTTTCTGAGTGGCCCTTTGTTTAGGTGATGTC
 CTCAGACCTGGACCCCAACAGCCTCACTCCCCATCCCAACCAGAGATGGCTCACTTCGGATCGAGGGTTG
 ACTACATCTCATCATCTCACGAATCTGCTGTAATATAAGACAACAGCTTTTAAATGTGTATATAACCCATG
 ATTTTCGGTTTTGTTTTGTTTTGTTTTCTTGATGGTTTTCCCTCTCCCTCCCTCTCTTCCCATCTCCTTTT
 AAATCTCTTTGAATCACATTTGGTAGTGATTTTACTTAGTCCAGTAGTCACATAGCTTTAATATCTAGTT
 CAAAGCTAACCATAGTATAATTGTTATATTAAGGAGTTATTTTTTCTTAAAACATTTTTTTTTGCTTGTTT
 TGGTTCTGTTCTCACTTTTAAAGGATGCTGAGATGGTAATATGACTCTCCATATTTTGGTACCAATTCTGA
 GACTGTATGAATTTTCAAGGTGGAACTTTAGCACACACTGAAGCAAAGTTGTGAAGTGCAGGGCGGGAGGTG
 GGCGTGAGCTTTCTATTTTGCCTTGTAGAAGAAGTGAGATGTAGTAAGCTAATTAACAGACTTTCTAGCAG
 TTCTTTTTGTGATGTCTCTTTGTTAATCTGAGTCTATCTATTTTCGGCAATAAGGTAAGGACGACAGTGTT
 TTGAGTGTCTCTTTTCTATAAGTGCTTTTTTTCTGTGAAAGAGGTGATATTATAAGGTTTTTTTGAAT
 TGTGAATCTAAAAAAGAAATGTTGTAATACAATTCATTAACATACATAGAAACTATTAAGAAAGAGAGA
 ATCAAAAATATTTTTGTGAGGGAGTCGGTCCCAGGCAGTTTATGCTCTGTGGAAGGAGGCGGGAAGGGAA
 CGTTGGCCAAGTCAGTTACTGAGATGAAGATCGCCCAGCTGCCAGGACCACCCAGGACAAGTTAGAGCAC
 TGTTTAGCTCCTTTGTCTGTGTGATAGACCTAAGAAGTGTATTAGTGTGTACCAGCCTATTAACCTCTTG
 TCTGTGCACAGCTTCAAATGTTACCGTCTAGTTAGATTTTTATTTAAAATATGAAAAACTGCTTTTTCCCAA
 GATGTTTTTTAAAACAAAGCTACAATTTTAATATTTAACATATTTAAAGTTTCAAAGCACACCTGTTTGG
 CTTGGGTGGGGTGGGGTGGGGGGACATTCTTTTTTTCAGTCTTAATTTTTAAATATTTGATCATTCTTCTAT

TGTCCAATCATTTTCAGCACCTCCAAAGGTCCCTAGGACACTTTGCCTCTCTTCTCCCCCTGCCCCCACCC
TGCTCCCACATCTGGGGGCCCATGGGCCAGGAGTGGATAAGCCTGCATTAATAACAACCTTTCTCCATTAC
TTTCTATTTACAAATTAGGAAAGCAACCTTTTGGTTTATATATATTTTTTTTTTAATACCTCAGTGCTGCAAG
TATCACCAGAGAGGCTATGGAAGAAATTTTTTTTTTAATTTATTGTAGATGTAAACAGAATTTTAAAAATAAA
AAGTATAAACATCACTGCACTGTGACTGGTGGGAAAAACTGACAGTTTCTCTTTGCACATGTTTAAACATT
TGGCTGTTATAATATATGGTCCCTCGGTTGGGAAAGATACTTATGATGAAGGATATTTTTTAAATTTAACTT
TTTTTTAAATATTGGTAATAGGTCGGCAACAGCAACTATAGAAGTACAACCTCAATAGATGGCATTAAAACA
TATTGTAGTGTGGATATATATTTTTCTTTTTTAAAATGTGATATTGACGTTTTTATTAATTTTTTTAAAT
TGTTACGTTTATAAATTTGGTACTTAAGGCACAGCCAGTATGAGACACTGAATGCGACATTTATTATAAAG
AGCTGCTGCACTCCTATTTTTATAAATTTTACTAACAAAGTAGACTAATGTAGACATTCACAGACATGGTA
GGGCAAAAGCATCTTCAAACATAAAGACTCCAAAATGCTAACTCAGAAAGAAAGAAAAAACCCGTTTTCAAT
TCTAATGAAACAGCAACAACATTTTTTTTTTAATTAATAAAAAAAATCATGTTCTTTGTTTTTCTAATAAAATG
TTAGGTTGTTTGGTGAGGTTTTTTTTGTTGTTTTTTTTCTTTCTTTGTTTTCTTTTTCTTTTCCCCAAACAAC
CAGATTAAATGCTGAGCGCTTTTTAAAATATCAAAACTTGTTCAGTCATAAAACAACAAAACATAAGTTTT
ATTTAAAAAAGAAAGAAAGAAAAATAGTAAATTCAGTAAATTCAGTGTAGACGAGGGAATTTAA
TTCTATTTTGTCCATGTTGGTGATGTACTGTACTTCCCTTCTCTGATCCCCATCACCTCATA
GAAGACTCTTTGTTGATCATTGTATGTTAATAATGTATAAAATGGCTATCTTGTAAGCGTGCTGCTCCTGGT
ACTAGTGTAGCGACTTTTTTTCTCTCTTTCTTAGTACATATTGATAGGTATAACATAATTAAGGTTTA
AAAAAATTAGACATAGTTATTCAGATTTAGGACCAGTAAGGATAGAACTTTCTCTTATTTATGAAAAAA
ATGCTAATAATTTGGGGCAGTTTTTTCTTTAATTAATTTTTTTCAATTTCAAGTTTAAATTTATTTTAGC
TGATCTGATGTGGTTTTCAACTAACCCAAGGTCTCACCATGTTAAAATGCCGGCGGACTCTACGGCGTTTTG
TAGATCCCCCCCCCCCCACCCACTGTGAAGGGGTGCCATACTACCTTAAATGCTAATGCTAGATATGCAAA
ACTGGATTTTTTTAAATTTATTTTTTAAAAGAGGGAGGCATGGTATATTAATGATTTTACTAAGAGAAAA
AATATTTTTTTAAGAATGCTCAGAAGAAATGATAATCTGTGTGAATATGTTTTAGATGTTTATATACCTT
TTGAAGAGACCCAGTAGCCCATAGCACAAATCTTGTGGAAATCCGATATGTTTTAATGTGGCTACCTAGGT
TTAAGGTTACGTTAGTCCCCCATTCATCTAGAAAGTCCATTTTGAAAGATTTTTGTAAATTTCTTTAAC
ACTGATGTTTCAGCCTCGTCTTTGTTTCAGTTAAGCTCAATGGCGAACATGGGAACCACCTTTCGCCTTCC
CTGGGGGAGAAACCCTCTTGGCTGATGGCTTTTTCCCCGGAATTATCAAACAGCCACCGGGTGACTTTCTGG
CTTCCAGATCCATCTGCCTGAGACCCCCGAACCTCTCTCCTCCAAGCAGAGGGCGAGTGAGTGGCATTAGC
TCCCCGACCCATTCCCGGTCTAGCTGGGCATGGGGCTGACGGAGATGACCAAGCCTTGGTCTGCTCTCTA
GCAGCTTCCACAGACTTGGCTCGTGGCCTTCTTATATCCACTGGGAACAAACAGCCTCGCGCTCTATACC
AAACAGCCTCGCGCTCTATCCAGTCGCCATTAGCTTGATTCAAACAAAGCCCCAGCAGGCCTTTGCGTT
TTTATCCTTCATAACCTTCATCTTAATTTGAACCTGTAGCTTGGACTTTAAGGTAGCATGGCTCTATTGCT
GTCAATTTACTGTTTCACTGCACAGCAATCACAGCCAGTGAATGTTACACACATCTTGCTAGACTAGTATA
AAAATCATGGGTAATGTTGGTTCTAATGACCTGAAAGGTGTTTCAGTTTTTGTCTTGGTTTTGTTTTGT
TTTTGATTTCTTGGGGGTGGGTTTTGCTTGTGTTTCCTTTTTCAATTTGGGGGTTTTTGGGAAAAAATTTAT
TTTTGGTTCCAAATAGAAAAACAAAACCTATTTTGATCTTTAGTGCAAACGAGGGCTAGGGACTTAGCCTC
CTCCACCACCTCCACACTGCTTCATTTCTGCCATTCACTCACTGCAGCATATTCAAGAATAAAGCAATATCG
TTTACTACATTTTTTATTGAAGGTCAGCCATGCTTTCTGTATTATATTGCATATGAAATGTTTTACAAAAG
AAACACTAACTCATACTTCTCTTTATTGGTTGCAAGTGGCACGCAGGAACAGAGGGAGAGTGGGGGGCTGG
TGGGGGAGGGGAGATTTTTTTTTTTTTTTTCTTGAATGTGCTTCGCAAGCCAGGCTATCTTCCAAGGAAGGC
AGACAGTGGGAGAGCAGAGGGACTGACTGCAGGCAAGCACATTGAAGAAAGACACTGGCGGGTTTTCCCCAC
CCTCACCCCAAAGCAGAAAACCTAGCAGACGTCAGCTCAGCCCCGTCTGGGCACAGACACTACACAAGGAG
ACGCTGGAAGTTAAGCAATACTTTAATACTGTAATATGTTTGTCTTTTTCTTTTCTTTTTTTTTTCTACCA
AAAAAAGTAAGTAACTAAAACACAAAACATATAAAATAAATCCATCCCTCTTGTGGGGACCTGCAGG
GGGGCAACCTTAATCCAAACACCTGGCTATCAAATAATCAGAATGTATTGTCTCAGACAGGATTTAGTTT
CGGGAGGCAGGGGCATGATGGGGGAGGGGGCCGGAGGCTGAGAGACAAAAGTTCCAGAGCCTCCCTCGAAG
GTTCTCTACTACTGTATTCTGTACATAATGTACCATCCCATGTGGAATCTGTGAGTGTCTCTTAAGTAGC
GTGGGCTAGCCAATCTGCCGTTTCATGGTGTATTGTAACCTCCGAATTCATATGTAATAGGATGCAAGTCT
AAGCGTTTTTCATGTGGACATAAATGTATCTAAATAAACTTTCCCTAGCACTGTGGCTGACCTCACCTTAC

TTTTTACTTTTAGTATGAAACTGATGAGAAGCTTTGGTAGTGAGTATTTTTTTTTATATATATACATATATAT
 GACTATCTATATATATATCTCAAGCATCTTTCAGGTCTTTGTGTGTGGCTTTCTTAAAGCCCTGTTGTAA
 AAAATTACTATGTGGATGGCAGTCTCTCACATCACAGATGTGGAAAGTATAATTTTTATATTTGTATTTTCA
 AATAAATAAGTTTGTGAAAGGTTTCCATCCTCTACTGTGGTCCAGAAATCAATGTGTTTGTCTGACAAAA
 AAAAAATAAATAAATAAATAAAGTGTTTTGAACAGA

Homo sapiens musashi RNA binding protein 2 (MSI2), transcript variant 4, mRNA (isoforma a-d)

GTGCGAGGCAGCGGGCTGAGCTAAGCCGAGCCACGTGTGACGGCTCTCGCCGCTGCCCCGGCTCCGCC
 GCTCGCAGAGAGATTTCGAGGAGCCCGGGCGGGGGGAGGAGGAGGGGAGGAGGGAGCGGAGATCTCGG
 GGCTCGGAGCCGGCCGCGCTCCGCTCCGATCGCTGTGGGGCTTGGTTTTTTGGGGGTGGGGGGCGGGG
 GGGCTCAGATATGGAGGCAAAATGGGAGCCAAAGCACCTCGGGCAGCGCCAACGACTCCCAGCACGACCC

GGTAAATGTTTATCGGTGGACTGAGCTGGCAGACCTCACCAGATAGCCTTAGAGACTATTTTAGCAAAT
 TTGGAGAAATTAGAGAATGTATGGTCATGAGAGATCCCCTACCAGAACGCTCCAGAGGCTTCGGTTTTCGT
 CACGTTCCAGACCCAGCAAGTGTAGATAAAGTATTAGGTCAGCCCCACCATGAGTTAGATTTCCAAGACG
 ATTGACCCCAAAGTTGCATTTCTCGTCGAGCGCAACCCAAGATGGTCACAAGAACAAGAAAATATTTG
 TAGGCGGGTTATCTGCGAACACAGTAGTGGAAGATGTAAAGCAATATTTGAGCAGTTTGGCAAGGTGGA
 AGATGCAATGCTGATGTTTGTATAAACTACCAACAGGCACAGAGGGTTTGGCTTTGTCACTTTTGAAGT
 GAAGATGTTGTGGAGAAAGTCTGTGAGATTCATTTCCATGAAATCAATAATAAATGGTAGAATGTAAGA
 AAGCTCAGCCGAAAGAAGTCATGTTCCACCTGGGACAAGAGGCCGGGGCCCGGGGACTGCCTTACCCAT
 GGACGCTTCATGCTTGGCATGGGGATGCTGGGATATCCCAACTTCGTGGCGACCTATGGCCGTGGCTAC
 CCCGGATTTGCTCCAAGCTATGGCTATCAGTTCCAGACTATTTGCCGGTTTACACAAGACATAATTTTTTA
 TCAACTAGCTCTTAAGAGAGGCATAGCAAAGTGGGGTTGCTACCATTTCTAGAGAGAGAGGACACAGTC
 CCGGCTGGGCTGCCCCGCTCCAGTCAATGCTCACTGAAAGTCTGTCTTAGCTGCCTGTTTGAATGACT
 GTTCTTTTTCTCATTTTTAATTTCTTGGACTCATGTCTCATTTGCTTCACTCAATTAATAAATAATTTATTC
 TCCAGTCCCCTCCCCTTTGCTTCTTGTATGCATTGTGACCGACCCCACTTCCCTCAGAAATGTAACGGGGC
 CAGAGGGAACTTCTCACAACCTTCGTAGAGCCTCCTCAGGGGAAGCTAGGAAGAAGACATCAAATGTTT
 TTAAGTCATGACCAAACAGGCTTGTGGGGACATATCATGGGGTGAGCTTTGAAGTGTGGTGGTCCAGA
 GGGGTGCAGATACGTGACTTGGAGCACCCGTGTCTTACGATGGACAGTGATAAAGGTGAACACACAGAG
 ACAGACTATTTCTTAAGAATGTGAGAAACCTGATCTGGAAGAGGAGCTATATAAACACTATCTGACTATC
 TTTGTCTTTTGGGGCCAGTGGCTGTTGGCATAATCACAAGCCTGTCTGTCTTCGAGAAGGGACAGTGGAG
 TCATCCAGGTGCTGCCACATGACAGGCACGGTGGGCACCGATCCACAGTGGGCCCCGCTTCCCCAGCTC
 GCCTCCCTGCCTGTGCTGGCCTGGCCTTGCCTGCTGGCACCATTGGAGTAGGAGGGGGTGGAACACAGGG
 GGCCCATCTGATCAGGCCCATCTCAAGTTGGCACTCCTGCCATCACCCCTTAGAAGGATCTTTTCCC
 ATGGCTTGACTTCCCTCATTTCCCTAACTGAAATACACCCACTCTCTTGAATAATGACGTACCACTCAG
 TTGGACCTCAAGAGTCACTGCTTTGTCTGTGCTGGTAGTTTGTGAGAAGTGACCCGCACGCTTCCATTT
 GATGCATTTGATGTGAGTGAATCCATACATTTGAATGTCATTTGCTTGGAGACCTACATGTGCAGTTT
 GCTCATCTCATTAAAGATGCTTGATGTAATAATTGGTTAGTTTCCCTTTTATTTTCTGCAGGCTTTTCCA
 TGAGTATTATTTTTTTCAAAGAACAATCTGTATGGCTTTTCCCCTCCTCATATTTGTTTTGCTATGA
 ATTGCTTTGCTTTGGTGAACCTGTCTAGTATGCTTGCCTCACAACGTTTTTAGCCATTTGTGAATTTTCT
 TCATCTCTGTAAATAGTTCATCTGTGCTTCTCCCTGATGACGTTTTATTTTTTTTCCCCTGTAAGCAAC
 GAGGTAGAAAAATAAATTGTTTACCATGGA

Homo sapiens actin beta (ACTB), mRNA (β -actina)

ACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACCCG
 CCGCCAGCTCACCATGGATGATGATATCGCCGCGCTCGTCGTGACAACGGCTCCGGCATGTGCAAGGCCG
 GCTTCGCGGGGACGATGCCCCCGGGCCGTCTTCCCCTCCATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGCGTG
 ATGGTGGGCATGGGTGAGAAGGATTCCTATGTGGGCGACGAGGCCAGAGCAAGAGAGGCATCCTCACCCCT
 GAAGTACCCCATCGAGCACGGCATCGTCACCAACTGGGACGACATGGAGAAAATCTGGCACCACACCTTCT
 ACAATGAGCTGCGTGTGGCTCCCAGGAGCACCCCGTGTCTGCTGACCGAGGCCCCCTGAACCCCAAGGCC
 AACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCCATGTACGTTGCTATCCAGGC
 TGTGCTATCCCTGTACGCTCTGGCCGTACCACTGGCATCGTGATGGACTCCGGTACAGGGGTACCCACA
 CTGTGCCCATCTACGAGGGGTATGCCCTCCCCATGCCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACCTG
 ACTGACTACCTCATGAAGATCCTCACCGAGCGCGGTACAGCTTACCACCACGGCCGAGCGGAAATCGT
 GCGTGACATTAAGGAGAAGCTGTGCTACGTCGCCCTGGACTTCGAGCAAGAGATGGCCACGGCTGCTTCCA
 GCTCCTCCCTGGAGAAGAGCTACGAGCTGCCTGACGGCCAGGTCATCACCATTGGCAATGAGCGTTCCGC
 TGCCCTGAGGCACTCTTCCAGCCTTCTTCCCTGGGCATGGAGTCTGTGGCATCCACGAACTACCTTCAA
 CTCCATCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGCAAAGACCTGTACGCCAACACAGTGCTGTCTGGCGGCACCA
 CCATGTACCCTGGCATTGCCGACAGGATGCAGAAGGAGATCACTGCCCTGGCACCCAGCACAATGAAGATC
 AAGATCATTGCTCCTCCTGAGCGCAAGTACTCCGTGTGGATCGGCGGCTCCATCCTGGCCTCGCTGTCCAC
 CTTCCAGCAGATGTGGATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCGGCCCCCTCCATCGTCCACCGCCAATGCT
 TCTAGGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACACCCTTCTTGACAAAACCTAACCTGCGCAGAAAACAAGAT
 GAGATTGGCATGGCTTTATTTGTTTTTTTTGTTTTGTTTTGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGCTTGACTCAGG
 ATTTAAAAACTGGAACGGTGAAGGTGACAGCAGTCGGTTGGAGCGAGCATCCCCAAAGTTCACAATGTGG
 CCGAGGACTTTGATTGCACATTGTTGTTTTTTAATAGTCATTCCAAATATGAGATGCGTTGTTACAGGAA
 GTCCCTTGCCATCCTAAAAGCCACCCCACTTCTCTAAGGAGAATGGCCCAGTCCCTCTCCCAAGTCCACA
 CAGGGGAGGTGATAGCAATTGCTTTCGTGTAATTATGTAATGCAAAATTTTTTTAATCTTCGCCTTAATAC
 TTTTTTATTTTGTATTTTGAATGATGAGCCTTCGTGCCCCCCCTTCCCCCTTTTTTGTCCCCCAACTT
 GAGATGTATGAAGGCTTTTGGTCTCCCTGGGAGTGGGTGGAGGCAGCCAGGGCTTACCTGTACTGACTT
 GAGACCAGTTGAATAAAAAGTGCACACCTTAAAAATGA

Figura 3. Secuencia nucleotídica de cada variante de MSI2 (ARNm). Se puede observar de color cada secuencia en donde son complementarios los oligos correspondientes, descritos en la Tabla 6.

a	MEANGSQGTSGSANDSQHDPGKMF	IGGLSWQTS	PDSL	RDYFSKFGEIRECMVMRDPTTKR	60
b	MA----	D	TSVLT	SVMFSPSSKMF	IGGLSWQTS
c	-----	---	---	FIGGLSWQTS	PDSL
d	MEANGSQGTSGSANDSQHDPGKMF	IGGLSWQTS	PDSL	RDYFSKFGEIRECMVMRDPTTKR	60

a	SRGFGFVTFADPASVD	KVLGQPHHELD	SKTIDPKVAF	PRRAQPKMVTRTKKIFVGGLSAN	120
b	SRGFGFVTF	ADPASVD	KVLGQPHHELD	SKTIDPKVAF	PRRAQPKMVTRTKKIFVGGLSAN
c	SRGFGFVTF	DPASVD	KVLGQPHHELD	SKTIDPKVAF	PRRAQPKMVTRTKKIFVGGLSAN
d	SRGFGFVTFADPASVD	KVLGQPHHELD	SKTIDPKVAF	PRRAQPKMVTRTKKIFVGGLSAN	120

a	TVVEDVKQYFEQFGKVEDAMLMFDKTTNRHRGFGFVTF	FENEDVVEK	VCEIHFHE	INNKMV	180
b	TVVEDVKQYFEQFGKVEDAMLMFDKTTNRHRGFGFVTF	FENEDVVEK	VCEIHFHE	INNKMV	176
c	TVVEDVKQYFEQFGKVEDAMLMFDKTTNRHRGFGFVTF	FENEDVVEK	VCEIHFHE	INNKMV	158
d	TVVEDVKQYFEQFGKVEDAMLMFDKTTNRHRGFGFVTF	FENEDVVEK	VCEIHFHE	INNKMV	180

a	ECKKAQPKEVMFPPGTRGRARGLPYTMDA	F	MLGMGLGY	PNFVATYGRGYPGFAPSYGYQ	240
b	ECKKAQPKEVMFPPGTRGRARGLPYTMDA	F	MLGMGLGY	PNFVATYGRGYPGFAPSYGYQ	236
c	ECKKAQPKEVMFPPGTRGRARGLPYTMDA	F	MLGMGLGY	PNFVATYGRGYPGFAPSYGYQ	218
d	ECKKAQPKEVMFPPGTRGRARGLPYTMDA	F	MLGMGLGY	PNFVATYGRGYPGFAPSYGYQ	240

a	FPGF	PAAAYGPV	AAAAVAAARG	-----	SGSN
b	FPDYLPVSQDIIFIN	-----	-----	-----	-----
c	FPGF	PAAAYGPV	AAAAVAAARGSVLNSYSAQPNFGAPASPAGSN	PARPGGFPGANSPGPV	278
d	FPDYLPVSQDIIFIN	-----	-----	-----	255
	**.	:	.	.	:
a	ADLYGPASQDSGVGNYS	SAASPQPGSGFGHGIAGPLIATAFTNGYH	328		
b	-----	-----	251		
c	ADLYGPASQDSGVGNYS	SAASPQPGSGFGHGIAGPLIATAFTNGYH	324		
d	-----	-----	255		

Figura 4. Alineación de isoformas de la proteína MSI2. El amplicón MSI2a se representa en azul, MSI2b en rojo, MSI2c en verde y MSI2a-d en naranja.

Una vez realizada la amplificación, los productos obtenidos se visualizaron en gel de agarosa 2% en buffer TAE 1X. Al momento de ser preparado, al gel se le agrega una gota de agente intercalante, en este caso Bromuro de etidio. Las muestras de ADN se cargan en el gel con buffer de carga Gel Loading Dye Purple (6X) (NEB®, B7024S) y un marcador de peso molecular Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder.

Las muestras se corren en cuba electroforética a 100V por aproximadamente 40 minutos en buffer de electroforesis TAE 1X. La visualización del gel se realiza mediante el uso de un transiluminador.

Para la PCR en tiempo real los primers utilizados son los mismos que para la PCR semicuantitativa. Sin embargo, la mix y las condiciones de reacción son diferentes y se detallan a continuación. El volumen final es de 20 μL y cada muestra se corre por duplicado.

Tabla 8. Máster Mix de reacción de PCR Real Time

Reactivos	Volúmenes
FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (2x)	10 μL
Forward Primer (30 μM)	0.2 μL
Reverse Primer (30 μM)	0.2 μL
DNAc	1.5 μL
Water, PCR Grade	8.1 μL

Tabla 9. Condiciones de reacción de la PCR real time

Etapas	Temperatura	Tiempo	
Inicial	50°C	2 minutos	
Desnaturalización y activación de la enzima	95°C	10 minutos	
Annealing	95°C	15 segundos	40 ciclos
Extensión	59°C	1 minuto	

Una vez finalizada la PCR, los datos del experimento se abren en el software Design and Analysis y el mismo software de acuerdo a la corrida marca un “threshold” o punto de corte y genera una tabla con los valores de Ct. Los mismos se exportan a Excel para su posterior análisis. Aquí se analizan los valores de Ct de cada muestra y se realiza un promedio de los duplicados. Luego se calcula el ΔCt , restándole al promedio de Ct de la muestra analizada el promedio de Ct de la muestra utilizada como gen constitutivo, en este caso β -actina. De modo de comparar entre las distintas isoformas con MSI2 total, se calcula el $\Delta\Delta Ct$, donde se resta el ΔCt de la condición de la isoforma en particular con la condición del donante sano correspondiente. Por último, el $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nos da idea de la relación que existe entre las condiciones (ANEXO 2).

Los datos obtenidos se grafican con el software GraphPad Prism 5.

Resultados y discusión

Para el estudio del rol de la oncoproteína MSI2 en muestras de pacientes de LLC, progresores y/o indolentes de acuerdo a aspectos clínicos previamente establecidos, nos propusimos poner a punto la evaluación de la expresión de las distintas isoformas a nivel de ARN mensajero por PCR semicuantitativa y en tiempo real.

En la siguiente sección se describen los siguientes puntos:

1. Estandarización de las condiciones de PCR para las isoformas de MSI2.
2. Evaluación de la expresión de MSI2 a nivel de ARN mensajero (ARNm) en células B de pacientes con LLC y donantes sanos.
3. Evaluación de la distribución de las isoformas de MSI2 en células B de pacientes con LLC y donantes sanos.

1. Estandarización de las condiciones de PCR para las isoformas de MSI2

Para estudiar la expresión de las isoformas de MSI2 a nivel de ARNm dos líneas celulares fueron utilizadas como controles. MEC1, que expresa altos niveles de MSI2, es una línea prolinfocítica derivada de un paciente con LLC (56) y HEK-293, que es una línea embrionaria humana de riñón donde, en principio, no está reportada la expresión de MSI2.

Para la estandarización de las condiciones de PCR de las isoformas de MSI2 se llevaron a cabo pruebas semicuantitativas utilizando cuatro juegos de

oligonucleótidos, previamente descritos en la Tabla 6 (MSI2 a, MSI2b, MSI2 c y MSI2 a-d) en tres muestras distintas (MEC1, HEK-293 y un paciente con LLC).

Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se compararon con un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), como se puede ver en la Figura 5.

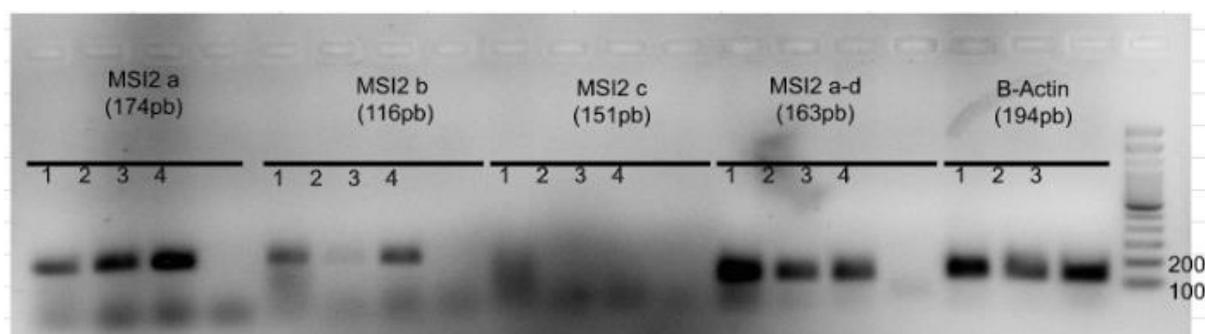


Figura 5. Evaluación de la expresión de las isoformas de MSI2 por PCR semicuantitativa en líneas celulares y células de pacientes con LLC. Gel de electroforesis de agarosa 2% con bromuro de etidio, donde se sembraron 20 μ L del producto de PCR. El producto de PCR generado por el cDNA de MEC1, HEK-293, y una muestra de LLC fueron sembrados en los pocillos 1, 2 y 3 respectivamente. En el pocillo 4 se sembró el control negativo de la PCR.

La eficiencia de la retrotranscripción de las muestras fue determinada mediante la amplificación de un gen constitutivo como es la β -actina en los cDNA de MEC1, HEK-293 y LLC. Las tres muestras muestran una amplificación de una banda de entre 100 a 200 pb correspondiente al amplicón esperado (Fig. 5, últimos tres pocillos). Con eso en mente evaluamos la expresión de las isoformas de MSI2 en las muestras testeadas.

De izquierda a derecha se sembró el producto de amplificación de cada isoforma (MSI2a, b, c, a-d) y β -actina correspondiente de las muestras evaluadas. En 1- se

sembró el producto generado de MEC1, en 2- HEK, en 3- LLC y 4- un control negativo sin ADN correspondiente a cada par de cebadores.

Los resultados muestran que MEC1, HEK y LLC expresan la MSI2a y la MSI2 a-d. A su vez se determinó que MEC1 y LLC expresan MSI2b, sin embargo, bajos niveles de expresión se observan para MSI2b en HEK. No se observa una clara amplificación de MSI2c en ninguna de las muestras analizadas. Como era de esperar los controles negativos no mostraron amplificación en ninguno de los pares de oligos testeados.

Dado que todas las bandas observadas presentan un tamaño de pb de acuerdo con lo esperado (ver Tabla 6), dichos oligos son los que se utilizaron para los posteriores experimentos.

2. Evaluación de la expresión de MSI2 a nivel de ARN mensajero (ARNm) en células B de pacientes con LLC y donantes sanos

Para determinar la expresión de MSI2 en muestras de pacientes con LLC de manera cuantitativa, primero, los pacientes a estudio fueron seleccionados según criterios de edad, sexo, recuento leucocitario, valor absoluto de linfocitos, estado mutacional, etc. (ver ANEXO 1); segundo, la expresión de MSI2 fue determinada por PCR en tiempo real en dichas muestras.

La expresión de MSI2 fue determinada mediante el uso de oligos que no discriminan entre las isoformas en muestras de pacientes con LLC (n=35) y donantes sanos (n=3) (ver Tabla 6). Cada muestra fue amplificada por duplicado, aquellas que presentan un desvío estándar menor a 1, fueron consideradas para el análisis (ver ANEXO 2).

Como se observa en la gráfica de la Figura 6, hay una mayor expresión de MSI2 en pacientes con LLC que en donantes sanos de acuerdo a lo esperado ($p=0.0003$), reproducible al trabajo de *Palacios et al. 2021* a nivel de proteínas (53).

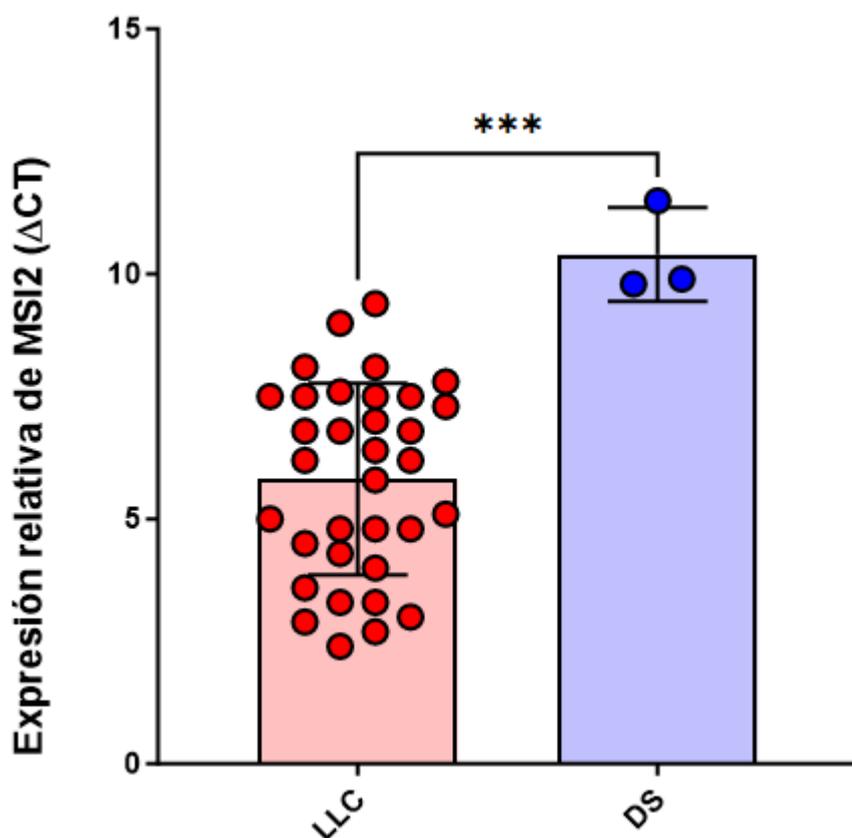


Figura 6. Evaluación de la expresión de ARNm de MSI2 total por PCR en tiempo real en pacientes con LLC (círculos rojos) y donantes sanos (DS, círculos azules).

Debido a que previamente *Palacios et al. (53)*, describió que los pacientes de mal pronóstico con un perfil mutacional de genes VH no mutados (NM-LLC) expresan más MSI2 que los de buen pronóstico (M-LLC), fue de interés determinar la expresión de MSI2 a nivel de ARNm en estos pacientes (ver ANEXO 1).

En la Figura 7 se muestra la distribución de MSI2 total en pacientes de buen y mal pronóstico, M-LLC (n=20) y NM-LLC (n=15) respectivamente. Los resultados muestran que, de acuerdo a la cohorte seleccionada, hay una tendencia a que los pacientes NM-LLC tienen más MSI2 que los M-LLC, aunque dicha diferencia no es estadísticamente significativa. En la cohorte previamente estudiada por *Palacios et al.* (53), 110 pacientes fueron evaluados, donde la mitad eran NM-LLC y la otra M-LLC. Creemos que posiblemente la razón por la que no hemos determinado la diferencia sea por el bajo número de pacientes estudiados.

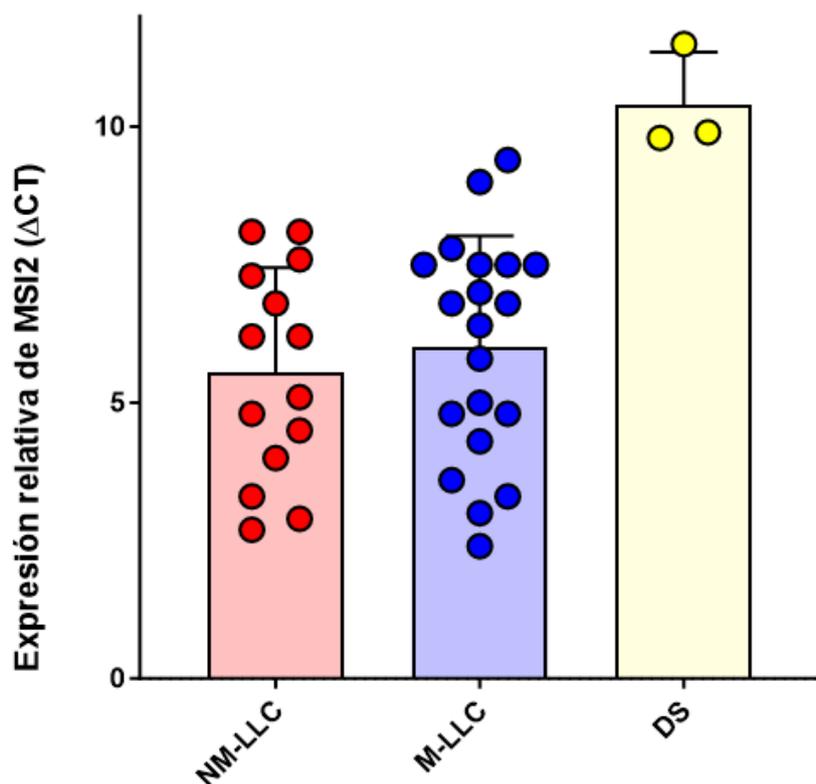


Figura 7. Evaluación de la expresión de ARNm de MSI2 total por PCR en tiempo real en pacientes con NM-LLC (círculos rojos), M-LLC (círculos azules) y los donantes sanos (círculos amarillos).

3. Evaluación de la distribución de las isoformas de MSI2 en células B de pacientes con LLC y donantes sanos

Posteriormente determinamos la distribución de las isoformas de MSI2 en los pacientes de LLC seleccionados y en los donantes sanos como se muestra en la Figura 8.

Los resultados muestran que tanto los linfocitos B tumorales como los no tumorales expresan MSI2a y MSI2b, y MSI2a-d, no así MSI2c. Debido a que no se observaron cambios entre MSI2a y MSI2a-d, tanto en las muestras de pacientes como en donantes sanos, creemos que MSI2d no se expresa en las células estudiadas. A su vez, no se registró amplificación de la isoforma MSI2c en ninguna de las dos poblaciones examinadas.

Interesantemente las muestras de LLC presentan 40% más MSI2a que MSI2b ($p < 0.0001$), mientras que esta diferencia es de tan solo 20% más en las muestras de DN ($p = 0.0053$, Figura 8). A su vez, los resultados muestran que hay casi 30% más MSI2a en LLC que en DN ($p = 0.0026$, Figura 8).

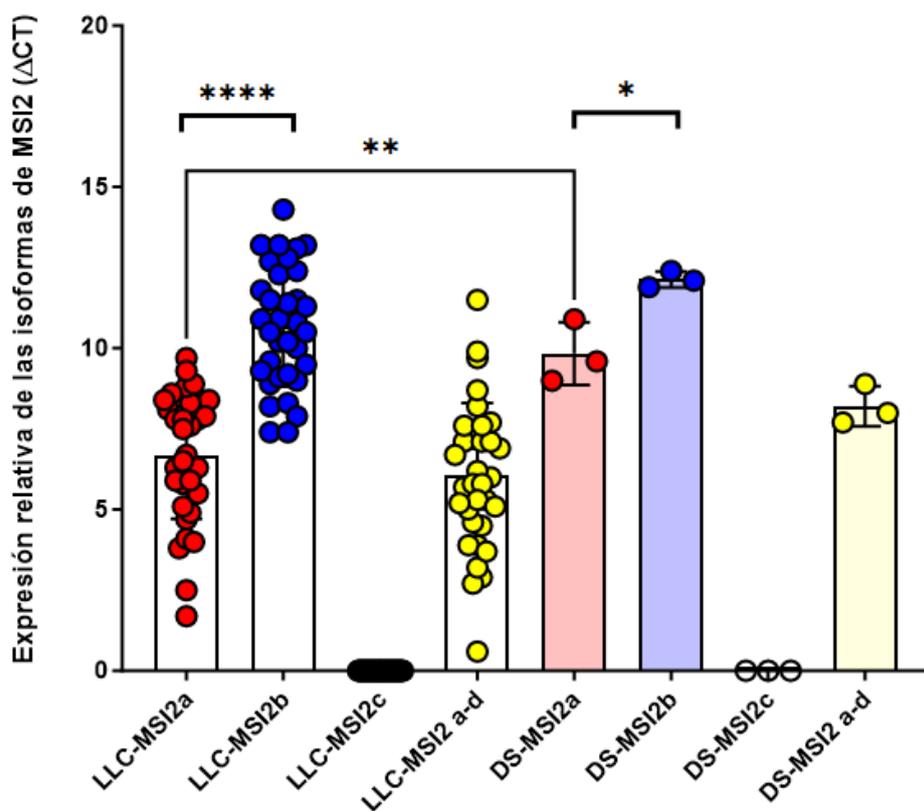


Figura 8. Evaluación de la distribución de ARNm por PCR en tiempo real de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC y donantes sanos.

Con el propósito de determinar la expresión de MSI2 total y sus isoformas en las muestras de pacientes con LLC de manera cuantitativa, se realizó el cálculo de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tomando como referencia las muestras de los donantes sanos para cada juego de cebadores (ver ANEXO 2). Los valores que se muestran en la figura 9 señalan cuánto más hay de MSI2 total y cada isoforma respecto al DS.

Los resultados muestran que la isoforma a (MSI2a) es la predominante para los pacientes con LLC. Observamos que los pacientes con LLC tienen 4.6 veces más MSI2a que MSI2b (Figura 9).

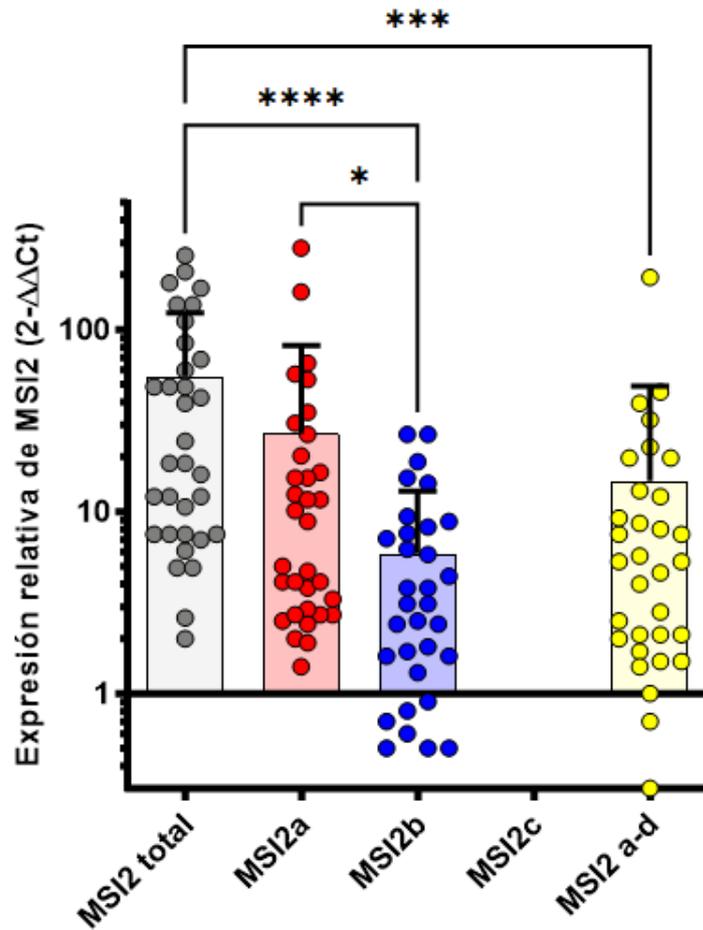


Figura 9. Evaluación de la distribución de ARNm por PCR en tiempo real de la distribución de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC (MSI2 total círculos grises, MSI2a círculos rojos, MSI2b círculos azules y MSI2a-d círculos amarillos).

Por último, evaluamos la distribución de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC con el perfil de VH mutado y no mutados (Figura 10).

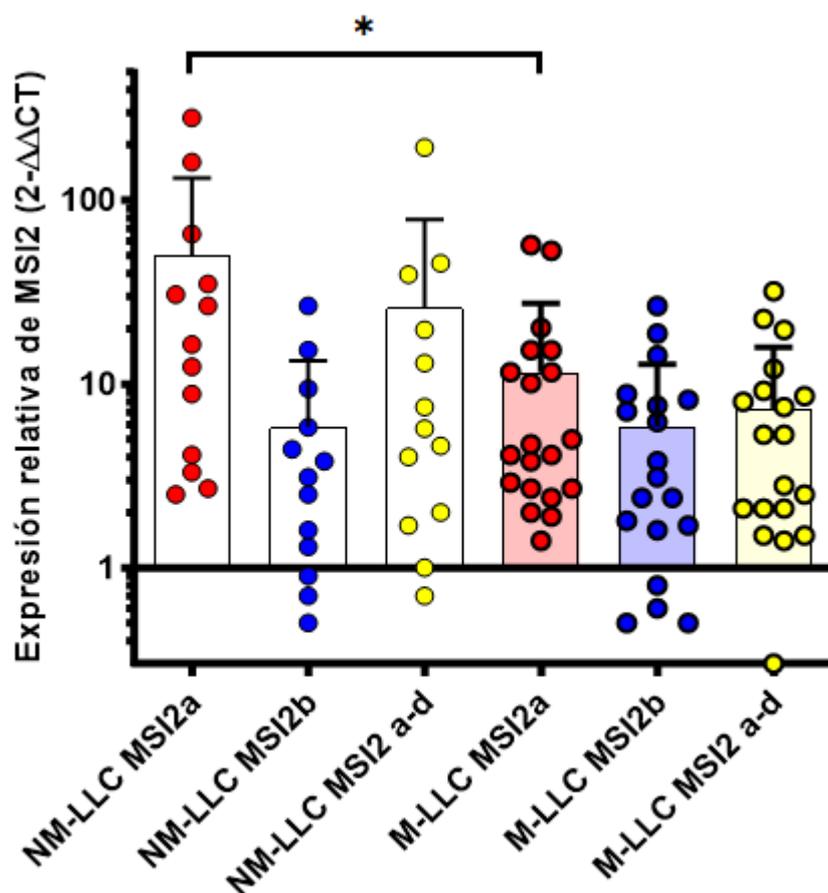


Figura 10. Evaluación de la distribución de ARNm por PCR en tiempo real de la expresión de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC con respecto al perfil mutacional de los genes VH (MSI2a círculos rojos, MSI2b círculos azules y MSI2a-d círculos amarillos).

Lo que podemos observar en este caso, es que no hay diferencia en la expresión de MSI2b en ambos grupos. Sin embargo, MSI2a se expresa 4.3 veces más en los pacientes de mal pronóstico (NM-LLC) comparado con los de buen pronóstico (M-LLC) ($p=0.0478$, Figura 10), sugiriendo un posible rol de MSI2a en la progresión de la LLC.

Este trabajo permitió determinar que a pesar de que, en la cohorte estudiada, no se ven diferencias en la expresión de MSI2 total (todas las isoformas), entre los pacientes

de buen y mal pronóstico, sí observamos que la isoforma a (MSI2a) es la que más se expresa en los pacientes de peor pronóstico, señalando la importancia de estudiar el rol de las isoformas de MSI2 en la progresión de esta leucemia.

Conclusiones

El proyecto desarrollado en este trabajo integrador generó información respecto a la distribución de las isoformas de MSI2 en pacientes con LLC con respecto a donantes sanos. Para las isoformas de MSI2 se ajustaron las condiciones a modo de evaluar dichas proteínas a nivel de ARNm por PCR tiempo final y en tiempo real.

En cuanto a la evaluación de los niveles de MSI2, los resultados obtenidos indican que los pacientes con LLC expresan mayores cantidades de MSI2 en comparación con los donantes sanos analizados.

En cuanto a la distribución de las diferentes isoformas de MSI2, observamos que tanto los linfocitos B tumorales como los no tumorales expresan MSI2a y MSI2b, no así MSI2c.

Debido a la dificultad experimental para identificar la expresión de MSI2d sola, la misma fue estudiada en conjunto con la isoforma a (MSI2a-d). Dado que no se observaron diferencias entre MSI2a con MSI2a-d, creemos que no hay expresión de MSI2d en las muestras estudiadas.

Al estudiar a los pacientes según su perfil mutacional de genes VH pudimos ver que no hay diferencia en la expresión de MSI2b en ambos grupos. Sin embargo, MSI2a

se expresa 4.3 veces más en los pacientes de mal pronóstico comparado con los de buen pronóstico.

En suma, los resultados obtenidos indican que hay una mayor expresión de MSI2a en los pacientes con perfil mutacional VH no mutado, que casualmente son los pacientes con peor pronóstico, aunque más pacientes deben ser evaluados para confirmar la hipótesis.

ANEXO 1

Tabla 10. Características de los pacientes con LLC utilizados en este trabajo.

N° de paciente	Edad	Sexo	Recuento leucocitario	Linfocitos	AID	Perfil mutacion al de genes VH	Evolución clínica
LLC 201	66	M	47000	-	(+/-)	Mutado	Indolente
LLC 206	65	F	60300	51700	(-)	Mutado	Indolente
LLC 217	67	M	22000	15600	(-)	Mutado	Indolente
LLC 225	64	M	5900	3400	(-)	Mutado	Indolente
LLC 237	64	M	-	12600	(-)	Mutado	-
LLC 245	73	F	-	7000	(-)	Mutado	-
LLC 249	60	M	-	27800	(-)	Mutado	Progresor
LLC 250	57	M	-	-	(+/-)	No mutado	Progresor
LLC 253	77	M	-	15600	(+/-)	No mutado	Progresor
LLC 254	49	F	-	11000	(-)	Mutado	Indolente
LLC 261 pp	77	M	-	-	(+/-)	No mutado	-
LLC 278	53	M	-	-	(+)	No mutado	Progresor
LLC 290	53	M	16600	12300	(-)	Mutado	-

LLC 292	-	F	18000	-	(-)	Mutado	-
LLC 293	71	M	20800	18960	(-)	Mutado	-
LLC 294	66	F	12900	8800	(-)	Mutado	-
LLC 313	49	M	161000	-	(+)	No mutado	-
LLC 356	77	M	95710	92050	(-)	Mutado	-
LLC 360 t3	52	M	167000	138940	(-)	No mutado	-
LLC 366	68	M	120000	-	(-)	Mutado	-
LLC 393	64	M	-	64740	(+/-)	No mutado	-
LLC 402	40	M	36470	23810	(-)	Mutado	-
LLC 425	64	M	-	6000	(-)	No mutado	-
LLC 428	71	M	42000	35900	(-)	No mutado	-
LLC 430	67	M	43300	41500	(-)	Mutado	-
LLC 432 ts	48	M	-	-	(+)	No mutado	-
LLC 434	63	F	15700	14600	(+)	Mutado	-
LLC 438	79	M	-	-	(-)	Mutado	-
LLC 448	71	M	24920	18800	(+)	No mutado	-
LLC 451	87	M	111000	102800	(+)	No mutado	-

LLC 455	-	F	-	-	(-)	Mutado	-
LLC 457 t1	52	M	-	421000	(+)	No mutado	-
LLC 460	69	M	-	12490	(+)	No mutado	-
LLC 484	79	F	-	22520	(-)	Mutado	-
LLC 497	-	F	-	-	(+)	No mutado	-

ANEXO 2

Tabla 11. Determinación de la expresión relativa de MSI2 y sus isoformas.

Se pueden observar en la Tabla 11, los valores de Ct de cada paciente en particular, los cuales realizamos por duplicado. Evaluamos el desvío entre las muestras para evaluar la reproducibilidad del experimento, este valor nunca supera el 1, por lo tanto, los resultados son reproducibles. Se calcula el ΔCt restándole al promedio de Ct de la muestra analizada el promedio de Ct de la muestra utilizada como housekeeping, en este caso β -actina. El valor obtenido de ΔCt lo promediamos para poder así obtener un único valor de ΔCt .

Para poder ver cuánto hay de cada isoforma con respecto a MSI2 total es que hacemos ΔCt menos el Ct de MSI2 total, y luego el cálculo de $2^{-\Delta \Delta Ct}$.

$2^{-\Delta \Delta Ct}$ nos da la información de cuántas veces hay de menos o de más del analito a determinar con respecto al que usamos para comparar, en este caso cuánto hay de cada isoforma con respecto a MSI2 total y DS.

De esta manera se realizaron los cálculos para cada paciente usado en este trabajo. Los datos obtenidos se grafican con el software GraphPad Prism 5 para su posterior interpretación.

Paciente	MSI2 total				MSI2a DS				MSI2b DS				MSI2c DS				MSI2a-d DS				2^A-DACT				
	MSI2 total	MSI2a	MSI2b	MSI2c	MSI2 a-d	ΔACTt	ΔACTa	ΔACTb	ΔACTc	ΔACTa-d	MSI2 total	MSI2a	MSI2b	MSI2c	MSI2a-d	MSI2 total	MSI2a	MSI2b	MSI2c	MSI2a-d	MSI2 total	MSI2a	MSI2b	MSI2c	MSI2a-d
313	3.3	3.8	8.9	-	3.9	-7.10	-6.03	-3.23	-	-4.30	137.2	65.5	9.4	-	19.7	137.2	65.5	9.4	-	19.7	137.2	65.5	9.4	-	19.7
360 t3	5.1	4.7	10.8	-	5.3	-5.30	-5.13	-1.33	-	-2.90	39.4	35.1	2.5	-	7.5	39.4	35.1	2.5	-	7.5	39.4	35.1	2.5	-	7.5
448	4	4.9	9.6	-	4.5	-6.40	-4.93	-2.53	-	-3.70	84.4	30.6	5.8	-	13.0	84.4	30.6	5.8	-	13.0	84.4	30.6	5.8	-	13.0
457 t1	2.9	2.5	8.2	-	2.9	-7.50	-7.33	-3.93	-	-5.30	181.0	161.3	15.3	-	39.4	181.0	161.3	15.3	-	39.4	181.0	161.3	15.3	-	39.4
253	7.6	8.5	11.8	-	7.4	-2.80	-1.33	-0.33	-	-0.80	7.0	2.5	1.3	-	1.7	7.0	2.5	1.3	-	1.7	7.0	2.5	1.3	-	1.7
261 pp (Valor descartado)	-5.6	-5.4	-0.4	-	-5.8	-16.00	-15.23	-12.53	-	-14.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
278	6.2	5.8	10.2	-	5.7	-4.20	-4.03	-1.93	-	-2.50	18.4	16.4	3.8	-	5.7	18.4	16.4	3.8	-	5.7	18.4	16.4	3.8	-	5.7
432 ts	8.1	7.8	12.7	-	8.2	-2.30	-2.03	0.57	-	0.00	4.9	4.1	0.7	-	1.0	4.9	4.1	0.7	-	1.0	4.9	4.1	0.7	-	1.0
460 (Valor descartado)	7.3	9.7	13.2	-	9.7	-3.10	-0.13	1.07	-	1.50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
497	2.7	1.7	10	-	2.7	-7.70	-8.13	-2.13	-	-5.50	207.9	280.8	4.4	-	45.3	207.9	280.8	4.4	-	45.3	207.9	280.8	4.4	-	45.3
393	4.8	6.2	12.3	-	6	-5.60	-3.63	0.17	-	-2.20	48.5	12.4	0.9	-	4.6	48.5	12.4	0.9	-	4.6	48.5	12.4	0.9	-	4.6
425	6.2	6.7	10.5	-	6.2	-4.20	-3.13	-1.63	-	-2.00	18.4	8.8	3.1	-	4.0	18.4	8.8	3.1	-	4.0	18.4	8.8	3.1	-	4.0
451	6.8	8.4	13.1	-	7.2	-3.60	-1.43	0.97	-	-1.00	12.1	2.7	0.5	-	2.0	12.1	2.7	0.5	-	2.0	12.1	2.7	0.5	-	2.0
428	4.5	8.1	7.4	-	0.6	-5.90	-1.73	-4.73	-	-7.60	59.7	3.3	26.6	-	194.0	59.7	3.3	26.6	-	194.0	59.7	3.3	26.6	-	194.0
250	8.1	5.1	11.5	-	8.7	-2.30	-4.73	-0.63	-	0.50	4.9	26.6	1.6	-	0.7	4.9	26.6	1.6	-	0.7	4.9	26.6	1.6	-	0.7
292	2.4	4.1	8.3	-	3.2	-8.00	-5.73	-3.83	-	-5.00	256.0	53.2	14.3	-	32.0	256.0	53.2	14.3	-	32.0	256.0	53.2	14.3	-	32.0
294	3	4	9.1	-	4.6	-7.40	-5.83	-3.03	-	-3.60	168.9	57.0	8.2	-	12.1	168.9	57.0	8.2	-	12.1	168.9	57.0	8.2	-	12.1
356	3.6	5.5	7.9	-	3.9	-6.80	-4.33	-4.23	-	-4.30	111.4	20.2	18.8	-	19.7	111.4	20.2	18.8	-	19.7	111.4	20.2	18.8	-	19.7
237	7.5	8.4	11.3	-	6.9	-2.90	-1.43	-0.83	-	-1.30	7.5	2.7	1.8	-	2.5	7.5	2.7	1.8	-	2.5	7.5	2.7	1.8	-	2.5
245	7.5	8.3	12.4	-	7.1	-2.90	-1.53	0.27	-	-1.10	7.5	2.9	0.8	-	2.1	7.5	2.9	0.8	-	2.1	7.5	2.9	0.8	-	2.1
290	7.5	8.8	12.8	-	7.1	-2.90	-1.03	0.67	-	-1.10	7.5	2.0	0.6	-	2.1	7.5	2.0	0.6	-	2.1	7.5	2.0	0.6	-	2.1
438	4.3	7.9	9.5	-	5.8	-6.10	-1.93	-2.63	-	-2.40	68.6	3.8	6.2	-	5.3	68.6	3.8	6.2	-	5.3	68.6	3.8	6.2	-	5.3
455	5	7.6	9	-	5.8	-5.40	-2.23	-3.13	-	-2.40	42.2	4.7	8.8	-	5.3	42.2	4.7	8.8	-	5.3	42.2	4.7	8.8	-	5.3
366	3.3	6.3	7.4	-	3.7	-7.10	-3.53	-4.73	-	-4.50	137.2	11.6	26.6	-	22.6	137.2	11.6	26.6	-	22.6	137.2	11.6	26.6	-	22.6
402	4.8	6.3	9.2	-	5	-5.60	-3.53	-2.93	-	-3.20	48.5	11.6	7.6	-	9.2	48.5	11.6	7.6	-	9.2	48.5	11.6	7.6	-	9.2
430	4.8	6.5	9.3	-	5.3	-5.60	-3.33	-2.83	-	-2.90	48.5	10.1	7.1	-	7.5	48.5	10.1	7.1	-	7.5	48.5	10.1	7.1	-	7.5
434	6.4	8.6	10.9	-	6.7	-4.00	-1.23	-1.23	-	-1.50	16.0	2.4	2.4	-	2.8	16.0	2.4	2.4	-	2.8	16.0	2.4	2.4	-	2.8
484	6.8	8.9	11.4	-	7.1	-3.60	-0.93	-0.73	-	-1.10	12.1	1.9	1.7	-	2.1	12.1	1.9	1.7	-	2.1	12.1	1.9	1.7	-	2.1

NM-LLC

M-LLC

Bibliografía

1. Rozman C, Montserrat E. Chronic Lymphocytic Leukemia.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199510193331606> [Internet]. 1995 Oct 19 [cited 2023 May 23];333(16):1052–7. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199510193331606>
2. Dighiero G. Unsolved issues in CLL biology and management. Leukemia [Internet]. 2003 [cited 2023 May 23];17(12):2385–91. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14523464/>
3. KIPPS TJ. CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AND RELATED DISEASES | Free Medical Textbook [Internet]. 2012 [cited 2023 May 26]. p. 1431–82. Available from:
<https://medtextfree.wordpress.com/2012/01/23/chapter-98-chronic-lymphocytic-leukemia-and-related-diseases/>
4. Dra Bistmans R, Dra Cabrejo A, del Rosario Fernández Grecco M, Dra Gamberale H, Dra Giordano R, Dra Pavlovsky M, et al. Leucemia Linfática Crónica. 2012.
5. Rai KR SACECALRPBS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. Blood [Internet]. 1975 Oct 27 [cited 2023 May 23];46(2):219–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27789434/>
6. Binet JL, Lepage M, Dighiero G, Charron D, Vaucier G, Merle Beral H, et al. A CLINICAL STAGING SYSTEM FOR CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA Prognostic Significance. 1997 [cited 2023 May 23]; Available from:
<https://acsjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1097-0142>

7. Hamblin TJ. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* [Internet]. 2007 Sep [cited 2023 May 23];20(3):455–68. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17707833/>
8. Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen S, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia - PubMed [Internet]. 1999 [cited 2023 May 23]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10477712/>
9. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH Genes Are Associated With a More Aggressive Form of Chronic Lymphocytic Leukemia. *Blood* [Internet]. 1999 Sep 15 [cited 2023 May 23];94(6):1848–54. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/94/6/1848/175735/Unmutated-Ig-VH-Genes-Are-Associated-With-a-More>
10. Parikh SA, Shanafelt TD. Prognostic factors and risk stratification in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2016 Apr 1;43(2):233–40.
11. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, Busch R, Senekowitsch R, Stern S, et al. Serum β 2-Microglobulin and Serum Thymidine Kinase are Independent Predictors of Progression-Free Survival in Chronic Lymphocytic Leukemia and Immunocytoma. <https://doi.org/10.3109/10428199609054782> [Internet]. 2009 [cited 2023 May 23];22(5–6):439–47. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428199609054782>
12. The International CLL-IPI working group. An international prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL-IPI): a meta-analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*. 2016 Jun 1;17(6):779–90.

13. James DF, Kipps TJ. Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Adv Ther* [Internet]. 2011 Jul 2 [cited 2023 May 23];28(7):534–54. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12325-011-0032-2>
14. Cramer P, Tausch E, von Tresckow J, Giza A, Robrecht S, Schneider C, et al. Durable remissions following combined targeted therapy in patients with CLL harboring TP53 deletions and/or mutations. *Blood* [Internet]. 2021 Nov 11 [cited 2023 May 23];138(19):1805–16. Available from: <https://ashpublications.org/blood/article/138/19/1805/476067/Durable-remissions-following-combined-targeted>
15. Kater AP, Seymour JF, Hillmen P, Eichhorst B, Langerak AW, Owen C, et al. Fixed duration of venetoclax-rituximab in relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia eradicates minimal residual disease and prolongs survival: Post-treatment follow-up of the Murano phase III study. *Journal of Clinical Oncology*. 2019 Feb 1;37(4):269–77.
16. Yosifov DY, Wolf C, Stilgenbauer S, Mertens D. From biology to therapy: The CLL success story. *Hemasphere* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 May 23];3(2). Available from: https://journals.lww.com/hemasphere/Fulltext/2019/04000/From_Biology_to_Therapy_The_CLL_Success_Story.3.aspx
17. Palma M, Mulder TA, Österborg A. BTK Inhibitors in Chronic Lymphocytic Leukemia: Biological Activity and Immune Effects. *Front Immunol*. 2021 Jul 1;12:2617.
18. Mihalyova J, Jelinek T, Growkova K, Hrdinka M, Simicek M, Hajek R. Venetoclax: A new wave in hematooncology. *Exp Hematol*. 2018 May 1;61:10–25.

19. Morabito F, Gentile M, Seymour JF, Polliack A. Ibrutinib, idelalisib and obinutuzumab for the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia: three new arrows aiming at the target.
<https://doi.org/10.3109/1042819420151061193> [Internet]. 2015 Dec 2 [cited 2023 May 23];56(12):3250–6. Available from:
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/10428194.2015.1061193>
20. Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, et al. Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2015 Dec 17 [cited 2023 May 23];373(25):2425–37. Available from:
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1509388>
21. Markham A. Idelalisib: First global approval. *Drugs* [Internet]. 2014 Sep 4 [cited 2023 May 23];74(14):1701–7. Available from:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s40265-014-0285-6>
22. Puła B, Gołos A, Górnjak P, Jamroziak K. Overcoming Ibrutinib Resistance in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Cancers* 2019, Vol 11, Page 1834 [Internet]. 2019 Nov 21 [cited 2023 May 26];11(12):1834. Available from:
<https://www.mdpi.com/2072-6694/11/12/1834/htm>
23. Burger JA. Bruton Tyrosine Kinase Inhibitors: Present and Future. *Cancer J* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2023 May 26];25(6):386–93. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31764119/>
24. Hentze MW, Castello A, Schwarzl T, Preiss T. A brave new world of RNA-binding proteins. Vol. 19, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 327–41.

25. Lukong KE, Chang K wei, Khandjian EW, Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease. Vol. 24, Trends in Genetics. 2008. p. 416–25.
26. Pereira B, Billaud M, Almeida R. RNA-Binding Proteins in Cancer: Old Players and New Actors. Vol. 3, Trends in Cancer. Cell Press; 2017. p. 506–28.
27. Park SM, Gönen M, Vu L, Minuesa G, Tivnan P, Barlowe TS, et al. Musashi2 sustains the mixed-lineage leukemia-driven stem cell regulatory program. *Journal of Clinical Investigation*. 2015 Mar 2;125(3):1286–98.
28. Kharas MG, Lengner CJ. Stem Cells, Cancer, and MUSASHI in Blood and Guts. Vol. 3, Trends in Cancer. Cell Press; 2017. p. 347–56.
29. Vu LP, Prieto C, Amin EM, Chhangawala S, Krivtsov A, Calvo-Vidal MN, et al. Functional screen of MSI2 interactors identifies an essential role for SYNCRIP in myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet*. 2017 Jun 1;49(6):866–75.
30. Nakamura M, Okano H, Blendy JA, Montell C. Musashi, a Neural RNA-Binding Protein Required for Drosophila Adult External Sensory Organ Development. Vol. 13, *Neuron*. 1994.
31. Sakakibara SI, Nakamura Y, Satoh H, Okano H. RNA-Binding Protein Musashi2: Developmentally Regulated Expression in Neural Precursor Cells and Subpopulations of Neurons in Mammalian CNS. 2001.
32. Hattori A, Tsunoda M, Konuma T, Kobayashi M, Nagy T, Glushka J, et al. Cancer progression by reprogrammed BCAA metabolism in myeloid leukaemia. *Nature*. 2017 May 25;545(7655):500–4.
33. Kang MH, Jeong KJ, Kim WY, Lee HJ, Gong G, Suh N, et al. Musashi RNA-binding protein 2 regulates estrogen receptor 1 function in breast cancer. *Oncogene*. 2017 Mar 23;36(12):1745–52.

34. Cragle CE, MacNicol MC, Byrum SD, Hardy LL, Mackintosh SG, Richardson WA, et al. Musashi interaction with poly(A)-binding protein is required for activation of target mRNA translation. *Journal of Biological Chemistry*. 2019 Jul 12;294(28):10969–86.
35. okabe2001.
36. Ruth Zearfoss N, Deveau LM, Clingman CC, Schmidt E, Johnson ES, Massi F, et al. A conserved three-nucleotide core motif defines musashi RNA binding specificity. *Journal of Biological Chemistry*. 2014 Dec 19;289(51):35530–41.
37. Horisawa K, Imai T, Okano H, Yanagawa H. The Musashi family RNA-binding proteins in stem cells. Vol. 1, *Biomolecular Concepts*. De Gruyter Mouton; 2010. p. 59–66.
38. Kaneko Y, Sakakibara S, Imai T, Suzuki A, Nakamura Y, Sawamoto K, et al. Musashi1: An Evolutionally Conserved Marker for CNS Progenitor Cells Including Neural Stem Cells [Internet]. Vol. 22, *Dev Neurosci*. 2000. Available from: www.karger.com/journals/dne
39. Kharas MG, Lengner CJ, Al-Shahrour F, Bullinger L, Ball B, Zaidi S, et al. Musashi-2 regulates normal hematopoiesis and promotes aggressive myeloid leukemia. *Nat Med*. 2010 Aug;16(8):903–8.
40. Sheng W, Dong M, Chen C, Li Y, Liu Q, Dong Q. Musashi2 promotes the development and progression of pancreatic cancer by down-regulating Numb protein [Internet]. Available from: www.impactjournals.com/oncotarget
41. Cox JL, Wilder PJ, Gilmore JM, Wuebben EL, Washburn MP, Rizzino A. The SOX2-Interactome in Brain Cancer Cells Identifies the Requirement of MSI2 and USP9X for the Growth of Brain Tumor Cells. *PLoS One*. 2013 May 7;8(5).

42. Gunter KM, McLaughlin EA. Translational control in germ cell development: A role for the RNA-binding proteins Musashi-1 and Musashi-2. Vol. 63, IUBMB Life. 2011. p. 678–85.
43. Guo K, Cui J, Quan M, Xie D, Jia Z, Wei D, et al. The novel KLF4/MSI2 signaling pathway regulates growth and metastasis of pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*. 2017 Feb 1;23(3):687–96.
44. Fox RG, Lytle NK, Jaquish D V., Park FD, Ito T, Bajaj J, et al. Image-based detection and targeting of therapy resistance in pancreatic adenocarcinoma. *Nature*. 2016 Jun 6;534(7607):407–11.
45. Lee J, An S, Choi YM, Lee J, Ahn KJ, Lee JH, et al. Musashi-2 is a novel regulator of paclitaxel sensitivity in ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2016 Nov 1;49(5):1945–52.
46. Tsujino T, Sugito N, Taniguchi K, Honda R, Komura K, Yoshikawa Y, et al. MicroRNA-143/Musashi-2/KRAS cascade contributes positively to carcinogenesis in human bladder cancer. *Cancer Sci*. 2019 Jul 1;110(7):2189–99.
47. Byers RJ, Currie T, Tholouli E, Rodig SJ, Kutok JL. MSI2 protein expression predicts unfavorable outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Sep 8;118(10):2857–67.
48. Mansouri L, Gunnarsson R, Sutton LA, Ameer A, Hooper SD, Mayrhofer M, et al. Next generation RNA-sequencing in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia [Internet]. Available from: <http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/>

49. Mu Q, Wang Y, Chen B, Qian W, Meng H, Tong H, et al. High expression of Musashi-2 indicates poor prognosis in adult B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* 2013 Aug;37(8):922–7.
50. Kaeda J, Ringel F, Oberender C, Mills K, Quintarelli C, Pane F, et al. Up-regulated MSI2 is associated with more aggressive chronic myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2015 Jul 1;56(7):2105–13.
51. Ito T, Kwon HY, Zimdahl B, Congdon KL, Blum J, Lento WE, et al. Regulation of myeloid leukaemia by the cell-fate determinant Musashi. *Nature.* 2010 Aug 5;466(7307):765–8.
52. Kaplan D, Sun Z, Tallman MS, Flinn IW, Xiao W, Caimi PF, et al. Prognostic Information and Biological Insights in Chronic Lymphocytic Leukemia by High-Resolution Immunophenotypic Analysis of ZAP70.
53. Palacios F, Yan XJ, Ferrer G, Chen SS, Vergani S, Yang X, et al. Musashi 2 influences chronic lymphocytic leukemia cell survival and growth making it a potential therapeutic target. *Leukemia.* 2021 Apr 1;35(4):1037–52.
54. MacNicol MC, Cragle CE, McDaniel FK, Hardy LL, Wang Y, Arumugam K, et al. Evasion of regulatory phosphorylation by an alternatively spliced isoform of Musashi2. *Sci Rep.* 2017 Dec 1;7(1).
55. Li M, Li AQ, Zhou SL, Lv H, Wei P, Yang WT. RNA-binding protein MSI2 isoforms expression and regulation in progression of triple-negative breast cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research.* 2020 May 24;39(1).
56. Stacchini A, Aragno M, Vallario A, Alfarano A, Circosta P, Gottardi D, et al. MEC1 and MEC2: two new cell lines derived from B-chronic lymphocytic

leukaemia in polymphocytoid transformation. Leuk Res. 1999 Feb
1;23(2):127–36.