



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**EXPRESIÓN DE LOS GENES *CASP8AP2* Y *H2AFZ* Y SU ASOCIACIÓN CON LA  
SUPERVIVENCIA Y RECAÍDA EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA  
AGUDA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL ROCÍO JUÁREZ VELÁZQUEZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM  
DRA. ALDA ROCÍO ORTIZ MUÑOZ  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

MÉXICO, D.F. NOVIEMBRE, 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.





Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 01 de septiembre de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **JUÁREZ VELÁZQUEZ MARÍA DEL ROCÍO** con número de cuenta **96065334** con la tesis titulada **"EXPRESIÓN DE LOS GENES CASP8AP2 Y H2AFZ Y SU ASOCIACIÓN CON LA SUPERVIVENCIA Y RECAÍDA EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA**:

Presidente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
Vocal: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA  
Secretario: MED. ESP. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI  
Suplente: DRA. MARÍA ANTONIETA CHÁVEZ GONZÁLEZ  
Suplente: DRA. ALDA ROCÍO ORTÍZ MUÑIZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 27 de octubre de 2014

*M. del Coro Arizmendi*  
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



## Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México,  
por brindarme el espacio para mi formación académica, estoy orgullosa de ser  
egresada de esta *alma mater*.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por los apoyos económicos  
brindados.

Beca doctoral No. 165427.

Fondo sectorial SSA/IMSS/ISSSTE/44402.

A los integrantes del comité tutor:

Med. Esp. Alessandra Carnevale Cantoni,

Dra. Alda Rocío Ortíz Muñiz,

por su disposición, sus consejos y sus aportaciones.

Agradezco profundamente a...

Santiago. Amor, felicidad, ilusión y esperanza. El motor más poderoso para luchar por un mundo mejor.

Sergio, mi complemento de vida, con quien he aprendido que la vida tiene caminos que no imaginamos, solo hay que estar dispuestos.  
Te amo.

Mis padres Lili y George, ejemplo de vida. Gracias por todo su apoyo y su inmenso amor, les estaré eternamente agradecida por darme los valores para ser quien soy.

Vico y Kary, Erín, Omar y Jonathan. Son los mejores hermanos, los amo.

Euri, Jorge, Lizzy, Karen y Tabata. Son maravillosos, nunca dejen de soñar, los amo.

A la Dra. Paty, por la oportunidad de trabajar en tu laboratorio, por el tiempo dedicado a mi formación académica, por las críticas siempre enriquecedoras y por tu amistad.

A Cultivo de Tejidos INP, Pill, Chelo, Adriana, Vero, Rob, Alex, Juan Carlos y Meche. Siempre es mejor trabajar entre amigos.

A mis AMIGOS, nenes y nenas que estuvieron echándome porras y al pendiente de mi y de mi Tesis.

A las enfermeras del servicio de AQUA del INP, Laura, Lupita y Elva, por la disposición para la colecta de muestras.

A los miembros de mi jurado: Dr. Diego Arenas, Dr. Enrique Miranda y Dra. María Antonieta Chávez; por el tiempo dedicado a la revisión de mi trabajo.

Al departamento de Genética Humana del INP, grupo de profesionales con gran calidad humana.

A la UNAM, refugio de almas y mentes que se forman soñando con lograr un México grande, sin violencia, sin corrupción y con valores.

A los que de alguna manera están y estuvieron, la vida esta llena de enseñanzas.

Dedicado a:

Los niños con cáncer, los colaboradores más importantes de este trabajo, que sin pretenderlo están generando conocimiento. Con la mejor de las suertes algún día lograremos vencer esta terrible enfermedad.



No te salves  
No te quedes inmóvil  
al borde del camino  
no congeles el júbilo  
no quieras con desgana  
no te salves ahora  
ni nunca  
no te salves  
no te llenes de calma  
no reserves del mundo  
sólo un rincón tranquilo  
no dejes caer los párpados  
pesados como juicios  
no te quedes sin labios  
no te duermas sin sueño  
no te pienses sin sangre  
no te juzgues sin tiempo

pero si  
pese a todo  
no puedes evitarlo  
y congelas el júbilo  
y quieres con desgana  
y te salvas ahora  
y te llenas de calma  
y reservas del mundo  
sólo un rincón tranquilo  
y dejas caer los párpados  
pesados como juicios  
y te secas sin labios  
y te duermes sin sueño  
y te piensas sin sangre  
y te juzgas sin tiempo  
y te quedas inmóvil  
al borde del camino  
y te salvas

entonces  
no te quedes conmigo

Mario Benedetti

Índice .....	Página
Resumen .....	1
Abstract .....	3
1. Introducción .....	5
1.1. El cáncer infantil en México .....	5
1.2 . Leucemia linfoblástica aguda .....	6
1.3. Factores de riesgo convencionales evaluados al momento del diagnóstico de LLA .....	9
1.3.1. Características del paciente .....	9
1.3.1.1. Sexo .....	9
1.3.1.2. Edad .....	9
1.3.2. Características de la enfermedad .....	10
1.3.2.1. Cuenta de leucocitos .....	10
1.3.2.2. Inmunofenotipo .....	10
1.3.3. Características genéticas .....	12
1.3.4. Alteraciones con valor pronóstico en LLA-T .....	13
1.3.5. Alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en LLA-B .....	14
1.3.5.1. Alteraciones numéricas .....	14
1.3.5.2. Alteraciones estructurales .....	15
1.4. Perfiles genómicos de alto riesgo en LLA .....	17
1.4.1. Gen <i>CASP8AP2</i> .....	18
1.4.2. Gen <i>H2AFZ</i> .....	19
1.5. Respuesta al tratamiento .....	19
1.5.1. Respuesta a tratamiento de esteroides (Prednisona) .....	19
1.5.2. Determinación de enfermedad mínima residual (EMR) como valoración de respuesta a tratamiento .....	20
1.6. Recaída en LLA .....	21
1.7. Supervivencia .....	22
1.7.1. Supervivencia libre de recaída .....	22
1.7.2. Supervivencia libre de evento .....	22



1.7.3. Supervivencia global.....	22
2. Justificación.....	23
3. Objetivos.....	24
3.1. Objetivo general.....	24
3.2. Objetivos particulares.....	24
4. Metodología.....	25
4.1. Selección de pacientes.....	25
4.2. Obtención y procesamiento de la muestra de médula ósea.....	26
4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA.....	26
4.4. Determinación de la expresión de <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i> .....	28
4.5. Análisis estadístico.....	29
5. Resultados.....	31
5.1. Niveles de expresión de los genes <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i> .....	31
5.2. Análisis de supervivencia de los grupos de expresión baja y media/alta de los genes <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i> .....	35
5.3. Asociación de las características clínicas, de laboratorio y genéticas con respecto a la presencia de recaída y muerte.....	37
5.4. Análisis de riesgo a presentar recaída en LLA, por las características clínicas, de laboratorio y genéticas.....	38
5.5. Valor predictivo de recaída de la cuenta de leucocitos y la expresión baja de <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i> .....	40
6. Discusión.....	42
7. Conclusiones.....	47
8. Referencias.....	48
9. Anexo.....	53

Índice de cuadros y figuras	Página
Cuadro 1. Frecuencia/incidencia de cáncer en niños y adolescentes atendidos dentro del programa del Seguro Popular en los años 2007-2010	6
Cuadro 2. Factores comúnmente utilizados en la estratificación de riesgo en LLA	8
Cuadro 3. Asociación de las características clínicas y la expresión génica con la recaída, en el grupo de pacientes con LLA	39
Cuadro 4. Análisis de riesgo para las características clínicas y de expresión génica	40
Cuadro 5. Valor de predicción a recaída de la cuenta de leucocitos y expresión génica de <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i>	41
Figura 1. Frecuencia de las leucemias y síndromes mielodisplásicos en edad pediátrica	5
Figura 2. Dispersión de los valores de expresión de <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i>	31
Figura 3. Análisis de SLR por el método de Kaplan-Meier, basado en los grupos de expresión alta, media y baja	32
Figura 4. Análisis de SLE por el método de Kaplan-Meier, basado en los grupos de expresión alta, media y baja	33
Figura 5. Análisis de SLR y SLE Kaplan-Meier en base a la expresión de <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i>	34
Figura 6. Análisis de SLR y SLE mediante Kaplan-Meier, basado en la expresión génica	36
Figura 7. Análisis de SLR y SLE mediante Kaplan-Meier, basado en la expresión de <i>CASP8AP2</i> y <i>H2AFZ</i>	37

## Resumen

En México, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el tipo más común. En países desarrollados se ha logrado una alta tasa de supervivencia que alcanza hasta el 86%. Este incremento se debe principalmente a la aplicación del tratamiento adecuado, basado en criterios clínicos y de laboratorio evaluados al momento del diagnóstico, que permiten identificar a grupos de riesgo a recaer. Aún al aplicar esta clasificación son insuficientes los parámetros para la correcta estratificación de todos los casos. Esta situación se refleja en los pacientes sin características de riesgo que eventualmente recaen. Recientemente, a través de estudios genómicos, se han identificado nuevos marcadores de riesgo; dentro del grupo de genes con probable valor predictivo de recaída en niños con LLA, se encuentran el gen de la proteína de unión a Caspasa 8 (*CASP8AP2*) y el de la variante de histona *H2AFZ*. La expresión del gen *CASP8AP2* se ha asociado con la respuesta al tratamiento, a agentes quimioterapéuticos *in vitro* y con la supervivencia libre de evento (SLE) de los pacientes con LLA. Los niveles de expresión bajos de *CASP8AP2* se asociaron con menor SLE y una mayor frecuencia de recaída. También se refiere que *H2AFZ* se expresa en niveles bajos en los pacientes con recaída. Los pacientes que expresaron niveles bajos para ambos genes, mostraron respuesta subóptima al tratamiento de inducción a la remisión y posteriormente recayeron. Sin embargo, no todos los reportes apoyan la asociación de la expresión baja de *CASP8AP2* con mal pronóstico, y sólo se cuenta con un estudio que analiza el gen *H2AFZ*. Aunque se ha sugerido que la expresión de ambos genes impacta en la predicción de recaída, es indispensable conocer la aplicabilidad de estos marcadores en un estudio prospectivo en nuestra población. El objetivo de este trabajo fue determinar si los niveles de expresión de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ* están asociados con la presencia de recaída, SLE, así como con los parámetros de evaluación de riesgo clínico y de laboratorio convencionales, en una cohorte de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico. Material y Métodos. Se colectaron aspirados de médula ósea de 86 pacientes con LLA al diagnóstico. Se construyó una base de datos clínicos, de laboratorio y de evolución de los pacientes. A partir de células mononucleadas se extrajo RNA total y se sintetizó cDNA. Se realizó la cuantificación relativa de la expresión de los genes *CASP8AP2*, *H2AFZ* y *ABL1* (control endógeno) por PCR en tiempo real. Los pacientes se agruparon en categorías de acuerdo a su expresión (baja y media/alta). Se analizaron las diferencias entre los grupos de expresión con respecto a la presencia y ausencia de recaída (prueba de Fisher). Se construyeron curvas de supervivencia libre de recaída (SLR) y SLE (método de Kaplan Meier, log-rank). Se evaluó el riesgo a presentar recaída (análisis de regresión logística) y se realizaron pruebas de valor pronóstico para conocer:

Sensibilidad, Especificidad, Valor Pronóstico Positivo (VPP) y Valor Pronóstico Negativo (VPN). Resultados. De los 86 pacientes, 74 se diagnosticaron con LLA-B y 12 con LLA-T; del total de pacientes 21 presentaron recaída. Se encontró incremento en la probabilidad de riesgo a presentar recaída en los pacientes con inmunofenotipo de células T, así como en los casos con cuenta alta de leucocitos y con expresión baja del gen *CASP8AP2*. El análisis de supervivencia mostró mayor SLR en los pacientes con expresión media/alta para el gen *CASP8AP2* en comparación con el grupo de expresión baja (log rank  $p=0.001$ ). Se observó el mismo comportamiento al analizar la expresión del gen *H2AFZ*, sin embargo, la diferencia entre grupos no fue significativa. Se observó que el grupo de pacientes con expresión baja para ambos genes tienen menores SLR y SLE ( $p<0.05$ ) con respecto al resto de los pacientes. Adicionalmente se determinó el valor predictivo para recaída de los niveles de expresión bajos de cada gen estudiado y se comparó con el valor obtenido para la cuenta de leucocitos alta (este parámetro fue utilizado como referencia ya que está establecido que se asocia con recaída). Este análisis mostró que el VPP y VPN de los niveles de expresión bajos de los genes estudiados son muy cercanos a los valores encontrados para la cuenta de leucocitos. También se determinaron los valores predictivos de la cuenta alta de leucocitos junto con la expresión baja de ambos genes, con esta combinación se obtuvieron los valores más altos de sensibilidad, especificidad, VPP y VPN, comparados con los valores obtenidos de los parámetros individuales. Discusión y Conclusiones. Los resultados muestran que el grupo de pacientes con expresión baja de *CASP8AP2*, presenta menores SLR y SLE. El análisis de riesgo reveló que el inmunofenotipo de células T, la cuenta alta de leucocitos y la baja expresión del gen *CASP8AP2*, confieren mayor riesgo a presentar recaída. Se observó que el gen *H2AFZ* por sí solo no identifica pacientes con riesgo a recaer. Los resultados del análisis de riesgo concuerdan con los encontrados para la supervivencia, en donde se encontró que los pacientes con expresión baja para ambos genes, tienen la mayor incidencia de recaída. Estos datos muestran que la expresión baja del gen *CASP8AP2* puede ser un marcador útil de recaída temprana en nuestros pacientes, y es evaluable desde el momento del diagnóstico. Este marcador adquiere mayor predictibilidad al ser utilizado en conjunto con la expresión baja del gen *H2AFZ* y los parámetros de riesgo ya establecidos como la cuenta de leucocitos alta.

## Abstract

In Mexico, cancer is the second cause of infant mortality and acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common type. High survival rate up to 86% has been achieved in developed countries. This increase is mainly due to the administration of suitable treatment protocols that are based on stratification of patients prone to relapse determined by clinical and laboratory criteria at the time of diagnosis. However, even with the application of this risk classification in children with ALL, the parameters remain insufficient for establishing a suitable stratification for all patients. That is the case of those patients with standard risk that eventually relapse. Recently, diverse genomic studies have been conducted to identify new molecular markers for risk. Among the genes proposed as predictors of relapse in children with ALL, Caspase-associated protein 2 (*CASP8AP2*) and histone family member 2 (*H2AFZ*) have been identified. The expression of *CASP8AP2* gene has been associated with response to treatment, to chemotherapeutic agents *in vitro* and with patient event-free survival (EFS). Low expression levels of *CASP8AP2* gene predicted a lower EFS and higher rate of leukemia relapse. It is also referred that *H2AFZ* gene is expressed at low levels in patients with relapse. Moreover, patients who showed low expression of both genes had a suboptimal treatment response and eventually relapsed. However, not all the reports have supported the association of *CASP8AP2* low expression with poor prognosis and only one study has analyzed the *H2AFZ* gene. Although it has been suggested that the expression of both genes impact the prediction of relapse, it is essential to know the applicability of these markers in our population through a prospective study. The aim of this study was to assess the prognostic value of the expression levels of *CASP8AP2* and *H2AFZ* genes, and associate these features with the presence of relapse, EFS, relapse-free survival (RFS) and clinical and laboratory risk parameters, in a cohort of recently diagnosed pediatric patients with ALL. Materials and Methods. Bone marrow samples of 86 patients were collected at diagnosis. A database of clinical, laboratory and patient outcomes was constructed. The RNA was obtained from mononuclear cells and cDNA was synthesized. Relative quantification of the expression levels for the *CASP8AP2*, *H2AFZ* and *ABL1* genes transcripts were determined by real time polymerase chain reaction. According to the level of expression of each gene, the patients were divided and classified into groups of low, medium and high expression. Fisher's exact test was used to determine differences between expression groups with respect to the presence and absence of relapse. The Kaplan-Meier method was applied to obtain differences in RFS and EFS between the expression groups. Logistic regression analysis was performed to determine the risk of relapse. Additionally, the sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated. Results. Of the 86 patients, 74 were diagnosed with B-ALL and 12 with T-ALL; only 21 presented relapse. An increased

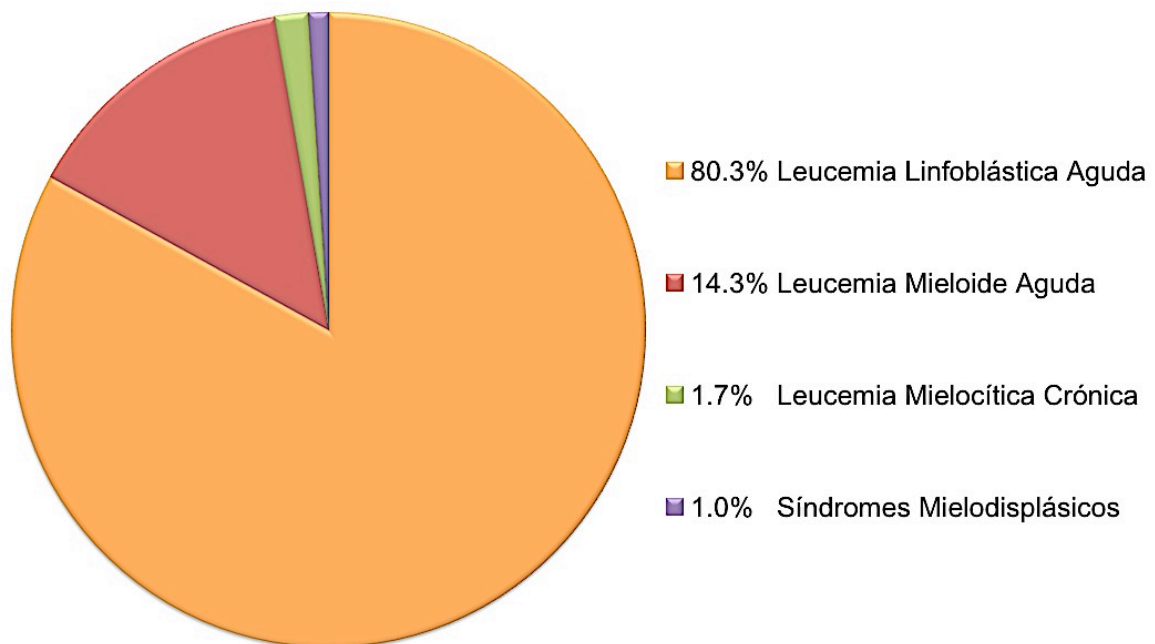
risk for early relapse was found in those patients with T-cell immunophenotype, high white blood cell (WBC) count and low expression of *CASP8AP2* gene. The survival analysis showed superior SFR in patients with medium/high levels of *CASP8AP2* gene expression compared to the low expression group (log rank  $p=0.001$ ). The same trend was observed after analyzing the different levels of *H2AFZ* gene expression; however, for this gene the difference between groups was not significant. The group of patients with low expression levels of both genes showed the lowest RFS and EFS ( $p<0.05$ ). Additionally, the predictive value for relapse of low expression levels of the target genes was determined; high WBC count was used as a reference because it is a well established predictor of relapse. This analysis showed that the PPV and NPV of low expression levels for both genes were close to the values determined for WBC. Predictive values of high WBC count together with low expression of both genes were analyzed. Higher values of sensitivity-specificity and PPV-NPV were observed compared to the values obtained separately for each of these parameters. Discussion and Conclusions. The results show that the group of patients with low expression of *CASP8AP2* gene has lower RFS and EFS. The risk analysis revealed that the T-cell immunophenotype, high WBC count and low expression of *CASP8AP2* gene, confer higher risk to relapse. It was observed that *H2AFZ* gene expression by itself does not identify patients with risk to relapse. The results of the risk analysis are consistent with those found for survival, showing that patients with low expression for both genes have the highest incidence of relapse. This data demonstrate that the low expression of *CASP8AP2* gene may be a useful marker for early relapse in our patients, and can be assessed at diagnosis. This marker acquires greater predictability when is used in combination with the low expression of the *H2AFZ* gene and risk parameters already established as high leukocyte count.



## 1. Introducción

### 1.1. El cáncer infantil en México

En México, el cáncer representa la segunda causa de muerte en niños entre los 4 y 15 años de edad. La leucemia es el tipo más frecuente en este grupo de edad, ya que se presenta en el 50.8% del total de casos con cáncer, de acuerdo al registro del programa de Seguro Popular del 2007 al 2010 (Cuadro 1)<sup>1</sup>. Dentro de la clasificación de las leucemias, el tipo más común es la leucemia linfoblástica aguda (LLA) que se diagnostica en el 83% de los casos (figura 1), y presenta una incidencia de 62.5 casos por millón/año entre los 0 y 18 años de edad)<sup>1</sup>, por lo cual representa un problema de salud pública en nuestro país.



*Figura 1. Frecuencia de las leucemias y síndromes mielodisplásicos en edad pediátrica. El tipo más común de leucemia es la linfoblástica aguda.*

Cuadro 1. Frecuencia/incidencia de cáncer en niños y adolescentes atendidos dentro del programa del Seguro Popular en los años 2007-2010

Diagnóstico	Frecuencia		Incidencia/millón en el año 2010
	(2007-2010)		
	Total n	(%)	
Leucemia	4,515	(50.8)	75.3
Linfomas	904	(10.1)	15.4
Neoplasias intracraneales	812	(9.0)	14.2
Tumores de células germinales	408	(4.2)	9.1
Osteosarcoma	396	(4.4)	4.6
Sarcomas de tejidos blandos	392	(4.3)	4.9
Retinoblastoma	335	(3.7)	5.8
Tumores Renales	320	(3.5)	5.5
Neoplasias reticulares	208	(2.3)	3.9
Neuroblastoma	177	(1.9)	2.3
Tumores Hepáticos	160	(1.7)	3.1
Tumor de Ewing y Sarcomas relacionados	130	(1.4)	2.9
Otros tumores sólidos	179	(2.0)	2.7
Casos en total	8,936	(100)	150.3

Clasificación internacional de cáncer infantil (ICCC-3). Stellarova-Foucher, 2005 (0-18 años de edad).

## 1.2. Leucemia linfoblástica aguda

La LLA comprende un grupo de neoplasias malignas que afectan la proliferación de las células precursoras de los linfocitos (linfoblastos), arrestadas en estadios tempranos de la diferenciación en la médula ósea<sup>2</sup>; principalmente se afectan las células precursoras de linaje B (88%), y en menor frecuencia a las células precursoras T

(12%)<sup>3</sup>. Esta enfermedad es más frecuente en edad pediátrica, aunque también se presenta en adultos.

De todos los tipos de cáncer infantil, particularmente en la LLA se ha logrado un incremento en el porcentaje de cura que va de un 10% registrado en los años 60's, hasta cerca del 90% alcanzado actualmente en países desarrollados<sup>4</sup>. En lo que concierne a instituciones de salud de nuestro país, que cuentan con unidades de oncología pediátrica altamente especializadas, se refiere un 75% de cura para los niños con LLA de precursores B<sup>5</sup>. Este avance se debe principalmente a la identificación de características clínicas y biológicas con valor pronóstico, que son clave en el diseño de los tratamientos clínicos modernos. Estratificar a los pacientes en grupos de riesgo basándose en los factores pronóstico, es una práctica frecuente para adaptar el tratamiento y tratar de evitar una probable recaída<sup>4,6,7</sup>.

Habitualmente los pacientes de LLA son clasificados en grupos de riesgo estándar, intermedio y alto. Los factores que conforman la clasificación de riesgo incluyen: a) características del paciente (edad, género); b) características de la enfermedad al diagnóstico (cuenta inicial de linfocitos en sangre periférica, inmunofenotipo de los blastos leucémicos en médula ósea, presencia de fusiones génicas o arreglos cromosómicos); c) evaluación de respuesta al tratamiento (porcentaje de blastos en médula ósea posterior a tratamiento de esteroides, y enfermedad mínima residual) (Cuadro 2)<sup>8</sup>.

La estratificación de riesgo en los pacientes con LLA ha tenido un gran impacto para el manejo adecuado de los pacientes, gracias a esto actualmente se logra una supervivencia libre de enfermedad en la mayor parte de los casos. Sin embargo, aún persiste un grupo de pacientes que a pesar de carecer de factores de alto riesgo,

eventualmente presentan recaída con una enfermedad altamente resistente a tratamiento. Actualmente se aplican las tecnologías genómicas para identificar nuevos marcadores moleculares valiosos en el pronóstico, que pueden ser útiles en la clasificación de riesgo de los pacientes, preferentemente desde el momento del diagnóstico. Esta conducta permitirá optimizar la aplicación de tratamiento y lograr una mayor supervivencia libre de enfermedad<sup>7-11</sup>.

Cuadro 2. Factores comúnmente utilizados en la estratificación de riesgo en la LLA

Factor	Favorable	Adverso
Edad (años)	1 a 10	<1 ó >10
Cuenta de leucocitos (x10 <sup>9</sup> /L)	<50	≥50
Inmunofenotipo	Precursor de células B	Células T
Genotipo	Hiperdiploide >50 cromosomas	Hipodiploide <44 cromosomas
Fusiones génicas	<i>ETV6-RUNX1</i>	<i>BCR-ABL1</i> <i>MLL-AF4</i>
Respuesta a tratamiento con esteroides (blastos en sangre periférica)	<1000/μl	≥ 1000/μl
Enfermedad mínima residual después de la inducción	<0.01%	≥ 1%

### 1.3. Factores de riesgo convencionales evaluados al momento del diagnóstico de LLA

#### 1.3.1. Características del paciente

##### 1.3.1.1. Sexo

El género es un factor propio del paciente que ha sido reconocido con valor en el pronóstico. En general, los varones tienen menor éxito en la supervivencia, ya que los testículos son reconocidos como “sitios santuario” debido a que los fármacos antineoplásicos no penetran adecuadamente, dando lugar a que las células malignas queden protegidas de los efectos de los quimioterapéuticos sistémicos; por esta razón son sitios frecuentes de recaídas. En algunos protocolos de tratamiento, la condición de sexo masculino, implica un año más de tratamiento con respecto a las mujeres, con el propósito de compensar la diferencia que hay en el pronóstico<sup>4</sup>.

##### 1.3.1.2. Edad

La edad ha sido establecida como uno de los más importantes factores de riesgo, lo cual es evidente al observar las diferencias en el pronóstico entre grupos de niños y adultos con LLA<sup>12</sup>, en estos últimos el pronóstico es desfavorable. A los menores de un año de edad se les atribuye alto riesgo; este tipo de leucemia es considerada congénita, debido a que su presentación es muy temprana y está caracterizada por alteraciones en el gen *MLL*<sup>13,14</sup>. También son calificados como pacientes de alto riesgo, aquellos que tienen una edad mayor a 10 años al momento del diagnóstico y en mayor medida si está presente alguna alteración genética desfavorable como lo es la fusión *BCR-ABL1*, la cual incrementa su frecuencia entre los pacientes adolescentes. La edad de presentación de la LLA se relaciona con las diferencias en la frecuencia de alteraciones génicas observadas en niños y adultos. En edad pediátrica se encuentran con mayor frecuencia alteraciones de buen pronóstico como hiperdiploidía con más

de 50 cromosomas (25%) y fusión *TEL-AML1* (22%); son menos frecuentes alteraciones de mal pronóstico como *BCR-ABL1* (3%). La frecuencia de estas alteraciones en los adultos es de 25% para *BCR-ABL*, del 7% para hiperdiploidia (>50 cromosomas) y 2% para *TEL-AML1*<sup>15</sup>.

### 1.3.2. Características de la enfermedad

#### 1.3.2.1. Cuenta de leucocitos

La cuenta de leucocitos al momento del diagnóstico es considerada uno de los factores pronóstico más relevantes en la LLA. La cuenta total de leucocitos mayor a  $50 \times 10^9/L$  está asociada con pronóstico desfavorable, y el riesgo aumenta aún más cuando el individuo afectado presenta una cifra mayor a  $100 \times 10^9/L$ . La carga tumoral alta favorece la infiltración de células leucémicas a “sitios santuarios” como sistema nervioso central y testículos, y estas características son más comunes en pacientes con inmunofenotipo de células T en comparación con la LLA de precursores B<sup>16</sup>.

#### 1.3.2.2 Inmunofenotipo

El inmunofenotipo de la LLA se establece por citometría de flujo, este estudio define el subtipo de leucemia que presenta cada paciente, lo cual tiene repercusiones terapéuticas<sup>17</sup>. Los inmunofenotipos encontrados en la LLA incluyen a los precursores de células B, a las células B maduras (Burkitt) y la LLA de células T<sup>3</sup>. El tratamiento en la LLA-T difiere del aplicado para la LLA-B debido a la quimiosensibilidad distinta de los linfoblastos de cada linaje<sup>4</sup>. El inmunofenotipo de células T se ha establecido como un marcador de mal pronóstico<sup>18</sup>, los pacientes con este subtipo poseen una supervivencia menor a la observada en la LLA de precursores B<sup>16</sup>.



En la LLA de precursores B tempranos, las células leucémicas expresan CD19, CD10 y TdT en el 90% de los casos, y el 75% también expresan el marcador CD34<sup>22</sup>. Las células que muestran este inmunofenotipo son comúnmente hiperdiploides, lo que está asociado a un pronóstico favorable<sup>19</sup>. Las leucemias con arreglos en el gen *MLL*, que son resultado de las translocaciones cromosómicas t(4;11)(q21;q23) (*MLL-AF4*), t(11;19)(q23;p13.3) (*MLL-ENL*), o t(9;11)(p22;q23) o (*MLL-AF9*), se ubican generalmente en el inmunofenotipo de la LLA de precursores B tempranos; la leucemia caracterizada por rearrreglos en *MLL* se conoce como leucemia bifenotípica o de linaje mixto, debido a que los blastos leucémicos expresan tanto marcadores mieloides (CD14) como linfoides (CD19)<sup>20</sup>. Alrededor del 25% de las leucemias recién diagnosticadas tienen inmunofenotipo pre-B, que al igual que el inmunofenotipo pre-B temprano, expresan CD19, CD20, CD22; más del 95% de estas leucemias expresan CD10 y TdT, pero sólo dos tercios expresan CD34. Del 20 al 25% de los casos con LLA pre-B presentan la translocación t(1;19)(q23;p13) (*E2A-PBX1*); los niños con esta translocación requieren de un tratamiento más agresivo con metotrexate sistémico para lograr una respuesta a tratamiento satisfactoria según lo referido en el protocolo St Jude Total therapy XIII y el protocolo ALL-BMF90<sup>15</sup>.

Del 2 al 4% de los casos con LLA son de células B maduras. Se han establecido dos subtipos diferentes dentro de este grupo, tanto fenotípicamente como genotípicamente. El tipo más común está caracterizado por células con morfología L3 de acuerdo a la clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB); la mayoría de los casos presentan una fase leucémica del linfoma de Burkitt. En esta leucemia las células expresan CD19, CD22, CD20 y con frecuencia CD10, al igual que en la LLA pre-B temprana y pre-B, sin embargo el antígeno CD34 es negativo. Las células de la LLA-B tienen como característica la presencia de la translocación recíproca de la banda 8q24 donde se ubica el gen *c-myc*, con cromosomas que contienen los genes de inmunoglobulinas para las cadenas pesadas (14q32) y ligeras (kappa en 2p12 y lambda en 22q11). Estas translocaciones son la t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(p12;q24) y

t(8;22)(q24;q11). El subtipo menos común de LLA-B está caracterizado por blastos con morfología L1 o L2. Esta leucemia también expresa TdT y CD34, y débilmente CD20. Las translocaciones t(8;14), t(2;8) y t(8;22) están ausentes, así como los rearrreglos en el gen c-myc<sup>17</sup>.

Las leucemias de linaje T muestran el antígeno de superficie CD7 y CD3 citoplasmático (cCD3), más del 90% de los linfoblastos T expresan CD2, CD5 y TdT. Los antígenos de superficie CD1a, CD3, CD4 y CD8, se detectan en menos del 45% de los casos. La LLA de linaje T puede dividirse en tres estadios de diferenciación inmunofenotípica: el estadio temprano (CD7<sup>+</sup>, cCD3<sup>+</sup>, CD3<sup>neg</sup>, CD4<sup>neg</sup> y CD8<sup>neg</sup>) estadio medio o común (cCD3<sup>+</sup>, CD3<sup>neg</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD1<sup>+</sup>), y estadio tardío (CD3<sup>+</sup>, CD1<sup>neg</sup>, y cualquiera de CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>)<sup>17</sup>. Sin embargo, el 25% de las LLA-T muestran patrones de antígenos que no corresponden a ninguno de estos estadios de maduración, por lo que la subdivisión del estadio de diferenciación no solía ser utilizada clínicamente<sup>19</sup>. Recientemente se ha reportado un tipo especial de LLA-T conocida como leucemia aguda linfoblástica de precursores tempranos de células T (ETP-ALL por sus siglas en inglés), la cual está asociada con alto riesgo de falla en el tratamiento de inducción a remisión, estas células tienen un inmunofenotipo especial caracterizado por la pérdida de la expresión de CD1 y CD8, expresan débilmente CD5 aunado a la expresión de uno o más antígenos de estirpe mieloide y/o de troncalidad. El riesgo a recaer en este subgrupo es mayor comparado con otros pacientes con LLA de células T<sup>18</sup>.

### 1.3.3. Características genéticas

El conocimiento de las alteraciones genéticas de la LLA ha sido clave en la optimización de la aplicación de tratamientos satisfactorios, ya que ha permitido definir subgrupos de LLA de bajo y alto riesgo<sup>4</sup>. Aproximadamente el 75% de los

casos pediátricos con LLA portan alguna anomalía cromosómica que puede ser relevante en el pronóstico<sup>21</sup>. Las alteraciones que tienen el mayor impacto en el manejo y tratamiento de la LLA son las translocaciones t(9;22)(q34;q11) (*BCR-ABL1*), t(4;11)(q21;q23) (*MLL-AF4*) y la hipodiploidía <44 cromosomas, dentro del rubro de marcadores genéticos que confieren alto riesgo. Asociadas a riesgo estándar para el paciente, se encuentran la translocación t(12;21)(p13;q22) (*ETV6-RUNX1*) y la hiperdiploidía que se consideran de pronóstico favorable<sup>15</sup>. A continuación se describen las alteraciones presentes tanto en la LLA-T como en la LLA-B.

#### 1.3.4. Alteraciones con valor pronóstico en la LLA-T

En este subtipo aún no ha sido establecida la estratificación de riesgo con base en alteraciones genéticas<sup>19</sup>, sin embargo, se ha observado que la desregulación en la expresión de algunos factores de transcripción como *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*) y las mutaciones en *NOTCH1*, podrían tener utilidad en el manejo de los pacientes<sup>22</sup>.

Actualmente se conocen diferentes tipos de alteraciones genéticas en la LLA-T de células T, que incluyen translocaciones cromosómicas que resultan en rearrreglos aberrantes del receptor de células T (TCR), translocaciones que no involucran el TCR como los que alteran a *MLL*, o las fusiones *NUP214-ABL1* y *PICALM-MLLT10*, amplificaciones, deleciones y mutaciones puntuales<sup>22</sup>. Algunas de estas anomalías son responsables del arresto de las células T en determinados estadios de diferenciación. Los estudios basados en perfiles de expresión génica por medio de microarreglos, han revelado subgrupos específicos en esta entidad. Se han identificado translocaciones cromosómicas que afectan la expresión de los oncogenes *TLX1* y *TLX3*. Se ha encontrado que los pacientes con alteraciones en *TLX1* muestran pronóstico favorable<sup>23,24</sup>, mientras que los casos positivos para *TLX3* se han asociado con un mal pronóstico<sup>25</sup>.

Por otra parte, se refiere la presencia de mutaciones en el gen *NOTCH1* en más del 50% de los casos con LLA T<sup>26</sup>. El receptor transmembranal NOTCH1 es una molécula importante durante la hematopoyesis. Las mutaciones en *NOTCH1* promueven el corte independiente de ligando de NOTCH1 por la proteasa g-secretasa, por lo cual se ha propuesto como una alternativa de tratamiento, el uso de inhibidores de dicha enzima<sup>27</sup>.

### 1.3.5. Alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en la LLA-B

#### 1.3.5.1. Alteraciones numéricas

Hiperdiploidía con más de 50 cromosomas: Esta alteración equivale a un contenido de DNA de 1.16 medido por citometría de flujo. Se encuentra aproximadamente en el 25% de los niños que presentan LLA de linaje B. Esta alteración se asocia con una evolución favorable, especialmente cuando los cromosomas supernumerarios involucran al 4, 10 ó 17; se considera como parámetro en la estratificación de grupos de riesgo para elección de tratamiento<sup>28</sup>.

Hipodiploidía: Está definida por un cariotipo con menos de 45 cromosomas, con contenido de DNA menor a 0.95, se refiere que está presente en menos del 2% de los pacientes con LLA de precursores de células B. Es un factor asociado a alto riesgo y es considerado de mal pronóstico<sup>15,29</sup>, existe tendencia a mayor riesgo de recaída en pacientes con menos de 44 cromosomas y es aún mayor cuando se observan cariotipos cercanos al número haploide<sup>19</sup>.

### 1.3.5.2. Alteraciones estructurales

Translocación t(9;22)(q34;q11.1). Esta translocación resulta en la fusión de los genes *BCR*, ubicado en la banda 22q11.1, y *ABL1*, situado en 9q34; causa una actividad anormal de la tirosina cinasa de *ABL1* asociada con incremento en la proliferación y decremento en la apoptosis. La frecuencia de la fusión *BCR/ABL1* incrementa con la edad; este rearrreglo se encuentra aproximadamente en el 3% de los niños con LLA y en alrededor del 25% de los adultos con este padecimiento<sup>13</sup>. La translocación está asociada con progreso desfavorable de la enfermedad y es catalogada como de alto riesgo en la mayoría de los protocolos actuales de tratamiento de LLA<sup>30</sup>. Los pacientes pediátricos con *BCR/ABL1* presentan con frecuencia mala respuesta a prednisona<sup>31,32</sup> y tienen altos niveles de enfermedad mínima residual al término de la terapia de inducción<sup>13</sup>. Actualmente se cuenta con un tratamiento específico para los pacientes *BCR/ABL1*, en el cual se combina la quimioterapia con un inhibidor de la tirosina cinasa (Imatinib), con lo cual se ha mejorado la evolución de estos pacientes<sup>33</sup>.

Translocación t(12;21)(p13;q22). Esta alteración produce la fusión génica *TEL/AML1*, se encuentra aproximadamente en el 25% de los casos de LLA, y se asocia con un pronóstico favorable. Mayormente se presenta en niños menores a 10 años de edad con LLA preB común<sup>13</sup>. Esta fusión ocurre entre el gen *TEL* ubicado en 12p13, el cual codifica una fosfoproteína nuclear de la familia de los factores de transcripción ETS implicados en la hematopoyesis definitiva<sup>34</sup>, y el gen *AML1* ubicado en la banda 21q22, que codifica para un factor de transcripción, que de manera similar que *TEL*, es esencial para la hematopoyesis embrionaria definitiva<sup>35</sup>. Se sugiere que la fusión *TEL/AML1* inhibe la actividad transcripcional del gen *AML1* normal, el cual está involucrado en la proliferación y diferenciación de las células hematopoyéticas. Esta fusión se encontró asociada con alta quimiosensibilidad a la L-asparaginasa en pacientes tratados con los protocolos del grupo Berlin-Frankfurt-Münster 2000 (BFM)<sup>36</sup>. Las células positivas al gen de fusión *TEL/AML1* también suelen ser más sensibles a otros fármacos,

especialmente a antraciclinas y etopósido (Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology)<sup>37</sup>.

Alteraciones en 11q23. En esta banda cromosómica se ubica el gen de la leucemia de linaje mixto (*MLL*). *MLL* se considera un oncogene con alta promiscuidad, debido a que está implicado en rearrreglos con más de 66 parejas cromosómicas diferentes<sup>38</sup>. *MLL* se encuentra alterado hasta en el 80% de los niños menores de un año con LLA. Las translocaciones más frecuentes en esta leucemia son la t(4;11)(q21;q23) (*MLL-AF4*), la translocación t(11;19) (*MLL-ENL*) y la translocación t(9;11) (*MLL-AF9*), que se encuentran asociadas a un pobre pronóstico, particularmente en pacientes que son menores a 2 años de edad<sup>13,14</sup>. El significado pronóstico de otros rearrreglos que involucran al gen *MLL*, como t(10;11) (*MLL-AF10*) y t(6;11) (*MLL-AF6*), aún no es concluyente<sup>39</sup>.

Translocación t(1;19)(q23;p13). Esta alteración provoca la fusión de los genes *E2A/PBX1*, se encuentra en aproximadamente en el 5% de los casos pediátricos y el 3% de adultos con LLA. Los genes involucrados son el *E2A* ubicado en el cromosoma 19p13 y *PBX1* en el cromosoma 1q23. Esta fusión provoca una proteína aberrante que tiene como efecto el arresto en la diferenciación celular<sup>40</sup>. Este rearrreglo cromosómico no está considerado de mal pronóstico y se refiere que los pacientes que presentan esta alteración tienen una buena respuesta a tratamiento con metotrexate según la experiencia del St Jude Total therapy XIII protocol y el ALL-BMF90 protocol BMF<sup>15,40</sup>.



#### 1.4. Perfiles genómicos de alto riesgo en la LLA

A pesar de que en la LLA se observan alteraciones genéticas características y recurrentes a las que se les ha atribuido valor pronóstico, éstas aún resultan insuficientes para identificar a los pacientes que sufrirán recaída. Los genotipos utilizados para la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo con un tratamiento adaptado a esta característica, sólo cubren el 60% de los casos con LLA-B dependiendo de la población estudiada. Sin embargo, un alto número de recaídas ocurren dentro del 40% restante, lo que implica la necesidad de identificar nuevos genes con valor en el pronóstico, que puedan ser utilizados como marcadores de riesgo<sup>41</sup>. En consecuencia, se ha incrementado el interés por la detección de nuevas alteraciones moleculares a lo largo de todo el genoma de los pacientes con LLA<sup>9,41</sup>. Diversos grupos han utilizado plataformas de microarreglos de alta resolución, entre los que se incluyen aquéllos que contienen polimorfismos de un solo nucleótido y arreglos de oligonucleótidos para hibridación genómica comparativa; esto con el fin de detectar nuevas alteraciones genéticas en la LLA, tanto de progenitores B como de linaje T. Con estos estudios, se han identificado múltiples alteraciones que ocurren en reguladores transcripcionales del desarrollo linfoide, reguladores del ciclo celular y genes supresores de tumor, genes de señalización linfoide y de respuesta a tratamiento<sup>42,43</sup>. Dentro de las moléculas identificadas asociadas con riesgo de recaída en la LLA, se encuentran la expresión de isoformas no funcionales de *IKZF1*<sup>44,45</sup>, rearrreglos y alta expresión del gen *CRLF2*<sup>46,47</sup>, mutaciones en la familia *JAK*<sup>46,46</sup>, y baja expresión de los genes *CASP8AP2*<sup>48-50</sup> y *H2AFZ*<sup>48</sup>. Estos últimos resultan de particular interés debido a que son relativamente recientemente identificados y aún no se ha determinado con precisión su utilidad como marcadores de pronóstico.

#### 1.4.1. Gen *CASP8P2*

El gen *CASP8AP2*, también conocido como *FLICE* o *FLASH*, está localizado en la banda cromosómica 6q15. Este gen codifica para una proteína con múltiples funciones, la cual es reconocida como un mediador clave en el proceso de apoptosis, en la señalización que activa la caspasa 8. Es una de las moléculas iniciadoras de la cascada proteolítica de las caspasas que inducen la muerte celular, formando parte del dominio de muerte, el cual incluye al receptor de Fas, al adaptador de unión a Fas (FADD) y a la caspasa 8<sup>51</sup>. Recientemente, se ha determinado que *CASP8AP2* participa en diversas funciones: como molécula esencial en la división celular<sup>52</sup>; como coactivador de la oncoproteína c-Myb, que es un factor de transcripción clave requerido en la hematopoyesis temprana<sup>53</sup>; también forma parte de la vía de señalización de los glucocorticoides, y el aumento en su expresión incrementa la sensibilidad de la célula a agentes como la prednisona, asparaginasa y daunorubicina<sup>44</sup>. El significado clínico de *CASP8AP2* fue reportado por primera vez por Flotho y cols. 2006, que asociaron las diferencias en expresión del gen con la respuesta a agentes quimioterapéuticos *in vivo* y con la supervivencia libre de evento de los pacientes (SLE)<sup>49</sup>. Los pacientes con niveles de expresión alta tuvieron significativamente mayor SLE y baja incidencia acumulativa a recaída, en comparación con los pacientes con bajos niveles de expresión. Posteriormente Flotho y cols. 2007, identificaron la firma génica de 14 genes asociados con enfermedad mínima residual y expresión baja de *CASP8AP2*<sup>48</sup>. La utilidad de la expresión de *CASP8AP2* para la identificación de pacientes con pronóstico adverso en la LLA aún es controvertida. Yang y cols. 2010, no encontraron asociación entre la sub-expresión del gen y la presencia de recaídas<sup>54</sup>, en contraste, Jiao y cols. 2012, refieren que en su experiencia *CASP8AP2* es un marcador potencial de pronóstico<sup>50</sup>. Por lo anterior, Camitta 2006 señala la necesidad de realizar estudios en poblaciones para corroborar la utilidad de la expresión de *CASP8AP2* como marcador de predicción de recaída<sup>55</sup>.

#### 1.4.2. Gen *H2AFZ*

Otro gen con expresión alterada en pacientes con mala respuesta al tratamiento es el de la histona 2 variante Z (*H2AFZ*). Es una molécula altamente conservada, la cual se expresa de manera independiente a la replicación del DNA y está involucrada en diversos procesos biológicos como: la activación de genes<sup>56,57</sup>; segregación y estabilidad cromosómica<sup>58,59</sup>; silenciamiento genético por heterocromatina<sup>57</sup> y progresión del ciclo celular<sup>56</sup>. Flotho y cols. 2007, reportaron una asociación entre los niveles bajos de expresión del gen *H2AFZ* y el alto riesgo de presentar recaída, también observaron que los pacientes que presentaron niveles bajos de expresión para los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*, mostraron respuesta subóptima a la remisión y eventualmente recayeron<sup>48</sup>. Este resultado apoya la observación de Lugthart y cols., en 2005, quien encontró que la baja expresión de *H2AFZ* se asocia con resistencia a la quimioterapia *in vitro*<sup>60</sup>. Sin embargo, la expresión de *H2AFZ* no ha sido evaluada en otras poblaciones de pacientes con LLA.

#### 1.5. Respuesta al tratamiento.

La aplicación de un tratamiento adecuado basado en la clasificación de riesgo, es importante en la evolución y supervivencia del paciente con LLA<sup>61</sup>. La respuesta inicial al tratamiento, evaluada por la reducción de blastos tanto en sangre periférica como en médula ósea, es un poderoso parámetro de riesgo para los niños con LLA, ya que permite la identificación temprana de los pacientes con riesgo a recaer <sup>62,63</sup>.

##### 1.5.1. Respuesta a tratamiento de esteroides (Prednisona)

La respuesta temprana a tratamiento es uno de los indicadores de pronóstico más utilizados en la LLA. Depende de numerosas variables, incluyendo características clínico-biológicas de la enfermedad, la dosis de quimioterapia, y la habilidad de cada

paciente para metabolizar fármacos antileucémicos<sup>64</sup>. El número de blastos circulantes después de la primera semana de quimioterapia, está asociado con el riesgo a presentar recaída<sup>31</sup>. Para la determinación de la respuesta temprana al tratamiento se utiliza un valor de corte en la cuenta de blastos en sangre periférica de 1,000/ $\mu$ l, el cual se toma como referencia para catalogar a los pacientes dentro de dos grupos: buena respuesta a prednisona <1,000/ $\mu$ l y mala respuesta  $\geq$  1,000/ $\mu$ l<sup>65</sup>; los pacientes sin blastos detectables, han mostrado tener mejor pronóstico<sup>63</sup>. Aunque diversos estudios refieren que la respuesta temprana a tratamiento con prednisona es el indicador más certero en la predicción de la respuesta a tratamiento<sup>30,31,63</sup>, existe controversia ya que se basa en la cuantificación de blastos en sangre periférica por métodos citomorfológicos, que pueden ser subjetivos y tiene una sensibilidad limitada de 5-10 x 10<sup>-2</sup> <sup>63,66</sup>. La utilidad de esta clasificación de riesgo, ha sido ampliamente reconocida en niños con LLA desde la década de los 80's<sup>65</sup>.

#### 1.5.2. Determinación de enfermedad mínima residual (EMR) como valoración de respuesta a tratamiento.

El término de EMR se refiere a los bajos niveles de enfermedad presentes durante o tras finalizar un tratamiento quimioterapéutico de inducción a remisión subóptima, al mismo tiempo se utiliza para referirse a un bajo grado de enfermedad que es potencialmente compatible con la recaída de un paciente que se encuentra en una remisión a largo plazo<sup>67</sup>. La detección de EMR tiene aplicabilidad en la práctica clínica, debido a su alto valor en el pronóstico en una serie de enfermedades hematológicas malignas, como lo es la LLA<sup>68</sup>. En diversos estudios se ha demostrado que la presencia de EMR correlaciona de manera significativa con la evolución clínica del paciente. De manera particular se ha identificado que la EMR es relevante en el pronóstico de niños con LLA<sup>69,70</sup>. Se tiene referencia que los pacientes que presentaron EMR en aspirados de médula ósea, con valores de 0.01% o mayores, en cualquier punto durante el tiempo de tratamiento, tienen un riesgo significativamente mayor de presentar recaída<sup>68-70</sup>. Los pacientes que manifestaron EMR con porcentajes mayores

o iguales al 1% al término del tratamiento de inducción a remisión, y que presentaron valores del 0.1% o mayores durante la terapia de consolidación, tuvieron un riesgo extremadamente alto a presentar recaída. Con base en este mismo argumento, el ensayo de EMR también ayuda a identificar al grupo de pacientes con pronóstico favorable<sup>68</sup>. Por otro lado, la EMR también se considera un factor de riesgo independiente que predice recaídas subsecuentes en pacientes con LLA que han presentado una primera recaída y que lograron entrar a una segunda remisión<sup>71</sup>.

#### 1.6. Recaída en la LLA

A pesar de los avances en el manejo y tratamiento actuales de la LLA, aproximadamente un 20% de los niños recaen. La recaída en la LLA, está definida como la reaparición de células leucémicas en cualquier sitio del cuerpo. Esto puede suceder como un evento aislado en un solo sitio (medular o extramedular), o puede presentarse de forma simultánea en ambos sitios. La mayor parte de las recaídas conservan el inmunofenotipo y el genotipo de la leucemia original, aunque en raras ocasiones se pueden observar células de un linaje diferente. De manera general, los blastos leucémicos presentes en las recaídas suelen ser menos responsivos y requieren de tratamientos intensivos<sup>72</sup>.

La recaída puede ser temprana o tardía, con base al tiempo de aparición. Se considera recaída temprana cuando se presenta antes de 30 meses del inicio del tratamiento.

## 1.7. Supervivencia

### 1.7.1. Supervivencia libre de recaída

La supervivencia libre de recaída (SLR), también conocida como supervivencia libre de enfermedad, es el período de tiempo desde el momento del diagnóstico del cáncer hasta la fecha del último contacto médico con el paciente sin signos o síntomas de la enfermedad, o hasta la fecha de presentación de recaída. En un ensayo clínico, la medición de la SLR es una manera de evaluar la respuesta al tratamiento<sup>73</sup>.

### 1.7.2. Supervivencia libre de evento

La supervivencia libre de evento (SLE), es el tiempo transcurrido desde el diagnóstico de la leucemia hasta la fecha de aparición de cualquiera de los siguientes eventos: muerte en inducción, falla a la terapia de inducción a la remisión, recaída o muerte en remisión o el desarrollo de una neoplasia secundaria, así como la fecha en que se tuvo contacto con el paciente libre de evento por última vez<sup>73</sup>.

### 1.7.3. Supervivencia global

La supervivencia global (SG) también es conocida como tasa de supervivencia, se define como el porcentaje de personas en un grupo de estudio o tratamiento que siguen vivos durante un período de tiempo después de que se diagnosticaran o comenzaran el tratamiento para una enfermedad como el cáncer. La tasa de supervivencia global a menudo se expresa como una tasa de supervivencia de cinco años, que es el porcentaje de personas en un grupo de estudio o de tratamiento que están vivas cinco años después del diagnóstico o del inicio del tratamiento<sup>73</sup>.



## 2. Justificación

El cáncer es la segunda causa de muerte infantil en el mundo, y la LLA es el tipo más frecuente. En la actualidad, más del 80% de los pacientes con LLA alcanza la cura gracias a la aplicación de tratamientos basados en la clasificación de riesgo de cada paciente, que está determinada por diferentes parámetros clínicos, genéticos y de respuesta temprana a tratamiento. Sin embargo, aún es elevado el número de pacientes que recaen a pesar de no mostrar características de riesgo. Recientemente, a través de estudios genómicos, se han identificado nuevos marcadores genéticos con potencial de predicción del pronóstico de los pacientes con LLA; dentro del grupo de genes con probable valor predictivo de recaída, se encuentran el gen de la *CASP8AP2* y el de la variante de histona *H2AFZ*. La expresión baja de estos genes, se ha asociado con menor SLE y mayor frecuencia de recaída. A la fecha se han realizado trabajos en donde se analiza el valor de la expresión de estos genes, sin embargo, no todos los reportes apoyan la asociación de la expresión baja de *CASP8AP2* con mal pronóstico, y sólo se cuenta con un estudio que analiza al gen *H2AFZ*. Aunque se ha sugerido que la expresión de ambos genes impacta en la predicción de recaída, no hay que dejar de lado que el comportamiento de estos posibles marcadores de predicción a la recaída puede variar dependiendo de los tratamientos aplicados a los pacientes, así como por la respuesta individual de cada uno de ellos; por lo anterior, es indispensable conocer la utilidad de estos marcadores en un estudio prospectivo en nuestra población, y así determinar si el análisis de la expresión de *CASP8AP2* y *H2AFZ* puede detectar desde el diagnóstico pacientes con riesgo a recaer.

### 3. Objetivos

#### 3.1. Objetivo general

- ✓ Determinar si los niveles de expresión de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ* están asociados con la presencia de recaída, SLE, así como con los parámetros de evaluación de riesgo clínico y de laboratorio convencionales, en una cohorte de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico.

#### 3.2 Objetivos particulares

- ✓ Determinar los niveles de expresión de los transcritos de *CASP8AP2* y *H2AFZ* en pacientes pediátricos recién diagnosticados con LLA.
- ✓ Determinar la asociación de los niveles de expresión de *CASP8AP2* y *H2AFZ* con la presencia de eventos adversos (recaída y muerte), y con los parámetros de clasificación de riesgo convencionales para LLA.
- ✓ Conocer el valor pronóstico para recaída de los niveles de expresión de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*.

## 4. Metodología

### 4.1. Selección de pacientes

Se capturaron un total de 164 pacientes con diagnóstico de LLA en el Instituto Nacional de Pediatría y el Hospital para el Niño Poblano, entre febrero de 2008 y diciembre de 2010. Se colectaron aspirados de médula ósea al momento del diagnóstico de la leucemia. Se eliminaron aquellos casos en los que no se obtuvo material biológico para realizar los análisis moleculares y los que recibieron tratamiento previamente a la obtención de la muestra de médula ósea; con base en esto, las muestras de 86 pacientes fueron adecuadas para el estudio. El proyecto contó con la aprobación y siguió los lineamientos de los Comités de Investigación y Ética Institucionales.

Se construyó una base de datos mediante la revisión del expediente clínico de cada uno de los pacientes, en la que se incluyeron las características clínicas y de laboratorio para la clasificación de riesgo de la enfermedad, y también se obtuvieron los datos de seguimiento clínico.

La leucemia fue clasificada al diagnóstico por inmunofenotipificación de acuerdo a los siguientes criterios: para LLA-B, cCD179a+, cCD22+, CD19+, con análisis adicional de CD34, TdT, CD10, CD20, CD22; para LLA-T, cCD3+, CD7+, con análisis adicional de CD34, TdT, CD1, CD2, CD3, CD5.

#### 4.2. Obtención y procesamiento de la muestra de médula ósea

Se colectó una muestra de 3 a 5 ml de aspirado de médula ósea (AMO) anticoagulado con heparina, por cada paciente. A partir de estas muestras se separó la fracción de las células mononucleadas por medio de un gradiente de densidad, para lo cual se diluyó el AMO con PBS (solución amortiguadora de fosfatos por sus siglas en inglés, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, USA) en una proporción 1:1. Por otro lado, se agregaron 3ml de solución Lymphoprep™ (Nycomed, Oslo, Norway) en un tubo cónico de 15ml y posteriormente se adicionó la muestra diluida teniendo cuidado de no romper las dos fases, a continuación se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min. Posteriormente se recuperó la capa de células mononucleadas con la ayuda de una pipeta de transferencia; a estas células se les realizaron tres lavados consecutivos con 10ml de PBS. Una vez que se purificaron las células, se cuantificaron con un hemocitómetro y se les adicionó un volumen suficiente de amortiguador de lisis celular RLT (Qiagen, Hilden, Germany) y se almacenaron en nitrógeno líquido hasta la subsecuente extracción de RNA total.

#### 4.3. Extracción de RNA y síntesis de cDNA

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las instrucciones de manufactura. El RNA se cuantificó en un espectrofotómetro y se verificó la integridad del RNA según el patrón de corrimiento electroforético característico, en un gel de agarosa al 1% revelado con bromuro de etidio y luz ultravioleta. Partiendo de 1µg de RNA total se generó el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de retro-transcripción siguiendo las siguientes condiciones:

Componentes de la primer fase de la reacción: 1µg de RNA, 0.5µl de hexámeros (100mM), agua DEPC (dietilpirocarbonato; Invitrogen, Carlsbad, USA) para un volumen final de ambas fases de la reacción de 20µl.

Componentes de la segunda fase de la reacción: 4µl de amortiguador 5X para la cadena molde (50mM de Tris-HCl pH 8.3, 75mM KCl y 3mM de MgCl<sub>2</sub>), 0.2mM de dNTP's, 5 unidades de enzima transcriptasa reversa MMLV (Virus de la leucemia murina de Molones), 2µl de DTT (ditiotreitól) como inhibidor de RNAsas (Invitrogen, Carlsbad, USA).

La primera fase de la reacción consistió en desnaturalización a 72° C por 3 min, el tubo de reacción se colocó inmediatamente en hielo y se agregó la mezcla de reacción de la segunda fase de incubación por 60 min a 37° C, y una etapa final de 7 min a 72° C.

Una vez sintetizado el cDNA, se realizó una PCR punto final del gen gliceraldehído 6 fosfato deshidrogenasa (GAPDH), con el siguiente juego de oligonucleótidos, 5'-ATCCCATCACCATCTTCCAG - 3' para la secuencia sentido, y 5'-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA - 3' para la secuencia antisentido. El tamaño del producto de amplificación fue de 317pb.

La reacción de amplificación por PCR consistió en los siguientes componentes: 1µl de cDNA, 1.5 unidades de enzima Taq polimerasa, 10pmol de cada oligonucleótido, 0.2mM de dNTP's, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 50mM de KCl, 20mM de Tris-HCl pH8.4 (Invitrogen, Carlsbad, USA) y agua para llevar a un volumen final de 25µl. La PCR

consistió de una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguida de 28 ciclos: desnaturalización de 30 seg a 94°C, alineamiento 30 seg a 62°C, extensión de 1 min a 72°C y extensión final de 5 min a 72°C. Se comprobó la amplificación por corrimiento electroforético del producto de PCR, en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

#### 4.4. Determinación de la expresión de *CASP8AP2* y *H2AFZ*

Los niveles de expresión de los transcritos de los genes *CASP8AP2*, *H2AFZ* y *ABL1*, fueron determinados por cuantificación relativa por RT-PCR en tiempo real, utilizando el LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science, Germany). La amplificación por qPCR de los cDNAs se realizó con sondas de expresión génica tipo TaqMan procedentes de la Universal Probe Library System (Roche Applied Science, Germany). Se utilizaron la sonda No.50 para *CASP8AP2*, la No.13 para *H2AFZ* y la No.86 para *ABL1*. El juego de oligonucleótidos utilizados para *CASP8AP2* NM\_012115.2 fueron: 5'-CCAGAGAGTCCGAGGGAGT-3' para la secuencia sentido y 5'-CCTTTTGAGAGTCACCACCTG-3' para la secuencia antisentido. Para *H2AFZ* NM\_002106.3N el set de oligonucleótidos fue: 5'-CACCGTGGGTCCGATTAG-3' para la secuencia sentido y 5'-GTCCTTTCCAGCCTTACCG-3' para la secuencia antisentido. La cuantificación de los transcritos se calculó mediante el método  $\Delta\Delta C_t$  utilizando el software LightCycler® Versión4 (Roche Applied Science, Germany), con el método de cuantificación relativa monocromática, normalizando los valores con el gen *ABL1* (control endógeno). El diseño de oligonucleótidos utilizado para el control endógeno *ABL1* NM\_007373.2 fueron: 5'-CAGAGAAGGTCTATGAACTCATGC-3' para la secuencia sentido y 5'-GGTGGATTTTCAGCAAAGGAG-3' para la secuencia antisentido.

Para conocer las condiciones óptimas de la reacción de PCR en tiempo real, se realizó una curva estándar para cada uno de los genes blanco, así como para el control

endógeno. Con este fin, a partir de una línea celular de linfocitos B humanos provenientes de un individuo sano, se extrajo RNA total y con 1µg se sintetizó cDNA; posteriormente, se realizó una dilución del cDNA inicial de 1:10 para continuar con diluciones seriales de 1:5, 1:25, 1:125. De cada una de las curvas estándar se obtuvo una eficiencia de 2.09, 2.07 y 2.04 para cada uno de los ensayos: *CASP8AP2*, *H2AFZ* y *ABL1* respectivamente, se consideró como eficiencia óptima para estos ensayos un valor igual a 2.0. Con estas curvas también se determinó la dilución óptima para el PCR, la cual resultó ser de 1:50.

Cada muestra analizada por PCR en tiempo real se ensayó por duplicado, y para asegurar la reproducibilidad en cada ensayo realizado, se amplificó una muestra de referencia (control positivo: línea celular de linfocitos B humanos sanos) y un control negativo (agua). La reacción de PCR se preparó utilizando 2µl de cDNA (dilución 1:50), 0.2µl de cada oligonucleótido (10µM), 0.1µl de sonda de hidrólisis TaqMan® (10µM), 2µl de LightCycler® TaqMan® Master (Roche Applied Science, Germany) y agua grado biología molecular para un volumen final de 10µl. La PCR se realizó en capilares bajo las siguientes condiciones: 1) preincubación de 10 min a 95°C; 2) 45 ciclos de amplificación que consistieron en 10 seg de desnaturalización a 95°C, seguido por 30 seg de alineación a 60°C y 5 seg a 72°C; 3) enfriamiento de 30seg a 30°C. En cada ciclo el equipo registra la lectura de fluorescencia a una longitud de onda de 530nm

#### 4.5. Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis univariado y multivariado utilizando pruebas de tendencia central para establecer el tipo de distribución para cada variable. Para determinar diferencias entre el grupo de pacientes que presentaron o no recaída, con respecto a la expresión de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*, así como con sus características clínicas y de laboratorio, se utilizó la prueba exacta de Fisher. Para determinar las diferencias en

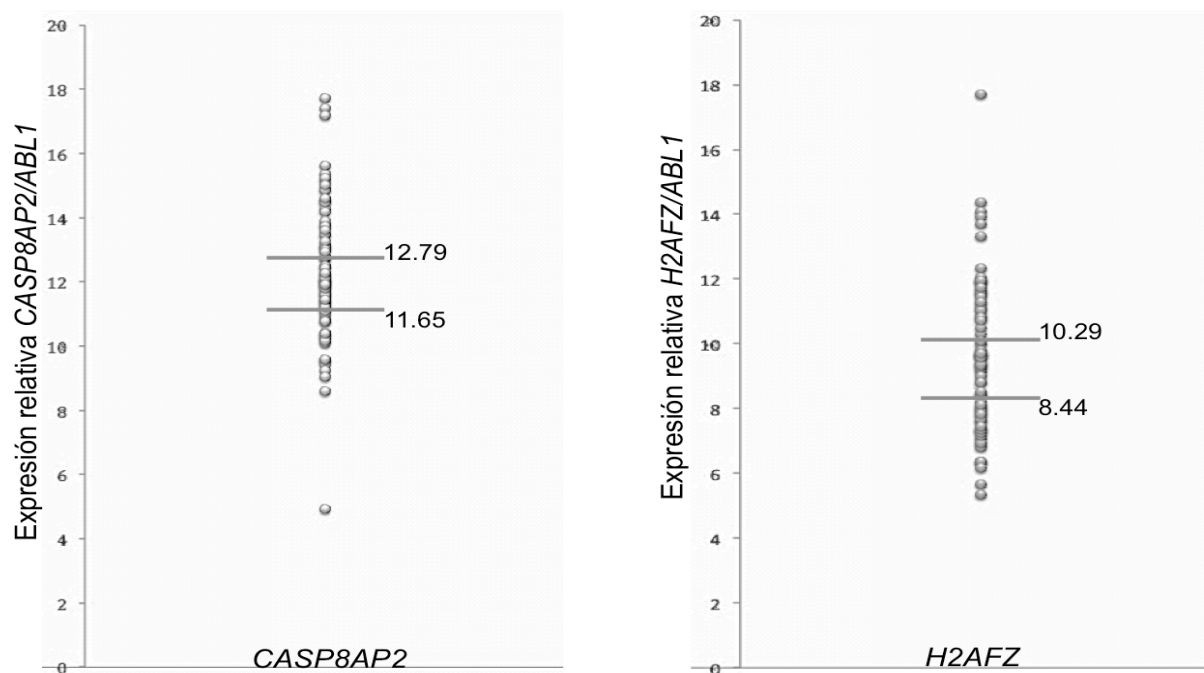
la SLR y la SLE entre los grupos de expresión (baja, media y alta) se utilizó el método de Kaplan-Meier. La SLR se definió como el tiempo transcurrido de la fecha de diagnóstico a la aparición de recaída, y la SLE incluyó el tiempo transcurrido a partir de la fecha del diagnóstico a la presentación de muerte o recaída. Se realizó un análisis de regresión logística para determinar el riesgo de presentar recaída en los pacientes con niveles bajos de expresión de ambos genes, así como con diversas características clínicas y de laboratorio (género, edad, cuenta de leucocitos). Se trabajó con un intervalo de confianza de 95% y se consideró como valor significativo el valor de  $p \leq 0.05$ . Se determinó el valor predictivo para la expresión baja de los genes estudiados y para la cuenta de leucocitos; adicionalmente se calcularon la sensibilidad y especificidad, así como los valores predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN). Se realizó un análisis de  $X^2$  para determinar diferencias entre VPP de la cuenta de leucocitos y la expresión del gen *CASP8AP2*; y entre recaída (temprana y tardía) y la expresión de *CASP8AP2*.



## 5. Resultados

### 5.1. Niveles de expresión de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*

La clasificación de la expresión de los genes estudiados se realizó con base en los métodos descritos por Flotho et al. 2006 y Yang et al 2010<sup>49,54</sup>. El total de pacientes se dividió por percentiles en tres grupos de acuerdo al nivel de expresión génica, y se obtuvo una clasificación en expresión baja, media y alta. Los valores de corte para *CASP8AP2* fueron  $\leq 11,65$  para expresión baja; 11.66 - 12.79 para expresión media y  $> 12.79$  para expresión alta. Los valores de corte para *H2AFZ* fueron  $\leq 8.44$  para expresión baja; 8.45 – 10.29 para expresión media y  $> 10.29$  para expresión alta. Las dispersiones de los valores de expresión del grupo de pacientes analizados se muestran en la figura 2.



*Figura 2. Dispersión de los valores de expresión de CASP8AP2 y H2AFZ. Los grupos de expresión se determinaron por percentiles. Para CASP8AP2 los puntos de corte fueron  $<11.65$  para expresión baja, 11.65-12.79 expresión media y  $>12.79$  expresión alta. Para el gen H2AFZ los valores de corte fueron  $<8.44$  para expresión baja, 8.44-10.29 expresión media y  $>10.29$  para expresión alta.*

Para conocer el comportamiento de los diferentes niveles de expresión génica con respecto a la SLR y SLE, se realizó un análisis de Kaplan-Meier (figura 3). Se encontró que el grupo de pacientes con expresión baja de *CASP8AP2* presentó menor SLR, con una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los grupos de expresión media y alta (log rank  $p= 0.001$  y  $p= 0.002$ , respectivamente). Sin embargo, al comparar los grupos de expresión media y alta, no se encontró diferencia significativa (log rank  $p= 0.354$ ) (figura 3A). Al analizar este mismo gen para la SLE, los resultados encontrados fueron similares (figura 4), el grupo de expresión baja mostró diferencia significativa con respecto al grupo de expresión alta (log rank  $p= 0.01$ ), mientras que entre los grupos de expresión baja y media se observó sólo una tendencia a ser significativamente diferentes (log rank  $p= 0.09$ ); entre los grupos de expresión alta y media no hubo diferencias (log rank  $p= 0.268$ ).

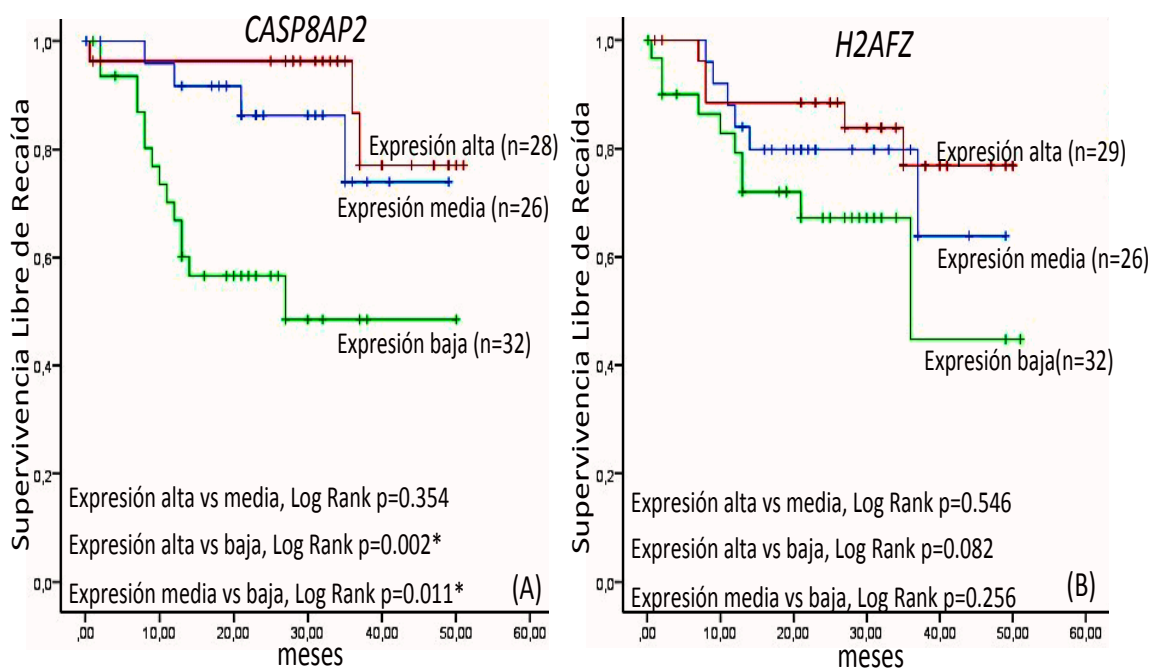


Figura 3. Análisis de SLR por el método de Kaplan-Meier, basado en los grupos de expresión alta, media y baja. (A) los pacientes con expresión alta y media de *CASP8AP2*, tienen mayor SLR vs el grupo de expresión baja; (B) el grupo de pacientes con expresión baja de *H2AFZ* tiende a presentar menor SLR. [\*= Valores estadísticamente significativos].

Al realizar los análisis de supervivencia asociados a los niveles de expresión del gen *H2AFZ*, se encontró el mismo comportamiento. El grupo con baja expresión génica presentó la menor SLR; entre los grupos de expresión baja y alta se encontró una tendencia a ser significativamente diferentes (log rank  $p= 0.08$ ). No se encontraron diferencias al comparar los otros grupos (figura 3B).

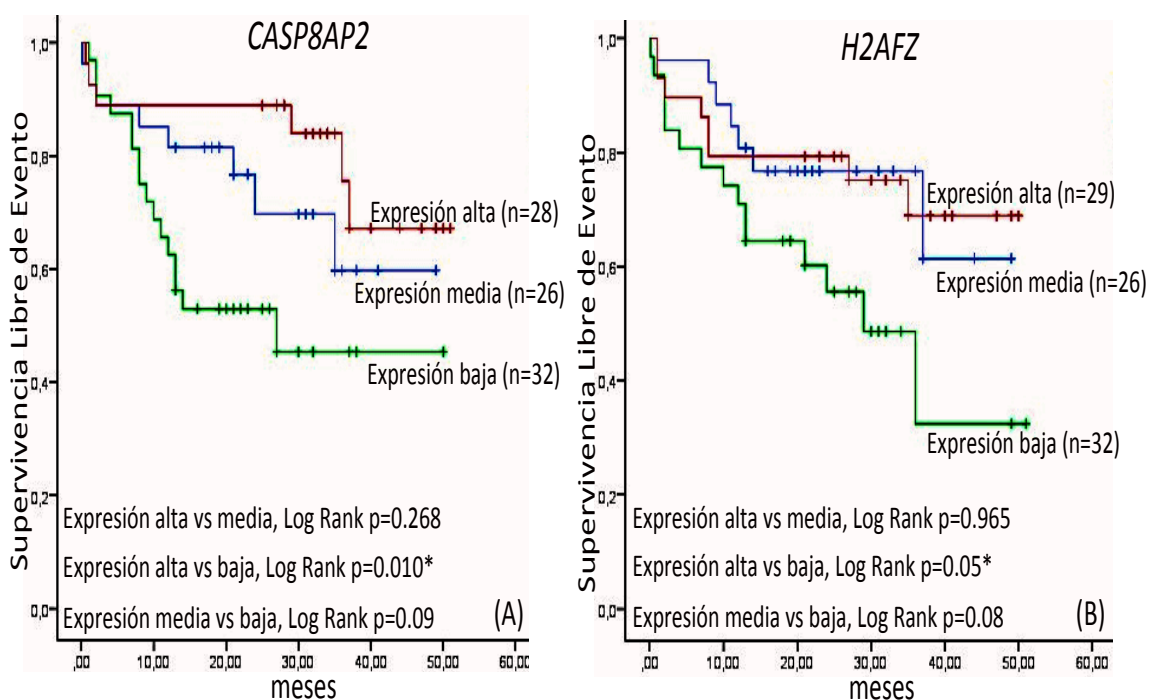


Figura 4. Análisis de SLE por el método de Kaplan-Meier, basado en los grupos de expresión alta, media y baja. (A) los pacientes con expresión alta y media de *CASP8AP2*, tienen mayor SLE vs el grupo de expresión baja; (B) el grupo de pacientes con expresión baja de *H2AFZ* presenta una menor SLE vs los demás grupos de expresión. [\*= Valores estadísticamente significativos].

Se analizó la supervivencia de los pacientes que presentaron los mismos niveles de expresión en ambos genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*, se obtuvieron resultados similares a los encontrados para el análisis individual del gen *CASP8AP2*. Para la SLR se observaron diferencias entre los grupos de expresión alta vs. baja (log rank  $p= 0.007$ ); también entre los grupos de expresión media vs. baja (log rank  $p= 0.03$ ) y hubo

tendencia entre los grupos alto vs. medio (log rank  $p= 0.317$ ) (figura 5A). En cuanto a la SLE se observaron diferencias entre los grupos de expresión alta vs baja (log rank  $p= 0.05$ ); entre los grupos medio vs bajo (log rank  $p= 0.02$ ) y tendencia entre los grupos alto vs medio (log rank  $p= 0.631$ ) (figura 5B). Para ambos tipos de supervivencia, los pacientes con expresión media y alta se comportaron de forma similar y sólo el grupo de expresión baja se comporta diferente. Con base en estas observaciones se decidió manejar a los grupos de expresión alta y media como un grupo único, para ser comparados con el grupo de baja expresión.

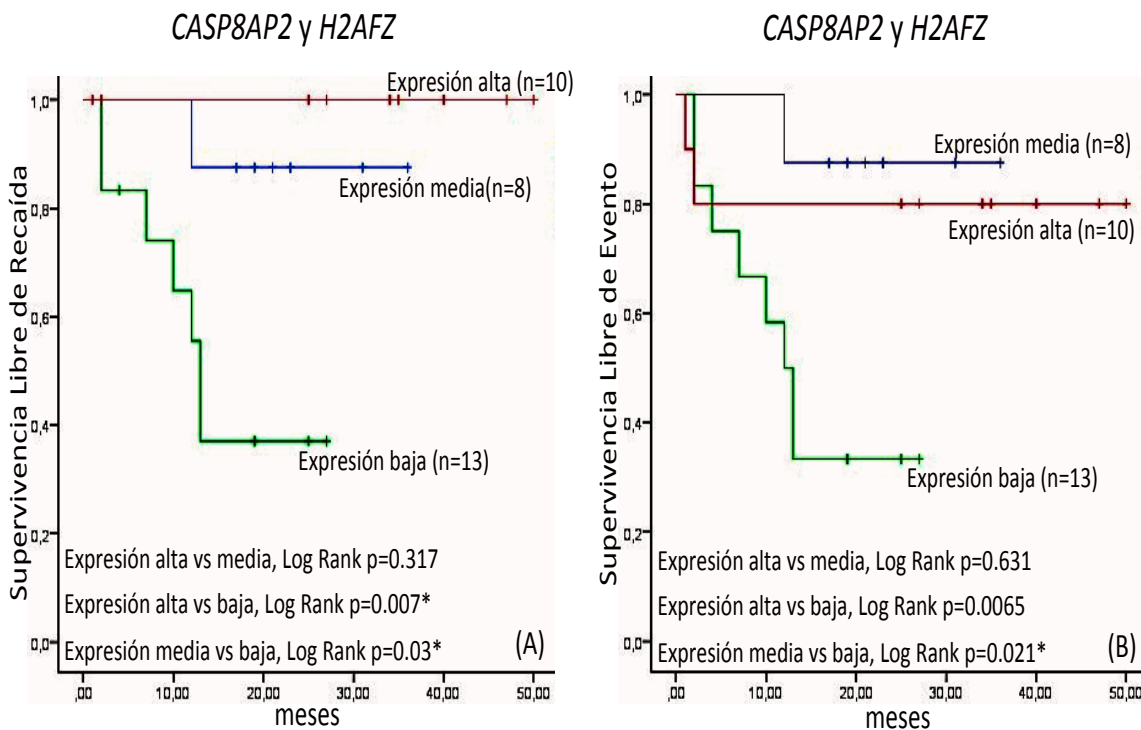


Figura 5. Análisis de SLR y SLE Kaplan-Meier con base en la expresión de CASP8AP2 y H2AFZ. (A) los pacientes con expresión alta de CASP8AP2/H2AFZ tienen la mayor SLR, la menor SLR la presentan el grupo de pacientes con expresión baja y (B) los pacientes con expresión baja de CASP8AP2/H2AFZ tienen la menor SLE. [\*= Valores estadísticamente significativos].

## 5.2. Análisis de supervivencia de los grupos de expresión baja y media/alta de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*.

Para conocer el impacto de la expresión baja y media/alta de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*, sobre la SLE y la SLR, se realizó un análisis de supervivencia mediante curvas de Kaplan-Meier. El análisis reveló que la mayor SLE se presenta en el grupo de pacientes con niveles de expresión medios/altos para el gen *CASP8AP2* (log rank  $p=0.001$ ), en comparación con el grupo de expresión baja (figura 6A). El mismo comportamiento fue observado al analizar los diferentes niveles de expresión del gen *H2AFZ*, mostrando una diferencia entre grupos con tendencia a ser significativa (log rank  $p=0.08$ ) (figura 6B). Al analizar la SLE se encontró que los pacientes que presentaron expresión menor, en cualquiera de los genes estudiados, tienen menor SLE con respecto a los pacientes con expresión media/alta ( $p<0.05$ ) (figura 6C y D). Con base en estos resultados, se analizó la expresión de los genes en conjunto, y se observó que el grupo de pacientes con expresión baja en ambos genes mostró la menor SLR y también SLE (log rank  $p=0.001$ ) con respecto a los pacientes con expresión media/alta para ambos genes, y aquéllos con expresión baja para un sólo gen (figura 7A y B).

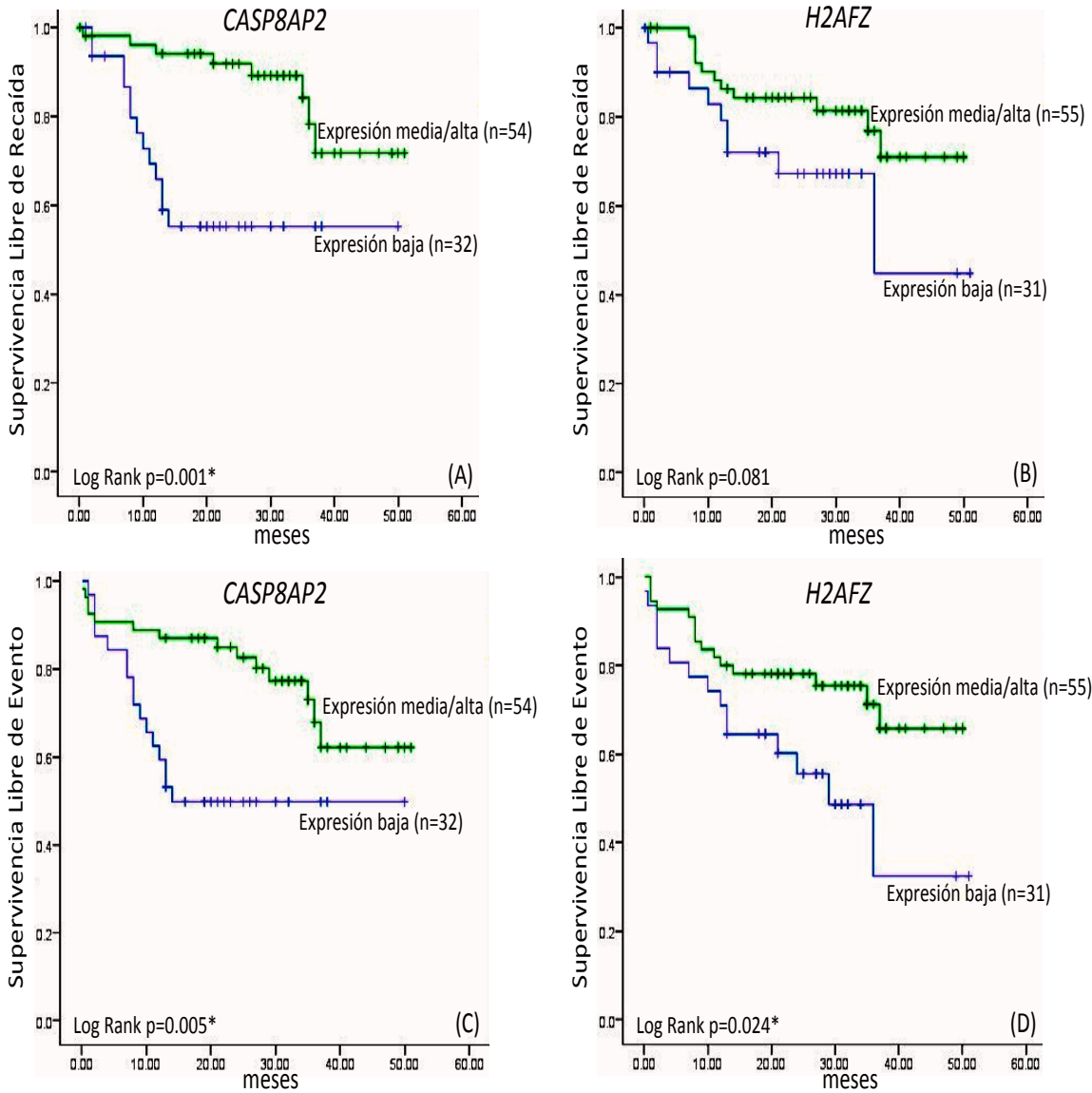


Figura 6. Análisis de SLR y SLE mediante Kaplan-Meier, basado en la expresión génica. (A) los pacientes con expresión media/alta de *CASP8AP2*, tienen mayor SLR; (B) el grupo de pacientes con expresión baja de *H2AFZ* tienden a presentar menor SLR; (C,D) los pacientes con expresión baja presentan una menor SLE. [\*= Valores estadísticamente significativos].

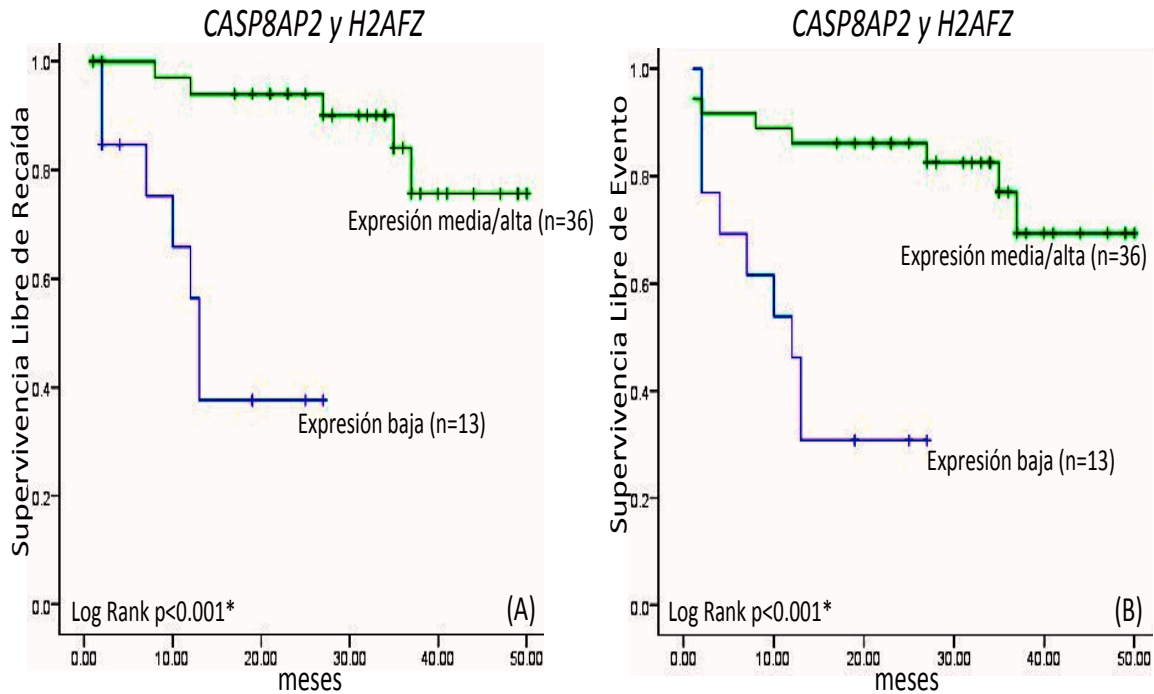


Figura 7. Análisis de SLR y SLE mediante Kaplan-Meier, basado en la expresión de CASP8AP2 y H2AFZ. (A) los pacientes con expresión media/alta de CASP8AP2/H2AFZ tienen mayor SLR y (B) mayor SLE. [\*= Valores estadísticamente significativos].

### 5.3. Asociación de las características clínicas, de laboratorio y genéticas, con respecto a la presencia de recaída y muerte

De los 86 pacientes, 74 se diagnosticaron con LLA-B y 12 con LLA-T; sus características clínicas y de laboratorio se muestran en la Cuadro 3. Del total de pacientes 21 presentaron recaída, 18 de ellos recayeron tempranamente (antes de los 30 meses de inicio de tratamiento), y 3 recayeron posteriormente a los 32, 36 y 37 meses. Dentro de las recaídas, 15/74 (20%) pacientes presentaron LLA de precursores de células B y 6/12 (50%) LLA de células T. Por otra parte, 15 pacientes murieron, 6/15 (40%) tuvieron recaída previa a la muerte; 13/74 (17.5%) pacientes presentaron LLA de precursores de células B y 2/12 (17%) LLA de células T.

Se determinó si existía diferencia entre presentar o no recaída con respecto a las categorías de expresión descritas de cada gen estudiado, así como con los marcadores clínicos convencionales. Se encontró que existe diferencia significativa respecto a la cuenta de leucocitos alta ( $>50 \times 10^9/l$ ) y a la expresión baja de *CASP8AP2* (prueba exacta de Fisher  $p < 0.05$ , Cuadro 3). También se determinó si existía diferencia entre presentar o no muerte con respecto a las categorías de expresión descritas de cada gen estudiado, así como con los marcadores clínicos convencionales; en este análisis no se encontraron diferencias significativas (Cuadro 3).

#### 5.4. Análisis de riesgo a presentar recaída en la LLA, por las características clínicas, de laboratorio y genéticas.

Se analizó el riesgo a presentar recaída asociado a la presencia de cada factor de riesgo convencional y a la expresión baja de los genes blanco; se encontró incremento en la probabilidad de riesgo a presentar recaída en los pacientes con inmunofenotipo de células T (OR 3.93 IC 95% 1.1-13.94), en aquellos casos con cuenta de leucocitos alta (OR 6.05 IC 95% 2.03-17.98), y con la expresión baja del gen *CASP8AP2* (OR 3.93 IC 95% 1.4-11.02 (regresión logística univariada  $p < 0.05$ , Cuadro 4). Se analizaron los parámetros que resultaron positivos para riesgo a presentar recaída aplicando análisis multivariado, se conservó la diferencia significativa para la cuenta de leucocitos alta (OR 1.72 IC 95% 0.004-5.35) y para la expresión baja de *CASP8AP2* (OR 1.14 IC 95% 0.28-3.4, regresión logística multivariada  $p < 0.05$ ).



Cuadro 3. Asociación de las características clínicas y la expresión génica con la recaída, en el grupo de pacientes con LLA

Característica	Total No. (%)	Recaída			Muerte		
		No	Si	Valor- <i>p</i>	No	Si	Valor- <i>p</i>
<b>Edad</b>							
1-9 años	69 (80)	52	17	1.00	60	9	0.06
<16 ≥10	17 (20)	13	4		11	6	
<b>Género</b>							
Masculino	48 (55)	35	13	0.61	39	9	0.78
Femenino	38 (45)	30	8		32	6	
<b>Cuenta de leucocitos</b>							
<50x10 <sup>9</sup> /L	68 (79)	56	12	0.01*	58	10	0.29
≥50x10 <sup>9</sup> /L	18 (21)	9	9		13	5	
<b>Inmunofenotipo</b>							
LLA-B	74 (86)	59	15	0.06	61	13	1.00
LLA-T	12 (14)	6	6		10	2	
<b>CASP8AP2</b>							
Expresión baja	32 (37)	19	13	0.01*	25	7	0.55
Expresión media/alta	54 (63)	46	8		46	8	
<b>H2AFZ</b>							
Expresión baja	31 (36)	21	10	0.29	24	7	0.38
Expresión media/alta	55 (64)	44	11		47	8	
<b>BCR-ABL1</b>							
Positivo	3 (3.5)	2	1	1.00	2	1	0.44
Negativo	83 (96.5)	63	20		69	14	
<b>TELAML1</b>							
Positivo	7 (8)	7	0	0.2	7	0	0.34
Negativo	79 (92)	58	21		64	15	
<b>E2A-PBX1</b>							
Positivo	2 (2)	0	2	0.06	2	0	1.00
Negativo	84 (98)	65	19		69	15	
<b>MLL-AF4</b>							
Positivo	0	0	0	1.00	0	0	1.00
Negativo	86 (100)	65	21		71	15	
<b>SIL-TAL1</b>							
Positivo	1 (1)	1	0	1.00	1	0	1.00
Negativo	85 (99)	64	21		70	15	

Valor de *p* por prueba exacta de Fisher; \*= Valores estadísticamente significativos

Cuadro 4. Análisis de riesgo para las características clínicas y de expresión génica

	Recaída OR (IC95%)	Valor- <i>p</i>	No Recaída OR (IC95%)
Edad			
<1 ó >10 años	0.94 (0.27-3.27)	0.924	1.06 (0.30-3.69)
<i>Inmunofenotipo</i>			
T-ALL	3.93 (1.10-13.94)	0.034*	0.25 (0.72-0.90)
<i>Cuenta de leucocitos</i>			
≥50 x 10 <sup>9</sup> /L	6.05 (2.03-17.98)	0.001*	0.16 (0.56-0.49)
<i>CASP8AP2</i>			
Expresión baja	3.93 (1.40-11.02)	0.009*	0.25 (0.09-0.71)
<i>H2AFZ</i>			
Expresión baja	1.90 (0.69-5.18)	0.200	0.52 (0.19-1.44)

Valor de *p* por regresión logística; \*= Valores estadísticamente significativos

#### 5.5. Valor predictivo de recaída de la cuenta de leucocitos y la expresión baja de *CASP8AP2* y *H2AFZ*

Se determinó el valor predictivo a presentar recaída, de los niveles de expresión baja de los genes estudiados. Con fines de comparación, se tomó como referencia un parámetro predictivo de recaída bien establecido como es la cuenta de leucocitos alta. Este análisis mostró que los VPP y VPN de la expresión baja para cada uno de los genes, *CASP8AP2* y *H2AFZ*, son similares a los valores determinados para la cuenta de leucocitos alta ( $X^2$   $p=0.15$ , Cuadro5). Para conocer los valores predictivos de la combinación de estos parámetros que resultaron positivos, se analizaron en conjunto la cuenta de leucocitos alta y la expresión baja de ambos genes mediante análisis multivariado; se observó mayor sensibilidad y especificidad, así como VPP y VPN mayores con respecto a los valores obtenidos con estos parámetros de forma individual (Cuadro5).

Cuadro 5. Valor de predicción a recaída de la cuenta de leucocitos y expresión génica de *CASP8AP2* y *H2AFZ*

	Sensibilidad(%) (IC 95%)	Especificidad(%) (IC 95%)	Valor pronóstico positivo(%) (IC 95%)	Valor pronóstico negativo(%) (IC 95%)
Cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$	43 (22.6-65.5)	86 (74.8-93.1)	50 (26.8-73.2)	82 (70.8-90.1)
Expresión baja <i>CASP8AP2</i>	62 (38.7-81.0)	71 (58.8-81.0)	41 (24.2-59.2)	85 (72.3-92.9)
Expresión baja <i>H2AFZ</i>	48 (26.4-69.6)	68 (54.8-78.4)	32 (17.3-51.4)	80 (66.6-89.1)
Expresión baja <i>CASP8AP2/H2AFZ</i>	33 (15.5-56.9)	90 (80.3-96.2)	54 (26.1-79.6)	81 (69.6-88.7)
Cuenta de leucocitos / expresión baja <i>CASP8AP2</i>	54 (26.1-79.6)	95 (82.2-99.1)	78 (40.2-96.0)	87 (72.5-94.4)
Cuenta de leucocitos / expresión baja <i>H2AFZ</i>	42 (16.5-71.4)	94 (81.4-99.1)	71 (30.2-94.9)	84 (69.3-92.8)
Cuenta de leucocitos / expresión baja <i>CASP8AP2/</i> expresión baja <i>H2AFZ</i>	62 (25.9-89.7)	96 (78.4-99.8)	83 (36.5-99.1)	89 (70.6-97.2)

\*= Valores estadísticamente significativos

## 6. Discusión

Recientemente se han realizado estudios genómicos enfocados a la búsqueda de nuevos marcadores de riesgo en la LLA, que permitan la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo desde el momento del diagnóstico, lo cual podría contribuir a aumentar la SLR de los pacientes. Se han identificado cambios en el transcriptoma de los blastos leucémicos, los cuales se han relacionado con la presencia de EMR, sin embargo, estas variaciones han sido poco exploradas en cuanto a la evaluación de la SLR y SLE en diversas poblaciones. Dentro de los genes asociados con respuesta adversa a tratamiento, destacan por su significancia y predictibilidad *CASP8AP2* y *H2AFZ*, cuya expresión baja se ha relacionado con mayor incidencia acumulativa de recaída<sup>48,49</sup>. El objetivo principal de este trabajo fue analizar la expresión de estos dos genes en una cohorte de pacientes pediátricos con LLA al momento del diagnóstico, y determinar si existe relación entre los niveles de expresión de los genes con la evolución clínica de los pacientes, así como determinar si estos dos marcadores genéticos podrían ser candidatos a ser incluidos en la clasificación inicial de riesgo en nuestra población.

La función proapoptótica de *CASP8AP2* y su baja expresión génica en los blastos leucémicos de pacientes con EMR, sugiere que este gen podría ser un marcador de riesgo de recaída por sus implicaciones en la respuesta al tratamiento. Nuestros resultados muestran que el grupo de pacientes que tienen expresión baja del gen *CASP8AP2*, tienen menores SLE y SG. Estos resultados concuerdan con los reportados por Flotho et. al, 2006, quienes estudiaron un grupo de 99 pacientes y determinaron que los pacientes con expresión baja del gen *CASP8AP2* mostraron menor SLE ( $p=0.02$ ) y mayor incidencia acumulativa de recaída ( $p=0.01$ )<sup>49</sup>. De forma similar, en un estudio de una cohorte de 39 pacientes recién diagnosticados con LLA, originarios de Beijing, se analizó la expresión de *CASP8AP2* y se encontró que los pacientes con

baja expresión presentaron mayor porcentaje de recaídas y menores SLE y SG en comparación con el grupo de expresión alta<sup>50</sup>. Sin embargo, la utilidad del gen *CASP8AP2* como marcador de riesgo aún es controvertido; Yang et. al. 2010, no encontraron una significancia biológica en un grupo de 90 pacientes con LLA-B tratados en el Taiwan Pediatric Oncology Group<sup>54</sup>.

Las bases biológicas de la variación de la expresión de *CASP8AP2* pueden asociarse a la delección de la región 6q15-16.1, que corresponde al sitio en el que se ubica el gen; este hallazgo ha sido reportado en pacientes con LLA de células T, esta alteración resulta en la disminución de la expresión de *CASP8AP2* y se ha asociado con la presencia de EMR. La delección del brazo largo del cromosoma 6 es una alteración que se presenta con amplia variación, ya que se refiere con frecuencias desde un 11% hasta del 32% de los pacientes pediátricos con LLA. La delección ocurre en 6q15-16.1 y se ha asociado con hiperleucocitosis tanto para LLA-B como LLA-T; en adultos, se ha observado una mayor frecuencia en la LLA-T (50%) asociada a una evolución clínica desfavorable. Sin embargo, en pacientes pediátricos se presenta relativamente con la misma frecuencia en ambos linajes (16% LLA-B y 11% LLA-T)<sup>74-76</sup>. Por otro lado, se refiere que en células cancerosas puede presentarse metilación aberrante en el promotor del gen *CASP8AP2*, lo cual contribuye a la disminución de su expresión, a la supervivencia celular prolongada y confiere resistencia a fármacos<sup>77</sup>.

Este es el segundo estudio en donde se analiza la expresión del gen *H2AFZ* como probable marcador de riesgo de recaída en la LLA. La expresión baja de *H2AFZ* se ha asociado con resistencia a quimioterapia en ensayos *in vitro*. En cuanto a la relación biológica entre la expresión génica de *CASP8AP2* y *H2AFZ*, se ha demostrado recientemente que la inhibición de la expresión de *CASP8AP2* afecta a la transcripción y procesamiento de la familia de histonas H2A<sup>78</sup>, esto sugiere que los dos genes

analizados podrían estar involucrados en procesos biológicos en común, aunque aún no se ha establecido el mecanismo de interacción.

Con la finalidad de conocer si la expresión baja de estos genes podría considerarse un marcador de riesgo de recaída dentro de nuestro grupo de pacientes, se determinó el incremento en el riesgo a presentar recaída tomando como variables la expresión baja de los genes *CASP8AP2* y *H2AFZ*, así como los factores clínicos de riesgo convencionales; los resultados mostraron incremento en el riesgo a recaída para el inmunofenotipo de células T, la cuenta de leucocitos alta, y la expresión baja de *CASP8AP2*. Estos resultados coinciden con lo encontrado en el análisis de SLR y SLE, en el que se observó que los niveles de expresión bajos del gen *CASP8AP2* se asociaron a menores SLR y SLE. Respecto a *H2AFZ*, la expresión baja no mostró ser un factor de riesgo de recaída; los pacientes con expresión baja del gen *H2AFZ*, muestran tendencia a presentar menor SLR, sin embargo esta asociación no es significativa ( $p=0.08$ ). Adicionalmente, se observó que los pacientes con expresión baja para el gen *CASP8AP2* así como para *H2AFZ*, tuvieron mayor incidencia acumulativa de recaída, este resultado es similar a lo referido por Flotho et al 2007. Los resultados sugieren que la expresión baja del gen *CASP8AP2* puede ser un marcador de recaída temprana de manera individual, y con mayor predictibilidad al detectarse en forma conjunta con la expresión baja del gen *H2AFZ*. Por otro lado, la edad y las fusiones génicas reconocidas para la clasificación de riesgo no resultaron significativas en este estudio, esto puede deberse a un efecto de tamaño de muestra, ya que sólo un paciente presentó menos de un año de edad. Se ha demostrado que la medición de EMR es un parámetro para la evaluación temprana de respuesta a tratamiento, por lo que sería importante incluirlo con el fin de conocer si la expresión de estos genes está asociada con esta cuantificación en nuestra población.

Los resultados hasta ahora mostrados son promisorios en cuanto a la utilidad del gen *CASP8AP2* como marcador predictivo de recaída en nuestra población de niños con LLA. El análisis de la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN (Cuadro 5) de la expresión baja de los genes estudiados, así como de la cuenta alta de leucocitos, reveló que de manera individual la expresión baja de cada gen tiene una sensibilidad y especificidad muy cercana a la encontrada para la cuenta de leucocitos alta; sin embargo, al considerar ambos genes con expresión baja se incrementa la especificidad. Entre los marcadores genéticos propuestos en este estudio, *CASP8AP2* mostró la mayor utilidad para la clasificación inicial de los pacientes, con un VPN de 85% (IC 95%= 72.3-92.9). Este valor se incrementa cuando se combina la expresión baja de *CASP8AP2* con la cuenta alta de leucocitos (87%, IC 95%= 72.5-94.4). Al analizar en conjunto los niveles de expresión bajos para ambos genes, y la cuenta alta de leucocitos, el VPN se incrementa hasta el 89% (IC 95%= 70.6-97.2).

La baja expresión de los genes analizados en conjunto con la cuenta de leucocitos alta, incrementó la sensibilidad, especificidad y los valores de predicción pronóstica, sin embargo, hay que considerar que los intervalos de confianza muestran que el tamaño de la muestra se debe incrementar con el fin de obtener resultados más confiables. En el grupo de pacientes estudiados, se encontró que la expresión media/alta de *CASP8AP2* y la cuenta baja de leucocitos, son datos que contribuyen a identificar a los pacientes menos propensos a recaída. Al igual que otros factores de riesgo, la expresión de *CASP8AP2* no es un marcador independiente de recaída, sin embargo es un candidato prometedor para ser incluido dentro de una firma génica para detectar a los niños con LLA en situación de riesgo. Lo anterior es especialmente importante en países con recursos limitados, ya que es necesario diseñar ensayos útiles con un costo accesible, que permitan la estratificación de los pacientes pediátricos con LLA. En este estudio se demuestra que la aplicación de parámetros de riesgo bien establecidos como lo es la cuenta de leucocitos alta, en conjunto con los marcadores de expresión

génica propuestos en este estudio, podrían ser útiles en la clasificación de riesgo de los pacientes con LLA en nuestro medio.

Cabe mencionar que fue factible conocer la evolución clínica de este grupo de pacientes ya que son parte del programa federal del seguro popular, que permite que los pacientes con diversos padecimientos oncológicos sean atendidos sin costo, lo cual disminuye el número de casos que abandonan el tratamiento. El porcentaje de pacientes estudiados que no han mostrado recaída (75%), se encuentra dentro de los intervalos más altos referidos para México, aunque es bien conocido que éste es menor con respecto a lo observado en países desarrollados. En particular, se refiere que el sur y sureste del país presentan menores tasas de SLE en niños con LLA (40.3%)<sup>79</sup>, por esta razón el análisis de expresión de los genes estudiados se debe extender a pacientes que son tratados en diferentes regiones de nuestro país, para conocer su significado en el pronóstico y así determinar con claridad el impacto de estos nuevos parámetros en poblaciones en donde se refieren altas tasas de recaída. Sin embargo, no hay que olvidar otros factores como el apego al tratamiento y la resolución de problemas derivados de éste, como es la toxicidad asociada a la quimioterapia.

Los resultados obtenidos sugieren que la expresión baja de ambos genes al momento del diagnóstico de LLA, podría ser utilizada como marcador de riesgo de recaída. La expresión de los genes analizados sumada a los factores con valor en el pronóstico de recaída ya establecidos, puede contribuir a la clasificación inicial de riesgo de los pacientes pediátricos con LLA. Es indispensable, seguir investigando sobre la interacción biológica de estos marcadores, su participación en la evolución de la LLA y su probable contribución con el incremento en el riesgo a presentar recaída.



## 7. Conclusiones

- Se encontró asociación de la expresión baja del gen *CASP8AP2* con una menor SLR y SLE. La expresión baja del gen *H2AFZ* mostró tendencia a presentar menor SLR. La mayor incidencia a recaída ocurre en el grupo de pacientes con expresión baja para ambos genes.
- La población estudiada mostró que el inmunofenotipo de células T, la cuenta de leucocitos alta y la baja expresión del gen *CASP8AP2*, son factores que incrementan el riesgo a presentar recaídas.
- La expresión baja del gen *CASP8AP2* puede ser un marcador útil de recaída temprana en nuestra población y es evaluable desde el momento del diagnóstico. Este marcador adquiere mayor predictibilidad al ser utilizado en conjunto con la expresión baja de *H2AFZ* y los parámetros de riesgo ya establecidos como la cuenta de leucocitos alta.
- Es necesario aumentar el tamaño de la muestra analizada, incluyendo pacientes bajo diferentes protocolos de tratamiento y de diversas regiones geográficas de México, para determinar el impacto de estos marcadores genéticos en la predicción de recaída en la LLA.

## 8. Referencias

1. Rivera-Luna, R. *et al.* Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int. J. Cancer* **132**, 1646–1650 (2013).
2. Wang D *et al.* in *Genetic Markers in the Prognosis of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia* (In Tech, 2013).
3. Pui, C.-H., Robison, L. L. & Look, A. T. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **371**, 1030–1043 (2008).
4. Rabin, K., Man, T.-K. & Lau, C. C. Personalized care of pediatric cancer patients. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **62**, 173–185; discussion 185–188 (2008).
5. Rivera-Luna, R. *et al.* Early death in children with acute lymphoblastic leukemia: does malnutrition play a role? *Pediatr Hematol Oncol* **25**, 17–26 (2008).
6. Duffy, M. J. & Crown, J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin. Chem.* **54**, 1770–1779 (2008).
7. Izraeli, S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside? *Br. J. Haematol.* **151**, 119–131 (2010).
8. Pui, C.-H. Recent research advances in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Formos. Med. Assoc.* **109**, 777–787 (2010).
9. Collins-Underwood, J. R. & Mullighan, C. G. Genomic profiling of high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **24**, 1676–1685 (2010).
10. Roberts, K. G. & Mullighan, C. G. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr. Opin. Pediatr.* **23**, 34–40 (2011).
11. Mullighan, C. G. Genomic profiling of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**, 489–503 (2011).
12. Rowe, J. M. Prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **150**, 389–405 (2010).
13. Pieters, R. & Carroll, W. L. Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* **24**, 1–18 (2010).
14. Pieters, R. *et al.* A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* **370**, 240–250 (2007).
15. Pui, C.-H. & Jeha, S. New therapeutic strategies for the treatment of acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Drug Discov* **6**, 149–165 (2007).
16. Rivera Luna Roberto. in *Hemato Oncología Pediátrica. Principios generales* 215–234 (Editores de textos mexicanos, SA de CV, 2006).
17. Campana, D. & Behm, F. G. Immunophenotyping of leukemia. *J. Immunol. Methods* **243**, 59–75 (2000).
18. Coustan-Smith, E. *et al.* Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* **10**, 147–156 (2009).
19. Harrison, C. J. *et al.* Detection of prognostically relevant genetic abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: recommendations from

the Biology and Diagnosis Committee of the International Berlin-Frankfurt-Münster study group. *Br. J. Haematol.* **151**, 132–142 (2010).

20. Krivtsov, A. V. & Armstrong, S. A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 823–833 (2007).

21. Armstrong, S. A. & Look, A. T. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **23**, 6306–6315 (2005).

22. De Keersmaecker, K., Marynen, P. & Cools, J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **90**, 1116–1127 (2005).

23. Cavé, H. *et al.* Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood* **103**, 442–450 (2004).

24. Ferrando, A. A. *et al.* Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **363**, 535–536 (2004).

25. Ferrando, A. A. *et al.* Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **1**, 75–87 (2002).

26. Weng, A. P. *et al.* Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* **306**, 269–271 (2004).

27. Sulis, M. L. *et al.* NOTCH1 extracellular juxtamembrane expansion mutations in T-ALL. *Blood* **112**, 733–740 (2008).

28. Heerema, N. A. *et al.* Abnormalities of chromosome bands 13q12 to 13q14 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18**, 3837–3844 (2000).

29. Pui, C. H. *et al.* Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line. *Blood* **75**, 1170–1177 (1990).

30. Aricò, M. *et al.* Improved outcome in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia defined by prednisone-poor response treated with double Berlin-Frankfurt-Muenster protocol II. *Blood* **100**, 420–426 (2002).

31. Dördelmann, M. *et al.* Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **94**, 1209–1217 (1999).

32. Schrappe, M. *et al.* Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood* **92**, 2730–2741 (1998).

33. Iqbal, N. & Iqbal, N. Imatinib: a breakthrough of targeted therapy in cancer. *Chemother Res Pract* **2014**, 357027 (2014).

34. Hock, H. *et al.* Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival. *Genes Dev.* **18**, 2336–2341 (2004).

35. Okuda, T., van Deursen, J., Hiebert, S. W., Grosveld, G. & Downing, J. R. AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* **84**, 321–330 (1996).

36. Ramakers-van Woerden, N. L. *et al.* TEL/AML1 gene fusion is related to in vitro drug sensitivity for L-asparaginase in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **96**, 1094–1099 (2000).

37. Frost, B.-M. *et al.* Translocation t(12;21) is related to in vitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **104**, 2452–2457 (2004).
38. Meyer, C. *et al.* The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* **27**, 2165–2176 (2013).
39. Meyer, C. *et al.* Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 449–454 (2005).
40. Bacher, U., Kohlmann, A. & Haferlach, T. Gene expression profiling for diagnosis and therapy in acute leukaemia and other haematologic malignancies. *Cancer Treat. Rev.* **36**, 637–646 (2010).
41. Meijerink, J. P. P., den Boer, M. L. & Pieters, R. New genetic abnormalities and treatment response in acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* **46**, 16–23 (2009).
42. Mullighan, C. G. New strategies in acute lymphoblastic leukemia: translating advances in genomics into clinical practice. *Clin. Cancer Res.* **17**, 396–400 (2011).
43. Mullighan, C. G. *et al.* Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **446**, 758–764 (2007).
44. Mullighan, C. G. *et al.* BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **453**, 110–114 (2008).
45. Kuiper, R. P. *et al.* IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* **24**, 1258–1264 (2010).
46. Mullighan, C. G. *et al.* Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **41**, 1243–1246 (2009).
47. Yoda, A. *et al.* Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 252–257 (2010).
48. Flotho, C. *et al.* A set of genes that regulate cell proliferation predicts treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **110**, 1271–1277 (2007).
49. Flotho, C. *et al.* Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* **108**, 1050–1057 (2006).
50. Jiao, Y. *et al.* CASP8AP2 is a promising prognostic indicator in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **36**, 67–71 (2012).
51. Jun, J.-I. *et al.* Role of FLASH in caspase-8-mediated activation of NF-kappaB: dominant-negative function of FLASH mutant in NF-kappaB signaling pathway. *Oncogene* **24**, 688–696 (2005).
52. Kittler, R. *et al.* An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* **432**, 1036–1040 (2004).
53. Alm-Kristiansen, A. H. *et al.* PIAS1 interacts with FLASH and enhances its co-activation of c-Myb. *Mol. Cancer* **10**, 21 (2011).
54. Yang, Y.-L. *et al.* Expression and prognostic significance of the apoptotic genes BCL2L13, Livin, and CASP8AP2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.* **34**, 18–23 (2010).
55. Camitta, B. M. Colonel Mustard, with the rope, in the ballroom. *Blood* **108**, 785–785 (2006).
56. Nekrasov, M. *et al.* Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its

- impact on promoter organization and dynamics. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1076–1083 (2012).
57. Soboleva, T. A. *et al.* A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 25–30 (2012).
  58. Greaves, I. K., Rangasamy, D., Ridgway, P. & Tremethick, D. J. H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 525–530 (2007).
  59. Huh, Y. H. & Sherley, J. L. Molecular cloaking of H2A.Z on mortal DNA chromosomes during nonrandom segregation. *Stem Cells* **29**, 1620–1627 (2011).
  60. Lugthart, S. *et al.* Identification of genes associated with chemotherapy crossresistance and treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **7**, 375–386 (2005).
  61. Pinkel, D. Selecting treatment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **14**, 4–6 (1996).
  62. Schrappe, M., Reiter, A. & Riehm, H. Cytoreduction and prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **14**, 2403–2406 (1996).
  63. Manabe, A. *et al.* Significance of the complete clearance of peripheral blasts after 7 days of prednisolone treatment in children with acute lymphoblastic leukemia: the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Haematologica* **93**, 1155–1160 (2008).
  64. Pui, C. H., Campana, D. & Evans, W. E. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* **2**, 597–607 (2001).
  65. Reiter, A. *et al.* Chemotherapy in 998 unselected childhood acute lymphoblastic leukemia patients. Results and conclusions of the multicenter trial ALL-BFM 86. *Blood* **84**, 3122–3133 (1994).
  66. Faderl, S. & Estrov, Z. The clinical significance of detection of residual disease in childhood ALL. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **28**, 31–55 (1998).
  67. Paietta, E. Assessing minimal residual disease (MRD) in leukemia: a changing definition and concept? *Bone Marrow Transplant.* **29**, 459–465 (2002).
  68. Coustan-Smith, E. *et al.* Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **100**, 2399–2402 (2002).
  69. Coustan-Smith, E. *et al.* Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* **351**, 550–554 (1998).
  70. Coustan-Smith, E. *et al.* Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **96**, 2691–2696 (2000).
  71. Coustan-Smith, E. *et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia after first relapse. *Leukemia* **18**, 499–504 (2004).
  72. Roganovic, J. in *Leukemia* (ed. Guenova, M.) (InTech, 2013). at <<http://www.intechopen.com/books/leukemia/acute-lymphoblastic-leukemia-in-children>>
  73. National Cancer Institute at the National Institutes of Health. NCI Dictionary of Cancer Terms.
  74. Hayashi, Y. *et al.* Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **76**, 1626–1630 (1990).

75. Takeuchi, S. *et al.* Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* **58**, 2618–2623 (1998).
76. Merup, M. *et al.* 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* **91**, 3397–3400 (1998).
77. Lee, K.-D. *et al.* Targeted Casp8AP2 methylation increases drug resistance in mesenchymal stem cells and cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **422**, 578–585 (2012).
78. Yang, X. *et al.* FLASH is required for the endonucleolytic cleavage of histone pre-mRNAs but is dispensable for the 5' exonucleolytic degradation of the downstream cleavage product. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 1492–1502 (2011).
79. Pérez-Cuevas, R. *et al.* Scaling up cancer care for children without medical insurance in developing countries: The case of Mexico. *Pediatr Blood Cancer* **60**, 196–203 (2013).

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

## Significance of *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression in survival and risk of relapse in children with acute lymphoblastic leukemia

Rocío Juárez-Velázquez<sup>1,2</sup>, Adriana Reyes-León<sup>1</sup>, Consuelo Salas-Labadía<sup>1</sup>, Roberto Rivera-Luna<sup>3</sup>, Liliana Velasco-Hidalgo<sup>4</sup>, Gerardo López-Hernández<sup>5</sup>, Norma López-Santiago<sup>6</sup>, Rogelio Paredes-Aguilera<sup>6</sup>, Aarón Domínguez-López<sup>7</sup>, Roberto Bernaldez<sup>8</sup> & Patricia Pérez-Vera<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Cultivo de Tejidos, <sup>3</sup>División de Hemato/Oncología Pediátrica, <sup>4</sup>Servicio de Oncología and <sup>6</sup>Servicio de Hematología, Instituto Nacional de Pediatría, México D.F., México, <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México, <sup>5</sup>Hospital para el Niño Poblano, Puebla, México, <sup>7</sup>Laboratorio del Departamento de Gastroenterología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México D.F., México and <sup>8</sup>Servicio de Hematología, Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, México

### Abstract

Novel biomarkers for risk refinement and stratification in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) are needed to optimize treatment results. We studied the expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* associated with relapse and survival in bone marrow samples from newly diagnosed children with ALL. We found: (a) an increased risk for early relapse in those patients with low expression of *CASP8AP2* (odds ratio [OR] 3.93, 95% confidence interval [CI] 1.40–11.02,  $p < 0.05$ ) confirming its usefulness as a predictive risk marker, although *H2AFZ* did not present the same effect; (b) patients with low expressions of *CASP8AP2* and *H2AFZ* had inferior survival rates ( $p < 0.001$ ); (c) the predictive values regarding low expressions of *H2AFZ* and *CASP8AP2* and high white blood cell count suggest that these features could help to identify more accurately patients at greater risk of relapse.

**Keywords:** Acute lymphoblastic leukemia, childhood, *CASP8AP2* expression, *H2AFZ* expression, risk of relapse

### Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common cancer in childhood. In Mexico the Popular Medical Insurance (PMI), which offers coverage for children who lack social medical protection, reported an incidence of 62.5 cases per one million/year [1]. Significant advances in the management of pediatric cancer have resulted in an increased cure rate in children diagnosed with ALL, which has risen from 10% in the 1960s to 76–86% currently in developed countries [2,3]. Some institutional highly specialized pediatric oncology units in Mexico report current overall survival for children with precursor B-cell ALL (B-ALL) of 75% [4].

Disease-free survival success is mainly due to the administration of suitable treatment protocols based on stratification of patients by risk groups [5–7]. The identification of patients prone to relapse is determined by high-risk, clinical laboratory criteria at the time of diagnosis and treatment response [2,3,8].

Although most parameters currently used in the classification of risk in children with ALL are universally considered, they remain insufficient for establishing a suitable stratification of all patients. This is the case for those patients who lack recognizable high-risk factors, who are treated as patients with standard risk and eventually relapse. *BCR-ABL1* and *MLL-AF4* are genetic abnormalities with known clinical value in ALL. Recently, diverse studies using high-resolution genomic methods have been conducted to identify new molecular markers for risk that could eventually be used as therapeutic targets. Among the genes proposed as predictors of relapse in children with ALL, Caspase 8-associated protein 2 (*CASP8AP2*), histone family member 2 (*H2AFZ*), Ikaros family zinc finger 1 (*IKZF1*), Janus kinase 2 (*JAK2*) and cytokine receptor-like factor 2 (*CRLF2*) have been identified [9–12].

The *CASP8AP2* gene, also known as *FLICE* or *FLASH*, is located at chromosome region 6q15. This gene encodes a protein with multiple functions that is recognized as a key mediator in the apoptotic process through interaction with the Caspase 8 death-effector domain. Diverse studies have shown that it also participates in cell division [13], nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling [14], c-Myb activation [15,16], S-phase cell cycle progression [17] and the transcription and maturation of the 3' end of histone mRNAs [18]. Furthermore, *H2AFZ* (also known as *H2AZ*, *H2A/Z* or *H2A.Z*, located at 4q24) is a highly conserved basal histone

that is expressed independently of DNA replication and is involved in diverse biological processes, including the transcriptional activation of genes [19,20], chromosomal segregation and stability [21,22], heterochromatic gene silencing [20] and cell cycle progression [19].

The clinical significance of *CASP8AP2* in childhood ALL was first reported by Flotho *et al.*, who associated differences in gene expression with response to chemotherapeutic agents *in vitro*, and with patient event-free survival (EFS) [9]. Low levels of *CASP8AP2* expression predicted a lower EFS and higher rate of leukemia relapse. Flotho *et al.* identified a gene signature of another 14 genes whose expression was associated with minimal residual disease (MRD) and low expression of *CASP8AP2*. *H2AFZ* was one of those genes with low expression in patients with relapse. Patients who showed low expression of both genes had a suboptimal treatment response and eventually relapsed [10]. The usefulness of *CASP8AP2* expression in the identification of patients with adverse ALL prognosis is controversial [23]. Yang *et al.* did not observe an association between the underexpression of *CASP8AP2* and the presence of relapse in patients with B-ALL [24]. In contrast, Jiao *et al.* found that *CASP8AP2* is a potential prognostic marker [11]. Based on these results, conducting studies in different populations with ALL to support the value of *CASP8AP2* expression as a predictive marker of relapse are required. Moreover, *H2AFZ* expression has not been evaluated in other populations of patients with ALL, a fact that highlights the importance of understanding the behavior of the *CASP8AP2* and *H2AFZ* genes in Mexican children with ALL.

The aim of this study was to assess the prognostic value of the gene expression levels of *CASP8AP2* and *H2AFZ*, and associate these features with the presence of relapse, EFS, relapse-free survival (RFS) and clinical and laboratory risk parameters, in a cohort of recently diagnosed pediatric patients with ALL treated in Mexican institutions.

## Materials and methods

### Selection of patients

Patients with ALL registered at the Instituto Nacional de Pediatría and the Hospital para el Niño Poblano were consecutively recruited from February 2008 to December 2010. Bone marrow samples were collected at diagnosis and their clinical progression was followed. Samples from 86 patients were available for molecular analysis. Cases in which RNA could not be obtained, and patients who received treatment prior to a bone marrow test, were excluded. The project was approved and followed the guidelines of the Research and Institutional Ethics Committees.

Leukemia was classified by immunophenotyping according to the following criteria: for B-ALL, cCD179a+, cCD22+ and CD19+ with additional analyses of CD34, terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), CD10, CD20 and CD22; and for T-cell ALL (T-ALL), cCD3+ and CD7+ with additional analysis of CD34, TdT, CD1, CD2, CD3 and CD5. The treatment protocols were based on the proposal for the PMI that includes the following

drugs: prednisone, L-asparaginase, vincristine, methotrexate, etoposide, cytosine arabinoside, 6-mercaptopurine and doxorubicin (Supplementary Table available online at <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.3109/10428194.2013.878458>) [25].

### RNA extraction

Mononuclear cells were obtained from bone marrow samples using density gradient centrifugation (Lymphoprep/Nycomed, Oslo, Norway). The purified cells were suspended in lysis buffer and stored in liquid nitrogen until the time of extraction. RNA was extracted using an RNeasy kit (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

### Determination of *CASP8AP2* and *H2AFZ* gene expression

Relative quantification of expression levels for the *CASP8AP2*, *H2AFZ* and *ABL1* gene transcripts were determined by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), utilizing a LightCycler 2.0 instrument (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). cDNA was obtained by standard methods (Invitrogen, Paisley, UK). Quantitative PCR amplification of the cDNA was performed using TaqMan gene expression probes from the Universal Probe Library System (Roche Applied Science, Germany). The primer sets used for *CASP8AP2* NM\_012115.2 were: left primer 5'-CCAGAGAGTCGGAGGGAGT-3' and right primer 5'-CCTTTTGAGAGTCACCACCTG-3'; for *H2AFZ* NM\_002106.3N:left primer 5'-CACCGTGGGTCCGATTAG-3' and right primer 5'-GTCCTTCCAGCCTTACCG-3'. Quantification of the transcripts was calculated by the  $\Delta\Delta C_T$  method using the *ABL1* gene as an endogenous control for data normalization; the primer set was: *ABL1* NM\_007373.2: left primer 5'-CAGAGAAGGTCTATGAACTCATGC-3' and right primer 5'-GGTGGATTTAGCAAAGGAG-3'. Gene expression was analyzed in duplicate. Based on the methods and descriptions of Flotho *et al.* and Yang *et al.*, the group of patients was divided by percentiles into three groups according to the level of each gene expression to classify patients into groups of low, medium and high expression (cut-off points were used for each gene) [9,24]. RFS analysis was performed considering each category of gene expression. The group of low *CASP8AP2* expression presented inferior RFS and were statistically different compared with those of high and medium expression ( $p = 0.002$ ;  $0.011$ , respectively); however, the high and medium expression groups were not different ( $p = 0.354$ ). When comparing *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression levels, similar results were obtained (high vs. low,  $p = 0.007$ ; medium vs. low,  $p = 0.03$ ; high vs. medium,  $p = 0.317$ ). Moreover, the analysis applied to *H2AFZ* expression showed that between low and high expression groups there was a tendency toward significance, and there were no differences for other comparisons. The survival analysis suggests that high and medium expression have very similar behavior, and only in the low expression group did statistical differences persist. Based on these observations, high and medium expression levels were combined in a single group for comparison with the low expression group.



**Statistical analysis**

Univariate and multivariate analyses were carried out using central tendency tests to characterize the study sample, and to establish the type of distribution for each variable. Fisher's exact test was used to determine differences between groups of patients who did and did not show relapse in terms of *CASP8AP2* and *H2AFZ* gene expression and clinical-biological characteristics. The Kaplan-Meier method was applied to obtain differences in RFS and EFS between the expression groups (low vs. medium and high). RFS was defined as the time elapsed from the date of diagnosis to the appearance of relapse, and EFS as the time elapsed from the date of diagnosis to the occurrence of death or relapse. Logistic regression analysis was performed to determine the risk of relapse in patients with low levels of *CASP8AP2* or *H2AFZ* expression and different clinical and laboratory characteristics (gender, age, white blood cell [WBC] count). A 95% confidence interval (CI) was used, and all tests were considered statistically significant when the *p*-value was < 0.05. The predictive values of low gene expression and WBC count were determined. Additionally, the sensitivity, specificity and positive (PPV) and negative (NPV) predictive values were calculated. The  $\chi^2$  test was used to determine differences between PPV values of WBC count and *CASP8AP2* gene expression, and between relapse (early and late) and *CASP8AP2* gene expression.

**Results**

**Clinical and gene expression features and their association with relapse**

Of the 86 patients, 74 were diagnosed with B-ALL and 12 with T-ALL; their clinical and laboratory characteristics are shown in Table I. The relative expression levels of *CASP8AP2* and *H2AFZ* were determined, and patients were grouped according to expression (32 and 31 in the low group and 54 and 55 in the medium/high group). Twenty-one out of 86 patients relapsed, 18 presented early relapse (prior to 30 months from treatment initiation) and three relapsed at 32, 36 and 37 months, respectively; 15/74 (20%) patients with B-ALL and 6/12 (50%) with T-ALL relapsed. The influence of conventional prognostic factors (gender, age, WBC count, immunophenotype, gene fusions) and the different expression categories (low and medium/high) for each gene on the absence or occurrence of relapse were determined. A significant difference with respect to high WBC count (> 50 × 10<sup>9</sup>/L) and low *CASP8AP2* expression was found (Fisher's exact test *p* < 0.05, Table I). Age and gene fusions were non-significant. Gene expression affected the time to relapse: low *CASP8AP2* expression was significantly more frequent in patients with early relapse (13/18;  $\chi^2$  *p* < 0.05).

**Risk of relapse for clinical and gene expression features**

The hazard risk of relapse was analyzed according to the presence of each conventional risk factor and to low expression of the target genes. The results of this analysis yielded an increase in the risk of relapse in patients with a T-cell immunophenotype (odds ratio [OR] 3.93, 95% CI 1.10-13.94), high WBC count (OR 6.05, 95% CI 2.03-17.98) and low *CASP8AP2*

Table I. Clinical and gene expression features of the ALL cohort and their association with relapse.

Feature	Total no. (%)	Relapse		<i>p</i> -Value
		No	Yes	
Age				
1-9 years	69 (80)	52	17	1.00
< 1 or ≥ 10 years	17 (20)	13	4	
Gender				
Male	48 (55)	35	13	0.61
Female	38 (45)	30	8	
WBC count				
< 50 × 10 <sup>9</sup> /L	68 (79)	56	12	0.01
≥ 50 × 10 <sup>9</sup> /L	18 (21)	9	9	
Immunophenotype				
B-ALL	74 (86)	59	15	0.06
T-ALL	12 (14)	6	6	
<i>CASP8AP2</i>				
Low expression	32 (37)	19	13	0.01
Medium/high expression	54 (63)	46	8	
<i>H2AFZ</i>				
Low expression	31 (36)	21	10	0.29
Medium/high expression	55 (64)	44	11	
<i>BCR-ABL1</i>				
Positive	3 (3.5)	2	1	1.00
Negative	83 (96.5)	63	20	
<i>TEL-AML1</i>				
Positive	7 (8)	7	0	0.2
Negative	79 (92)	58	21	
<i>E2A-PBX1</i>				
Positive	2 (2)	0	2	0.06
Negative	84 (98)	65	19	
<i>MLL-AF4</i>				
Positive	0	0	0	1.00
Negative	86 (100)	65	21	
<i>SIL-TAL1</i>				
Positive	1 (1)	1	0	1.00
Negative	85 (99)	64	21	

ALL, acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood cell.

gene expression (OR 3.93, 95% CI 1.40-11.02, univariate logistic regression *p* < 0.05, Table II). Multivariate analysis was used to analyze these parameters, and the significant difference found for high WBC count and low *CASP8AP2* expression persisted (OR 1.72, 95% CI 0.004-5.35 and OR 1.14, 95% CI 0.28-3.40, respectively; multivariate logistic regression *p* < 0.05). However, the risk of relapse in those patients with lower WBC count (< 50 × 10<sup>9</sup>/L) and low expression of *CASP8AP2* was not statistically significant (OR 1.13, 95% CI 0.377-3.381, *p* = 0.82).

**Survival analysis for *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression groups**

Kaplan-Meier curves were generated to estimate the impact of *CASP8AP2* and *H2AFZ* gene expression on RFS and

Table II. Risk analysis for clinical and gene expression features.

	Relapse, OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	Non-relapse, OR (95% CI)
Age			
< 1 or ≥ 10 years	0.94 (0.27-3.27)	0.924	1.06 (0.30-3.69)
Immunophenotype			
T-ALL	3.93 (1.10-13.94)	0.034	0.25 (0.72-0.90)
WBC count			
> 50 × 10 <sup>9</sup> /L	6.05 (2.03-17.98)	0.001	0.16 (0.56-0.49)
<i>CASP8AP2</i>			
Low expression	3.93 (1.40-11.02)	0.009	0.25 (0.09-0.71)
<i>H2AFZ</i>			
Low expression	1.90 (0.69-5.18)	0.20	0.52 (0.19-1.44)

ALL, acute lymphoblastic leukemia; WBC, white blood cell.

EFS. These curves showed superior RFS (log-rank  $p = 0.001$ ) [Figure 1(A)] in patients with medium/high levels of *CASP8AP2* gene expression in comparison with the low expression group. The same trend was observed after analyzing the different levels of *H2AFZ* gene expression; however, for this gene the difference between groups was not significant [Figure 1(B)]. The EFS analysis revealed that those patients who presented lower expression of the studied genes had lower EFS compared to patients with medium/high expression ( $p < 0.05$ ) [Figures 1(C) and 1(D)].

The group of patients with low expression levels of both genes showed the lowest RFS and EFS [ $p < 0.001$ , Figures 2(A) and 2(B)] compared to patients with medium/high expression for both genes or with low expression for only one gene.

### Predictive value of WBC count, *CASP8AP2* and *H2AFZ* low expression in relapse

Additionally, the predictive value for relapse of low expression levels of the target genes was determined. For comparison, high WBC count was used as a reference because it is a well-established predictor of relapse. This analysis showed that the PPV and NPV of low expression levels for

both genes were close to the values determined for WBC ( $\chi^2 p = 0.15$ , Table III). To determine the predictive values of the combination of these positive parameters, high WBC count and low expression of both genes were analyzed. Higher values of sensitivity-specificity and PPV-NPV were observed compared to the values obtained separately for each of these parameters (Table III).

### Discussion

Recently, genomic approaches have been applied to find novel genetic risk markers that will allow the stratification of children with ALL into risk groups at diagnosis, thereby leading to an improvement in RFS. Changes in the transcriptome of leukemic blasts have been associated with the presence of MRD, but these changes have been relatively unexplored in terms of survival in diverse populations that follow different therapeutic regimens. Among the genes associated with adverse responses to treatment, low levels of *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression have been highlighted for their association with a higher cumulative incidence of relapse [9,10]. The objective of this study was to analyze the expression of these two genes at diagnosis in a group of

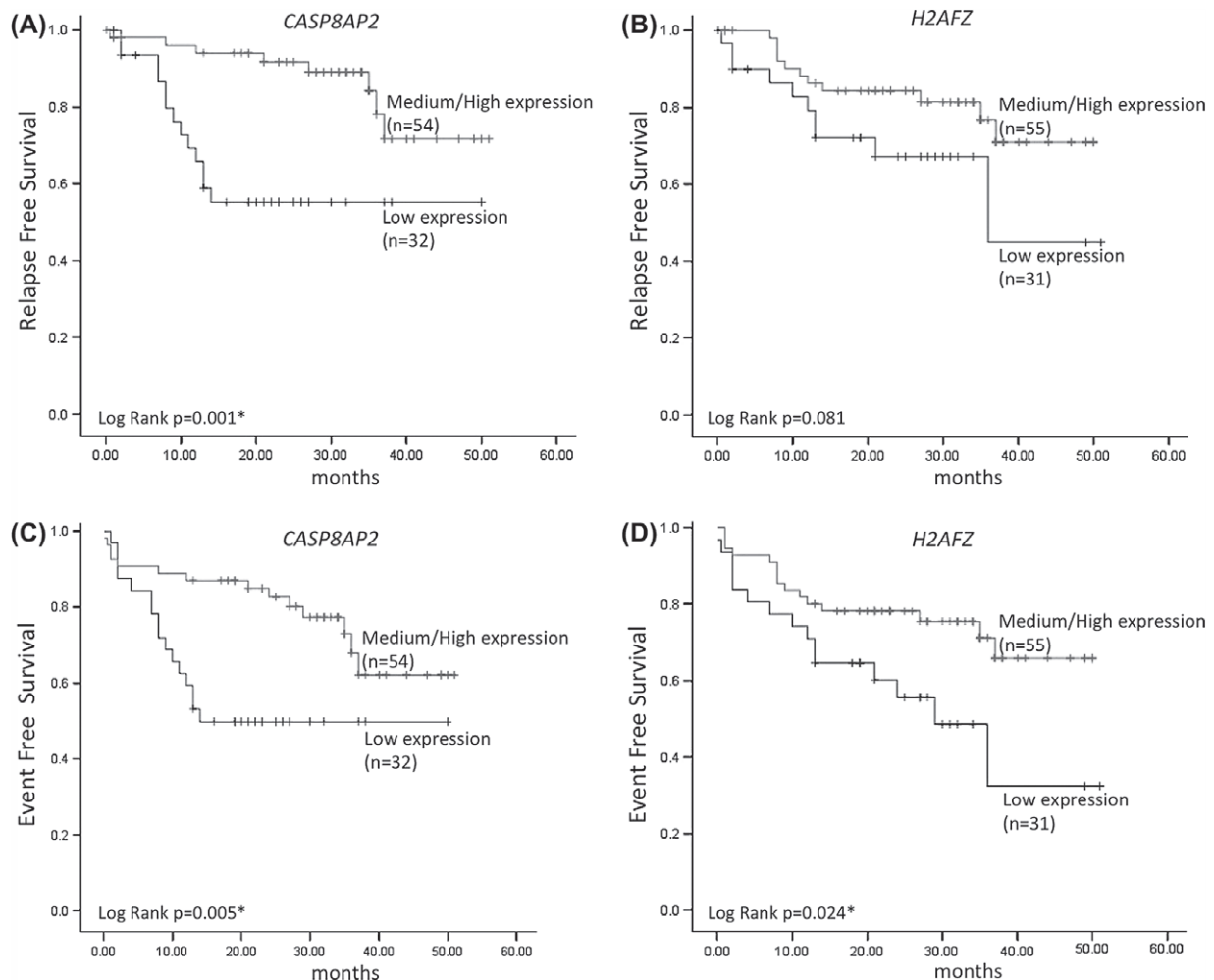


Figure 1. Kaplan-Meier analysis of RFS and EFS according to gene expression. (A) Patients with medium/high *CASP8AP2* expression have superior RFS ( $p = 0.001$ ); (B) patients with low *H2AFZ* expression tend to have lower RFS; (C, D) patients with lower gene expression have minor improvements in EFS ( $p < 0.005$ ;  $p < 0.024$ ).

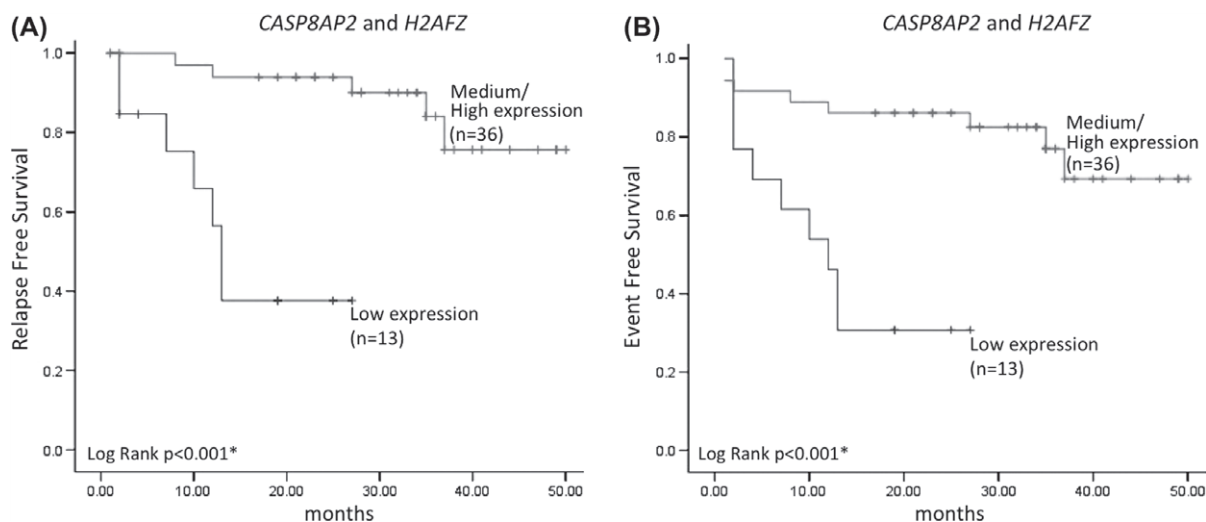


Figure 2. Kaplan-Meier analysis of RFS and EFS according to expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ*. (A) Patients with medium/high *CASP8AP2*/*H2AFZ* expression have superior RFS ( $p < 0.001$ ) and (B) superior EFS ( $p < 0.001$ ).

children with ALL. We determined the association between the levels of gene expression and patients' clinical progression, as well as attempting to define whether these two genetic markers could be candidates for inclusion in the initial risk classification of our population.

The proapoptotic function of *CASP8AP2*, its low expression in ALL blasts in patients with MRD, and the cell resistance to drugs observed when the promoter of *CASP8AP2* is methylated, suggest that this gene could be implicated in a suboptimal treatment response. Our results show that those patients with low expression of *CASP8AP2* also had lower RFS and EFS. These results are in agreement with those of Flotho *et al.* in a study conducted in a cohort of 99 patients, where those with low expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* showed lower EFS ( $p = 0.02$ ) and a greater cumulative incidence of relapse ( $p = 0.01$ ) [10]. Similarly, *CASP8AP2* expression was analyzed in a cohort study of 39 children from Beijing with ALL at diagnosis; in this study, the authors reported that patients with low expression levels showed a greater percentage of relapse and lower EFS and overall survival compared to the high expression group; this result was verified in another cohort of 106 patients [11]. However, the usefulness of *CASP8AP2* as a risk marker remains controversial, since Yang *et al.* found no biological significance in a group of 90 children with B-ALL recruited by the Taiwan Pediatric Oncology Group [24].

The biological basis for the variation of *CASP8AP2* expression could be associated with the occurrence of a deletion at the 6q15q16.1 region, which corresponds to

the gene's location. In patients with T-ALL it has been demonstrated that the deletion results in a decrease in *CASP8AP2* expression; these findings have been associated with the presence of MRD [26]. An extensive variation in incidence of the 6q15q16.1 deletion has been reported: it is observed in from 11% up to 32% of children with ALL, occurring in both lineages (16% in B-ALL and 11% in T-ALL) [27–29]. This deletion has been associated with adverse characteristics such as hyperleukocytosis, as frequently in B-ALL as in T-ALL. In adults with T-ALL this deletion is particularly frequent (50%), and has been observed in association with unfavorable clinical progression [30]. Furthermore, other possibilities of *CASP8AP2* silencing should be considered: aberrant methylation in the promoter of *CASP8AP2* has been reported in cancer cells, contributing to prolonged cell survival and resulting in drug resistance [31]. Epigenetic mechanisms affecting *CASP8AP2* expression must be further explored in patients with ALL.

This is the second study to evaluate the usefulness of *H2AFZ* expression as a relapse risk marker in childhood ALL. A low level of *H2AFZ* expression has been associated with resistance to chemotherapy in *in vitro* assays. Regarding the biological relationship between *CASP8AP2* and *H2AFZ*, it has been shown that inhibition of *CASP8AP2* gene expression affects the transcription and processing of the H2A histone family [18]. This finding suggests that these two genes could converge in functional processes, although the mechanism of interaction has not yet been established.

Table III. Predictive values for relapse of WBC count, *CASP8AP2* and *H2AFZ* gene expression.

	Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	Positive predictive value (%) (95% CI)	Negative predictive value (%) (95% CI)
WBC count $\geq 50 \times 10^9/L$	43 (22.6–65.5)	86 (74.8–93.1)	50 (26.8–73.2)	82 (70.8–90.1)
<i>CASP8AP2</i> low expression	62 (38.7–81.0)	71 (58.8–81.0)	41 (24.2–59.2)	85 (72.3–92.9)
<i>H2AFZ</i> low expression	48 (26.4–69.6)	68 (54.8–78.4)	32 (17.3–51.4)	80 (66.6–89.1)
<i>CASP8AP2</i> / <i>H2AFZ</i> low expression	33 (15.5–56.9)	90 (80.3–96.2)	54 (26.1–79.6)	81 (69.6–88.7)
WBC count/ <i>CASP8AP2</i> low expression	54 (26.1–79.6)	95 (82.2–99.1)	78 (40.2–96.0)	87 (72.5–94.4)
WBC count/ <i>H2AFZ</i> low expression	42 (16.5–71.4)	94 (81.4–99.1)	71 (30.2–94.9)	84 (69.3–92.8)
WBC/ <i>CASP8AP2</i> low expression/ <i>H2AFZ</i> low expression	62 (25.9–89.7)	96 (78.4–99.8)	83 (36.5–99.1)	89 (70.6–97.2)

WBC, white blood cell.

With the purpose of determining whether low expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* could be considered as a risk marker for relapse in our group of patients, an analysis of hazard of relapse was performed taking into account the low expression of *CASP8AP2* and *H2AFZ* and conventional clinical risk factors as variables. The results showed an increase in the risk of relapse for patients with T-cell immunophenotype, high WBC count and low *CASP8AP2* expression. These results are in agreement with those found in the survival analysis, where low levels of *CASP8AP2* expression were associated with lower RFS and EFS. The patients with low expression of *H2AFZ* tended to have low RFS, but the association was not significant ( $p = 0.081$ ). Additionally, it was observed that patients with low levels of *CASP8AP2* and *H2AFZ* expression had a greater cumulative incidence of relapse. This result is similar to that reported by Flotho *et al.* Interestingly, in the studied group, all patients who showed relapse and low expression of *CASP8AP2* relapsed early. These data suggest that low *CASP8AP2* expression could be useful as a predictive marker of early relapse at diagnosis, and its predictability could be increased when low expression of *H2AFZ* is also present. Although age and specific gene fusions are recognized risk factors, they were not statistically significant in the studied patients, presumably due to sample size; also, only one patient was less than 1 year old. It is also important to include MRD measurement in order to determine whether gene expression is associated with early treatment response.

The results presented thus far are promising, indicating the usefulness of *CASP8AP2* as a predictive marker of relapse in Mexican children with ALL. Analysis of the sensitivity, specificity, PPV and NPV (Table III) reveals that the low expression level of each individual gene is associated with similar values of sensitivity and specificity as compared to high WBC count. However, when the expression levels of both genes are analyzed together, the specificity, PPV and NPV are increased. Among the genetic markers proposed in this study, *CASP8AP2* has the greater utility in the initial screening of patients, with a NPV of 85% (95% CI 72.3–92.9). This value increases when low level of *CASP8AP2* expression is used in combination with high WBC count (87%, 95% CI 72.5–94.4). When low levels of expression of both genes and high leukocyte count are analyzed together, the NPV increases to 89% (95% CI 70.6–97.2).

The analysis of low gene expression combined with high WBC count increased sensitivity, specificity and predictive values, although the confidence intervals show that sample size should be increased in order to obtain more accurate values. For the studied group, high expression of *CASP8AP2* and low WBC count were useful markers for identifying patients less prone to relapse. As for other risk factors, *CASP8AP2* expression is not an independent marker of relapse, but is a promising candidate to be included in the gene signature for detecting children with ALL at risk, mainly in countries where MRD analysis is not feasible. The identification of these informative genes is relevant for countries with limited resources, in order to design useful and cost-effective assays for the screening of our children with ALL. This analysis demonstrates that the application of

well-established risk markers, such as high WBC count, with the gene expression markers proposed in this study could be useful for the stratification of Mexican children with ALL.

It should be noted that follow-up of the studied patients was feasible because they are part of the PMI program, which allows for the treatment of patients with diverse oncological diseases, reducing the number of cases who abandon treatment. The percentage of patients without relapse (75%) was found to be among the highest values reported in Mexico, but lower than those observed in developed countries. It is important to consider that some regions of Mexico with a lower socioeconomic level have inferior rates of EFS in patients with acute leukemia [32]. For this reason, the same expression analysis should be extended to patients who are treated in different regions of the country, to determine its prognostic significance and applicability. However, other factors such as adherence to treatment and the resolution of treatment-related issues should not be ruled out.

These results suggest that low expression levels of both genes at the time of ALL diagnosis could be used as a risk marker for relapse, besides others. The gene expression analysis discussed here, in addition to previously established prognostic factors, could contribute to the initial risk stratification of children with ALL. However, it is necessary to increase the study sample to include patients under different treatment protocols from diverse geographical regions of Mexico, and also from other countries, to determine the impact and applicability of these new parameters. Further research is therefore required to elucidate the biological interaction of these markers, their role in the progression of ALL and their potential contribution to the risk of relapse.

## Acknowledgements

The authors would like to thank the nurses of the Área de Quimioterapia Ambulatoria (AQUA) at the Instituto Nacional de Pediatría, for their assistance in sample collection.

**Potential conflict of interest:** Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article at [www.informahealthcare.com/lal](http://www.informahealthcare.com/lal).

Financial support was provided by CONACyT FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE/44402 (P.P.-V.).

This article constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of México (UNAM). Rocío Juárez-Velázquez acknowledges the scholarship and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACyT) PhD grant 165427, and UNAM.

## References

- [1] Rivera-Luna R, Correa-González C, Altamirano-Alvarez E, et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *Int J Cancer* 2013;132:1646–1650.
- [2] Neale GAM, Campana D, Pui C-H. Minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia: real improvement with the real-time quantitative PCR method? *J Pediatr Hematol Oncol* 2003;25:100–102.



- [3] Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol* 2011;29:551-565.
- [4] Rivera-Luna R, Olaya-Vargas A, Velásquez-Aviña M, et al. Early death in children with acute lymphoblastic leukemia: does malnutrition play a role? *Pediatr Hematol Oncol* 2008;25:17-26.
- [5] Rabin K, Man T-K, Lau CC. Personalized care of pediatric cancer patients. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2008;62:173-188.
- [6] Duffy MJ, Crown J. A personalized approach to cancer treatment: how biomarkers can help. *Clin Chem* 2008;54:1770-1779.
- [7] Izraeli S. Application of genomics for risk stratification of childhood acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside? *Br J Haematol* 2010;151:119-131.
- [8] Bhojwani D, Howard SC, Pui C-H. High-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma* 2009;9:S222-S230.
- [9] Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* 2006;108:1050-1057.
- [10] Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, et al. A set of genes that regulate cell proliferation predicts treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2007;110:1271-1277.
- [11] Jiao Y, Cui L, Gao C, et al. CASP8AP2 is a promising prognostic indicator in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2012;36:67-71.
- [12] Juárez-Velázquez MR, Salas-Labadía C, Reyes-León A, et al. Genetic markers in the prognosis of childhood acute lymphoblastic leukemia. In: Mejia-Arangure JM, editor. *Clinical epidemiology of acute lymphoblastic leukemia - from the molecules to the clinic*. Rijeka, Croatia: In Tech; 2013. pp 193-235.
- [13] Kittler R, Putz G, Pelletier L, et al. An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 2004;432:1036-1040.
- [14] Choi YH, Kim KB, Kim HH, et al. FLASH coordinates NF-kappa B activity via TRAF2. *J Biol Chem* 2001;276:25073-25077.
- [15] Alm-Kristiansen AH, Saether T, Matre V, et al. FLASH acts as a co-activator of the transcription factor c-Myb and localizes to active RNA polymerase II foci. *Oncogene* 2008;27:4644-4656.
- [16] Alm-Kristiansen AH, Lorenzo PI, Molværsmyr A-K, et al. PIAS1 interacts with FLASH and enhances its co-activation of c-Myb. *Mol Cancer* 2011;10:21.
- [17] Barcaroli D, Dinsdale D, Neale MH, et al. FLASH is an essential component of Cajal bodies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:14802-14807.
- [18] Yang X, Xu B, Sabath I, et al. FLASH is required for the endonucleolytic cleavage of histone pre-mRNAs but is dispensable for the 5' exonucleolytic degradation of the downstream cleavage product. *Mol Cell Biol* 2011;31:1492-1502.
- [19] Nekrasov M, Amrichova J, Parker BJ, et al. Histone H2A.Z inheritance during the cell cycle and its impact on promoter organization and dynamics. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:1076-1083.
- [20] Soboleva TA, Nekrasov M, Pahwa A, et al. A unique H2A histone variant occupies the transcriptional start site of active genes. *Nat Struct Mol Biol* 2012;19:25-30.
- [21] Greaves IK, Rangasamy D, Ridgway P, et al. H2A.Z contributes to the unique 3D structure of the centromere. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:525-530.
- [22] Huh YH, Sherley JL. Molecular cloaking of H2A.Z on mortal DNA chromosomes during nonrandom segregation. *Stem Cells* 2011;29:1620-1627.
- [23] Camitta BM. Colonel Mustard, with the rope, in the ballroom. *Blood* 2006;108:785.
- [24] Yang Y-L, Lin S-R, Chen J-S, et al. Expression and prognostic significance of the apoptotic genes BCL2L13, Livin, and CASP8AP2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res* 2010;34:18-23.
- [25] Consejo Nacional para la Prevención y el Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia. In: Rivera-Luna R, editor. *Protocolos Técnicos Cáncer en Niños*. México, D.F.: Edamsa Impresiones S.A. de C.V.; 2010.
- [26] Remke M, Pfister S, Kox C, et al. High-resolution genomic profiling of childhood T-ALL reveals frequent copy-number alterations affecting the TGF-beta and PI3K-AKT pathways and deletions at 6q15-16.1 as a genomic marker for unfavorable early treatment response. *Blood* 2009;114:1053-1062.
- [27] Hayashi Y, Raimondi SC, Look AT, et al. Abnormalities of the long arm of chromosome 6 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990;76:1626-1630.
- [28] Takeuchi S, Koike M, Seriu T, et al. Frequent loss of heterozygosity on the long arm of chromosome 6: identification of two distinct regions of deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1998;58:2618-2623.
- [29] Merup M, Moreno TC, Heyman M, et al. 6q deletions in acute lymphoblastic leukemia and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1998;91:3397-3400.
- [30] Mancini M, Vegna ML, Castoldi GL, et al. Partial deletions of long arm of chromosome 6: biologic and clinical implications in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2002;16:2055-2061.
- [31] Lee K-D, Pai M-Y, Hsu C-C, et al. Targeted Casp8AP2 methylation increases drug resistance in mesenchymal stem cells and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;422:578-585.
- [32] Pérez-Cuevas R, Doubova SV, Zapata-Tarres M, et al. Scaling up cancer care for children without medical insurance in developing countries: the case of Mexico. *Pediatr Blood Cancer* 2013;60:196-203.

## Supplementary material available online

Supplementary Table showing national treatment protocols