



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

**“Identificación de pacientes pediátricos con
leucemia linfoblástica aguda pertenecientes al
subtipo similar a *BCR-ABL1* positivo (Ph-like)”**

TESIS

Que para obtener el título de

Biólogo

PRESENTA

Eduardo Adrián Hernández Monterde

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Silvia Patricia Pérez Vera



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2018.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos

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

- Proyecto CONACYT PDCPN-2014/248591.
- Beca para tesis de pregrado No. 248591 (Proyecto CONACYT PDCPN-2014/248591).

A los fondos federales 2015/2016 del Instituto Nacional de Pediatría, por el apoyo económico brindado.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología, por la beca otorgada al concluir mi tesis (No. 17ABTL0444).

Al Instituto Nacional de Pediatría, por permitirme realizar el proyecto de tesis de Licenciatura.

Al servicio de Oncología y Hematología del Instituto Nacional de Pediatría y al servicio de Oncología del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, por el acceso al material biológico para este proyecto.

Agradezco:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme formado.

A mis padres por apoyarme siempre.

A mi familia, por sus consejos y por estar siempre pendientes de mí.

A Rocío, por todo lo que me enseñaste, eres una gran maestra, te admiro mucho.

A Paty, por darme la oportunidad de trabajar contigo, por guiarme y cuidar cada detalle de este proyecto. Fue un honor ser tu alumno.

A todo el equipo del laboratorio de Genética y Cáncer, es una gran escuela.

A todas las personas especiales en mi vida, son una motivación para ser alguien mejor.

La más asombrosa y compleja forma en que se manifiesta el universo,
es la vida.

Índice de contenido

Abreviaturas	7
Resumen	8
1. Introducción	9
1.1 El cáncer pediátrico en México	9
1.2 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)	9
1.2.1 Clasificación de la LLA.....	10
1.2.2 Alteraciones genéticas de la LLA pre-B	10
1.2.3 Alteraciones cromosómicas numéricas.....	11
1.2.4 Alteraciones cromosómicas estructurales	11
1.3 El subtipo <i>BCR-ABL1</i> positivo.....	12
1.4 El subtipo similar a <i>BCR-ABL1</i> positivo: Un hallazgo por perfil de expresión.....	13
1.4.1 Incidencia del subtipo similar a <i>BCR-ABL1</i> positivo.....	18
1.4.2 Alteraciones frecuentes del subtipo similar a <i>BCR-ABL1</i> positivo.....	18
1.4.3 Alteraciones en <i>CRLF2</i>	20
1.4.4 Genes sobre-expresados	22
1.4.5 Detección del subgrupo similar a <i>BCR-ABL1</i> positivo.....	24
1.5 Planteamiento del problema.....	25
1.6 Justificación	25
1.7 Objetivo General	26
1.8 Objetivos Particulares	26
1.9 Hipótesis	26
2. Material y Métodos	27
2.1 Población de estudio	27
2.2 Estrategia del estudio.....	27
2.3 Aislamiento de linfoblastos	28
2.4 Extracción de RNA	28
2.5 Síntesis del cDNA.....	28
2.5.1 Verificación de síntesis del cDNA	29
2.6 Cuantificación relativa de transcritos por PCR Tiempo Real	29
2.7 Detección del rearrreglo <i>P2RY8-CRLF2</i>	32

2.8 Análisis de resultados	33
2.9 Características clínicas y de laboratorio	33
3. Resultados.....	34
3.1 Pacientes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like por su perfil de expresión	34
3.2 Frecuencia de las alteraciones de <i>CRLF2</i>	37
3.3 Pacientes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like por la sobre-expresión de <i>CRLF2</i> y el rearrreglo <i>P2RY8-CRLF2</i>	37
3.4 Características clínicas y de laboratorio de los candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like	38
4. Discusión.....	39
4.1 Candidatos Ph-like por su perfil de expresión.....	39
4.2 Candidatos Ph-like por alteraciones que afectan la vía JAK-STAT.....	41
4.3 Frecuencia de los candidatos Ph-like y sus alteraciones en población LLA pre-B mexicana	42
4.4 El perfil de expresión génica y las alteraciones en <i>CRLF2</i> como alternativas para el diagnóstico de pacientes Ph-like	42
4.5 Características clínicas de los pacientes candidatos Ph-like	44
4.6 Participación de las alteraciones del subtipo Ph-like en el proceso de leucemogénesis.....	45
5. Perspectivas	46
6. Conclusiones	47
7. Literatura Citada.....	48
Anexo 1. Protocolo de aislamiento de células mononucleares	55
Anexo 2. Protocolo de extracción de RNA.....	56
Anexo 3. Método comparativo o método $\Delta\Delta\text{Ct}$ de cuantificación relativa.....	57
Anexo 4a. Niveles de expresión relativa de la cohorte “Otros-B”	58
Anexo 4b. Niveles de expresión de cinco pacientes con la translocación <i>BCR-ABL1</i> (Ph+).....	59
Anexo 5. Características de los candidatos Ph-like	60
Anexo 6. Características clínicas y de laboratorio de la cohorte “Otros-B” evaluada	61

Abreviaturas

INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LLA pre-B	Leucemia Linfoblástica Aguda de precursores B
ANC	Anormalidades en el Número de Copias
SNP	Polimorfismo de Un Solo Nucleótido
CLD	Cuenta de Leucocitos al Diagnóstico
EMR	Enfermedad Mínima Residual
Ph	“Philadelphia” (Filadelfia)
ITC	Inhibidores de Tirosina Kinasa
SLE	Supervivencia Libre de Evento
HGC	Hibridación Genómica Comparativa
LDA	“Low Density Array” (Microarreglo de Baja Densidad)
SLR	Supervivencia Libre de Recaída
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
RNA	“Ribonucleic Acid” (Ácido Ribonucleico)
DNA	“Deoxiribonucleic Acid” (Ácido Desoxirribonucleico)
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa
cDNA	DNA complementario
dNTP`s	Desoxinucleótidos
A.M.O.	Aspirado de Médula Ósea
se-CRLF2	Sobre-expresión de <i>CRLF2</i>
PEG	Perfil de Expresión Génica
pb	Pares de bases

Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia más común en niños y el subtipo más frecuente es el que afecta a las células precursoras B (LLA pre-B). Este presenta de forma recurrente las fusiones génicas *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *KMT2A-AFF1* y *BCR-ABL1*; las dos últimas consideradas de mal pronóstico. Estas alteraciones ocurren en <70% de los casos, por tanto, existen pacientes que portan lesiones génicas desconocidas o para las que aún no se desarrollan herramientas de diagnóstico. Recientemente se identificó un grupo de pacientes con alto riesgo a recaer en el 15-20% de las LLA pre-B, asociado a ascendencia hispano/latina, con un perfil de expresión similar a los casos *BCR-ABL1* positivos (Ph+), pero sin este rearrreglo; se denominan similares a *BCR-ABL1* positivo (Ph-like) y se caracterizan por presentar alteraciones en cinasas y sus receptores. Es posible detectar a estos pacientes por la sobre-expresión de una firma génica, dentro de la cual es decisivo el incremento en la expresión del gen *CRLF2* (se-*CRLF2*); también se identifican a través de las lesiones en genes de cinasas alteradas en el subtipo, en donde la alteración más frecuente es el rearrreglo *P2RY8-CRLF2*. Caracterizar genéticamente a los pacientes con LLA es muy relevante ya que permite conocer su pronóstico y asignar un esquema de tratamiento dependiendo de la alteración encontrada, por tanto este trabajo tiene como objetivo identificar pacientes pediátricos con LLA pre-B candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like por su perfil de expresión, la sobre-expresión de *CRLF2* y la presencia del rearrreglo *P2RY8-CRLF2*. Para el estudio, se obtuvo médula ósea de pacientes LLA pre-B sin las fusiones génicas recurrentes. A partir de células mononucleares se extrajo RNA y se sintetizó cDNA. Se determinaron los niveles de expresión de seis genes seleccionados de diferentes perfiles Ph-like (*CRLF2*, *SEMA6A*, *TSPAN7*, *IGJ*, *BMPR1B* y *PON2*) mediante q-RT-PCR por el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_t$. Para establecer la sobre-expresión se utilizó como valor de corte la mediana para cada gen. El rearrreglo *P2RY8-CRLF2* se buscó por RT-PCR. De las muestras de pacientes colectadas, se analizaron 50 que cumplieron con los criterios de inclusión, de las cuales, nueve casos (18%) sobre-expresaron entre 5 y 6 genes, los restantes (82%) sobre-expresaron entre 0 y 4 genes del perfil evaluado. En total se observaron veinticinco casos (50%) con se-*CRLF2* y al buscar la presencia del rearrreglo *P2RY8-CRLF2*, este fue detectado en 17 pacientes (35%). A partir de esto se obtuvieron treinta y dos candidatos Ph-like que cumplen con diferentes características que distinguen al subtipo Ph-like; con perfil+se-*CRLF2*+*P2RY8-CRLF2*= 3 casos; sólo con perfil= 6 casos; sólo con se-*CRLF2*= 9 casos; con se-*CRLF2*+*P2RY8-CRLF2*= 7 casos; sólo con el rearrreglo *P2RY8-CRLF2*= 7 casos. Con lo anterior podemos concluir que el subtipo Ph-like y particularmente las alteraciones en *CRLF2* podrían tener una alta frecuencia en la población infantil afectada. Es relevante identificar a estos pacientes por su frecuencia, implicaciones en el pronóstico de la enfermedad, y porque potencialmente pueden recibir terapia específica.

1. Introducción

1.1 El cáncer pediátrico en México

El cáncer se ha convertido en un problema prioritario de salud pública a nivel mundial. En México, esta enfermedad es la segunda causa de muerte en niños y adolescentes entre 5 -14 años de edad (INEGI, 2015), y la incidencia de las diversas neoplasias ha aumentado de acuerdo a los registros anuales del Seguro Popular, pasando de 133 casos/millón en 2007 a 156 casos/millón en 2012 (Rivera-Luna *et al.*, 2014). Se refiere que en el periodo de 2007-2012 las leucemias tuvieron la mayor prevalencia al representar el 49.8% (7066 casos) de todos los pacientes con cáncer registrados en edad pediátrica (0-18 años), y de éstos, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) fue la más prevalente (Figura 1).

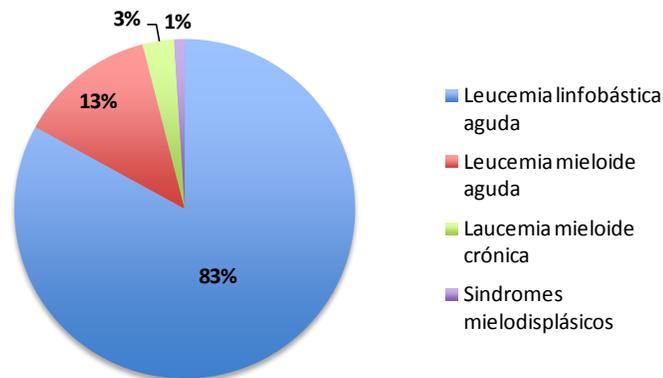


Figura 1. Prevalencia de leucemia en pacientes pediátricos (0-18 años, 7066 casos) registrados en el Seguro Popular en el periodo 2007-2012. Se observa que la LLA afectó a la más del 80% de los niños registrados. Tomado y modificado de Rivera-Luna *et al.*, 2014.

1.2 Leucemia linfoblástica aguda (LLA)

La LLA es un cáncer originado por la proliferación descontrolada de linfocitos inmaduros en médula ósea; estas células se denominan blastos por encontrarse arrestadas en diferentes estadios tempranos de la diferenciación celular. El origen de la LLA es multifactorial, generalmente se presenta una alteración genética como lesión inicial, y de forma secundaria, anormalidades en el número de copias (ANC) y mutaciones puntuales en diversos genes (Moorman, 2016), así como alteraciones que afectan vías de señalización celular; todos estos son eventos que cooperan para consolidar la enfermedad (Inaba *et al.*, 2013). Adicionalmente, el componente hereditario es un factor que puede generar predisposición a desarrollar LLA; en población europea se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en genes implicados en la maduración linfocítica (ej. *IKZF1*, *ARID5B*), que muestran una asociación significativa

con el riesgo de desarrollar la enfermedad (Treviño *et al.*, 2009). También se ha informado que la incidencia de este tipo de cáncer se incrementa hasta 20 veces en los niños con síndrome de Down (Carroll *et al.*, 2011). Aunque esta neoplasia es la más frecuente en niños, actualmente se alcanzan tasas de supervivencia que ascienden al 80% de los casos. Este avance está dado por la posibilidad de estratificar a los pacientes en categorías de riesgo a partir de diversas características, de tal forma que en los protocolos de tratamiento actuales el riesgo a recaer se basa en criterios como son la edad, género, cuenta de leucocitos al diagnóstico (CLD) (Moorman, 2016), el nivel de enfermedad mínima residual (EMR) (Kang *et al.*, 2010) y por la presencia alteraciones genéticas.

1.2.1 Clasificación de la LLA

De manera general, la LLA se clasifica de acuerdo al linaje linfocítico afectado. Se tienen así LLA de células T (LLA-T) y LLA de células B (LLA-B). Esta investigación se centra en el estudio de los primeros estadios de maduración de los blastos leucémicos de la LLA-B, que se determinan por la expresión diferencial de marcadores inmunológicos como CD19, CD34, CD10, CD79a y CD22 (Campana y Behm, 2000). En este estudio se abordará a los estadios pro-B (o B temprana) y pre-B, referidos así por el estado inmaduro del receptor de células B (RCB) y que en la LLA-B designan a los subtipos LLA pro-B y LLA pre-B respectivamente (Pérez-Vera *et al.*, 2011), mismos que comúnmente se engloban como LLA pre-B.

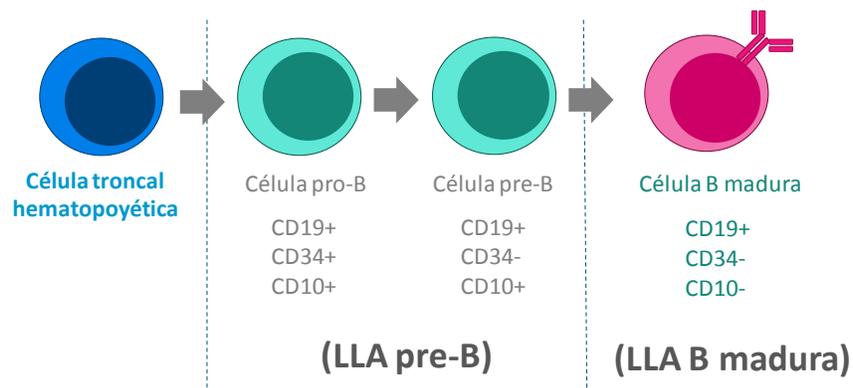


Figura 2. Maduración de células B. Se muestran algunos marcadores inmunofenotípicos que permiten determinar el estado de maduración de los blastos leucémicos. La LLA se desarrolla principalmente a partir de células pro-B y pre-B. Tomado y modificado de (Pérez-Vera *et al.*, 2011).

1.2.2 Alteraciones genéticas de la LLA pre-B

La LLA pre-B presenta múltiples alteraciones genéticas y cromosómicas que son específicas del subtipo, lo que permite su uso para el diagnóstico así como para clasificar la enfermedad bajo criterios citogenéticos

(cuadro 1 y 2) y/o moleculares. Algunas alteraciones poseen significado biológico al ser clave para el desarrollo de la leucemia (leucemogénesis), o bien, tienen valor pronóstico ya que permiten evaluar el riesgo de los pacientes a recaer y la posibilidad de ajustar el esquema de tratamiento utilizado (Moorman, 2012).

1.2.3 Alteraciones cromosómicas numéricas

Los blastos leucémicos en la LLA pre-B presentan diversas aneuploidías (cambios en la ploidía), que se asocian a desenlaces clínicos que pueden ser drásticamente diferentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aneuploidías de la LLA pre-B.

Subtipo genético	Pronóstico clínico	Prevalencia en pacientes pediátricos
Hiperdiploidía (51-65 cromosomas)	Bueno	25%-30%
Hipodiploidía (44 cromosomas)	Malo y decae con la reducción progresiva en el número de cromosomas	5%-8%
Cercanos a la haploidía (23-29 cromosomas)	Malo	0.7%-2.4%

Tomado de Ghazavi *et al.*, 2015.

1.2.4 Alteraciones cromosómicas estructurales

En la LLA pre-B, las lesiones estructurales más comunes son las translocaciones que generan fusiones génicas. Las translocaciones de mayor frecuencia y de valor pronóstico se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Translocaciones recurrentes en la LLA pre-B

Subtipo genético	Genes implicados	Pronóstico clínico	Prevalencia en pacientes pediátricos
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i>	Bueno	25%
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3-PBX1</i>	Intermedio a bueno	≤6%
t(4;11)(q21;q23) t(v;11q23)	<i>KMT2A-AFF1</i>	Malo	75% en menores a 1 año. 1%-2% en mayores a 1 año.
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	Malo*	3%-5%

Tomado de Ghazavi *et al.*, 2015. *Cuando se trata la leucemia con esquemas terapéuticos convencionales.

En general las alteraciones antes mencionadas son mutuamente excluyentes (Moorman, 2012), sin embargo esto no siempre sucede, ya que los pacientes con hiperdiploidía también pueden presentar rearrreglos genéticos. Por otro lado, la prevalencia de las fusiones *ETV6-RUNX1* y *TCF3-PBX1* suele variar entre poblaciones, con frecuencias reportadas para México del 8.7% y 5.8% respectivamente (Pérez-Vera *et al.*, 2008; Martínez-Mancilla *et al.*, 2013). Con el incremento en la edad la frecuencia de las alteraciones genéticas asociadas con un pronóstico favorable decae, mientras que las alteraciones asociadas a mal pronóstico como la *BCR-ABL1*, son más comunes (Moorman, 2016). Aunque estas alteraciones son eventos importantes en la leucemogénesis, son insuficientes para desarrollar y establecer la neoplasia; ahora se conoce que la mayoría de los casos con LLA muestran una constelación de anormalidades adicionales que incluyen alteraciones genéticas estructurales, mutaciones y cambios en el número de copias de genes implicados en la diferenciación y proliferación celular (Mullighan, 2012).

1.3 El subtipo *BCR-ABL1* positivo

La primera lesión genética que se encontró asociada a un tipo de cáncer específico es la que resulta de la translocación t(9;22)(q34;q11.2), que da origen al denominado cromosoma Filadelfia, referido también como Ph+ (Moorman, 2012). Aunque inicialmente fue descrita en leucemia mieloide crónica, también ocurre en 3%-5% de los casos de LLA pediátrica. En esta alteración, se une la secuencia 5' del gen *Breakpoint Cluster Región (BCR)* en el cromosoma 22 a la secuencia 3' del gen *C-Abl oncogén 1 (ABL1)* en el cromosoma 9. Al expresarse y posteriormente traducirse la fusión génica *BCR-ABL1*, da por resultado una oncoproteína con actividad tirosina cinasa constitutiva, que lleva a activación de múltiples vías de señalización, incremento en la proliferación celular y desregulación en la diferenciación y adhesión (Ghazavi, 2015). Comúnmente esta alteración se acompaña de lesiones secundarias, como mutaciones o deleciones en el factor de transcripción linfóide *IKZF1*, que ocurren hasta en el 84% de los casos (Mullighan *et al.*, 2009).

Los pacientes con LLA pre-B que portan esta alteración suelen tener mal pronóstico al ser tratados bajo esquemas de quimioterapia estándar, los cuales incluyen la administración de fármacos como L-asparaginasa y daunorubicina. Sin embargo, la reciente incorporación de inhibidores de tirosina cinasa (ITC) como imatinib, dasatinib y nilotinib, ha permitido elevar las tasas de supervivencia libre de evento (SLE) a 4 años (periodo sin recaída, segunda neoplasia o muerte) del 65% al 84% de los casos (Ghazavi *et al.*, 2015; Jiménez-Morales *et al.*, 2008).

1.4 El subtipo similar a *BCR-ABL1* positivo: Un hallazgo por perfil de expresión

Si bien las alteraciones mencionadas son las más recurrentes en LLA precursora B en niños, sólo se identifican en aproximadamente el 70% de los casos (Moorman, 2016); es decir, para el 30% de los pacientes no se habían podido establecer marcadores de diagnóstico o pronóstico que permitieran estratificarlos más allá de los criterios clínicos antes mencionados. A este subgrupo de pacientes con LLA pre-B se les refiere como “otros-B” (B-others) (Figura 3).

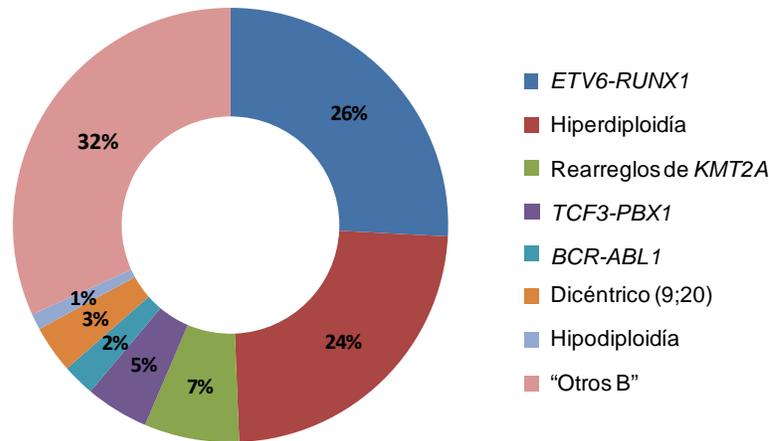


Figura 3. Frecuencia de las alteraciones genéticas más comunes en pacientes pediátricos con LLA pre-B. Tomado y modificado de Inaba *et al.*, 2013.

Recientemente, la caracterización molecular mediante estudios genómicos, micro-arreglos de expresión, SNPs y secuenciación de próxima generación, ha permitido describir nuevas alteraciones y subtipos de pacientes con LLA pre-B que no coexisten con las alteraciones estructurales recurrentes descritas a nivel citogenético y molecular, es decir, corresponden al grupo de pacientes “otros B”. A continuación se mencionan los estudios que dieron a conocer un nuevo subtipo molecular denominado “similar a *BCR-ABL1* positivo o Philadelphia-like”.

En 2009, Den Boer y colaboradores estudiaron a 190 pacientes pediátricos con LLA provenientes de Alemania y Holanda, con la finalidad de mejorar su tipificación genética mediante el diseño de un clasificador basado en el perfil de expresión génica de los subtipos de LLA más frecuentes. Para seleccionar el juego de sondas mínimo que permitiera la predicción de los seis subtipos de LLA con valor en el pronóstico (*ETV6-RUNX1*, hiperdiploidía, rearreglos de *TCF3*, *BCR-ABL1*, rearreglos en *KMT2A*, o LLA-

T) se eligieron los 110 juegos de sondas (para 90 genes) que con la más alta sensibilidad clasificaban de manera correcta a los subtipos de estudio; con éstas llevaron a cabo un análisis de agrupación jerárquica de los pacientes por su perfil de expresión. Al aplicar el perfil, el 100% de los pacientes pertenecientes a alguno de los seis subtipos fueron correctamente identificados. Sin embargo, 44 casos de un total de 154 pacientes con LLA pre-B no fueron asignados a ningún subtipo, es decir, representaron al grupo de los “otros B”; treinta (68%) de ellos se distinguieron de los demás por presentar un perfil de expresión parecido al de los casos *BCR-ABL1* positivos, pero sin la translocación característica. El hallazgo de este perfil relacionado a la activación de tirosina cinasas, llevó a que estos pacientes fueran nombrados como “similares a *BCR-ABL1*”. Se encontró un grupo de genes sobre-expresados asociados a este nuevo subtipo molecular, entre ellos: *BMP1B*, *ECM1*, *IGJ*, *PON2*, *SEMA6A* y *TSPAN7*. Con el seguimiento de los pacientes, se determinó que su pronóstico fue adverso como sucede con el subtipo *BCR-ABL1* positivo, ya que sólo el 59% mostró SLE a 5 años en comparación con el 84% de los restantes casos con LLA pre-B en la cohorte. Adicionalmente, los pacientes presentaron una cuenta leucocitaria en el diagnóstico hasta tres veces mayor respecto a los demás subgrupos. Con el posterior análisis genético de las muestras por Hibridación Genómica Comparativa (HGC) se reportó que los miembros de este subgrupo tuvieron mayor número de alteraciones genéticas, de las cuales destacaron las deleciones en genes que participan en la maduración de los linfocitos B, como *IKZF1*, *TCF3*, *EBF1*, *PAX5* y *VPREB1*, y que se encontraron alterados en más del 80% de los casos. Por otro lado, destaca el hecho de que en el diagnóstico estos pacientes fueron erróneamente clasificados dentro de grupos de riesgo bajo e intermedio, al considerar los criterios de los protocolos en los que se enrolaron, lo que implicaba estar sometidos a un régimen de tratamiento menos intensificado. Finalmente, por su mal pronóstico, estos pacientes “similares a *BCR-ABL1* positivos” se convirtieron en el subgrupo de LLA pre-B de alto riesgo más numeroso.

En otro estudio simultáneo al de Den Boer y cols.,(2009), pero llevado a cabo con población de los Estados Unidos, Harvey y colaboradores (2010a) analizaron los perfiles de expresión de un grupo de 207 pacientes con LLA pre-B en alto riesgo a recaer, con el objetivo de identificar nuevos subgrupos genéticos, genes marcadores para el diagnóstico, o posibles blancos terapéuticos. Algunos criterios utilizados para la selección de estos casos con mal pronóstico, fueron presentar una cuenta leucocitaria al diagnóstico >50000 cel./ μ L, estar en un rango de edad entre 1 a 20 años, tener infiltración de blastos leucémicos en sistema nervioso central o testículos, no presentar alteraciones genéticas asociadas a un pronóstico favorable (*t(12;21)/ETV6-RUNX1* o trisomía de los cromosomas 4 y 10) ni las alteraciones de mal pronóstico ya conocidas (*t(9;22)/BCR-ABL1* o hipodiploidía). Para poder realizar un análisis de agrupamiento de los pacientes de acuerdo a su perfil de expresión, utilizaron un micro-arreglo de

expresión de alta densidad a partir del cual seleccionaron las sondas génicas a evaluar mediante tres métodos distintos (Alto Coeficiente de Variación (HC), Análisis del Perfil Atípico en Cáncer (COPA) y Reconocimiento de Atípicos por Muestreo de Extremos (ROSE)). De esta forma, con cada uno eligieron los 254 juegos de sondas con la más alta variación en expresión respecto a su valor de tendencia central en la cohorte estudiada. Al realizar el análisis de agrupamiento se encontró que con las sondas seleccionadas por los tres métodos, se identificaron los mismos ocho grupos de pacientes, es decir, se obtuvieron ocho perfiles de expresión. Destacó el grupo número ocho con 24 miembros, de los cuales sorpresivamente 61% fueron de origen hispano/latino; este subgrupo tuvo la menor tasa de SLE a cuatro años, que fue del 21% en comparación con 66.3% de toda la cohorte. En particular, el análisis ROSE definió al grupo ocho por la sobre-expresión de genes como *BMPR1B*, *CRLF2*, *MUC4*, *PON2*, *GPR110*, *SEMA6* e *IGJ*, mismos que fueron previamente reportados por ser predictivos para la detección de los casos que sí son positivos a la fusión *BCR-ABL1* (Juric *et al.*, 2007). Por tanto, a esta firma asociada a la activación de tirosina cinasas la denominaron “similar a *BCR-ABL1*” o “Philadelphia-like (Ph-like)”. Para profundizar más en la heterogeneidad de los pacientes con alto riesgo, correlacionaron sus perfiles de expresión con las ANC’s. De esta manera se encontraron deleciones en el gen *IKZF1* que han sido vinculadas a mal pronóstico (Mullighan *et al.*, 2009), mismas que tuvieron una asociación significativa con los miembros del grupo ocho al presentarse en el 91% de los casos. Adicionalmente, en este grupo se observaron variantes en el número de copias en la región adyacente al locus de *CRLF2*, lo que permitió la posterior identificación de rearrreglos en este gen. Finalmente, el hallazgo del perfil de “activación de tirosina-cinasas” característico del grupo ocho, llevó a secuenciar los genes que codifican estas enzimas en 198 muestras, lo que dio como resultado la identificación de mutaciones en *JAK1* y *JAK2* en 19 pacientes, 12 de los cuales formaron parte del grupo con el perfil Ph-like.

En 2013, Harvey y colaboradores mejoraron el clasificador génico que desarrollaron previamente, con el objetivo de identificar de forma prospectiva a los casos Ph-like. A partir de un micro-arreglo de alta densidad obtuvieron los perfiles de expresión génica de 811 pacientes con LLA pre-B de alto riesgo, y mediante un análisis de predicción seleccionaron los 68 juegos de sondas (para 38 genes) que mejor distinguieron al subgrupo Ph-like. Posteriormente, al analizar estos genes con un micro-arreglo de baja densidad (LDA) refinaron el modelo clasificador para así obtener los 15 genes más predictivos en la identificación de pacientes Ph-like; estos fueron *IGJ*, *SPATS2L*, *MUC4*, *CRLF2*, *CA6*, *NRXN3*, *BMPR1B*, *GPR110*, *CHN2*, *SEMA6A*, *PON2*, *SLC2A5*, *S100Z*, *TP53INP1* e *IFITM1*. De esta manera, el clasificador demostró la capacidad de predecir los casos de estudio con un alto grado de sensibilidad (93%) y especificidad (89.7%).

Cabe resaltar que en los estudios mencionados, cada sistema de clasificación de pacientes fue verificado en una cohorte de validación, dando soporte a los resultados obtenidos. Esto demuestra que las firmas de expresión génica son una herramienta robusta para la detección de pacientes. Sin embargo, en la identificación del subgrupo similar a *BCR-ABL1* positivo, se ha observado que los clasificadores génicos no son del todo transferibles entre las poblaciones de estudio. Al evaluar las diferentes firmas de expresión identificadas, Boer y colaboradores (2015) encontraron que aunque hay solapamiento, existe variación en el grupo de pacientes que son clasificados como Ph-like. De esta manera reportaron que 54 de 79 pacientes (68%) identificados con la firma europea, no fueron detectados con la firma norteamericana. A su vez, cuando se evaluó la firma europea en una cohorte estadounidense, 15 de 40 casos Ph-like (37%) no se detectaron. Las diferencias en la composición genética de las poblaciones que se han estudiado, como la ancestría americana que puede contener parcialmente componente amerindio con respecto a la europea, el grupo de riesgo al que fueron asignados por sus características clínicas, así como el objetivo inicial para el análisis de los perfiles de expresión, pueden ser factores que contribuyan a que sean diferentes los casos identificados (Boer *et al.*, 2015). De esta manera, ya que cambian los marcadores que denotan la activación de tirosina cinasas, la caracterización del subgrupo Ph-like debiera realizarse en las diferentes regiones y/o poblaciones que aún no han sido estudiadas.

Otros estudios enfocados en el mejoramiento de la estratificación de riesgo y no en la clasificación genética, han destacado la alteración de algunos genes marcadores, que en los trabajos previamente citados integran las firmas Ph-like. A continuación se hace mención a estas investigaciones.

En el momento del diagnóstico se asigna el primer estatus de riesgo en los pacientes LLA-B y se basa exclusivamente en dos características clínicas que cuentan con valor pronóstico. Los pacientes entre 1 y 10 años de edad, y/o una cuenta leucocitaria menor a 50000 cel./ μ L, son clasificados con riesgo estándar. En contraparte, los pacientes diagnosticados menores a 1 año o mayores a 10, y/o cuenta de leucocitos mayor a 50000 cel./ μ L, son clasificados con alto riesgo a recaer (Hunger y Mullighan, 2015a). Sin embargo, aún cuando los pacientes muestran características clínicas favorables, las recaídas se presentan en ambos grupos de riesgo. Por tal motivo, Kang y colaboradores (2010) buscaron mejorar el estatus de riesgo de un grupo de 207 pacientes que previamente fueron caracterizados genéticamente por Harvey (2010a), mediante un perfil de expresión construido en función del evento de recaída y combinado con la detección de EMR (presencia de al menos 1 célula leucémica por cada 10000 células normales después de 29 días de quimioterapia, lo que eleva el riesgo a recaer). A través de un micro-

arreglo de alta densidad obtuvieron perfiles de expresión génica, a partir de los cuales realizaron un análisis de riesgos que les permitió seleccionar los 42 juegos de sondas (para 38 genes) con la más alta asociación a Supervivencia Libre de Recaída “SLR” (periodo de 4 a 5 años sin detección de células leucémicas, una vez que el paciente fue declarado como libre de enfermedad). Con la posterior medición de EMR al término de la terapia de inducción a la remisión (esquema de 29 días de tratamiento con quimioterapia en el que se busca eliminar el 95% de células leucémicas), construyeron un clasificador combinado con el cual obtuvieron 3 grupos de riesgo que difirieron significativamente en su SLR. De 191 pacientes con muestra disponible, 72 integraron un grupo de bajo riesgo en el que el 87% de los casos presentó 4 años de SLR; en un grupo de riesgo intermedio (81 casos) la SLR a 4 años fue del 62% mientras que en 38 pacientes asignados al grupo de alto riesgo, la SLR a 4 años sólo fue del 29% y cercana a 0% a los 5 años de seguimiento. Los pacientes con el peor pronóstico se caracterizaron por mostrar sobre-expresados los genes *BMPR1B*, *CTGF*, *TTYH2*, *IGJ*, *PON2*, *CD73*, *CDC42EP3*, *TSPAN7* y *SEMA6A*. Es interesante observar que algunos de estos genes también fueron reportados por Harvey *et al.* (2010a y 2013) y Den Boer *et al.* (2009) en la caracterización del subgrupo similar a *BCR-ABL1*. Por tanto, los miembros del subtipo Ph-like, que como se ha mencionado presentan bajas tasas de supervivencia, podrían ser susceptibles de ser identificados mediante un clasificador génico basado en la SLR y la EMR.

Adicionalmente, en 2008 Hoffmann y colaboradores buscaron mejorar la estratificación de riesgo a recaer de pacientes pediátricos con LLA-B mediante una firma de expresión génica correlacionada con el pronóstico clínico a largo plazo. Para ello analizaron las muestras de un grupo de 55 pacientes que alcanzaron remisión al término de la terapia de inducción pero con evento de recaída en 16 de ellos. Al evaluar los perfiles de expresión identificaron a los tres genes que mejor discriminaban el pronóstico clínico. De esta manera, se reportó que el perfil de expresión definido por la regulación a la baja de los genes *AZIN*, *GLUL* y la sobre-expresión de *IGJ*, permitió predecir el pronóstico de los 55 pacientes con una especificidad del 97.4% y una sensibilidad del 68.8%. Al evaluar su valor en el riesgo a recaer, se encontró que la diferencia en la supervivencia de los pacientes con estos genes alterados fue significativamente menor. En este estudio destaca la identificación de *IGJ* sobre-expresado, que como se ha mencionado es uno de los genes que distinguen al subgrupo Ph-like. Por tanto, los marcadores de mal pronóstico basados en el nivel de expresión reportados por Kang *et al.* (2010) y Hoffmann *et al.* (2008) no sólo constituyen una herramienta que mejora la clasificación de riesgo inicial, también permiten detectar pacientes que por su alto riesgo a recaer podrían pertenecer al subgrupo Ph-like.

1.4.1 Incidencia del subtipo similar a *BCR-ABL1* positivo

Como se ha revisado, el grupo Ph-like se ha convertido en el subtipo de alto riesgo más frecuente; actualmente se sabe que representa entre el 15-20% de los casos con LLA pre-B (Ghazavi *et al.*, 2015) o bien, hasta 50% de los “otros B” (Moorman, 2016). Se refiere que su incidencia incrementa con la edad y se estabiliza en adultos mayores a 40 años (Figura 4) (Roberts *et al.*, 2014 y 2017).

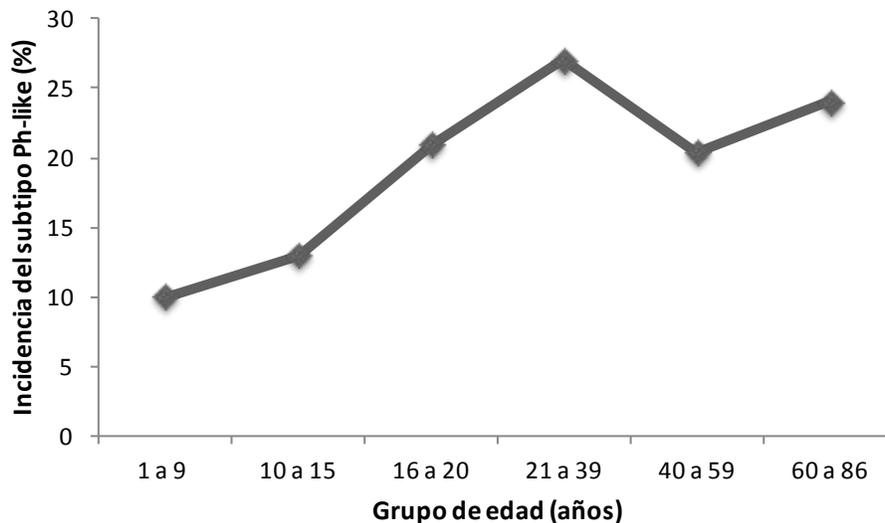


Figura 4. Incidencia del subtipo Ph-like en pacientes con LLA pre-B por grupo de edad. Se observa que entre pacientes pediátricos la frecuencia es mayor en adolescentes. Tomado y modificado de Roberts *et al.*, 2014 y 2017.

1.4.2 Alteraciones frecuentes del subtipo similar a *BCR-ABL1* positivo

Los pacientes Ph-like despliegan un amplio repertorio de lesiones genéticas, lo que hace a este subgrupo sumamente heterogéneo. Sin embargo, destacan aquellas que llevan a la desregulación de receptores de citocinas y a la activación de tirosina cinasas. Roberts y colaboradores (2014) reportaron la frecuencia de estas alteraciones a partir del análisis genómico de 264 pacientes Ph-like (Figura 5). Las alteraciones convergen principalmente en vías de señalización como son la JAK-STAT, la vía de ABL y la vía de Ras, por la presencia de rearrreglos o mutaciones de genes clave en la transducción de señales (Cuadro 3). Por tanto, a pesar de la complejidad genética de los pacientes Ph-like, ya que la mayoría de los casos involucran lesiones en *JAK-STAT* y *ABL*, podría ser factible la intervención terapéutica mediante el empleo de ITC (ej. Imatinib, dasatinib, ruxonitinib) en combinación con quimioterapia (Tran *et al.*, 2016), de la misma forma que se ha tratado a los pacientes Ph+.

En estudios preclínicos, ya se ha demostrado

que la activación de las vías mencionadas puede ser revertida a través de ITC específicos para cada grupo de alteraciones (Hunger y Mullighan , 2015a).

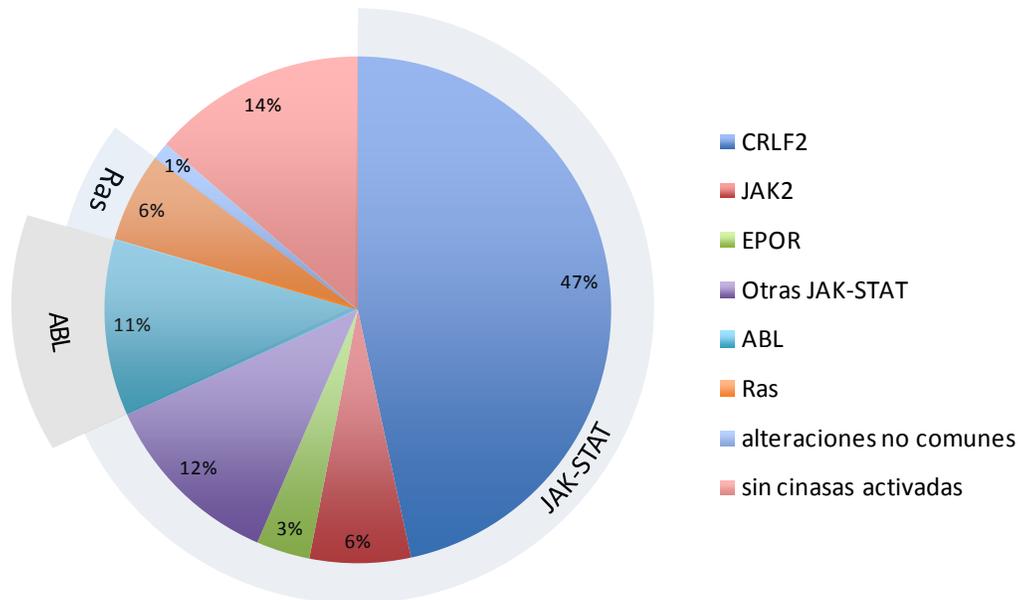


Figura 5. Distribución de alteraciones más frecuentes en el subgrupo Ph-like. Se muestra la frecuencia de CRLF2 sobre-expresado, rearreglos en *JAK2* y *EPOR*, otras mutaciones activadoras de la vía JAK-STAT, rearreglos en la vía ABL, mutaciones en la vía de Ras, alteraciones raras y los casos sin mutaciones en cinasas. Tomado y modificado de Roberts *et al.*, 2014.

Cuadro 3. Vías de señalización alteradas, genes implicados y alternativas terapéuticas para los pacientes Ph-like.

Vía alterada	Genes implicados	Inhibidor de cinasa
JAK-STAT	<i>CRLF2, JAK2, EPOR, IL7R, SH2B3, TSLP, FLT3</i>	Ruxolitinib
	<i>IL2RB</i>	Inhibidor de JAK1/JAK3
	<i>TYK2</i>	Inhibidor de TYK2
ABL	<i>ABL1, ABL2, CSF1R, PDGFRB</i>	Dasatinib
Ras	<i>NRAS, KRAS, PTPN11, NF1</i>	No desarrollado

Tomado de Roberts *et al.*, 2012.

A continuación se describen las alteraciones que se presentan en el gen *CRLF2*.

1.4.3 Alteraciones en *CRLF2*

Hasta el 50% de los casos Ph-like presentan alteraciones en el gen *CRLF2* (*Citokine Receptor-Like Factor 2*) (Mullighan, 2012). Las lesiones en *CRLF2* llevan a la sobre-expresión de este receptor de citocinas, que al heterodimerizar con el receptor α de interleucina 7 (*ILR7 α*), y con la posterior unión a su ligando la linfopoyetina estromal tímica (TSLP), activan la vía de JAK-STAT de forma constitutiva, lo que promueve la proliferación celular (Harvey *et al.*, 2010b) (Figura 6).

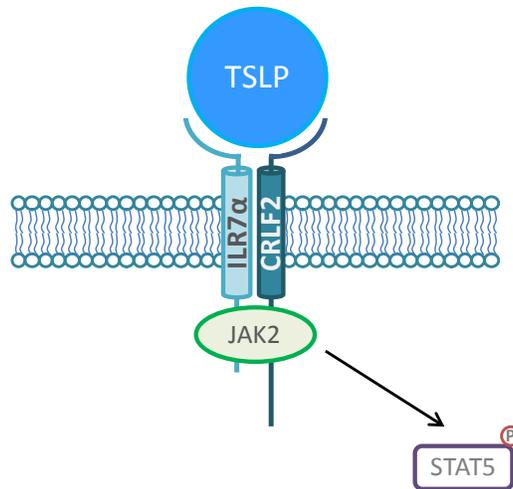


Figura 6. Participación de *CRLF2* en la vía de JAK-STAT. Las alteraciones en *CRLF2* mantienen la activación del factor de transcripción STAT5, lo que permite la expansión de las células leucémicas. Tomado y modificado de Carroll *et al.*, 2011.

Entre los mecanismos conocidos que llevan a la desregulación de *CRLF2*, se tiene la delección *P2RY8-CRLF2*; ésta se origina dentro de la región pseudoautosómica *PAR1* en los cromosomas sexuales (Figura 7a, en donde toda la región codificante de *CRLF2* se yuxtapone con el primer exón no codificante del gen *P2RY8* (*Purinergic Receptor P2Y*), quedando así bajo el control de su promotor (Figura 7b). Por otro lado, la translocación de la región *PAR1* al locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IGH@*) en 14q32, deja la activación de *CRLF2* bajo el control del potenciador (*enhancer*) de *IGH@* (Palmi *et al.*, 2012). Aunque son poco frecuentes, las mutaciones en el dominio transmembranal de *CRLF2* (ej. p.Phe232Cys) también generan la heterodimerización del receptor y activan la transducción de señales (Yoda *et al.*, 2010). Estas alteraciones en *CRLF2* están fuertemente asociadas a mutaciones en la familia JAK; aproximadamente el 50% de los casos con rearrreglos en *CRLF2* se ven acompañados por mutaciones en *JAK1/2* (Mullighan, 2012), y contrariamente, la aparición de estas mutaciones es rara cuando *CRLF2* no está alterado. Por otro lado, la expresión de *CRLF2* acompañada de mutaciones en el dominio pseudocinasa de *JAK2* (ej. p.Arg683) también resulta en la activación citocina-independiente de la vía

mencionada (Mullighan *et al.*, 2009). Destaca el hecho de que las alteraciones en *CRLF2* son altamente frecuentes en los casos LLA pre-B con Síndrome de Down, ya que se presentan en la mitad de estos pacientes (Ghazavi *et al.*, 2015); también están altamente asociadas a la ascendencia hispano/latina de acuerdo a los estudios realizados en los Estados Unidos de América (Harvey *et al.*, 2010b).

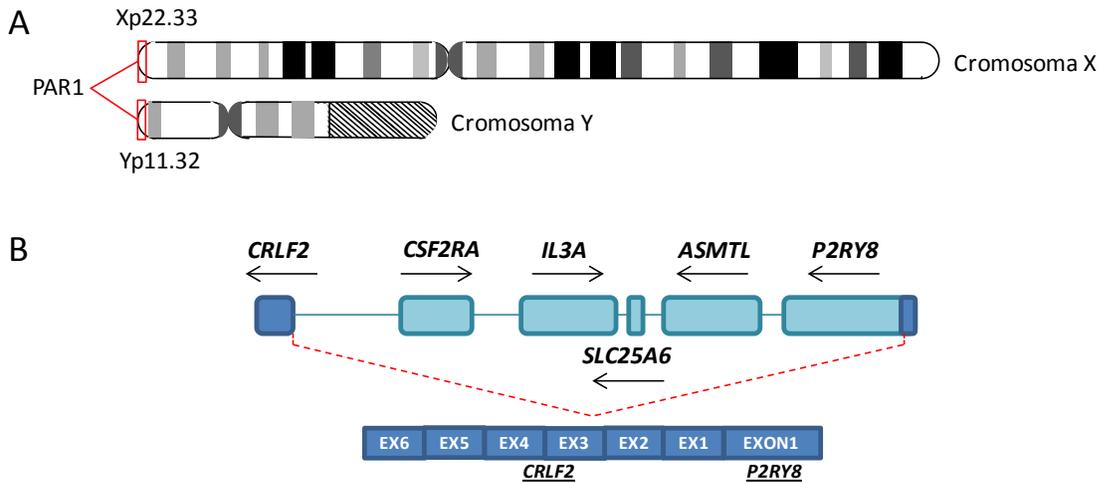


Figura 7. (A) *CRLF2* y *P2RY8* se localizan en la región PAR1 de los cromosomas sexuales. (B) Se muestra la deleción intersticial que genera la fusión *P2RY8-CRLF2*. Tomado y modificado de Dyer *et al.*, 2010 y Hertzberg *et al.*, 2010.

Diversos estudios han profundizado sobre el impacto de *CRLF2* desregulado en el pronóstico de los pacientes. Palmi y colaboradores (2012) determinaron que la fusión *P2RY8-CRLF2* puede incrementar hasta tres veces el riesgo a recaer, además de observar que los pacientes con *CRLF2* sobre-expresado tienen una SLE significativamente menor. Otros estudios también han determinado que la sobre-expresión de *CRLF2*, y particularmente la presencia del rearrreglo *P2RY8-CRLF2*, son marcadores de pronóstico adverso (Chen *et al.*, 2012; Cario *et al.*, 2010). Sin embargo, van Der Veer y colaboradores (2013) no han encontrado esta asociación. Con base en esto, actualmente el valor pronóstico de *CRLF2* desregulado aún está en debate y parece ser dependiente del esquema de tratamiento utilizado, también de las características de la cohorte de estudio, así como del tipo de análisis para definir los valores de corte que establecen la sobre-expresión de este gen. La importancia de detectar alteraciones en este receptor radica en su uso potencial como blanco terapéutico, para la inhibición de la vía JAK-STAT.

1.4.4 Genes sobre-expresados

Como se ha mencionado, las firmas de expresión que han permitido la detección del subtipo Ph-like, están conformadas por un conjunto de genes sobre-expresados. Además de *CRLF2*, son recurrentes otros genes cuyo papel en el fenotipo de LLA pre-B aún no ha sido descrito, sin embargo, son característicos del subtipo. A continuación se describe la función biológica de cinco genes frecuentes en las firmas Ph-like así como su participación en otras enfermedades.

- *BMPR1B* “Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 1B”

El receptor de la proteína morfogenética ósea 1B, también denominado *ALK6* (*Activin Receptor-like Kinase 6*), es uno de los tres receptores tipo 1 de la proteína morfogenética (BMP's) con dominio serina-treonina cinasa. Durante la condrogénesis es requerido para la maduración y proliferación de los condrocitos. Este gen también se expresa en células troncales mesenquimales en bajos niveles, incluso no detectables. En contraste, su expresión aumenta durante la osteogénesis, donde es necesario para el modelado óseo, ya que regula la diferenciación de osteoblastos a osteocitos. Las alteraciones en la intensidad, localización y duración de la actividad de *BMPR1*, conducen a la formación de hueso heterotópico (que consiste en la deformación de hueso y cartílago) así como a desórdenes del metabolismo óseo (Lin *et al.*, 2016).

- *TSPAN7* “Tetraspanin 7”

La tetraspanina 7 es una proteína perteneciente a la superfamilia 4 de proteínas transmembranales, también conocida como familia de las tetraspaninas. La mayoría se caracterizan por poseer dominios hidrofóbicos y son únicas en su capacidad para asociarse de forma lateral con otras proteínas de membrana, por lo que actúan como organizadores al agrupar proteínas en complejos funcionales; así, participan al mediar procesos de adhesión y migración celular (Zoller, 2009). La tetraspanina 7 se expresa ampliamente en células no hematopoyéticas, sobre todo en el cerebro (Hosokawa *et al.*, 1999). Sin embargo, se ha descrito que se expresa fuertemente en LLA-T (Takagi *et al.*, 1995). Mediante análisis por micro-arreglos se ha demostrado la sobre-expresión de este gen en cáncer de estómago, páncreas, hígado, esófago y colorectal (Cheong *et al.*, 2015). En otro estudio se encontró que la sobre-expresión de *TSPAN7* reduce de forma significativa la carga tumoral en el modelo murino de mieloma múltiple; por otro lado, mediante ensayos *in vitro* se observó que la expresión de este gen mejora la adhesión de las células de mieloma múltiple a células del estroma de la médula ósea. Adicionalmente, *TSPAN7* sobre-

expresado indujo un incremento significativo de la migración de células tumorales (5TGM1) en cultivos en monocapa de células endoteliales de médula ósea (Cheong *et al.*, 2015).

- *IGJ* "Immunoglobulin J Chain"

Este gen codifica para las cadenas de unión de las IgA e IgM multiméricas y se expresa de forma ubicua en diferentes tejidos como el intestino delgado, colon, bazo y las glándulas salivales. Adicionalmente, contribuye en la unión al componente secretorio de dichas inmunoglobulinas. La enfermedad de la cadena pesada, en la que se genera la sobreproducción de anticuerpos IgA o IgM, es un trastorno asociado a este gen (GeneCards, 2016).

- *PON2* "Paraoxonase 2"

La paraoxonasa 2 es una enzima que se localiza en varias estructuras del citosol y está encargada de la prevención del estrés oxidante intracelular (Chistiakov *et al.*, 2017), donde es capaz de destoxificar lipoproteínas de baja densidad oxidadas (oxLDL). Esta proteína, que se expresa ampliamente en los tejidos humanos (GeneCards, 2017), cuenta con un dominio transmembranal con el que puede translocarse a la membrana plasmática, e impide la peroxidación de lípidos. Además, por su actividad degradadora de anillos de lactona, disminuye la homocisteína tiolactona, intermediario que induce la N-homocisteinilación de proteínas (Abelló *et al.*, 2014). Por otro lado, PON2 está involucrado en mecanismos independientes de su actividad lactonasa y que median la ateroprotección, como es la inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis y la generación de superóxido dependiente de mitocondrias (Altenhöfer *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado el efecto cardioprotector de esta paraoxonasa. En 2004, Navab y colaboradores reportaron que la deficiencia de PON2 y apolipoproteína E (apoE) en ratones alimentados con dieta rica en grasas, llevó a la reducción de LDL en comparación con ratones normales. Así también, se ha observado que la sobre-expresión de PON2 en ratones apoE deficientes, atenúa el desarrollo de aterosclerosis, mejora el transporte reverso de colesterol, así como la capacidad antioxidante del suero, y restaura la función antiinflamatoria de los lípidos de alta densidad (HDL) (Ng *et al.*, 2006).

- *SEMA6A* "Semaphorin 6A"

La semaforina 6A es una glicoproteína transmembranal inicialmente descrita por participar en el direccionamiento de los axones nerviosos, así como en la migración celular durante el desarrollo del sistema nervioso central. Se ha reportado la participación de este gen en diferentes neoplasias. Zhao y

colaboradores (2015) refieren que la sobre-expresión de *SEMA6A* en pacientes con glioblastoma se asoció con una supervivencia más larga, y este factor mantuvo valor pronóstico independiente. En ensayos *in vitro* en las líneas celulares de glioblastoma U251 y U87, encontraron que el incremento en concentración de la proteína suprime la capacidad migratoria e inhibe el potencial invasivo y de proliferación de estas células. En adición, la reducción de esta proteína altera el citoesqueleto, la motilidad y capacidad invasiva de células de melanoma con mutaciones en la cinasa BRAF (Loria *et al.*, 2015). *SEMA6A* también inhibe la angiogénesis tumoral (Dhanabal *et al.*, 2005). En el trabajo de Prislei y colaboradores (2008), realizado en la línea celular A2780 de cáncer de ovario, se describió que la sobre-expresión de *SEMA6A* participa en resistencia a diversos fármacos por su asociación directa con los niveles de TUBB3, proteína ligada a mal pronóstico y a la resistencia a quimioterapia en cáncer gástrico, de ovario, pulmón, mama y páncreas. Asimismo, se reportó que la *SEMA6A* sobre-expresada es una forma citoplasmática capaz de regular la composición de los isotipos de tubulina, afectando de manera indirecta la dinámica de los microtúbulos del citoesqueleto. Adicionalmente, se han detectado altos niveles de expresión de esta semaforina en numerosas muestras de cáncer de riñón (Prislei *et al.*, 2008). Finalmente, en ciertas formas de cáncer pulmonar, la región 5q23.1 en la que se ubica este gen se encuentra “deletada” (Ueno *et al.*, 1998).

1.4.5 Detección del subgrupo similar a *BCR-ABL1* positivo

Se pueden utilizar diversas estrategias para identificar los casos Ph-like, como se ha revisado, una de ellas es el análisis de transcritos. Entre los ensayos más utilizados para este fin se tienen los microarreglos de expresión, mismos que evalúan los niveles de transcripción altos o bajos de un grupo de genes. También ha sido ampliamente utilizada la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), en la que se cuantifican RNA mensajeros amplificados mediante sondas y oligonucleótidos específicos, ofreciendo alta sensibilidad y un costo relativamente bajo en comparación con los microarreglos.

Como se mencionó, las firmas de expresión pueden cambiar esencialmente por el fondo genético de la población de estudio. Por esto, otra estrategia de detección es a través de la búsqueda de las alteraciones más frecuentes, particularmente aquellas en las que se encuentran cinasas implicadas. Los rearrreglos genéticos como las deleciones, pueden ser detectadas mediante microarreglos de SNPs, con los que se identifican alelos mutados. Otra alternativa es mediante MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples), donde para amplificar una secuencia de DNA específica, se requiere la unión de dos sondas que son ligadas por una DNA ligasa. Finalmente, la reacción en cadena de la

polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR), fundamentada en la síntesis de un DNA complementario (cDNA) a partir de un RNA mensajero maduro y su posterior amplificación, es otra metodología ampliamente utilizada para el fin mencionado.

1.5 Planteamiento del problema

Dada la heterogeneidad del subgrupo Ph-like, el diagnóstico diferencial de estos casos resulta esencialmente una tarea compleja. Sin embargo, por el tipo de alteraciones que presentan estos pacientes, el perfil de expresión génica y la búsqueda de rearrreglos en genes de cinasas, representan alternativas viables para detectarlos. Por tanto, en este trabajo se evaluará si una firma de expresión construida a partir de seis genes y la detección del rearrreglo *P2RY8-CRLF2*, permiten identificar pacientes de este subgrupo en la población pediátrica mexicana con LLA.

1.6 Justificación

En los pacientes con LLA pre-B las alteraciones genéticas y cromosómicas que se diagnostican rutinariamente, así como los factores clínicos que contribuyen a definir el pronóstico, no son suficientes para estratificar a la totalidad de los casos. Existen pacientes que recaen, los cuales pueden pertenecer a subgrupos no caracterizados o en los que aún no se han desarrollado alternativas de diagnóstico. Es este el caso del subtipo Ph-like. La heterogeneidad de alteraciones que presentan estos pacientes es el principal elemento que obstaculiza su detección. Es una prioridad implementar una estrategia de diagnóstico que sea factible realizar en la mayoría de los laboratorios que atienden estos pacientes. Por otro lado, con base en los hallazgos referidos, el subtipo Ph-like podría tener una alta frecuencia en la población mexicana.

1.7 Objetivo General

Identificar pacientes pediátricos con LLA pre-B candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like a través de una firma de expresión génica y por la presencia de la delección *P2RY8-CRLF2*.

1.8 Objetivos Particulares

- Determinar si la firma de expresión propuesta, permite identificar a pacientes candidatos a pertenecer al subtipo de estudio.
- Determinar si la presencia del rearreglo *P2RY8-CRLF2* se asocia con la sobre-expresión del gen *CRLF2*.
- Conocer la frecuencia del rearreglo *P2RY8-CRLF2* en la población de estudio.
- Conocer las características clínicas y de laboratorio de los pacientes candidatos Ph-like.

1.9 Hipótesis

Debido a que el estudio es descriptivo se pueden formular varias hipótesis. Se menciona una de ellas.

La firma de expresión génica propuesta y la detección del rearreglo *P2RY8-CRLF2*, contribuirán a identificar candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like de la LLA pre-B.

2. Material y Métodos

2.1 Población de estudio

Se recolectaron aspirados de médula ósea de pacientes pediátricos con LLA pre-B con los siguientes criterios de inclusión: muestras al diagnóstico o en recaída de pacientes entre 0-18 años de edad, atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) o el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), reclutados en el periodo comprendido de septiembre de 2015 a octubre de 2016. Para integrarse al estudio, se solicitó la aceptación de cada paciente o tutor de los participantes, mediante la firma de una carta de consentimiento/asentimiento informado.

Se excluyeron los pacientes con las fusiones génicas recurrentes, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, en las que participa el gen *KMT2A*, o con diagnóstico de LLA-T, o en los que posteriormente se confirmó un diagnóstico diferente a LLA, además de las muestras en donde no se obtuvo material para análisis.

2.2 Estrategia del estudio

Para tamizar las muestras e identificar candidatos del subgrupo Ph-like, en el Laboratorio de Genética y Cáncer del Instituto Nacional de Pediatría (INP), se aplicaron diversas metodologías basadas en la detección de algunas de las alteraciones más frecuentes en este subtipo genético. En la Figura 8 se muestran los biomarcadores y las metodologías utilizadas, y se distinguen en color azul las que se abordaron en esta tesis.

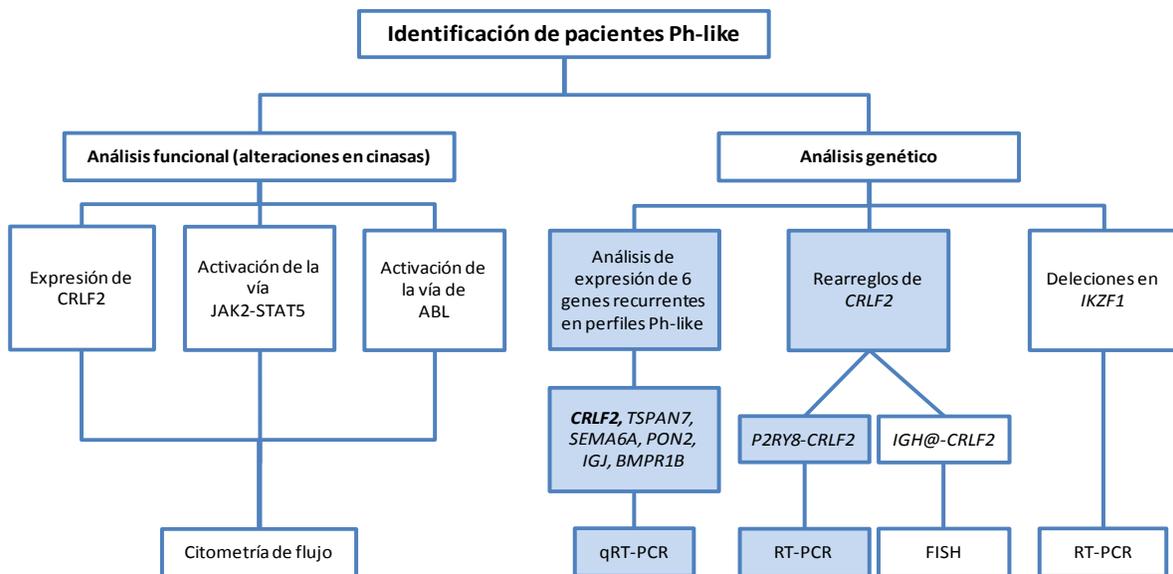


Figura 8. Biomarcadores y estrategia de análisis para identificar pacientes LLA pre-B del subtipo Ph-like. En sombreado se indican los genes y alteraciones evaluadas en este trabajo.

2.3 Aislamiento de linfoblastos

Los aspirados de médula ósea forman parte del material biológico recolectado para los estudios de diagnóstico de los pacientes; estas muestras fueron anticoaguladas en un tubo Vacutainer EDTA_K₂ (BD, Franklin Lakes NJ, USA) o heparina de sodio.

Para obtener células mononucleadas (linfoblastos), se utilizó un protocolo de separación por gradiente de densidad con Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) (ver Anexo 1).

Para cuantificar y medir la viabilidad de las células se utilizó un hemocitómetro y tinción de azul tripano (Gibco). Se separó una fracción de entre 1×10^6 y 5×10^6 células, misma que fue resuspendida en buffer de lisis RLT (QIAGEN, Hilden, Germany). Las muestras se almacenaron en crioviales y se congelaron en nitrógeno líquido hasta su procesamiento.

2.4 Extracción de RNA

Para la extracción de ácido ribonucleico (RNA) se utilizó el kit *RNeasy Mini* (QIAGEN, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante (ver Anexo 2); el material extraído se eluyó en 40 μ L de agua libre de RNasas. La concentración de RNA total se cuantificó con un espectrofotómetro Epoch (BioTek) a una absorbancia de 260 nm; la calidad del material se valoró mediante la relación de absorbancias 260/280 nm y se consideró adecuada al encontrarse en un rango entre 1.8 y 2. También se verificó la integridad del RNA extraído mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium).

2.5 Síntesis del cDNA

La síntesis del DNA complementario (cDNA) consistió en dos reacciones consecutivas. La reacción 1, de desnaturalización y alineamiento, se llevó a cabo con 1 μ g de RNA (exceptuando las muestras en que se obtuvo una cantidad menor), más 0.5 μ L de *Random Primers* 100 mM y agua libre de RNasas, para obtener un volumen final de 20 μ L. Para la reacción 2 de transcripción reversa, se agregó al tubo con el contenido de la reacción 1 previamente incubado, 1 μ L de enzima M-MLV RT (Invitrogen, Carlsbad, USA), más 6 μ L de buffer 5X (Tris-HCl 250 mM (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl₂ 15 mM), 2 μ L de ditiotreitolo DTT 0.1 M y 0.5 μ L de dinucleótidos (dNTP's) 10 mM. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler (Eppendorf Nexus Gradient) con las condiciones de reacción que se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de reacción para síntesis de cDNA

Reacción 1 Desnaturalización y alineamiento		Reacción 2 Transcripción reversa	
Temperatura	Tiempo	Temperatura	Tiempo
72 °C	3 min.	37 °C	60 min.
Pase directo a 4°C	Hasta agregar reacción 2	94 °C	6 min.

2.5.1 Verificación de síntesis del cDNA

Para verificar la síntesis del cDNA se amplificó el gen *GAPDH* mediante PCR punto final. Por cada tubo de reacción se utilizaron 0.2 µL de DNA Taq Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2.5 µL de buffer 10X (HCl Tris 200mM (pH 8.4), KCl 500mM), 1.5 µL de MgCl₂ 50mM, 0.5 µL de dNTP's, 0.5 µL de oligonucleótido para la secuencia sentido (5` - ATCCATCACCATCTTCCAG - 3`), 0.5 µL de oligonucleótido para la secuencia antisentido (5` - TGTGGTCATGAGTCCTCCA - 3`), 17.3 µL de agua grado PCR y 2 µL de cDNA para un volumen final de 25 µL. Las condiciones de reacción se muestran en el Cuadro 5. El producto de amplificación de 317 pb se confirmó con electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium).

Cuadro 5. Condiciones de reacción para amplificar *GAPDH*.

	Reacción	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Desnaturalización	94 °C	5 min.
	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
40 ciclos	Alineamiento	62 °C	30 seg.
	Extensión	72 °C	1 min.
1 ciclo	Extensión final	72 °C	5 min.

2.6 Cuantificación relativa de transcritos por PCR Tiempo Real

Para determinar el nivel de expresión de los genes *CRLF2*, *TSPAN7*, *SEMA6A*, *IGJ*, *PON2* y *BMPR1B* en cada muestra, se llevó a cabo su cuantificación relativa mediante qRT-PCR con un LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science). Para la amplificación se eligió una sonda de DNA tipo TaqMan y el juego de oligonucleótidos específicos de cada gen; estos se obtuvieron de la *Universal Probe Library System* (Roche Applied Science) al ingresar las secuencias disponibles en el Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI). De esta manera se obtuvo lo siguiente:

- **CRLF2**

Homo sapiens cytokine receptor-like factor (*CRLF2*), variante transcripcional 1, mRNA, NM_022148.2:

Sonda: #53 (no. cat. 04688503001)

Cuadro 6. Juego de oligonucleótidos para CRLF2.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	19	617 - 635	agcgactggtcagaggatga	95
Derecho	21	691 - 711	aatttgacagctttggttg	

- **TSPAN7**

Homo sapiens tetraspanin 7 (*TSPAN7*), mRNA, NM_004615.3:

Sonda: #18 (no. cat. 04686918001)

Cuadro 7. Juego de oligonucleótidos para TSPAN7.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	23	129 - 151	catctactccttctgtcttctgga	70
Derecho	21	178 - 198	agtaagttgccccagactcc	

- **SEMA6A**

Homo sapiens SEMA6A-001 sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6A, ENST00000343348.6|ENSG00000092421.12:

Sonda: #88 (no. cat. 04689135001)

Cuadro 8. Juego de oligonucleótidos para SEMA6A.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	20	1845 - 1864	tggacaccagttcctgatga	92
Derecho	23	1914 - 1936	tcattggaggttgcatactttc	

- **PON2**

Homo sapiens PON2-001 paraoxonase 2, ENST00000433091.2|ENSG00000105854.7:

Sonda: #21 (no. cat. 04686942001)

Cuadro 9. Juego de oligonucleótidos para PON2.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	20	364 - 383	tccacactgccacctgatta	73
Derecho	21	416 - 436	agccagaccattgggaagtat	

- **IGJ**

Homo sapiens immunoglobulin J polypeptide, linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides (*IGJ*), NM_144646.3:

Sonda: #6 (no. cat. 04685032001)

Cuadro 10. Juego de Oligonucleótidos para *IGJ*.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	23	306 - 328	tgtggagagaaacatccgaatta	71
Derecho	20	357 - 376	atggtgaggtgggatcagag	

- ***BMPR1B***

Homo sapiens bone morphogenetic protein receptor, type IB (*BMPR1B*), NM_001203.2:

Sonda: #21 (no. cat. 04686942001)

Cuadro 11. Juego de oligonucleótidos para *BMPR1B*.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	23	142 - 164	tttcatgccttgttgataaaggt	95
Derecho	26	211 - 236	gcttgtttaacttttgttctctc	

- ***GUS-β***

Homo sapiens glucuronidase, beta (*GUSB*), NM_000181.3:

Sonda: #57 (no. cat. 04688546001)

Cuadro 12. Juego de oligonucleótidos para *GUS-β*.

Oligonucleótidos	Longitud (nt)	Posición	Secuencia	Amplicon (nt)
Izquierdo	20	1017 - 1036	cgccctgcctatctgtattc	91
Derecho	20	1088 - 1107	tccccacaggagtgtag	

La cuantificación relativa de cada transcrito se calculó mediante el método $\Delta\Delta C_t$ (ver Anexo 3), normalizando los valores con el gen *GUS-β* como control endógeno. Para cinco de los genes se utilizó cDNA de una muestra de médula ósea normal como calibrador; debido a que el gen *BMPR1B* no se expresa en médula ósea sana el transcrito no fue detectable, se seleccionó cDNA de una muestra de LLA para la calibración de este gen. El análisis de expresión se realizó por duplicado con un control negativo de reacción y bajo las condiciones mostradas en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Condiciones de reacción para ensayo de PCR Tiempo Real.

	Reacción	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Pre calentamiento	90 °C	10 min.
	Desnaturalización	90 °C	10 seg.
45 ciclos	Alineamiento	60 °C	30 seg.
	Extensión	72 °C	5 seg.
1 ciclo	Enfriamiento	4 °C	30 seg.

Nota: Durante la fase de alineamiento de cada uno de los 45 ciclos de amplificación se tomó lectura de la fluorescencia emitida por la sonda génica.

2.7 Detección del rearreglo *P2RY8-CRLF2*

Para determinar la presencia de la deleción *P2RY8-CRLF2*, se realizó una PCR punto final que amplifica un fragmento del transcrito de este rearreglo. Por cada reacción de amplificación se utilizaron 0.1 µL de Taq platinum (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2.5 µL de buffer 10X, 0.75 µL de MgCl₂ 50mM, 0.5 µL de dNTP's 10mM, 0.5 µL de oligonucleótido Forward 10mM, 0.5 µL de oligonucleótido Reverse 10mM, 18.15 µL de agua grado PCR y 2 µL de cDNA, para obtener un volumen final de 25 µL. Los oligonucleótidos utilizados en esta reacción flanquean el punto de fusión de este rearreglo génico y fueron diseñados para el primer exón de *P2RY8* (5'-GGACAGATGGAAGG-3') y el tercer exón de *CRLF2* (5'-GTCCATTCCTGATGGAGAA-3') (Palmi *et al*, 2012). En el Cuadro 14 se muestran las condiciones de la reacción. Como control positivo se utilizó una dilución 1:10000 del producto de amplificación de una muestra positiva a dicho rearreglo (donada por el Dr. Charles Mullighan del *St. Jude Children's Research Hospital*). El amplicón de ~511 pb se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (Biotium) (Figura 9).

Cuadro 14. Condiciones de reacción para amplificar la fusión *P2RY8-CRLF2*.

	Reacción	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	Pre calentamiento	94 °C	2 min.
	Desnaturalización	94 °C	30 seg.
40 ciclos	Alineamiento	63 °C	30 seg.
	Extensión	72 °C	1 min.
1 ciclo	Extensión final	72 °C	10 min.

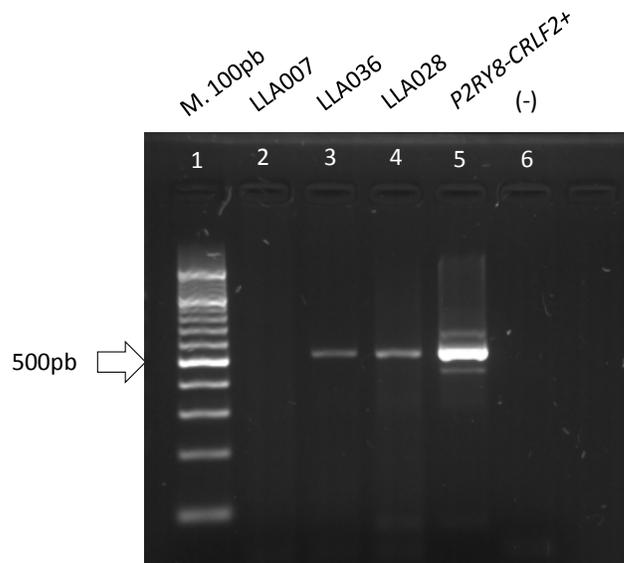


Figura 9. Rearreglo *P2RY8-CRLF2*. En el carril 1 del gel de electroforesis se muestra el marcador de peso molecular de 100 pb; la muestra del carril 2 es negativa; en el carril 3 y 4 se presentan muestras de 2 pacientes positivos al rearreglo *P2RY8-CRLF2*. En los carriles 5 y 6 se muestran los controles positivo y negativo respectivamente. El tamaño del producto esperado \approx 511 pb. Las condiciones de corrida: Voltaje = 80 V, Tiempo = 40 min.

2.8 Análisis de resultados

Los valores de corte para establecer la sobre-expresión de cada gen se obtuvieron a partir de la mediana. Para fines comparativos se obtuvieron los niveles de expresión de cada gen del perfil en pacientes positivos a la fusión *BCR-ABL1*.

Para seleccionar candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like se estableció que debían cumplir con al menos uno de los siguientes criterios referidos en la literatura:

- 1) Sobre-expresar entre 5-6 genes (80-100%) del perfil de expresión génico (Roberts *et al.*, 2017).
- 2) Presentar sobre-expresión de *CRLF2* (se-*CRLF2*) (Harvey *et al.*, 2010a; Roberts *et al.* 2014).
- 3) Presentar el rearreglo *P2RY8-CRLF2* (Harvey *et al.*, 2010b).

2.9 Características clínicas y de laboratorio

A partir de una base de datos construida con la información clínica y paraclínica de los expedientes de los pacientes, se obtuvieron las siguientes características: edad, género, fecha de diagnóstico, cuenta de leucocitos al momento del diagnóstico, inmunofenotipo, y resultado del estudio de las translocaciones cromosómicas recurrentes. Se obtuvieron las frecuencias para cada característica.

3. Resultados

3.1 Pacientes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like por su perfil de expresión

En este trabajo se obtuvo el perfil de expresión génica de 50 pacientes pediátricos con LLA pre-B sin las alteraciones genéticas más frecuentes (otros B); los valores de expresión $2^{-\Delta\Delta CT}$ se muestran en el Anexo 4a. Para buscar candidatos Ph-like con un perfil de expresión similar al de los casos *BCR-ABL1* positivos, se utilizaron como referencia los niveles de expresión de un grupo de cinco pacientes con esta translocación (Figura 10, Anexo 4b). Para definir el estado de sobre-expresión de los seis genes evaluados se utilizó a la mediana como valor de corte y el cual también fue aplicado al grupo de pacientes Ph+, los cuales mostraron niveles de expresión que se agruparon de forma cercana a la mediana o por encima de ésta. En este estudio se consideraron como candidatos Ph-like a los pacientes que sobre-expresaron 5-6 genes de la firma propuesta (PEG+). Con base en esto, nueve de 50 pacientes (18%) son candidatos Ph-like, tres de ellos por sobre-expresar todos los genes del perfil y seis casos por sobre-expresar 5 genes (cuadro 15). Los nueve pacientes mostraron se-*CRLF2*, y tres de ellos presentaron el rearrreglo *P2RY8-CRLF2* (Cuadro 16; Anexo 5), uno de los cuales se diagnosticó con síndrome de Down (paciente LLA046; Anexo 5).

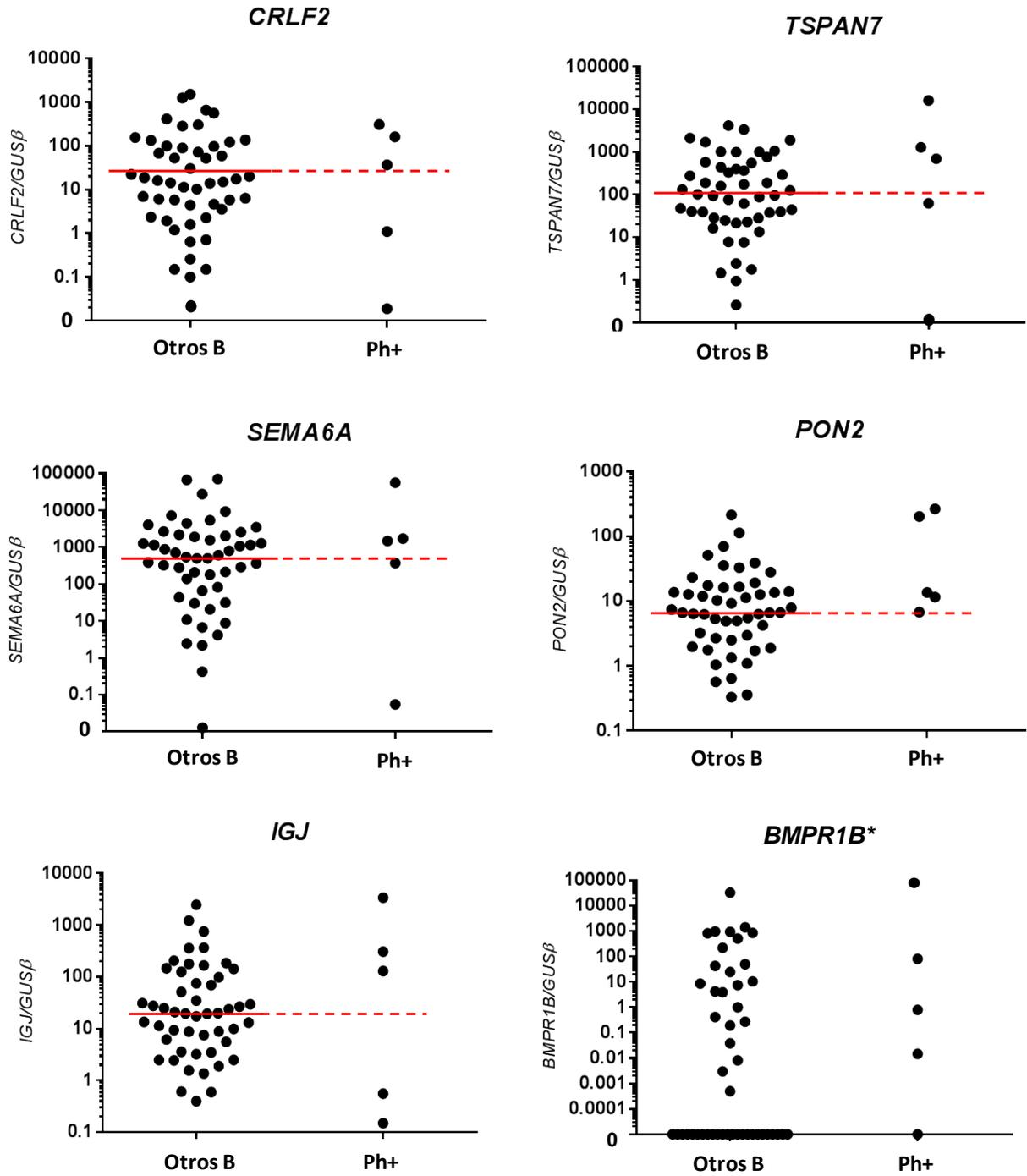


Figura 10. Niveles de expresión relativa. Se muestran los niveles de expresión normalizados de los genes del perfil Ph-like evaluado para 50 pacientes “otros-B” y 5 pacientes *BCR-ABL1* positivos. Con una línea roja se indica el valor de la mediana. * Indica mediana = 0

Cuadro 15. Niveles de expresión normalizados de los 50 pacientes LLA pre-B analizados. Nueve pacientes son positivos al perfil evaluado (PEG+), 41 son negativos (PEG-). En rojo se indican los niveles de expresión con valor mayor o igual a la mediana; en verde los niveles menores a la mediana.

PACIENTE	NIVEL DE EXPRESIÓN					
	<i>CRLF2</i>	<i>TSPAN7</i>	<i>SEMA6A</i>	<i>PON2</i>	<i>IGJ</i>	<i>BMPR1B</i>
LLA113	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA058	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA062	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA005	Red	Green	Red	Red	Red	Red
LLA046	Red	Green	Red	Red	Red	Red
LLA034	Red	Red	Red	Red	Green	Red
LLA039	Red	Red	Red	Red	Red	Green
LLA051	Red	Red	Red	Red	Red	Green
LLA068	Red	Red	Red	Red	Red	Green
LLA106	Red	Red	Red	Red	Green	Green
LLA054	Red	Green	Red	Red	Green	Red
LLA092	Red	Green	Red	Red	Green	Red
LLA040	Green	Red	Red	Green	Green	Red
LLA033	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA090	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA105	Green	Red	Green	Red	Red	Red
LLA010	Red	Green	Green	Red	Red	Red
LLA031	Green	Green	Red	Red	Red	Red
LLA003	Green	Green	Red	Red	Red	Red
LLA006	Green	Green	Red	Red	Red	Red
LLA117	Green	Green	Green	Red	Red	Red
LLA036	Red	Red	Red	Green	Green	Green
LLA114	Red	Red	Red	Green	Green	Green
LLA072	Red	Red	Green	Red	Green	Green
LLA064	Red	Red	Green	Red	Green	Green
LLA057	Red	Red	Green	Green	Red	Green
LLA002	Red	Green	Green	Green	Red	Red
LLA020	Green	Green	Green	Green	Red	Red
LLA017	Green	Red	Green	Red	Red	Green
LLA001	Green	Red	Red	Red	Green	Green
LLA053	Green	Red	Red	Green	Red	Green
LLA066	Green	Red	Red	Green	Green	Red
LLA028	Green	Red	Red	Green	Green	Red
LLA035	Red	Red	Green	Green	Green	Green
LLA069	Red	Red	Green	Green	Green	Green
LLA073	Red	Red	Green	Green	Green	Green
LLA013	Red	Green	Red	Green	Green	Green
LLA079	Red	Green	Green	Red	Green	Green
LLA044	Red	Green	Green	Red	Green	Green
LLA027	Green	Red	Green	Green	Green	Red
LLA047	Green	Green	Red	Green	Red	Green
LLA030	Green	Green	Red	Green	Red	Red
LLA049	Green	Green	Red	Green	Green	Green
LLA007	Green	Green	Green	Red	Red	Green
LLA055	Green	Green	Green	Red	Green	Green
LLA018	Green	Green	Green	Green	Green	Red
LLA089	Green	Green	Green	Green	Green	Green
LLA009	Green	Green	Green	Green	Green	Green
LLA012	Green	Green	Green	Green	Green	Green
LLA118	Green	Green	Green	Green	Green	Green

3.2 Frecuencia de las alteraciones de *CRLF2*

En este estudio 25 (50%) de los 50 pacientes analizados presentaron *se-CRLF2*, y 17 (35%) de 48 pacientes con material disponible fueron positivos al rearrreglo *P2RY8-CRLF2* (Figura 11). En 10 de los 25 casos con *se-CRLF2* (40%) se encontró el rearrreglo.

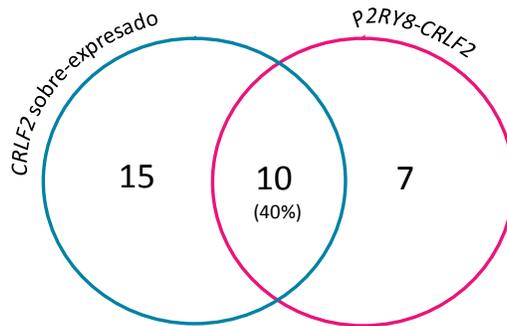


Figura 11. Alteraciones de *CRLF2* en la cohorte “Otros- B” estudiada. La *se-CRLF2* afecta a la mitad de los pacientes evaluados mientras que el rearrreglo *P2RY8-CRLF2* se detecto en siete casos sin *se-CRLF2*.

3.3 Pacientes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like por la sobre-expresión de *CRLF2* y el rearrreglo *P2RY8-CRLF2*

La *se-CRLF2* es la alteración más frecuente del subgrupo Ph-like, por ello los pacientes que muestran únicamente esta característica se consideran candidatos a pertenecer al subgrupo. Debido a que el rearrreglo *P2RY8-CRLF2* es una de las principales causas de la *se-CRLF2*, los pacientes positivos a esta alteración también se consideran parte del subgrupo en estudio. De acuerdo con esto se seleccionaron 23 candidatos que sin cumplir con el perfil de expresión (PEG-) muestran las siguientes características: siete casos presentan *se-CRLF2* y tienen la delección *P2RY8-CRLF2*; nueve casos con *se-CRLF2* pero sin el rearrreglo *P2RY8-CRLF2* y siete casos con la delección *P2RY8-CRLF2* sin *se-CRLF2* (Cuadro 16; Anexo 5).

Con base en los tres criterios de selección se identificaron 32 candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like, lo que representa el 64% de la población estudiada (Cuadro 16). Entre estos, nueve pacientes (28%) fueron identificados por perfil de expresión, mientras que 23 (72%) fueron detectados por alteraciones en *CRLF2*.

Cuadro 16. Características de los 32 pacientes LLA pre-B candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like.

Perfil de expresión	Alteraciones en cinasas		No. de candidatos (32/50)
	<i>CRLF2</i> sobre-expresado	<i>P2RY8-CRLF2</i>	
+	+	+	3
+	+	-	6
-	+	+	7
-	+	-	9
-	-	+	7

Simbología: + = positivo; - = negativo

3.4 Características clínicas y de laboratorio de los candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like

Las características clínicas de los pacientes en el momento del diagnóstico, permiten que sean clasificados con riesgo estándar o alto riesgo a recaer. Con base en la información clínica y paraclínica comúnmente utilizada para llevar a cabo la estratificación de estos pacientes, se obtuvo lo siguiente: De los 32 candidatos Ph-like, 17 casos estuvieron en un rango de edad de 1 a <10 años, mientras que los otros 15 fueron diagnosticados entre 10-18 años de edad. Ningún caso fue menor a 1 año. En cuanto a la cuenta de leucocitos, 10 candidatos tuvieron una cuenta ≥ 50000 cel./ μL y en los 22 pacientes restantes fue < 50000 cel./ μL . Dieciocho pacientes fueron del género femenino y 14 del masculino (Figura 11). Finalmente entre los 17 casos que presentan el rearrreglo *P2RY8-CRLF2*, 12 (70%) fueron menores a 10 años de edad. Los resultados y características clínicas correspondientes a toda la cohorte (53 pacientes) se muestran en el anexo 4.

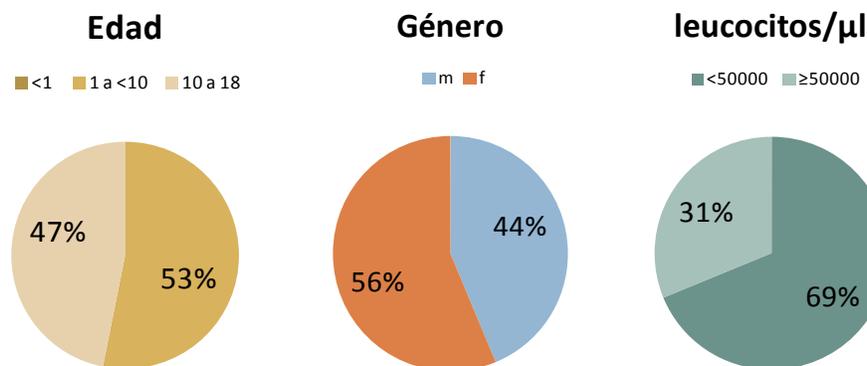


Figura 11. Características clínicas de los 32 pacientes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like. f = femenino; m = masculino.

4. Discusión

El 70% de los pacientes con LLA pre-B pertenecen a algún subtipo molecular definido por una alteración genética característica, lo que permite el empleo de metodologías simplificadas para su detección en el momento del diagnóstico (Ghazavi *et al.*, 2015). En contraste, la heterogeneidad genética del subtipo Ph-like dificulta la identificación de estos pacientes. En algunos centros de salud de Norteamérica y Europa que atienden niños con cáncer, se han incorporado metodologías genómicas (ej. secuenciación de exoma, microarreglos) como parte de los análisis clínicos de rutina para el diagnóstico de los casos Ph-like (Tran *et al.*, 2016), sin embargo, su aplicación representa un gasto alto. Particularmente en México, aunque el cáncer es la segunda causa de mortalidad de niños y adolescentes, ninguna entidad de servicios de salud ha desarrollado o implementado métodos de diagnóstico para el subgrupo de alto riesgo Ph-like, aun cuando las más recientes referencias señalan una creciente incidencia de leucemia en edad pediátrica en nuestro país (Rivera-Luna *et al.*, 2014) y con la sospecha de que en población latina este subtipo puede ser frecuente (Harvey *et al.* 2010).

Diversos grupos de investigación ya están abordando alternativas metodológicas para la detección de los casos Ph-like (Tran *et al.*, 2016; Herold y Gökbuget., 2017). En esta investigación se evaluó una selección de biomarcadores que pueden conformar herramientas sólidas y simplificadas para identificar candidatos a pertenecer a este subgrupo.

4.1 Candidatos Ph-like por su perfil de expresión

Al analizar las muestras de 50 pacientes con LLA pre-B sin las alteraciones genéticas más frecuentes se encontró que nueve de ellos cumplen con más del 80% del perfil evaluado, es decir, sobre-expresaron entre cinco y seis de los genes propuestos para identificar al subtipo Ph-like. Estos casos (PEG+) son candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like ya que el perfil de expresión se construyó con genes que han permitido identificar a este subgrupo en otras poblaciones (Den Boer *et al.*, 2009; Harvey *et al.*, 2010 y 2013). Se ha demostrado que con el perfil de la población de Norteamérica no es posible detectar a todos los casos Europeos y viceversa, por lo que no existe un perfil de expresión universal que permita identificar a la totalidad de casos afectados (Boer *et al.*, 2015). Sin embargo, los genes compartidos entre los distintos perfiles podrían representar aquellas lesiones que forman el común denominador del subtipo Ph-like entre diferentes cohortes de pacientes. Debido a que el perfil propuesto se fundamenta en esta premisa, puede establecerse que los pacientes detectados son fuertes candidatos a pertenecer al subgrupo. Cabe señalar que aunque es la sobre-expresión lo que distingue a los genes que fueron evaluados, son diversos los criterios que se han empleado para establecer valores de corte que definan

este estado (Den Boer *et al.*, 2009; Harvey *et al.*, 2010; Palmi *et al.*, 2012); el valor de la mediana elegido en este trabajo concuerda con el utilizado por Harvey *et al.* (2010) para la caracterización del subtipo. Adicionalmente, Ross y colaboradores (2003) reportaron que los genes *PON2*, *SEMA6A*, *IGJ* y *BMPR1B* presentan incremento de transcritos en los casos Ph+. El hecho de que la mayoría de los pacientes Ph+ evaluados hayan mostrado niveles de expresión de estos genes cercanos o por encima de la mediana, permite dar soporte a este valor como punto de corte.

Es importante mencionar que los clasificadores génicos que se han desarrollado para la detección del subtipo Ph-like están conformados de un mínimo de 15 genes (Harvey *et al.*, 2013), lo que da como resultado que su sensibilidad para detectar a los casos afectados se incrementa, ya que permite que se presenten hasta siete genes sin sobre-expresión (Jain *et al.*, 2017) para diferenciar a los casos del subtipo de estudio. En esta investigación fueron seis los genes evaluados, lo cual se considera una limitante, ya que podría haber pacientes que no se detecten con este perfil.

Los perfiles de expresión Ph+ están altamente asociados a la activación de tirosina-cinasas ya que identifican pacientes con el rearrreglo *BCR-ABL1*; sin embargo, en el caso de los perfiles Ph-like únicamente se infiere la hiper-activación de cinasas o sus receptores, pues éste generalmente no da información directa sobre las enzimas o moléculas implicadas en las vías de señalización. Hasta el momento se conoce que existe una excepción, que es el gen *CRLF2*. Este gen, que muestra algún tipo de alteración en la mayor proporción de los pacientes caracterizados genómicamente, es el único receptor acoplado a una cinasa que ha sido reportado dentro del grupo de genes que distinguen a los perfiles Ph-like, particularmente en los clasificadores desarrollados por Harvey *et al.* (2010; 2013). Con base en esto, los candidatos seleccionados con el perfil propuesto están sujetos a uno de los dos escenarios siguientes: a) cuando sobre-expresen a *CRLF2* como parte de los cinco o seis genes del perfil, y b) cuando en los candidatos *CRLF2* no esté sobre-expresado, pero sí los cinco genes restantes. Para los pacientes en el primer escenario, que es el caso de los nueve pacientes detectados en el grupo de estudio, se conoce que la lesión en cinasas que presentan es la del co-receptor *CRLF2* que activa cinasas de la familia JAK. Por otro lado, para los candidatos que se apeguen al segundo escenario son desconocidas las cinasas desreguladas, por lo que tendrían que ser sometidos a estudios que permitan identificar sus alteraciones, por ejemplo en las vías de ABL o Ras (Roberts *et al.*, 2014). Se ha observado hasta el momento que las alteraciones en cinasas o receptores de citocinas que pueden presentarse en el subtipo Ph-like parecen ser excluyentes entre sí, lo que ha permitido definir subgrupos dentro del propio subtipo (Roberts *et al.*, 2014) (figura 5). Hay que destacar que a pesar de su alta relevancia, la mayor parte de los genes de cinasas que están alterados no han sido integrados como parte del perfil de expresión Ph-like, porque las

lesiones que presentan no llevan a su sobre-expresión, más bien conllevan a que la actividad enzimática no pueda ser regulada.

4.2 Candidatos Ph-like por alteraciones que afectan la vía JAK-STAT

Se refiere que parte importante de la estrategia a seguir para la detección de pacientes del subtipo Ph-like ha consistido en encontrar su perfil de expresión característico. La etapa posterior en la que se indaga cuáles son las cinasas alteradas, se realiza con el objetivo de poder utilizarlas como blancos terapéuticos y no necesariamente para el diagnóstico (Tran *et al.*, 2016). Roberts *et al.* (2014) encontraron que las lesiones en genes de las cinasas más frecuentes del subtipo engloban a más del 60% de los casos y se dan específicamente en *CRLF2*, *JAK2*, *ABL1* y *ABL2* (Figura 5). Por tanto, una nueva alternativa para identificar directamente a estos pacientes puede ser mediante la detección de estas alteraciones que afectan la vía JAK-STAT o de ABL. Con base en esto, se determinó que los nueve casos que muestran *se-CRLF2* y los 14 con la delección *P2RY8-CRLF2* (con o sin *se-CRLF2*) son candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like, ya que aunque no cumplen con el perfil de expresión (PEG-), presentan estas lesiones que son características del subtipo en estudio.

En particular, el 40% de los casos con *se-CRLF2* tiene el rearrreglo *P2RY8-CRLF2*, lo que significa que en el 60% restante el incremento de transcritos se explicaría a través de otras alteraciones, como la translocación *IGH@-CRLF2* o mutaciones en *CRLF2*. Recientemente Schmäh *et al.* (2017) también observaron alta expresión de este co-receptor en pacientes LLA pre-B hiperdiploides, es decir, con ganancia de los cromosomas X/Y.

Por otro lado, aunque la presencia de la delección *P2RY8-CRLF2* da como resultado la sobre-expresión de *CRLF2*, existen casos en los que este incremento no es detectable, tal como sucedió en siete de los candidatos Ph-like (Cuadro 16). Esto puede atribuirse a que la delección está presente en una subclona minoritaria y no en toda la población de blastos leucémicos (Palmi *et al.*, 2012).

El perfil de expresión y las lesiones en *CRLF2* analizadas se detectaron en el único paciente con síndrome de Down que fue evaluado, lo que sugiere la posibilidad de que los casos con trisomía 21 puedan desarrollar el genotipo Ph-like. En particular, aunque no hay consenso sobre el valor pronóstico que tiene *CRLF2* desregulado en los pacientes LLA pre-B, resulta atractivo como una alternativa terapéutica para los casos con trisomía 21, pues se ha observado que son más propensos a los efectos adversos generados por la quimioterapia convencional (Moorman, 2016). Por tanto, este grupo de pacientes

4.3 Frecuencia de los candidatos Ph-like y sus alteraciones en población LLA pre-B mexicana

Es relevante mencionar que en el grupo de pacientes evaluado, la delección *P2RY8-CRLF2* tuvo una frecuencia (35%) que es mayor a lo previamente referido para el grupo que incluye a todos los rearrreglos y mutaciones de *CRLF2*, es decir, 30% del subgrupo de los “otros B” (Moorman, 2016). Si los pacientes con sobre-expresión de *CRLF2* que no tienen esta delección (60%) presentan el rearrreglo *IGH@-CRLF2* o la mutación p.Phe232Cys, las alteraciones en dicho gen podrían ser mucho más frecuentes de lo que se ha visto en otros estudios. Adicionalmente, se observó que la delección *P2RY8-CRLF2* fue mucho más frecuente en los pacientes menores de 10 años de edad, lo que concuerda con la relación edad-dependiente que se ha referido, en donde el rearrreglo *P2RY8-CRLF2* se asocia a una menor edad, mientras que *IGH@-CRLF2* es más común en adolescentes y adultos jóvenes (Hunger *et al.*, 2015b; Schmäh *et al.*, 2017).

Al considerar que los candidatos representan el 64% del grupo de los “otros B” evaluado y que además todos muestran alteraciones en *CRLF2*, entonces el subtipo Ph-like podría tener una muy alta frecuencia en los pacientes pediátricos con LLA pre-B mexicanos, esto con base en lo siguiente: 1) Además de las alteraciones que convergen en la vía JAK-STAT, existen anormalidades en las vías de ABL y Ras (Roberts *et al.*, 2014); 2) Al evaluar cohortes parcialmente compuestas de población hispana y/o latina, la mayor proporción de casos Ph-like se ha reportado en pacientes con esta ancestría (Harvey *et al.*, 2010a); 3) La frecuencia de los casos Ph-like potenciales, obtenidos en esta cohorte rebasa el 50% referido por diferentes estudios para el grupo de los “otros B” (Moorman, 2016).

4.4 El perfil de expresión génica y las alteraciones en *CRLF2* como alternativas para el diagnóstico de pacientes Ph-like

El perfil de expresión Ph-like se convierte en una herramienta robusta para el diagnóstico cuando permite detectar el mayor número de casos “otros-B” con alteraciones en cinasas. Si bien en esta investigación se abordaron solo lesiones de *CRLF2*, mediante el perfil propuesto se detectaría sólo una fracción de los pacientes con alteraciones en este gen (28%). Por tanto, el perfil requiere mayor sensibilidad para identificar a todos los casos. Sin embargo, esto no significa que los nueve pacientes PEG+ dejen de ser fuertes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like, ya que sí sobre-expresan los genes que distinguen al subtipo. Una alternativa para robustecer este perfil génico puede ser evaluando la adición de otros genes característicos del subtipo, como *GPR110* y *MUC4* (Harvey *et al.*, 2010 y 2013).

Cabe señalar que en los casos que no cumplen con el perfil (PEG-) pero que si muestran sobre-expresión en algunos de los genes evaluados, podrían buscarse otras alteraciones características del subtipo (ej. hiper-actividad de la vía ABL) a fin de determinar si pueden clasificarse como candidatos Ph-like. Adicionalmente, en estos casos también puede existir hiperactivación de la vía JAK-STAT sin que *CRLF2* esté implicado y por lesiones que afecten genes como *EPOR*, *IL2RB* o *SH2B3*; una alternativa para la evaluación de estas vías afectadas es a través de ensayos de fosforilación *in vitro* (Roberts *et al.*, 2014).

Hay que destacar la factibilidad de que el perfil de expresión Ph-like de la población mexicana afectada sea sustancialmente distinto a las firmas descritas (Boer *et al.*, 2015), de tal manera que para determinar con exactitud cuáles son los genes que distinguen al subgrupo tendrían que caracterizarse genómicamente casos Ph-like potenciales, como los que se detectaron en este trabajo. Sin embargo, debe considerarse que los perfiles de expresión pueden variar, como se observó en las muestras Ph+ evaluadas (Anexo 4). Por tanto los casos PEG- que sí presentan alguna de las alteraciones en *CRLF2* buscadas no pueden descartarse como candidatos. Además, el hecho de que puedan existir pacientes con lesiones en cinasas que no se apeguen al perfil, fortalece la hipótesis de abordar el diagnóstico de los casos Ph-like a través de las lesiones en cinasas que caracterizan al subtipo. Al respecto, los pacientes con *CRLF2* alterado, pero sin el perfil Ph-like se refieren como muy poco frecuentes (Jain *et al.*, 2017), aunque existen; para apoyar que son parte del grupo se sugiere buscar un biomarcador adicional y de alta frecuencia en el subtipo, como son las deleciones en *IKZF1* (Den Boer *et al.*, 2009).

La heterogeneidad de lesiones que muestra el subtipo Ph-like es una llamada de atención para abordar el diagnóstico de estos casos a través de varias estrategias. A partir de los resultados obtenidos puede establecerse que los dos instrumentos de detección analizados se complementan, pues cada uno puede detectar diferentes candidatos Ph-like que cumplen con características que definen a este subtipo. Además, por la dificultad que podría representar encontrar un perfil de expresión más robusto, mediante la aplicación de ambas herramientas se reduciría el número de casos no clasificados en este subgrupo y que si tienen el genotipo Ph-like. Asimismo, el diagnóstico de los candidatos seleccionados deberá confirmarse con un clasificador génico validado (como el de Harvey *et al.*, 2010a; 2013) a fin de dar soporte al modelo planteado. En la Figura 12 se muestra una estrategia de identificación conformada por las pruebas evaluadas. Si al incrementar la sensibilidad del perfil de expresión propuesto se identifican los mismos casos detectados a través de las alteraciones en *CRLF2*, podría elegirse una de las dos herramientas para obtener candidatos Ph-like con las alteraciones en este gen. Cabe señalar que la ventaja del perfil génico sería la posibilidad de detectar casos con otro tipo de alteraciones en cinasas.

Alternativamente el estatus de los candidatos podría reforzarse mediante la determinación de alteraciones en *IKZF1*.

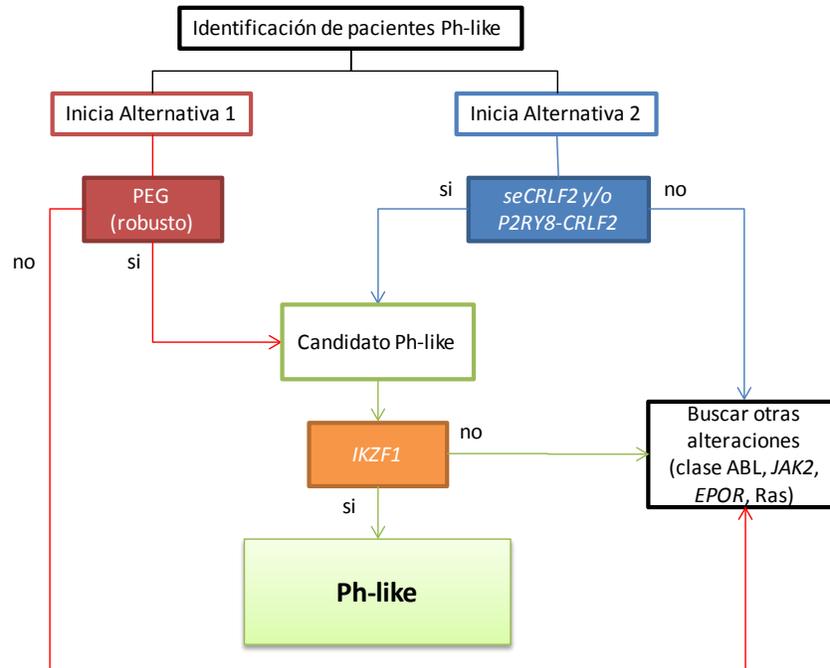


Figura 12. Se muestra propuesta para detección de casos Ph-like. Con la alternativa A se identificarían candidatos a través del perfil de expresión génica. Con la alternativa B se obtienen candidatos mediante las alteraciones en *CRLF2*.

4.5 Características clínicas de los pacientes candidatos Ph-like

Los pacientes que desarrollan una LLA pre-B con genotipo Ph-like tienen un pronóstico adverso (Ghazavi *et al.*, 2015). Sin embargo, de acuerdo a sus características clínicas más de la mitad de los candidatos habrían sido estratificados como pacientes de buen pronóstico, de forma que al menos 53% de los casos se estratificarían así por su edad (1 a ≤ 10 años) y hasta un 69% por su cuenta leucocitaria (< 50000 cel./ μ L); esto implica la asignación de una terapia de quimioterapia menos agresiva para ellos, hecho que incrementa el riesgo de mostrar una mala respuesta a ésta. Por otro lado, el hallazgo de un amplio porcentaje de pacientes entre 10 y 18 años concuerda con la elevada frecuencia de casos afectados en este rango de edad (Roberts *et al.*, 2014). De esta manera se enfatiza la importancia de utilizar la clasificación genética para esclarecer de forma más precisa el pronóstico de los pacientes.

4.6 Participación de las alteraciones del subtipo Ph-like en el proceso de leucemogénesis

En el proceso de leucemogénesis no se conoce el papel de gran parte de los genes con sobre-expresión. Sin embargo se ha observado que la naturaleza y frecuencia de las alteraciones es subtipo-dependiente (Mullighan, 2012) y cooperan de forma aditiva para el establecimiento de la población de blastos leucémicos en la médula ósea (Inaba *et al.*, 2013). De esta forma, las lesiones genéticas que despliegan los pacientes Ph-like pueden explicar las ventajas que adquieren las células leucémicas para su desarrollo y supervivencia. De esta forma, los genes que se ven sobre-expresados en el subtipo cobran importancia más allá de su uso para el diagnóstico, al participar en el progreso de la enfermedad. En particular la activación constitutiva del factor de transcripción STAT5 que se adquiere por la sobre-expresión de *CRLF2* promovería una síntesis continua del factor inhibidor de la apoptosis Bcl-xL (Thomas *et al.*, 2015), y de otras proteínas como Pim-1 y la Ciclina D1 cuya actividad promueve la proliferación celular (Domanska *et al.*, 2012). La sobre-expresión de *PON2* también estaría favoreciendo la supervivencia celular mediante la inactivación de la vía intrínseca de apoptosis al prevenir la acumulación de superóxido, evento que inicia la señalización para la liberación del citocromo C mitocondrial. Se ha reportado que los altos niveles de *PON2* se correlacionan con la resistencia a muerte de células K562 de leucemia mieloide tratadas con un inhibidor de ABL1 (Imatinib) (Witte *et al.*, 2011). Alternativamente la actividad de *BMPR1B* también podría inducir la expansión de linfoblastos tal como se ha descrito en condrocitos (Lin *et al.*, 2016). Por otro lado el incremento de *TSPAN7* y *SEMA6A* puede favorecer la adherencia de células leucémicas al estroma de la médula ósea, por su capacidad de regular procesos de organización de la membrana celular (Prislei *et al.*, 2008) y del citoesqueleto (Cheong *et al.*, 2015). Se ha sugerido que el evento de recaída puede originarse a partir de células leucémicas latentes que sobreviven a la quimioterapia, por su adherencia a células del estroma de médula ósea (Schwartzman *et al.*, 2017). De esta manera, es importante profundizar en el estudio de estos genes, ya que eventualmente podrían convertirse en blancos terapéuticos para el tratamiento de los casos afectados. Finalmente, si se valida que los pacientes candidatos pertenecen al subtipo Ph-like, las metodologías que fueron evaluadas podrían integrarse dentro de los protocolos de diagnóstico para la detección de este genotipo de alto riesgo, en tanto que su empleo permitiría contemplar la posibilidad de aplicar terapia específica con ITC como parte de los esquemas de tratamiento que se utilizan en las instituciones de salud de nuestro país.

5. Perspectivas

Los pacientes que son positivos a todas las alteraciones estudiadas (tres casos) son fuertes candidatos a pertenecer al subgrupo Ph-like, sin embargo su diagnóstico, así como el de todos los candidatos detectados deberá ser verificado a través de una herramienta que haya sido validada en estudios previos, por ejemplo con el perfil de 15 genes de Harvey y cols. (2013).

En paralelo, entre los candidatos que muestran *se-CRLF2* pero que no presentan la delección *P2RY8-CRLF2* (15 candidatos) se buscaría la causa que lleva al incremento de transcritos de *CRLF2*, por lo cual podría buscarse el rearrreglo *IGH@-CRLF2* mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Esto permitirá caracterizar las lesiones genéticas que presentan estos pacientes, de tal forma que puedan utilizarse posteriormente en la evaluación de blancos terapéuticos. Cabe señalar que esta determinación debería realizarse aún cuando los estudios que ayuden a confirmar la clasificación genética de estos pacientes, establezcan que no forman parte del subgrupo Ph-like, por el propio significado biológico que tiene *CRLF2* sobre-expresado.

En los candidatos sin *se-CRLF2*, pero con la delección *P2RY8-CRLF2*, la sospecha de la existencia de subclonas con este rearrreglo podría buscarse a través de FISH.

Finalmente podría incrementarse la sensibilidad del perfil de expresión al evaluar otro grupo de genes que distinguen al subtipo Ph-like, con la expectativa de poder detectar con esta herramienta a los 23 pacientes que tienen alguna alteración en *CRLF2* y que no cumplieron con el perfil propuesto en este trabajo.

6. Conclusiones

- 1) El perfil de expresión propuesto permite detectar candidatos del subgrupo Ph-like.
- 2) Las alteraciones en *CRLF2* se perfilan como las lesiones genéticas de mayor frecuencia en los casos LLA pre-B de la población mexicana estudiada.
- 3) El subgrupo Ph-like podría convertirse en el subtipo de alto riesgo de mayor frecuencia en nuestra población.
- 4) Las metodologías utilizadas se complementan en la detección de candidatos Ph-like.

7. Literatura Citada

- Abelló, D., Sancho, E., Camps, J., & Joven, J. (2014). Exploring the role of paraoxonases in the pathogenesis of coronary artery disease: a systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(11), 20997–21010.
- Altenhöfer, S., Witte, I., Teiber, J. F., Wilgenbus, P., Pautz, A., Li, H., Daiber, A., Witan, H., Clement, A., Förstermann, U., & Horke, S. (2010). One enzyme, two functions: PON2 prevents mitochondrial superoxide formation and apoptosis independent from its lactonase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *285*(32), 24398–24403.
- Boer, J. M., Marchante, J. R. M., Evans, W. E., Horstmann, M. A., Escherich, G., Pieters, R., & Den Boer, M. L. (2015). BCR-ABL1-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. *Haematologica*, *100*(9), e354-357.
- Campana, D., & Behm, F. G. (2000). Immunophenotyping of leukemia. *Journal of Immunological Methods*, *243*(1–2), 59–75.
- Cario, G., Zimmermann, M., Romey, R., Gesk, S., Vater, I., Harbott, J., Schrauder, A., Moericke, A., Izraeli, S., Akasaka, T., Dyer, M. J. S., Siebert, R., Schrappe, M., & Stanulla, M. (2010). Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood*, *115*(26), 5393–5397.
- Chen, I.-M., Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Gastier-Foster, J., Wharton, W., Kang, H., Borowitz, M. J., Camitta, B. M., Carroll, A. J., Devidas, M., Pullen, D. J., Payne-Turner, D., Tasian, S. K., Reshmi, S., Cottrell, C. E., Reaman, G. H., Bowman, W. P., Carroll, W. L., Loh, M. L., Winick, N. J., Hunger, S. P., & Willman, C. L. (2012). Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK, and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*, *119*(15), 3512–3522.
- Cheong, C. M., Chow, A. W. S., Fitter, S., Hewett, D. R., Martin, S. K., Williams, S. A., Bik To, L., Zannettino, A. C. W., & Vandyke, K. (2015). Tetraspanin 7 (TSPAN7) expression is upregulated in multiple myeloma patients and inhibits myeloma tumour development in vivo. *Experimental Cell Research*, *332*(1), 24–38.
- Chistiakov, D. A., Melnichenko, A. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2017). Paraoxonase and atherosclerosis-related cardiovascular diseases. *Biochimie*, *132*, 19–27.
- Den Boer, M. L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R. X., Cheok, M. H., Buijs-Gladdines, J. G. C. A. M., Peters, S. T. C. J. M., Van Zutven, L. J. C. M., Beverloo, H. B., Van der Spek, P. J., Escherich, G., Horstmann, M. A., Janka-Schaub, G. E., Kamps, W. A., Evans, W. E., & Pieters, R. (2009). A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet. Oncology*, *10*(2), 125–134.

- Dhanabal, M., Wu, F., Alvarez, E., McQueeney, K. D., Jeffers, M., MacDougall, J., Boldog, F. L., Hackett, C., Shenoy, S., Khramtsov, N., Weiner, J., Lichenstein, H. S., & LaRochelle, W. J. (2005). Recombinant semaphorin 6A-1 ectodomain inhibits in vivo growth factor and tumor cell line-induced angiogenesis. *Cancer Biology & Therapy*, 4(6), 659–668.
- Dyer, M. J. S., Akasaka, T., Capasso, M., Dusanj, P., Lee, Y. F., Karran, E. L., Nagel, I., Vater, I., Cario, G., & Siebert, R. (2010). Immunoglobulin heavy chain locus chromosomal translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: rare clinical curios or potent genetic drivers? *Blood*, 115(8), 1490–1499.
- GeneCards Human Gene Database. *JCHAIN* Gene. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=JCHAIN>. Consultado <25/02/16>
- GeneCards Human Gene Database. *PON2* gene. Disponible en: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PON2>. Consultado <04/03/16>
- Ghazavi, F., Lammens, T., Van Roy, N., Poppe, B., Speleman, F., Benoit, Y., Van Vlierberghe, P., & De Moerloose, B. (2015). Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Experimental Hematology*, 43(8), 640–653.
- Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Chen, I.-M., Wharton, W., Mikhail, F. M., Carroll, A. J., Kang, H., Liu, W., Dobbin, K. K., Smith, M. A., Carroll, W. L., Devidas, M., Bowman, W. P., Camitta, B. M., Reaman, G. H., Hunger, S. P., Downing, J. R., & Willman, C. L. (2010b). Rearrangement of *CRLF2* is associated with mutation of *JAK* kinases, alteration of *IKZF1*, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 115(26), 5312–5321. (b)
- Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Wang, X., Dobbin, K. K., Davidson, G. S., Bedrick, E. J., Chen, I. M., Atlas, S. R., Kang, H., Ar, K., Wilson, C. S., Wharton, W., Murphy, M., Devidas, M., Carroll, A. J., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Downing, J. R., Relling, M., Yang, J., Bhojwani, D., Carroll, W. L., Camitta, B., Reaman, G. H., Smith, M., Hunger, S. P., & Willman, C. L. (2010a). Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, 116(23), 4874–4884.
- Herold, T., & Gökbuget, N. (2017). Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Current Oncology Reports*, 19(5), 31.
- Hertzberg, L., Vendramini, E., Ganmore, I., Cazzaniga, G., Schmitz, M., Chalker, J., Shiloh, R., Iacobucci, I., Shochat, C., Zeligson, S., Cario, G., Stanulla, M., Strehl, S., Russell, L. J., Harrison, C. J., Bornhauser, B., Yoda, A., Rechavi, G., Bercovich, D., Borkhardt, A., Kempski, H., te Kronnie, G., Bourquin, J. P., Domany, E., & Izraeli, S. (2010). Down syndrome acute lymphoblastic leukemia, a highly heterogeneous disease in

- which aberrant expression of CRLF2 is associated with mutated JAK2: a report from the International BFM Study Group. *Blood*, *115*(5), 1006–1017.
- Hoffmann, K., Firth, M. J., Beesley, A. H., Freitas, J. R., Ford, J., Senanayake, S., de Klerk, N. H., Baker, D. L., & Kees, U. R. (2008). Prediction of relapse in paediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia using a three-gene risk index. *British Journal of Haematology*, *140*(6), 656–664.
- Hosokawa, Y., Ueyama, E., Morikawa, Y., Maeda, Y., Seto, M., & Senba, E. (1999). Molecular cloning of a cDNA encoding mouse A15, a member of the transmembrane 4 superfamily, and its preferential expression in brain neurons. *Neuroscience Research*, *35*(4), 281–290.
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015a). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *The New England Journal of Medicine*, *373*(16), 1541–1552.
- Hunger, S. P., & Mullighan, C. G. (2015b). Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*, *125*(26), 3977–3987.
- Inaba, H., Greaves, M., & Mullighan, C. G. (2013). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet (London, England)*, *381*(9881), 1943–1955.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido. Disponible en:
<http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/registros/vitales/mortalidad/tabulados/ConsultaMortalidad.asp>. Consultado <09/01/16>
- Jain, N., Roberts, K. G., Jabbour, E., Patel, K., Eterovic, A. K., Chen, K., Zweidler-McKay, P., Lu, X., Fawcett, G., Wang, S. A., Konoplev, S., Harvey, R. C., Chen, I. M., Payne-Turner, D., Valentine, M., Thomas, D., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Cortes, J., Kornblau, S., O'Brien, S., Pierce, S., Jorgensen, J., Shaw, K. R., Willman, C. L., Mullighan, C. G., Kantarjian, H., & Konopleva, M. (2017). Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*, *129*(5), 572–581.
- Jiménez-Morales, S., Miranda-Peralta, E., Saldaña-Álvarez, Y., Pérez-Vera, P., Paredes-Aguilera, R., Rivera-Luna, R., Velázquez-Cruz, R., Ramírez-Bello, J., Carnevale, A., & Orozco, L. (2008). BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leukemia Research*, *32*(10), 1518–1522.
- Juric, D., Lacayo, N. J., Ramsey, M. C., Racevskis, J., Wiernik, P. H., Rowe, J. M., Goldstone, A. H., O'Dwyer, P. J., Paietta, E., & Sikic, B. I. (2007). Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *25*(11), 1341–1349.

- Kang, H., Chen, I.-M., Wilson, C. S., Bedrick, E. J., Harvey, R. C., Atlas, S. R., Devidas, M., Mullighan, C. G., Wang, X., Murphy, M., Ar, K., Wharton, W., Borowitz, M. J., Bowman, W. P., Bhojwani, D., Carroll, W. L., Camitta, B. M., Reaman, G. H., Smith, M. A., Downing, J. R., Hunger, S. P., & Willman, C. L. (2010). Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *115*(7), 1394–1405.
- Lin, S., Svoboda, K. K. H., Feng, J. Q., & Jiang, X. (2016). The biological function of type I receptors of bone morphogenetic protein in bone. *Bone Research*, *4*, 16005.
- Loria, R., Bon, G., Perotti, V., Gallo, E., Bersani, I., Baldassari, P., Porru, M., Leonetti, C., Di Carlo, S., Visca, P., Brizzi, M. F., Anichini, A., Mortarini, R., & Falcioni, R. (2015). Sema6A and Mical1 control cell growth and survival of BRAFV600E human melanoma cells. *Oncotarget*, *6*(5), 2779–2793.
- Martínez-Mancilla, M., Rodríguez-Aguirre, I., Tejocote-Romero, I., Medina-Sanson, A., Ocadiz-Delgado, R., & Gariglio, P. (2013). Clinical relevance of the fusion transcripts distribution pattern in mexican children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, *35*(3), 170–173.
- Moorman, A. V. (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews*, *26*(3), 123–135.
- Moorman, A. V. (2016). New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *101*(4), 407–416.
- Mullighan, C. G. (2012). The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program, 2012*, 389–396.
- Mullighan, C. G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L. A. A., Miller, C. B., Ma, J., Liu, W., Cheng, C., Schulman, B. A., Harvey, R. C., Chen, I. M., Clifford, R. J., Carroll, W. L., Reaman, G., Bowman, W. P., Devidas, M., Gerhard, D. S., Yang, W., Relling, M. V., Shurtleff, S. A., Campana, D., Borowitz, M. J., Pui, C. H., Smith, M., Hunger, S. P., Willman, C. L., Downing, J. R., & Children's Oncology Group. (2009). Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *360*(5), 470–480.
- Navab, M., Ananthramaiah, G. M., Reddy, S. T., Van Lenten, B. J., Ansell, B. J., Fonarow, G. C., Vahabzadeh, K., Hama, S., Hough, G., Kamranpour, N., Berliner, J. A., Lusis, A. J., & Fogelman, A. M. (2004). The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. *Journal of Lipid Research*, *45*(6), 993–1007.
- National Cancer Institute: PDQ® Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Disponible en: <http://www.cancer.gov/types/leukemia/patient/child-all-treatment-pdq>. Consultado <03/01/2016>

- Ng, C. J., Hama, S. Y., Bourquard, N., Navab, M., & Reddy, S. T. (2006). Adenovirus mediated expression of human paraoxonase 2 protects against the development of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Molecular Genetics and Metabolism*, *89*(4), 368–373.
- Palmi, C., Vendramini, E., Silvestri, D., Longinotti, G., Frison, D., Cario, G., Shochat, C., Stanulla, M., Rossi, V., Di Meglio, A. M., Villa, T., Giarin, E., Fazio, G., Leszl, A., Schrappe, M., Basso, G., Biondi, A., Izraeli, S., Conter, V., Valsecchi, M. G., Cazzaniga, G., & Te Kronnie, G. (2012). Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, *26*(10), 2245–2253.
- Pérez-Vera, P., Reyes-León, A., & Fuentes-Pananá, E. M. (2011). Signaling proteins and transcription factors in normal and malignant early B cell development. *Bone Marrow Research*, *2011*, 502751.
- Pérez-Vera, P., Salas, C., Montero-Ruiz, O., Frías, S., Dehesa, G., Jarquín, B., & Rivera-Luna, R. (2008). Analysis of gene rearrangements using a fluorescence in situ hybridization method in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *184*(2), 94–98.
- Prislei, S., Mozzetti, S., Filippetti, F., De Donato, M., Raspaglio, G., Cicchillitti, L., Scambia, G., & Ferlini, C. (2008). From plasma membrane to cytoskeleton: a novel function for semaphorin 6A. *Molecular Cancer Therapeutics*, *7*(1), 233–241.
- Rivera-Luna, R., Shalkow-Klincovstein, J., Velasco-Hidalgo, L., Cárdenas-Cardós, R., Zapata-Tarrés, M., Olaya-Vargas, A., Aguilar-Ortiz, M. R., Altamirano-Alvarez, E., Correa-Gonzalez, C., Sánchez-Zubieta, F., & Pantoja-Guillen, F. (2014). Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer*, *14*, 790.
- Roberts, K. G., Gu, Z., Payne-Turner, D., McCastlain, K., Harvey, R. C., Chen, I.-M., Pei, D., Iacobucci, I., Valentine, M., Pounds, S. B., Shi, L., Li, Y., Zhang, J., Cheng, C., Rambaldi, A., Tosi, M., Spinelli, O., Radich J. P., Minden, M. D., Rowe, J. M., Luger, S., Litzow, M. R., Tallman, M. S., Wiernik, P. H., Bhatia, R., Aldoss, I., Kohlschmidt, J., Mrózek, K., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., Stock, W., Kornblau, S., Kantarjian, H. M., Konopleva, M., Paietta, E., Willman, C. L., & Mullighan, C. G. (2017). High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *35*(4), 394–401.
- Roberts, K. G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., Yang, Y.-L., Pei, D., McCastlain, K., Ding, L., Lu, C., Song, G., Ma, J., Beckfort, J., Rusch, M., Chen, S. C., Easton, J., Cheng, J., Boggs, K., Santiago-Morales, N., Iacobucci, I., Fulton, R. S., Wen, J., Valentine, M., Cheng, C., Paugh, S. W., Devidas, M., Chen, I. M., Reshmi, S., Smith, A., Hedlund, E., Gupta, P., Nagahawatte, P., Wu, G., Chen, X., Yergeau, D., Vadodaria,

- B., Mulder, H., Winick, N. J., Larsen, E. C., Carroll, W. L., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Grayson, G., Tasian, S. K., Moore, A. S., Keller, F., Frei-Jones, M., Whitlock, J. A., Raetz, E. A., White, D. L., Hughes, T. P., Guidry Auvil, J. M., Smith, M. A., Marcucci, G., Bloomfield, C. D., Mrózek, K., Kohlschmidt, J., Stock, W., Kornblau, S. M., Konopleva, M., Paietta, E., Pui, C. H., Jeha, S., Relling, M. V., Evans, W. E., Gerhard, D. S., Gastier-Foster, J. M., Mardis, E., Wilson, R. K., Loh, M. L., Downing, J. R., Hunger, S. P., Willman, C. L., Zhang, J., & Mullighan, C. G. (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *371*(11), 1005–1015.
- Ross, M. E., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Girtman, K., Williams, W. K., Liu, H. C., Mahfouz, R., Raimondi, S. C., Lenny, N., Patel, A., & Downing, J. R. (2003). Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*, *102*(8), 2951–2959.
- Schmäh, J., Fedders, B., Panzer-Grümayer, R., Fischer, S., Zimmermann, M., Dagdan, E., Bens, S., Schewe, D., Moerick, A., Alten, J., Bleckmann, K., Siebert, R., Schrappe, M., Stanulla, M., & Cario, G. (2017). Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood. *Pediatric Blood & Cancer*. e26539
- Schwartzman, O., Savino, A. M., Gombert, M., Palmi, C., Cario, G., Schrappe, M., Eckert, C., von Stackelberg, A., Huang, J. Y., Hameiri-Grossman, M., Avigad, S., Te Kronnie, G., Geron, I., Birger, Y., Rein, A., Zarfati, G., Fischer, U., Mukamel, Z., Stanulla, M., Biondi, A., Cazzaniga, G., Vetere, A., Wagner, B. K., Chen, Z., Chen, S. J., Tanay, A., Borkhardt, A., & Izraeli, S. (2017). Suppressors and activators of JAK-STAT signaling at diagnosis and relapse of acute lymphoblastic leukemia in Down syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(20), E4030–E4039.
- Takagi, S., Fujikawa, K., Imai, T., Fukuhara, N., Fukudome, K., Minegishi, M., Tsuchiya, S., Konno, T., Hinuma, Y., Yoshie, O. (1995). Identification of a highly specific surface marker of T-cell acute lymphoblastic leukemia and neuroblastoma as a new member of the transmembrane 4 superfamily. *International Journal of Cancer*, *61*(5), 706–715.
- Thomas, S. J., Snowden, J. A., Zeidler, M. P., & Danson, S. J. (2015). The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *British Journal of Cancer*, *113*(3), 365–371.
- Tran, T. H., & Loh, M. L. (2016). Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, *2016*(1), 561–566. <https://doi.org/10.1182/asheducation-2016.1.561>
- Treviño, L. R., Yang, W., French, D., Hunger, S. P., Carroll, W. L., Devidas, M., Willman, C., Neale, G., Downing, J., Raimondi, S. C., Pui, C. H., Evans, W. E. & Relling, M. V. (2009). Germline genomic variants associated with childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetics*, *41*(9), 1001–1005.

- Ueno, K., Kumagai, T., Kijima, T., Kishimoto, T., & Hosoe, S. (1998). Cloning and tissue expression of cDNAs from chromosome 5q21-22 which is frequently deleted in advanced lung cancer. *Human Genetics*, *102*(1), 63–68.
- van der Veer, A., Waanders, E., Pieters, R., Willemse, M. E., Van Reijmersdal, S. V., Russell, L. J., Harrison, C. J., Evans, W. E., van der Velden, V. H., Hoogerbrugge, P. M., Van Leeuwen, F., Escherich, G., Horstmann, M. A., Mohammadi Khankahdani, L., Rizopoulos, D., De Groot-Kruseman, H. A., Sonneveld, E., Kuiper, R. P., & Den Boer, M. L. (2013). Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*, *122*(15), 2622–2629.
- Witte, I., Altenhöfer, S., Wilgenbus, P., Amort, J., Clement, A. M., Pautz, A., Förstermann, U., & Horke, S. (2011). Beyond reduction of atherosclerosis: PON2 provides apoptosis resistance and stabilizes tumor cells. *Cell Death & Disease*, *2*, e112.
- Yoda, A., Yoda, Y., Chiaretti, S., Bar-Natan, M., Mani, K., Rodig, S. J., West, N., Xiao, Y., Brown, J. R., Mitsiades, C., Sattler, M., Kutok, J. L., DeAngelo, D. J., Wadleigh, M., Piciocchi, A., Dal Cin, P., Bradner, J. E., Griffin, J. D., Anderson, K. C., Stone, R. M., Ritz, J., Foà, R., Aster, J. C., Frank, D. A., & Weinstock, D. M. (2010). Functional screening identifies CRLF2 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(1), 252–257.
- Zhao, J., Tang, H., Zhao, H., Che, W., Zhang, L., & Liang, P. (2015). SEMA6A is a prognostic biomarker in glioblastoma. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *36*(11), 8333–8340.
- Zöller, M. (2009). Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(1), 40–55.

Anexo 1. Protocolo de aislamiento de células mononucleares

Para cada muestra se realizó el siguiente proceso, utilizando una campana de flujo laminar y condiciones de esterilidad:

- 1) Se transfirió el aspirado de médula ósea (A.M.O.) a un tubo estéril de 15 mL.
- 2) Se agregó un volumen 1:1 de PBS estéril (Gibco) al A.M.O. y se homogeneizó.
- 3) Se separaron las células mononucleares por gradiente de densidad. A la muestra diluida se añadió 1 volumen de Lymphoprep (Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway) (equivalente al volumen de A.M.O. inicial) a temperatura ambiente, evitando mezclar o generar burbujas.
- 4) Posteriormente se centrifugó a 1500 r.p.m. por 30 minutos.
- 5) Con una pipeta Pasteur se tomó la capa de células mononucleares que quedó entre las fases y se colocó en un nuevo tubo estéril de 15 mL. Para lavar las células se agregó PBS estéril (Gibco) hasta obtener un volumen final de 10 mL.
- 6) Se centrifugó a 1500 r.p.m. por 10 min y se retiró el sobrenadante.
- 7) Se hicieron 2 lavados adicionales con PBS estéril (Gibco).
- 8) Para cuantificar y medir viabilidad a las células, previo al último lavado se tomaron 10 μ L de la suspensión celular y se mezclaron con 10 μ L de azul tripano (Gibco) en un tubo eppendorff de 0.6 mL.
- 9) Se colocaron 10 μ L de la mezcla a cada lado de un hemocitómetro y se cuantificaron las células.
- 10) Se calculó el número total de mononucleares.

Anexo 2. Protocolo de extracción de RNA

Para cada muestra se procedió como se enlista a continuación:

- 1) Las células resuspendidas en buffer de lisis RLT (QIAGEN, Hilden, Germany) se homogeneizaron con vórtex .
- 2) Se agregó al lisado un volumen (1:1) de etanol al 70 %, y se mezcló por pipeteo.
- 3) Se transfirió un volumen de hasta 700 μ L del lisado dentro de una columna RNeasy spin column (QIAGEN, Hilden, Germany), la cual contiene una membrana para retener el RNA total; la columna se colocó dentro de una camisa de colecta de 2 mL. Se centrifugó a 12000 r.p.m. por 15 seg. Se desechó el líquido colectado en la camisa. Este punto se repitió hasta agotar el volumen del lisado homogeneizado.
- 4) Se agregaron 700 μ L de buffer RW1 (QIAGEN, Hilden, Germany) dentro de la columna y se centrifugó a 12000 r.p.m., por 15 seg. Se desechó el líquido colectado en la camisa.
- 5) Se agregaron 500 μ L de buffer RPE (QIAGEN, Hilden, Germany) y se centrifugó a 12000 r.p.m., por 15 seg. Se desechó el líquido colectado.
- 6) Se agregaron 500 μ L de buffer RPE. Se centrifugó a 12000 r.p.m. por 2 min, con el fin de eliminar todo el líquido contenido en la membrana de la columna “RNeasy”.
- 7) Para eluir el RNA, la columna se transfirió a un tubo de colecta nuevo de 1.5ml. Se agregaron 40 μ L de agua libre de RNasas al centro de la membrana de la columna, y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 1 min.
- 8) La elución de RNA se conservó en congelación hasta su uso posterior.

Anexo 3. Método comparativo o método $\Delta\Delta Ct$ de cuantificación relativa

1) Se obtienen los valores:

$$\Delta Ct \text{ (muestra)} = Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ gen referencia}$$

$$\Delta Ct \text{ (calibrador)} = Ct \text{ gen blanco} - Ct \text{ gen referencia}$$

2) Se obtiene el valor $\Delta\Delta Ct$:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ (muestra)} - \Delta Ct \text{ (calibrador)}$$

Donde $\Delta\Delta Ct$ representa la diferencia entre el promedio del valor ΔCt de la muestra con respecto al promedio ΔCt del calibrador.

3) Se calcula el valor de expresión normalizada para el gen blanco:

$$\text{Expresión normalizada} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Anexo 4a. Niveles de expresión relativa de la cohorte “Otros-B”

Valores de expresión $2^{-\Delta\Delta CT}$ de la cohorte de 50 pacientes pediátricos con LLA pre-B evaluados. En rojo se indican los niveles con valor mayor o igual a la mediana; en verde los niveles menores a la mediana.

PACIENTE	NIVEL DE EXPRESIÓN					
	<i>CRLF2</i>	<i>TSPAN7</i>	<i>SEMA6A</i>	<i>PON2</i>	<i>IGJ</i>	<i>BMPR1B</i>
LLA113	657.11	4153.18	7281.40	213.78	1234.75	43.71
LLA058	52.71	1904.24	71220.26	112.99	2469.49	33456.53
LLA062	18.77	367.09	4451.27	16.11	359.54	7.62
LLA005	1251.98	24.93	544.95	51.27	167.73	0.00005
LLA046	415.87	47.50	1067.48	11.88	20.97	867.07
LLA034	137.19	159.79	1144.10	11.24	2.51	4.26
LLA039	304.44	2134.97	5404.70	17.51	206.50	0
LLA051	72.00	576.03	66913.05	13.93	51.27	0
LLA068	99.04	294.07	1287.18	13.55	24.93	0
LLA106	134.36	278.20	501.46	35.26	1.37	0
LLA054	17.39	21.41	2179.83	32.67	6.19	515.56
LLA092	68.12	62.25	1573.76	12.73	13.09	10.48
LLA040	2.35	101.83	2574.36	1.72	19.70	982.29
LLA033	15.03	1698.45	27746.15	2.68	148.06	3.92
LLA090	0.71	174.85	1152.06	4.96	99.04	0.04
LLA105	5.82	765.36	44.02	7.84	143.01	0.01
LLA010	1530.70	44.63	388.02	23.10	186.10	8.69
LLA031	6.06	1.77	9345.14	12.64	69.55	955.43
LLA003	4.46	28.84	2019.80	69.55	367.09	50.21
LLA006	14.02	28.25	1902.15	27.86	754.82	1.00
LLA036	22.16	333.14	501.46	6.59	13.55	0
LLA114	97.68	3373.43	803.41	2.97	8.82	0
LLA072	59.30	188.71	324.03	10.27	2.45	0
LLA064	155.42	552.56	215.27	16.56	0.40	0
LLA057	19.97	1016.93	4.14	0.64	26.72	0
LLA002	556.40	7.83	181.01	5.50	125.36	25.11
LLA020	4.65	93.70	280.14	1.33	178.52	1418.35
LLA017	1.93	396.18	31.56	7.36	20.11	0
LLA001	3.58	130.68	873.09	9.25	7.51	0
LLA053	10.34	189.36	3492.39	2.50	27.86	0
LLA066	2.28	1002.93	4067.71	0.33	9.99	0.41
LLA028	0.10	96.34	2665.15	1.97	9.38	219.79
LLA035	89.88	1067.48	10.93	1.88	3.25	0
LLA069	282.09	996.00	65.34	5.35	3.61	0
LLA073	30.27	436.55	209.38	4.23	1.56	0
LLA013	16.11	88.03	1269.46	6.63	3.51	0
LLA079	122.79	39.67	290.02	38.85	0.61	0
LLA044	52.35	23.10	0.42	19.16	2.50	0
LLA027	1.20	125.37	139.10	0.57	11.39	0.19
LLA047	6.32	40.22	709.18	1.04	35.02	0
LLA030	14.32	1.45	20.68	6.32	31.12	837.53
LLA049	0.26	0.26	608.87	6.28	17.39	0
LLA007	11.39	16.22	364.55	6.59	23.75	0
LLA055	6.96	13.45	6.68	3.23	29.65	0
LLA018	0.15	0.95	2.17	1.09	19.43	0.27
LLA089	0.15	37.79	2.46	0.36	5.58	0
LLA009	5.82	76.64	82.14	6.23	1.89	0
LLA012	0.64	2.44	8.81	1.76	0.60	0
LLA118	0	7.59	0	4.92	8.88	0
MEDIANA	15.57	95.02	501.46	7.00	19.91	0

Anexo 4b. Niveles de expresión de cinco pacientes con la translocación *BCR-ABL1* (Ph+)

Valores de expresión $2^{-\Delta\Delta CT}$ de los cinco pacientes con LLA pre-B positivos a la translocación *BCR-ABL1* (Ph+). En rojo se indican los niveles con valor mayor o igual a la mediana obtenida en la cohorte de 52 pacientes “otros-B”; en verde se indican los niveles menores a la mediana.

MUESTRA	NIVEL DE EXPRESIÓN					
	<i>CRLF2</i>	<i>TSPAN7</i>	<i>SEMA6A</i>	<i>PON2</i>	<i>IGJ</i>	<i>BMPR1B</i>
Ph+ 1	36.76	699.41	1478.58	11.55	130.69	0.01
Ph+ 2	162.02	1287.18	1722.16	202.25	308.69	0.8
Ph+ 3	305.49	16158.44	56658.31	263.2	3396.89	82.14
Ph+ 4	0.02	62.68	0.06	13.54	0.56	117312.72
Ph+ 5	1.1	0	372.22	6.73	0.15	0

Anexo 5. Características de los candidatos Ph-like

Características de los 32 pacientes LLA pre-B candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like.

Candidatos Ph-like (N=32)			
No.	PEG (N=9/32)	se-CRLF2 (N=25/32)	P2RY8-CRLF2 (N=17/32)
LLA046	+	+	+
LLA039	+	+	+
LLA068	+	+	+
LLA113	+	+	-
LLA058	+	+	-
LLA062	+	+	-
LLA051	+	+	-
LLA034	+	+	-
LLA005	+	+	-
LLA106	-	+	+
LLA054	-	+	+
LLA036	-	+	+
LLA114	-	+	+
LLA035	-	+	+
LLA013	-	+	+
LLA044	-	+	+
LLA092	-	+	-
LLA010	-	+	-
LLA072	-	+	-
LLA064	-	+	-
LLA057	-	+	-
LLA002	-	+	-
LLA069	-	+	-
LLA073	-	+	-
LLA079	-	+	-
LLA090	-	-	+
LLA031	-	-	+
LLA040	-	-	+
LLA028	-	-	+
LLA049	-	-	+
LLA055	-	-	+
LLA018	-	-	+

Simbología: PEG = Perfil de Expresión Génica; se-CRLF2 = sobre-expresión de CRLF2; + es positivo; - es negativo;

Anexo 6. Características clínicas y de laboratorio de la cohorte “Otros-B” evaluada

Paciente	Edad	Género	Leucocitos/ml (al diagnóstico)
LLA113	12	M	153800
LLA058	14	F	86500
LLA062	10	F	3700
LLA005	16	M	155900
LLA046	6	F	16200
LLA034	11	F	3500
LLA039	6	F	3400
LLA051	13	M	9700
LLA068	10	M	2000
LLA106	11	M	144000
LLA054	9	F	9400
LLA092	11	M	200900
LLA040	5	M	29000
LLA033	4	F	26100
LLA090	4	F	600
LLA105	2	F	1200
LLA010	15	F	160600
LLA031	14	M	3100
LLA003	8	F	174600
LLA006	9	F	1100
LLA117	12	F	1600
LLA036	2	M	1800
LLA114	4	F	2100
LLA072	4	F	90800
LLA064	7	F	5300
LLA057	16	F	81600
LLA002	14	M	108000
LLA020	18*	M	184000
LLA017	4	F	2600
LLA001	3	F	56000
LLA053	2	F	11000
LLA066	6	M	2800
LLA028	2	F	5130
LLA035	6	M	3400
LLA069	3	F	10800
LLA073	SIN DATO	SIN DATO	SIN DATO
LLA013	12	M	45000
LLA079	SIN DATO	SIN DATO	SIN DATO
LLA044	3	F	33000
LLA027	8	F	73700
LLA047	4	M	3100
LLA030	7	M	2100
LLA049	2	M	60000
LLA007	11	M	3600
LLA055	14	F	40400
LLA018	8	M	6000
LLA089	13	F	5400
LLA009	13	F	3000
LLA012	3	M	83600
LLA118	12	F	432200