



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

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE  
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA DE BAJO Y DE ALTO  
RIESGO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BÁRCENAS LÓPEZ DIEGO ALBERTO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES**  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

**COMITÉ TUTOR: DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ**  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
**DR. FEDERICO ÁVILA MORENO**  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MARZO, 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.





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

**IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE  
PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA DE BAJO Y DE ALTO  
RIESGO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BÁRCENAS LÓPEZ DIEGO ALBERTO**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ  
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DR. FEDERICO ÁVILA MORENO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

**MÉXICO, CD. MX., MARZO, 2018**



Lic. Ivonne Ramírez Wanca  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presenta

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomolécula del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 06 de noviembre de 2017, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **BÁRCENAS LÓPEZ DIEGO ALBERTO** con número de cuenta 304116285, con la tesis titulada: **"IDENTIFICACIÓN DE GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS ENTRE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA DE BAJO Y DE ALTO RIESGO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES**:

- Presidente: DRA. MILVA CAROLINA BEKKER MÉNDEZ
- Vocal: DR. ADOLFO MARTÍNEZ TOVAR
- Secretario: DR. FEDERICO AVILA MORENO
- Suplente: DRA. ANA MARÍA SALAZAR MARTÍNEZ
- Suplente: DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANQUE

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 19 de febrero de 2018

**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
COORDINADOR DEL PROGRAMA



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM por darme la oportunidad de realizar mis estudios en un programa de alta calidad académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU: 737534, No. de apoyo 596726) durante mis estudios de maestría.

También a CONACYT por el financiamiento del proyecto mediante la Convocatoria de Proyectos de Investigación para Atender Problemas Nacionales 2013 (PDCPN2013-01-215726) y la Convocatoria Fronteras de la Ciencia CONACYT (2016-01-2119), los cuales permitieron la realización de este trabajo.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM por el financiamiento otorgado para la presentación de este trabajo en la Conferencia Europea de Genética Humana 2017.

Finalmente, a mi tutora principal, la Dra. Silvia Jiménez Morales, y a los miembros de mi comité tutor, Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré y Dr. Federico Ávila Moreno por sus valiosas aportaciones y por guiarme durante la realización de este proyecto.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A la Dra. Silvia Jiménez por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto en el INMEGEN, por su confianza, apoyo y amistad, las cuales me permitieron desempeñarme de la mejor forma durante mis estudios de maestría.

A los miembros del jurado, por sus valiosas contribuciones en el proyecto y la elaboración de la tesis:

Dr. Federico Ávila Moreno

Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré

Dra. Vilma Carolina Bekker Méndez

Dr. Adolfo Martínez Tovar

Dra. Ana María Salazar Martínez

Al Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños, especialmente a Juan Carlos Núñez por invitarme a formar parte de este grandioso grupo de investigación.

A todo el Laboratorio de Genómica del Cáncer del INMEGEN: al Dr. Alfredo y Luis por darme la oportunidad de pertenecer a su laboratorio y a mis compañeros Mireya, Carlos, Diana, Beto, Fredy, Rocío, Magda, Lalo, Didier, Mali, Vai, Gaby y Marco, que en algún punto de todos aprendí (y sigo aprendiendo) algo y contribuyeron a mi formación académica y personal en el labo, por ser un estupendo equipo de trabajo.

A mi familia, lo mejor y lo más importante que tengo. Primeramente a mis padres Lino y Rosaura, a Selene, Juan Carlos y Emilio, por su apoyo incondicional en todo aspecto de mi vida.

A Gaby, por estar siempre conmigo en las buenas y en las malas, por apoyarme en todo momento en este nuevo camino que elegí, por tus consejos, ánimos, y por acompañarme durante todo este tiempo en mi vida.

Un agradecimiento especial al laboratorio de Inmunología de la Facultad de Odontología, principalmente a la Dra. Dolores Jiménez por impulsarme a tomar este camino de la investigación.

Finalmente, a los pacientes y a sus padres que colaboraron para la realización de este proyecto. Mil gracias a todos.

## **DEDICATORIA**

A mis padres, Lino y Rosaura.

Gracias por creer en mí y apoyarme siempre. Sin ustedes simplemente no lo hubiera logrado y les estaré eternamente agradecido.



# ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS .....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT.....	3
ANTECEDENTES .....	5
Cáncer infantil .....	5
Leucemia aguda linfoblástica (LAL).....	6
Definición y epidemiología de la LAL .....	7
Diagnóstico y manifestaciones clínicas .....	7
Clasificación de LAL .....	8
Etiología de LAL.....	11
Genética de la LAL .....	12
Clasificación de riesgo, pronóstico y tratamiento en LAL .....	17
Recaída en LAL .....	20
Nuevas herramientas en la clasificación de riesgo: análisis del transcriptoma .....	21
Epidemiología de LAL en México .....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	25
OBJETIVOS .....	26
Objetivo general .....	26
Objetivos particulares .....	26
ESTRATEGIA GENERAL .....	26
Población de estudio .....	26
Criterios de inclusion.....	26
Criterios de exclusion.....	27
Criterios de eliminación.....	27
DISEÑO METODOLÓGICO.....	28
METODOLOGÍA .....	30
Extracción y evaluación de la integridad del RNA.....	30
Detección de los trascritos quiméricos más comunes.....	30
Preparación del RNA e hibridación en microarreglos de expresión .....	30
Procesamiento de datos crudos .....	31

Análisis exploratorios de datos, expresión diferencial y agrupamiento jerárquico .....	31
Validación de los datos obtenidos por microarreglos mediante RT-qPCR .....	31
Análisis Estadístico.....	32
<b>RESULTADOS</b> .....	32
Características clínicas y demográficas de la cohorte .....	32
Inmunofenotipo .....	33
Clasificación de riesgo: .....	33
Mortalidad y recaídas muy tempranas: .....	33
Características clínicas de la cohorte incluida en el análisis de expresión.....	34
Perfiles de expresión en pacientes de alto y bajo riesgo .....	34
Identificación de perfiles de expresión asociados a cuadro clínico de hiperleucocitosis .....	38
Identificación de subgrupos moleculares mediante agrupamiento jerárquico no supervisado.....	39
Identificación de perfiles de expresión Ph like .....	40
Identificación de biomarcadores de recaída muy temprana .....	42
Validación de los GDE en pacientes con RMT .....	46
Identificación de genes asociados con la recaída .....	47
Identificación de perfiles de expresión asociados a recaída y muerte .....	49
<b>DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	63
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	64
<b>ANEXOS</b> .....	79
ANEXO A: Publicación de artículo científico .....	79
ANEXO B. Asistencia a congreso internacional.....	93

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación inmunológica de la leucemia aguda linfoblástica infantil.....	11
Tabla 2. Clasificación de riesgo empleada para los protocolos de tratamiento del hospital St. Jude (Memphis TN, EEUU.).....	18
Tabla 3. Características de la población de estudio para el análisis de expresión.....	35
Tabla 4. Genes con mayor expresión diferencial entre pacientes de alto riesgo vs bajo riesgo bajo los criterios del NCI.....	37
Tabla 5. Genes con mayor expresión diferencial en pacientes con hiperleucocitosis (>100 x 10 <sup>9</sup> /L).....	39
Tabla 6. Genes con mayor expresión diferencial en pacientes que presentaron recaída muy temprana .....	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo tradicional de la hematopoyesis.....	6
Figura 2. Clasificación Franco-Américo-Británico.....	9
Figura. 3. Ontogenia del linfocito B.....	10
Figura 4. Frecuencia de las alteraciones genéticas más comunes en la LAL infantil.....	16
Figura 5. Gráfica de escalamiento multidimensional de los datos de expresión de pacientes con LAL infantil.....	21
Figura 6. Frecuencia de alteraciones genéticas presentes en niños y adolescentes con subtipo Ph-like.....	22
Figura 7. Incidencia por grupo de edad de las leucemias infantiles reportadas en la Ciudad de México de 2006 a 2007.....	24
Figura 8. Fases de tratamiento de paciente pediátrico con LAL y momentos de toma de muestra de MO.....	28
Figura 9. Metodología del procesamiento de muestras, análisis y obtención de resultados.....	29
Figura 10. Perfiles de expresión entre pacientes de alto riesgo (AR) vs bajo riesgo (BR).....	36
Figura 11. Perfiles de expresión en pacientes con hiperleucocitosis ( $>100 \times 10^9 /L$ ).....	38
Figura 12. Análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de los datos de expresión por subtipo molecular. ....	40
Figura 13. Perfil de expresión <i>BCR-ABL1+</i> y Philadelphia-like (Ph-like).....	41
Figura 14. Perfiles de expresión en pacientes con recaída muy temprana (RMT).....	43
Figura 15. Plot de volcán de los genes diferencialmente expresados en pacientes con recaída muy temprana (RMT).....	44
Figura 16. Vía de señalización del receptor de células B.....	45
Figura 17. Moléculas implicadas en la sobrevivencia celular y resistencia a apoptosis en la RMT.....	46
Figura 18. Validación por RT-qPCR de genes diferencialmente expresados en pacientes con RMT.....	46
Figura 19. Perfiles de expresión en muestras pareadas al diagnóstico y a la RMT.....	47
Figura 20. Complejo NF $\kappa$ B como regulador central en pacientes con RMT.....	48
Figura 21. Perfil de expresión asociado a mortalidad por RMT.....	49
Figura 22. Gen MYC como regulador central en pacientes con mortalidad temprana.....	50

## ABREVIATURAS

AR= Alto riesgo

BR= Bajo riesgo

cDNA= Ácido desoxirribonucleico complementario

CNA= Alteraciones en el número de copias (del inglés Copy Number Alterations)

CTH= Células troncales hematopoyéticas

CTPH= Células troncales y progenitoras hematopoyéticas

EGIL= European Group of Immunological Classification

FAB= Franco-Americano-Británico

FC= Fold Change (Tasa de cambio)

FDR= False Discovery Rate

GDE= Genes diferencialmente expresados

GO= Ontología génica (del inglés Gene Ontology)

IARC = International Agency for Research of Cancer

IL-1 = Interleucina 1

IL-6 = Interleucina 6

ITC= Inhibidores de tirosinacinas

LAL = Leucemia aguda linfoblástica

LAM= Leucemia Aguda Mieloide

MO = Médula ósea

NCI= Instituto Nacional del Cáncer (del inglés National Cancer Institute)

OMS= Organización Mundial de la Salud

PCR= Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

PreB= Precusores B

RIN= Valor de integridad de RNA (del inglés RNA Integrity Number)

RMA= Robust Multiarray Analysis

RMT= Recaída muy temprana

RNA= Ácido ribonucleico

RTqPCR= PCR en tiempo real

SLE = Sobrevida libre de eventos

SNC= Sistema Nervioso Central

TC= Tirosina cinasa

TNF = Factor de necrosis tumoral (del inglés Tumor Necrosis Factor)

## RESUMEN

**Introducción:** La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es el cáncer infantil más común a nivel mundial. Diversos estudios han reportado que nuestro país presenta algunas de las tasas de incidencia y de mortalidad más altas descritas a nivel mundial, además de que bajo los mismos criterios de clasificación de riesgo empleados en todo el mundo casi la mitad de los casos en México son considerados como grupos de alto riesgo (AR) a recaída y muerte, presentando el doble de casos en comparación con lo que se observa en países desarrollados. Además, una alta proporción de recaídas en niños mexicanos (17%) ocurren durante el primer año de tratamiento (recaída muy temprana) y la mitad de ellas aparecen en pacientes que fueron clasificados al diagnóstico como de buen pronóstico (bajo riesgo, BR). Por lo anterior, es urgente identificar potenciales biomarcadores que complementen la clasificación de riesgo, con la finalidad de identificar a aquellos pacientes con alto riesgo a recaída, incrementar su supervivencia y evitar principalmente las recaídas.

**Objetivo:** Identificar genes diferencialmente expresados entre la leucemia aguda linfoblástica de bajo y de alto riesgo a recaída e identificar potenciales biomarcadores de recaída.

**Método:** Se llevó a cabo un estudio de caso-control anidado en una cohorte de pacientes. El análisis de transcriptoma se realizó mediante microarreglos de expresión Affymetrix (HTA 2.0). Se analizó el transcriptoma de 63 pacientes, de los cuales, 16 (casos) presentaron recaída muy temprana (primeros 18 meses de tratamiento) y 47 (controles) no presentaron recaída durante los 18 meses de seguimiento (a partir del diagnóstico y tratamiento). Se consideraron genes diferencialmente expresados (GDE) aquellos con un Fold-Change superior a 1.2 y un ANOVA  $p < 0.01$ . Las comparaciones entre los grupos analizados (por clasificación de riesgo, recaída y cuenta leucocitaria) se realizaron con el software Transcriptome Analysis Console (TAC Affymetrix) y Morpheus (Broad Institute). Los análisis de vías y procesos biológicos relacionados se realizaron con el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA) y la herramienta en línea GOrilla.

**Resultados:** El análisis de agrupamiento jerárquico mostró la formación de dos clusters correspondientes a los grupo de riesgo (AR y BR), mientras que *MUC4*, *ITGA5* y *PBX3* son algunos ejemplos de los genes con mayor sobre-expresión en el grupo de alto riesgo. Algunos pacientes se agruparon en un grupo de riesgo distinto al originalmente asignado bajo criterios

clínicos. El perfil de expresión de los pacientes con hiperleucocitosis ( $>100 \times 10^9 /L$ ) se caracterizó por la sobre-expresión de genes relacionados a los procesos biológicos de adhesión y señalización celular como *ITGA4*, *SEMA6A*, *MUC4*, *NT5E*, mismos que han sido previamente asociados a un pronóstico clínico desfavorable. Por otra parte, el análisis comparativo entre pacientes que presentaron recaída muy temprana mostraron que las vías biológicas más afectadas se relacionan con la diferenciación de linfocitos B (*EBF1*, *BLNK*, *BLK*), resistencia a la apoptosis (vía *NFκB*, *p53*) y al tratamiento quimioterapéutico (*BLVRB*, *RASD1*, *MSH6*). Asimismo, nuestro análisis de muestras de pacientes al momento de la recaída muy temprana mostró que los perfiles de expresión son similares al que se observa en su muestra correspondiente al momento del diagnóstico.

**Conclusiones:** El análisis del transcriptoma es una herramienta útil para identificar perfiles de expresión asociados alto riesgo, hiperleucocitosis, recaída y mortalidad muy temprana. Algunos de los GDE (*MUC4*, *ITGA5* y *PBX3*) en pacientes clasificados clínicamente como AR han sido previamente asociados con mal pronóstico en LAL y otras neoplasias. En los pacientes con recaída muy temprana, los genes significativamente alterados en su expresión fueron *EBF1*, *BLNK*, *BLK*, *BLVRB*, etc; siendo las vías de diferenciación linfoide, resistencia a apoptosis y quimiorresistencia, las más afectadas. Este proyecto representa el primer esfuerzo multi-institucional en México encaminado a profundizar en el conocimiento de los perfiles de expresión del genoma en LAL infantil en nuestro país, con el fin de identificar potenciales biomarcadores de alto riesgo a recaída y mortalidad muy temprana en LAL infantil.

**Palabras clave:** leucemia aguda linfoblástica, perfiles de expresión génica, recaída muy temprana, niños, biomarcadores.



## ABSTRACT

**Introduction:** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer worldwide. It has been reported that Mexico has some of the highest incidence and mortality rates described elsewhere, even though the risk stratification of our patients is based on risk stratification criteria used in the rest of the world. Additionally, almost half of the ALL cases in Mexico are classified as high risk (HR) groups for relapse and death, twice as many as in developed countries. Very early relapse frequencies in Mexican children are also higher than the ones described in developed countries (13.4 vs. 4.5%), and half of them appear in patients classified as low or standard risk (LR, good prognosis) for relapse. Therefore, it is urgent to identify potential biomarkers that complement the risk classification, in order to identify those patients at high risk of relapse, increase their survival and prevent their relapse.

**Objective:** To identify differentially expressed genes between high- and low-risk acute lymphoblastic leukemia and to identify potential biomarkers for high risk to relapse.

**Methodology:** A case-control study was performed. Transcriptome analysis of 63 patients, of which 16 (cases) had VER (relapse occurred during the first 18 months of treatment) and 47 (controls) patients who did not relapsed during the 18 months following the ALL diagnosis. Analysis was carried out using Affymetrix gene expression microarrays (HTA 2.0). Differentially expressed genes (DEG) were considered those with a Fold-Change>1.2 and ANOVA  $p < 0.01$ . Comparisons between groups (risk stratification, relapse and leukocyte counts) were performed using the Transcriptome Analysis Console (TAC Affymetrix) and Morpheus (Broad Institute) software. Pathway analysis and related biological processes were identified with Ingenuity Pathway Analysis software (IPA) and online tool GOrilla.

**Results:** The hierarchical cluster analysis showed two clusters corresponding to HR and LR, *MUC4*, *ITGA5* and *PBX3* are examples of the most overexpressed genes in the HR group. Based on gene expression profile, some patients fitted into a different risk group which they were assigned to, according to clinical criteria. On the other hand, patients with hyperleukocytosis  $>100 \times 10^9 / L$  (at diagnosis) were characterized by the overexpression of genes related to cell adhesion and cellular signaling like *ITGA4*, *SEMA6A*, *MUC4*, *NT5E*, which have been associated with unfavorable clinical outcome. Expression profiles of samples at the time of very early relapse were highly similar to their corresponding sample at diagnosis, and the most affected biological pathways were those related to the differentiation of B lymphocytes (*EBF1*, *BLNK*,

*BLK*), resistance to apoptosis (NFκB pathway, *p53*) and chemoresistance (*BLVRB*, *RASD1*, *MSH6*).

**Conclusions:** Transcriptome analysis is a useful tool to identify gene expression profiles associated with HR, hyperleukocytosis, very early relapse and mortality. Abnormal expression of genes as *MUC4*, *ITGA5* and *PBX3* in HR patients has been previously associated with poor prognosis in ALL and other neoplasms. *EBF1*, *BLNK*, *BLK*, *BLVRB*, *RASD1* and *MSH6* were among the most significant abnormally expressed genes in very early relapse patients. These genes are playing a role in the lymphoid differentiation, resistance to apoptosis and chemoresistance biological processes. This project represents the first multi-institutional effort in Mexico in order to understand the transcriptomic background of childhood ALL in Mexican cases and to identify potential biomarkers to detect high risk for relapse and death cases.

**Key words:** Acute lymphoblastic leukemia, gene expression profiles., very early relapse, children, biomarkers.

## ANTECEDENTES

### Cáncer infantil

El cáncer infantil es un grave problema de salud pública mundial. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), cada año se diagnostican aproximadamente 215 mil casos en niños menores de 15 años en todo el mundo, de los cuales alrededor de 85 mil casos son adolescentes de 15 a 19 años [1]. Estos números varían entre diferentes poblaciones; mientras que en países desarrollados el cáncer infantil representa menos del 1% de todas las neoplasias malignas, en países en desarrollo los índices son significativamente más altos. Una de las principales razones es que en países en desarrollo, la población infantil constituye un alto porcentaje del total poblacional, aunado a que existe una menor calidad de atención por deficiencias en la infraestructura de salud, y una detección o tratamiento tardíos de los pacientes [2].

En el mundo, de todas las neoplasias infantiles, aproximadamente la mitad son de origen hematológico, principalmente leucemias y linfomas. Las leucemias se definen como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de las células de origen linfoide o mieloide, mismas que suprimen la hematopoyesis normal y tienen la capacidad de invadir sitios extramedulares. Así, por su linaje hematopoyético y velocidad de progresión, las leucemias se clasifican en mieloide o linfoide y agudas o crónicas, respectivamente (**Fig. 1**) [3,4]. Se consideran agudas cuando su desarrollo es rápido e involucra progenitores hematopoyéticos inmaduros, mientras que las leucemias crónicas son de lento desarrollo y surgen a partir de células en etapas más avanzadas de maduración. Actualmente, la OMS clasifica a las leucemias agudas en mieloides, mixtas (linaje ambiguo) y linfoblásticas de linaje B o linaje T [5]. De todos los tipos de leucemia, la leucemia aguda linfoblástica (LAL) constituye más del 85% de todos los casos en pediatría, mientras que la leucemia de origen mieloide tiene un prevalencia de 13.1 al 17.2% de los casos de leucemia infantil. El porcentaje restante está representado por casos de leucemia de linaje mixto y leucemia crónica [6, 7, 8].

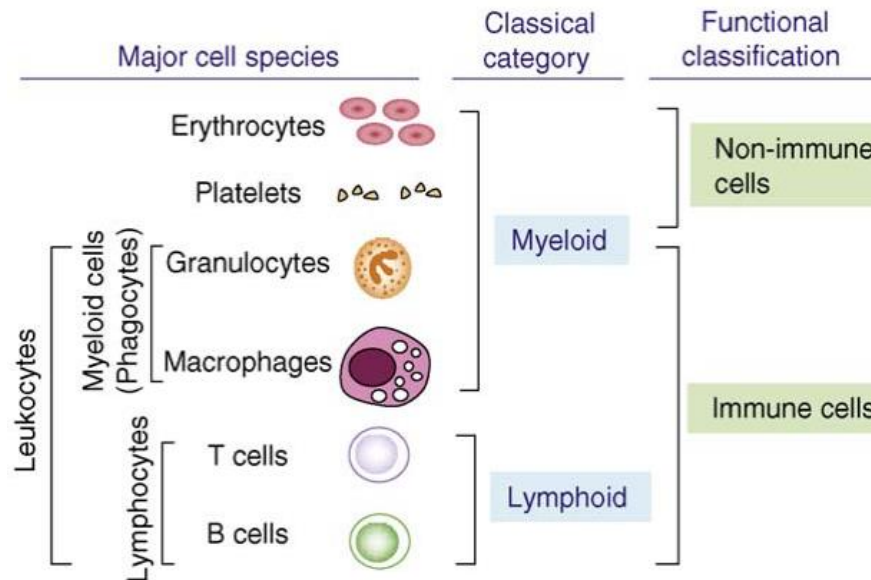


Figura 1. Modelo tradicional de la hematopoyesis: contempla los linajes mieloide y linfoide. Tomado y modificado de Kawamoto & Katsura, 2009 [4].

### Leucemia aguda linfoblástica (LAL)

La LAL surge de la proliferación mono/oligoclonal de un precursor hematopoyético de la serie linfoide en la médula ósea (MO) [9]. Esta neoplasia fue una de las primeras en ser tratadas con agentes quimioterapéuticos (antifolatos), y en países desarrollados la sobrevida libre de eventos (SLE) ha pasado de un 50% a principios de la década de los 80s hasta más del 90% en la actualidad [10]. Con los esquemas actuales de tratamiento, aunado al uso de criterios clínicos y moleculares que permiten identificar casos de alto riesgo a recaída, al desarrollo de terapias dirigidas y al desarrollo de nuevas tecnologías de análisis masivo que han permitido conocer mejor a la enfermedad, se han mejorado notablemente las tasas de remisión y cura. No obstante, la LAL continúa siendo unas de las primeras causas de mortalidad por cáncer en niños y adultos jóvenes [11]. Aún más, en países en vías de desarrollo las altas tasas de incidencia y mortalidad por LAL persisten, por lo que constituye un reto el alcanzar mejores tasas de sobrevida y reducir la mortalidad por esta enfermedad en poblaciones como la nuestra.

## **Definición y epidemiología de la LAL**

La LAL es una enfermedad que surge a partir de la transformación maligna de un precursor de estirpe linfóide como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas (proceso multi-step) que impiden la maduración de los blastos linfoides y le confieren otras propiedades como la resistencia a la apoptosis y desregulación del ciclo celular [10]. Además, las células leucémicas o blastos leucémicos, se acumulan en la médula ósea, suprimen la hematopoyesis, compitiendo con las células normales por los nichos medulares, y son capaces de migrar e invadir otros tejidos. La incidencia de la LAL varía substancialmente por población y zona geográfica, con las tasas más altas reportadas en Italia, Estados Unidos, Suiza y Costa Rica [12] y más bajas en poblaciones asiáticas y afroamericanas [10]. En los EEUU, los hispanos son el grupo con la mayor incidencia de LAL, principalmente los de California y Texas y cuya población latina es predominantemente de origen mexicano [13-16]. Respecto al género, la incidencia es ligeramente mayor en hombres, quienes a su vez suelen tener peor pronóstico relacionado a inmunofenotipo y alteraciones genéticas desfavorables [17]. En cuanto a la edad, el grupo con mayor incidencia es el de 1-4 años, con una disminución progresiva durante la niñez y adolescencia hasta alcanzar un pico más después de los 60 años [10].

## **Diagnóstico y manifestaciones clínicas**

A diferencia de las neoplasias sólidas derivadas de precursores linfoides como los linfomas, en las leucemias debe haber infiltración en MO, siendo necesario un mínimo de 20% de blastos leucémicos presentes en MO para su confirmación [18]. Las manifestaciones clínicas iniciales de las leucemias agudas en el niño son muy diversas, y reflejan principalmente el resultado del fracaso de la función medular y de la infiltración blástica en órganos y tejidos extramedulares. Los pacientes cursan con un cuadro febril, causado por citocinas pirogénicas (IL-1, IL-6, TNF) liberadas por las células, que puede ceder a las 72 hrs aprox. después del tratamiento de inducción [19]. Las infecciones prolongadas, dolor óseo y el síndrome anémico (taquicardia, astenia, fatiga, anorexia, palidez), son otros síntomas comunes en los pacientes con LAL. Pero además, el paciente puede cursar con dolor de cabeza, vómito, alteraciones de la función mental, oliguria y anuria. Hemorragias intracraneales solo ocurren en pacientes con leucocitosis elevada

(>400 x 10<sup>9</sup> /L) y muy pocos casos no presentan signos ni síntomas de la enfermedad [20]. A la exploración física se puede encontrar petequias, púrpuras, equimosis y hepatoesplenomegalia; pueden presentarse hemorragias en mucosas y algunas veces linfadenopatías [10]. Algunos pacientes pueden presentar masa mediastinal, e infiltración blástica en el timo. Otros sitios donde puede haber infiltración de células leucémicas son los testículos, glándulas salivales [Síndrome de Mikulicz] y ojo [21].

## **Clasificación de LAL**

Para la clasificación de la LAL, en la clínica se consideran varios parámetros incluyendo datos morfológicos, citoquímicos, inmunohistoquímicos y genéticos.

### *Clasificación morfológica*

El grupo Franco-Americano-Británico [FAB] clasifica a la LAL por la morfología de los blastos leucémicos, empleando tinciones convencionales (May-Grünwald-Giemsa, Wright-Giemsa) (**Fig. 1**) [22, 23]; subdividiéndola en tres subtipos:

- a) L1. Linfoblastos pequeños, con cromatina homogénea, núcleo de forma regular y nucléolos pequeños o nulos, citoplasma escaso y ligera basofilia (**Fig. 2A**).
- b) L2. Linfoblastos grandes y con alto nivel de pleomorfismo. Abundante citoplasma y cromatina heterogénea, numerosos nucléolos, nivel de citoplasma y basofilia variable (**Fig. 2B**).
- c) L3. Linfoblastos grandes y homogéneos, caracterizado principalmente por su intensa basofilia, nucléolos abundantes y vacuolización prominente. Son denominados linfoblastos tipo Burkitt (**Fig. 2C**).

En la actualidad, los criterios morfológicos se consideran poco útiles en la clínica y acorde a la Organización Mundial para la Salud (OMS) se ha abandonado este parámetro desde 2008 [10].

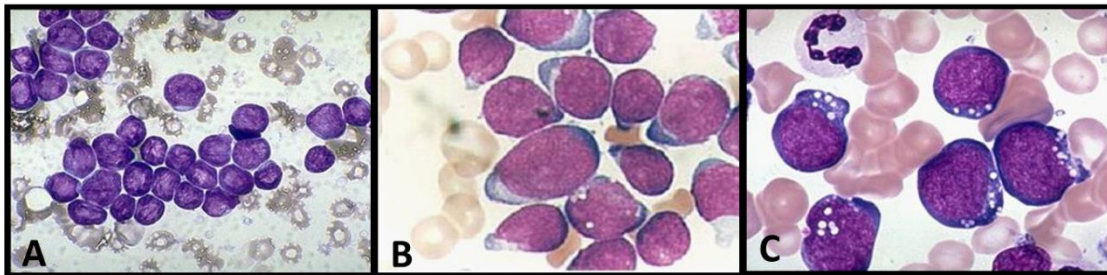


Figura 2. Clasificación Franco-Américano-Británico: A) L1, B) L2 y C) L3 . Tomado y modificado de Roganovic 2013 [22].

### *Clasificación inmunológica*

Un criterio clínico indispensable para la clasificación de la leucemia es el inmunofenotipo, el cual identifica el origen de la población clonal de células neoplásicas. Se tienen que emplear paneles que mediante citometría de flujo identifican múltiples marcadores celulares tanto de superficie como intracelulares, mismos que indican las etapas de maduración de las clonas leucémicas presentes (**Fig. 3**)[24]. Los paneles de marcadores pueden variar entre institución o centro hospitalario. El panel empleado en el hospital St. Jude emplea al menos un marcador con alta sensibilidad y especificidad para cada linaje, sea de linaje B (CD19 para sensibilidad, CD79a y CD22 para especificidad), T (CD7 para sensibilidad y CD3 para especificidad) o mielóide (linajes mixtos, CD13 y CD33 para sensibilidad y MPO para especificidad) [10]. Otros paneles como el del Grupo Europeo de Clasificación Inmunológica de Leucemias (EGIL) asignan un puntaje para determinar la especificidad de un grupo de marcadores hacia un linaje [25].

La clasificación inmunológica permite que la LAL se clasifique de acuerdo al grado de maduración en la que se encuentran detenidos los blastos leucémicos; para fines terapéuticos, principalmente se dividen en precursores de células B (preB), de células B (cel-B) maduras y de células T (Cel-T). A su vez, el subtipo pre-B se subclasifica en pro-B. Pre-B temprana y pre-B (**Tabla 1**).

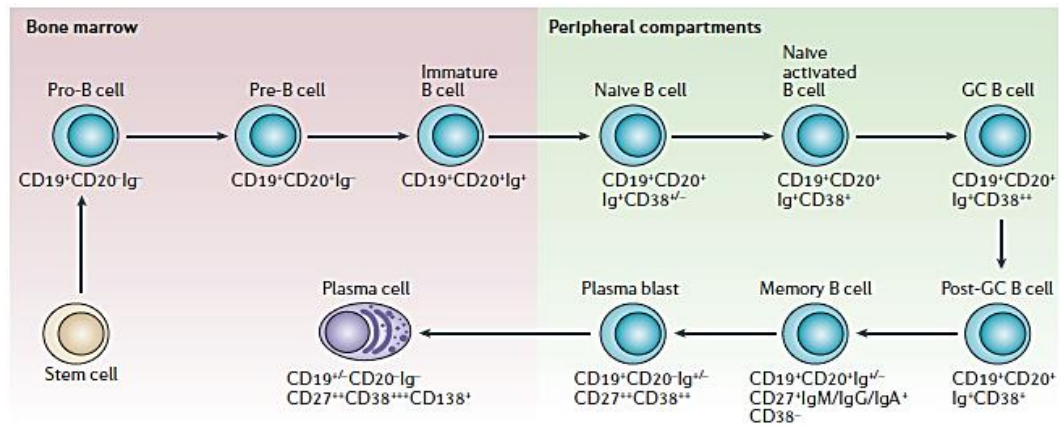


Fig. 3. Ontogenia del linfocito B. Los marcadores de superficie expresados permiten identificar las distintas etapas de maduración del linfocito B. Tomado de Edwards & Cambridge, 2006 [24].

La importancia de esta clasificación es su valor en el establecimiento del pronóstico. Las leucemias de linajes T y B maduras se consideran de mal pronóstico y alto riesgo (AR) a recaída, mientras que las Pre-B temprana y pre-B, además de ser las más frecuentes (~80% de los casos), están asociadas a factores pronóstico favorables (edad, alteraciones genéticas y cuenta leucocitaria), bajo riesgo (BR) de recaída y una buena respuesta al tratamiento [25]. La prevalencia de la LAL de linaje T representa alrededor del 12% de los casos, y aunque actualmente se han descrito subtipos asociados a un curso clínico en particular, se considera en general de mal pronóstico. En ocasiones pueden presentarse leucemias de linaje mixto o bifenotípicas (marcadores mieloides en leucemias linfoides y viceversa), que aunque representan una minoría están asociadas a mal pronóstico [26].



Tabla 1. Clasificación inmunológica de la leucemia aguda linfoblástica infantil.

SUBTIPO	MARCADORES	FRECUENCIA (%)
<b>Precusores B</b>	CD19+, CD22+, CD79a+, cIg±, sIgμ+, HLA-DR+	
- <b>Pro-B</b>	CD10-	5
- <b>Pre-B temprana</b>	CD10+	63
- <b>Pre-B</b>	CD10±, cIg+	16
<b>B madura</b>	CD19+, CD22+, CD79a+, cIg+, sIgμ+, sIgK+	3
<b>Linaje T</b>	CD7+, cCD3+	
- <b>Células T</b>	CD2+, CD1±, CD4±, CD8±, TdT±, HLA-DR-	10
- <b>PreT</b>	CD2-, CD1-, CD4-, CD8-, TdT+, HLA-DR±	1
- <b>PreT temprana</b>	CD1-, CD8-, CD5 <sup>weak</sup> , CD13+, CD33+, CD11b+, CD117+, CD65+, HLA-DR+	2

cIg: Inmunoglobulina citoplasmática, sIg: Inmunoglobulina de superficie, TdT: Desoxinucleotidil-transferasa terminal. Tomado de Larson, 2016 [10].

## Etiología de LAL

Al igual que otras neoplasias malignas, la LAL surge mediante un proceso de múltiples pasos en el que una célula somática sufre alteraciones genéticas que contribuyen individualmente para su transformación maligna [10]. A pesar de los esfuerzos destinados a desarrollar estudios epidemiológicos que puedan ofrecer pistas acerca de los agentes etiológicos y de susceptibilidad para desarrollar la enfermedad, no existe un solo agente causal que haya sido identificado. Lo que es muy claro, es que en el desarrollo de la LAL participan tanto factores genéticos como ambientales.

### *Factores ambientales*

Uno de los primeros factores ambientales propuestos como agente predisponente de la LAL fue la exposición a radiación ionizante, específicamente a rayos X durante la gestación [27]. Posteriormente se reportó que agentes alquilantes como el benceno y otros compuestos químicos

también incrementaban el riesgo a padecer LAL [28]. Otros factores sugeridos son la exposición a radiación electromagnética, exposición a pesticidas, consumo de tabaco o alcohol durante el embarazo, entre otros [29]. El sobrepeso y la desnutrición son otros factores que han sido asociados al riesgo a desarrollar leucemias linfoides en edades tempranas [30].

### ***Factores genéticos***

Algunos síndromes con predisposición genética se han asociado a un mayor riesgo a desarrollar LAL y LAM como el síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom y ataxia telangectasia, citando algunos. Sin embargo, estos síndromes sólo explican un porcentaje muy bajo de todos los casos con leucemia [10, 31].

Mediante estudios de asociación de genoma completo (GWAS) se ha revelado que polimorfismos de un solo nucleótido (SNP por sus siglas en inglés) pueden conferir riesgo a desarrollar la leucemia, pero los SNPs de riesgo varían entre los diferentes grupos étnicos. Los más conocidos se encuentran en genes que participan en la hematopoyesis y en la regulación del ciclo celular, como *IKZF1*, *ARID5B*, *CEBPE*, *CDNK2A* y *GATA3* [32-36]. Es de hacer notar, que las variantes más consistentemente asociadas al riesgo a padecer LAL se encuentran en el gen *ARID5B*; de hecho se ha reportado que estas variantes tienen una mayor frecuencia en poblaciones hispanas y han sido asociadas significativamente al desarrollo de LAL y un mayor riesgo a recaída [34, 36, 37].

### **Genética de la LAL**

Las alteraciones genéticas son el sello distintivo de esta enfermedad, ya que definen subtipos característicos en LAL. Entre ellos se encuentran la ganancia o pérdida de cromosomas (aneuploidías), translocaciones cromosómicas, inserciones/deleciones (Indels), mutaciones puntuales y variaciones en el número de copias (CNV por sus siglas en inglés).

### ***Aneuploidias***

Las alteraciones en el número de cromosomas o aneuploidias son un fenómeno común en LAL, constituyendo más del 21% de los casos pediátricos. Dentro de las aneuploidías, las de mayor valor pronóstico son las hiperdiploidías (más de 50 cromosomas) y las hipodiploidías (menos de 45 cromosomas). Las hiperdiploidías son las más frecuentes (presentes hasta en un 30% de los casos) y generalmente involucran la ganancia de los cromosomas 4, 10, 14, 17 y 21 [38]. Las hiperdiploidías están asociadas a inmunofenotipo pre-B, baja cuenta leucocitaria y edad de 1 a 10 años y por ende a buen pronóstico [10]. Por su parte, las hipodiploidías son poco comunes, representando menos del 3% de los casos; sin embargo, su pronóstico es excepcionalmente pobre y se encuentran frecuentemente asociados a cuenta elevada de leucocitos en sangre periférica y a la presencia de mutaciones en el gen *p53* [39, 40].

### ***Translocaciones***

De todas las alteraciones genéticas en esta leucemia, las translocaciones son las mejor descritas y con mayor relevancia clínica. Algunos de estos rearrreglos génicos resultan en la expresión de genes quiméricos que alteran la función normal de factores de transcripción o reguladores epigenéticos, generan proteínas con actividad constitutiva, etc. [11]. Los rearrreglos génicos están presentes en más del 40% de los casos con LAL de poblaciones caucásicas (**Fig. 4**) [41]. Los rearrreglos génicos con mayor relevancia pronóstica en LAL de células pre-B son: a) *ETV6-RUNX1*, b) *TCF3-PBX1*, c) *BCR-ABL* y d) rearrreglos en el gen *MLL*. En la LAL de células T los reordenamientos genéticos más comunes implican a los receptores de las cel-T (14q11.2: TCR- $\alpha$  y TCR- $\delta$ , 7q34: TCRB y 7p14-15: TCR- $\gamma$ ) [11].

**a) Gen *ETV6-RUNX1*:** La fusión génica *ETV6-RUNX1* (t(12;21)(p13;q22)), también llamado *TEL-AML1*, es la anomalía estructural más frecuente en LAL, presentándose en el 20-25% de los casos, aunque su frecuencia varía en distintas poblaciones [41]. El gen *ETV6* (*TEL*) está localizado en la banda 12p13.1 y tiene un papel fundamental en el establecimiento de la

hematopoyesis definitiva en todos los linajes en la médula ósea; se han identificado más de 30 fusiones génicas que involucran a este gen, pero es con el gen *RUNX1* con el que comúnmente se encuentra translocado [42]. *RUNX1* (*AML1*, *CBFA2*) es un factor de transcripción involucrado en la generación y maduración de progenitores hematopoyéticos y el establecimiento de la hematopoyesis definitiva en el embrión [43]. La fusión entre *ETV6* y *RUNX1* mantiene la capacidad de reconocimiento de secuencias blanco de *RUNX1*, induciendo la desregulación génica de ellos mediante un mecanismo de represión transcripcional y por lo tanto impide la maduración de las células portadoras de esta translocación [44]. *ETV6-RUNX1* es considerado un rearrreglo génico de buen pronóstico, asociado a inmunofenotipo pre-B, hiperdiploidías y con tasas de remisión clínica post-tratamiento de inducción de casi 100% [42]. En México, la frecuencia de este rearrreglo génico es una de las más bajas reportadas en todo el mundo, estando presente en el 7 al 13.5% de los casos [45-47].

**b) Gen *TCF3-PBX1*:** La translocación *TCF3-PBX1* (t(1;19)(q23;p13)) es también una de las más frecuentes en la LAL pre-B. Ambos genes son factores de transcripción, *TCF3* (*E2A*) es un regulador maestro de genes involucrados en la linfopoyesis de células B y *PBX1* es un regulador de la expresión de genes de la familia *HOX* [48]. La fusión génica *TCF3-PBX1* transforma a la célula de varias formas: por un lado, la pérdida de función de *TCF3* arresta la maduración de las células pro-B temprana y por otro lado, actúa como un potente activador transcripcional (*PBX1* no es expresado en el compartimento linfóide y carece de función por sí solo) induciendo expresión ectópica de genes blanco de *PBX1* [48, 49]. El gen *TCF3-PBX1* está presente en el 2 al 11.5% de los casos de LAL, aunque su frecuencia varía entre las distintas poblaciones (más común en afroamericanos, 12%) [41, 46]. Los pacientes con esta fusión génica generalmente presentan cuenta leucocitaria elevada y recaída al sistema nervioso central (SNC), pero bajo los regímenes actuales de quimioterapia se considera un rearrreglo génico de buen pronóstico [10]. En nuestro país, la prevalencia reportada de *TCF3-PBX1* varía desde un 7 a 11.5% de los casos de LAL pre-B [46, 47].

c) **Gen *BCR-ABL1***: Esta fusión génica (t(9;22)(q34;q11.2)) involucra a los genes *BCR-ABL1* y surge de la translocación entre los brazos largos del cromosoma 9 y 22 dando como resultado un cromosoma 22 más corto, denominado cromosoma Philadelphia (Ph) por la ciudad donde se descubrió [50]. En LAL es más común en adultos (una cuarta parte de los casos) pero infrecuente en niños (2-4% de los casos) [51]. En nuestro país, la frecuencia de *BCR-ABL1* va del 2 al 4%, por lo que no difiere significativamente de lo reportado en otras poblaciones [47-47, 52-53].

*BCR-ABL1* es una proteína tirosina cinasa (TC) que se encuentra activa constitutivamente y cuya capacidad de autofosforilación es independiente de los estímulos por citocinas. Así, su actividad, desregula procesos celulares vitales como el control de la proliferación, diferenciación, y sobrevivencia celular [54]. Esta fusión génica ha sido asociada a mal pronóstico y alta probabilidad de recaída, por lo que el tratamiento de estos niños contemplaba quimioterapia más intensa y trasplante de células troncales y progenitoras hematopoyéticas (CTPH) [4]. El pronóstico de estos pacientes ha mejorado notablemente con el uso de inhibidores de TC (ITC) como el imatinib y dasatinib, administrados en conjunto con protocolos de quimioterapia intensa [55].

d) **Gen *MLL***: El gen *MLL* (del inglés Mixed-Lineage Leukemia, también llamado *KMT2A*) codifica para una proteína esencial para el desarrollo temprano y la hematopoyesis que forma parte de un complejo con actividad metiltransferasa, específicamente de la trimetilación de la histona 3 en el residuo de lisina H3K4 [56]. Se han identificado más de 50 fusiones génicas que involucran a este gen, tanto en leucemias linfoides como mieloides [57]. En LAL, los rearrreglos del gen *MLL* se encuentran hasta en el 6% de los pacientes, siendo *MLL-AF4* (t(4;11)(q21;q23)) la fusión génica más común [11, 41]. La presencia de rearrreglos de *MLL* se asocia a hiperleucocitosis, edad menor a 1 año (especialmente <6 meses) y mal pronóstico [58]. Se ha establecido mediante perfiles de expresión que este subtipo constituye una entidad única y es uno de los tipos de cáncer con las menores tasas de mutación reportadas [59].

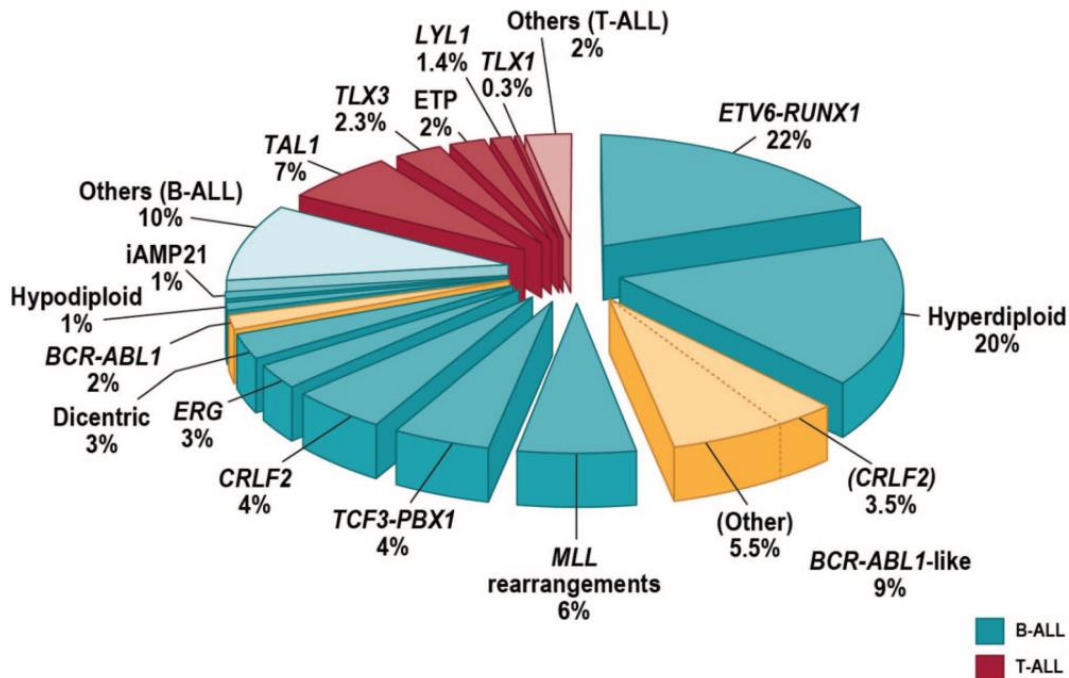


Fig. 4. Frecuencia de las alteraciones genéticas más comunes en la LAL infantil. Tomado de Mullighan, 2012 [41].

#### *Alteraciones en el número de copias, microdeleciones y mutaciones puntuales*

Se ha demostrado mediante ensayos funcionales y de secuenciación del genoma que las alteraciones en el número de copias (del inglés “*Copy number alterations*” o CNA), mutaciones puntuales y microdeleciones son comunes en el establecimiento de la leucemia [60]. Especialmente en la LAL pre-B, las alteraciones más frecuentes involucran importantes reguladores de la linfopoyesis como *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* y *LMO*, que al estar mutados impiden la maduración de los precursores linfoides [11]. *PAX5* es blanco frecuente de translocaciones, deleciones y mutaciones puntuales hasta en el 30% de los casos de LAL-pre-B, y se ha sugerido que el curso clínico es sumamente distinto en función del tipo de alteración [61]. Los genes *EBF1* e *IKZF1* tienen un papel crucial en el desarrollo del linfocito B pero actúan en etapas más tempranas de la linfopoyesis. Las deleciones en estos genes pueden estar presentes desde el inicio de la enfermedad pero son más frecuentes en los casos con recaída [62-64]. Otros genes implicados involucran frecuentemente reguladores del ciclo celular y supresores de tumor

(*CDKN2A/B*, *PTEN*, *RBI*), receptores de superficie y proteínas con actividad tirosina cinasa (*CRLF2*, *EPOR*, *IL7R*, *ABL1*, *JAK2*, *KRAS*, *NRAS*). La identificación de mutaciones en estos genes ha permitido identificar más subtipos moleculares con valor pronóstico, especialmente con el uso de tecnologías de alto rendimiento como la secuenciación masiva [41].

A diferencia de la LAL de linaje B, la LAL de células-T no está del todo caracterizada. Sin embargo, se ha reportado que los genes frecuentemente mutados son *NOTCH1*, *PTEN*, *RBI*, entre otros [11]. Entre éstos, se encuentran algunos genes relacionados a la regulación y maduración linfoide como *RUNX1*, *IKZF1*, *GATA3* y *EP300*, genes de la vía RAS, receptores de citocinas como *IL7R*, *KRAS*, *NRAS*, *JAK* y *NF1*, y reguladores epigenéticos como los del complejo polycomb *PRC2* y *SETD2* [11]. Con estudios de expresión génica se ha determinado que la LAL-T es una entidad sumamente heterogénea, y aunque es posible identificar subtipos moleculares, el mayor número de casos no poseen rearrreglos génicos que los identifiquen como ocurre con la LAL pre-B [65]. Además, su perfil transcripcional es muy similar a precursores hematopoyéticos y leucemias mieloides, por lo que se sugiere que este subtipo surge de un progenitor primitivo con potencial de linaje múltiple [65-66].

## **Clasificación de riesgo, pronóstico y tratamiento en LAL**

### ***Clasificación de riesgo***

Actualmente, el mejor abordaje para el tratamiento de la LAL está basado en una clasificación que evalúa el riesgo de un paciente a recaer a la enfermedad. Esta clasificación emplea criterios clínicos como la edad y cuenta leucocitaria al diagnóstico, así como criterios inmunológicos, citogenéticos y moleculares. Con base en ello, generalmente se identifican dos grupos de riesgo: bajo riesgo (BR o también llamado riesgo estándar o habitual) y alto riesgo (AR). Cabe mencionar que algunas instituciones de salud también consideran a los grupos de riesgo intermedio y muy alto riesgo [67, 68]. La clasificación de riesgo permite regular la intensidad de un tratamiento, siendo mayor en pacientes con alto riesgo a recaída [10]. Acorde a los criterios del Instituto Nacional de Cáncer (NCI del inglés National Cancer Institute) de los Estados Unidos, los parámetros mínimos para considerar a un paciente como de bajo riesgo a

recaer son: una edad entre 1 a 9 años y cuenta leucocitaria menor a  $50 \times 10^9 /L$  al diagnóstico. Las alteraciones genéticas (*ETV6-RUNX1*, hiperdiploidías) e inmunofenotipo pre-B complementan la clasificación de buen pronóstico [69, 70]. Por otra parte, los pacientes menores de 1 año y  $\geq 10$  años de edad, cuenta leucocitaria mayor a  $50 \times 10^9 /L$  e inmunofenotipo de células B, cel-T y bifenotípicas se consideran de alto riesgo. Las alteraciones genéticas identificadas como de mal pronóstico son las hipodiploidías, las translocaciones *BCR-ABL1* y los rearrreglos del gen *MLL*; éste último es más frecuente en pacientes menores de un año de edad [10, 26, 71] [Tabla 2].

Tabla 2. Clasificación de riesgo empleada para los protocolos de tratamiento del hospital St. Jude (Memphis TN, EE. UU.).

GRUPO DE RIESGO	CARACTERÍSTICAS
Bajo riesgo (riesgo estándar)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Edad entre 1 a &lt;10 años</li> <li>- Cuenta leucocitaria en sangre periférica menor a <math>50 \times 10^9 /L</math></li> <li>- <i>ETV6-RUNX1+</i>, <i>TCF3-PBX1+</i><sup>1</sup></li> <li>- Hiperdiploidías (&gt; 50 cromosomas)</li> <li>- Inmunofenotipo de precursores B</li> </ul>
Alto riesgo	<ul style="list-style-type: none"> <li>- &lt;1 y <math>\geq 10</math> años</li> <li>- Cuenta leucocitaria en sangre periférica mayor a <math>50 \times 10^9 /L</math></li> <li>- <i>BCR-ABL1+</i>, <i>MLL-r+</i></li> <li>- Hipodiploidías (&lt; 45 cromosomas)</li> <li>- Inmunofenotipo de células B maduras y linajes T</li> </ul>
Muy alto riesgo <sup>2</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Fallo de inducción a la remisión</li> <li>- <math>\geq 1\%</math> de blastos en MO (EMR) 6 meses después del tx de inducción</li> </ul>

1. Rearreglo génico considerado de buen pronóstico con protocolos de quimioterapia intensa. 2. Solo establecido bajo el monitoreo de enfermedad mínima residual (EMR).

Tomado de Larson 2016 [10]



## *Tratamiento*

El tratamiento en LAL consiste principalmente de tres etapas: inducción a la remisión, intensificación [o consolidación] y mantenimiento.

- a) Inducción a la remisión: tiene como objetivo alcanzar la remisión clínica de los síntomas y restaurar la hematopoyesis. Esta fase emplea el uso de glucocorticoides (prednisona, dexametasona), vincristina, l-asparaginasa, antraciclina (doxorubicina o daunorrubicina) y metotrexato intratecal, este último indistinto del grupo de riesgo [72]. En pacientes de alto riesgo se administran dosis de radioterapia intracraneal, aunque algunos consideran que debido a las complicaciones y secuelas generadas es preciso reconsiderar la persistencia del uso de radioterapia [73]. Pacientes *BCR-ABL* positivos también son candidatos a ser tratados con inhibidores de tirosina cinasa como el imatinib, mejorando significativamente las tasas de supervivencia de los pacientes [51, 74].
- b) Intensificación (consolidación): una vez alcanzada la remisión clínica (inmediatamente al término del tratamiento de inducción), el paciente es candidato a la fase de intensificación. Suelen emplearse los mismos fármacos que la terapia de inducción, pero a diferentes dosis y pulsos de administración, y a diferencia de los pacientes clasificados como de bajo riesgo, a los pacientes de alto riesgo se les continúa administrando antraciclina [72]. Los pacientes de alto riesgo, principalmente aquellos *BCR-ABL*<sup>+</sup> y sin respuesta favorable al tratamiento de inducción pueden ser sometidos a trasplante de CTPH [54, 75].
- c) Mantenimiento: tiene como objetivo la eliminación de las células leucémicas residuales, reduciendo así el riesgo de recaída. Los principales fármacos administrados son la mercaptopurina (diariamente) y metotrexato (semanal), vincristina y prednisona (el cual varía en dosis dependiendo del grupo de riesgo) [70].
- d) Terapias dirigidas: actualmente, con el uso de terapias dirigidas como los inhibidores de tirosina cinasa para pacientes con la fusión *BCR-ABL*, se han mejorado significativamente las tasas de supervivencia sin la necesidad de trasplantes de CTPH [51, 74].

## Recaída en LAL

La recaída es sin duda el mayor obstáculo a enfrentar para disminuir los índices de mortalidad por esta enfermedad. Aproximadamente un 20% de los niños diagnosticados con LAL la presentan, de tal forma que el mal pronóstico con el que cursan estos pacientes aunado a la alta incidencia de la LAL, convierten a la recaída en una de las principales causas de muerte por cáncer infantil en todo el mundo [76]. La recaída se sospecha cuando reaparecen signos, síntomas o hallazgos de laboratorio propios de la enfermedad tras haberse logrado la remisión completa. Los sitios más comunes de la recaída son la MO, SNC, testículos y ovarios [77, 78]. El tiempo a la recaída es el mejor predictor de pronóstico, mediante el cual se pueden clasificar en tres grupos:

- a) Recaídas muy tempranas: durante los primeros 18 meses después del diagnóstico inicial.
- b) Recaídas tempranas: posterior a los 18 meses después del diagnóstico inicial, pero durante los primeros 6 meses después de finalizado el tratamiento de quimioterapia de primera línea.
- c) Recaídas tardías: posterior a los 6 meses de finalizado el tratamiento de quimioterapia de primera línea.

Las recaídas muy tempranas tienen el peor pronóstico, con una sobrevida que no supera el 15% [79]. El sitio de recaída es otro predictor de pronóstico; así, la recaída en MO aislada, además de ser la más frecuente (40%), tiene el peor pronóstico (sobrevida general de ~25% a 5 años) [78]. El segundo sitio de recaída más común es el SNC (aprox. 20%), con una sobrevida significativamente mayor (~60% de sobrevida general a 5 años) al grupo de recaída a MO. Los blastos leucémicos en la recaída suelen ser más resistentes a la quimioterapia, pudiendo surgir a partir de clonas presentes al diagnóstico o de nuevas poblaciones como resultado del tratamiento [80]. En LAL pre-B, son comunes las deleciones o alteraciones en el número de copias (CNA) en genes relacionados con el desarrollo del linfocito B como *EBF1*, *IKZF1*, *ETV6*, *TCF3* y *CDKN2A/2B* [62, 63]. Otras alteraciones importantes por su papel en el metabolismo de fármacos como *MSH6*, *NT5C2*, *CREBBP*, han aportado información relevante en la clínica por

estar potencialmente involucrados en mecanismos de quimiorresistencia [81-83]. Estos avances demuestran las grandes ventajas de emplear herramientas de análisis masivo para el estudio de la recaída en la LAL.

### Nuevas herramientas en la clasificación de riesgo: análisis del transcriptoma

El desarrollo de nuevas tecnologías de análisis masivo como los análisis de expresión (microarreglos, RNA-seq), secuenciación de genoma completo y exoma, fue un parteaguas en el estudio de enfermedades complejas como el cáncer. Estas herramientas han revelado la heterogeneidad genética de la LAL, donde además de las fusiones génicas ya descritas, las células leucémicas presentan mutaciones puntuales, microdeleciones, CNA, y otras translocaciones poco frecuentes que podrían tener implicaciones relevantes en la conducta clínica de la enfermedad [41]. Los análisis de expresión génica permiten evaluar la expresión de miles de genes de manera simultánea, y el uso de microarreglos en el estudio del cáncer representó un gran avance para describir nuevos subtipos tumorales, hallar firmas de expresión con relevancia clínica e identificar nuevos blancos terapéuticos [84]. En la LAL, los primeros abordajes con microarreglos de expresión demostraron que se pueden identificar con alta eficacia los distintos subtipos moleculares de la enfermedad [85, 86]. Además, fue posible identificar pacientes con subtipos moleculares no caracterizados previamente, pacientes con riesgo a recaída y casos que presentaron pobre respuesta al tratamiento (**Fig. 5**) [67, 87].

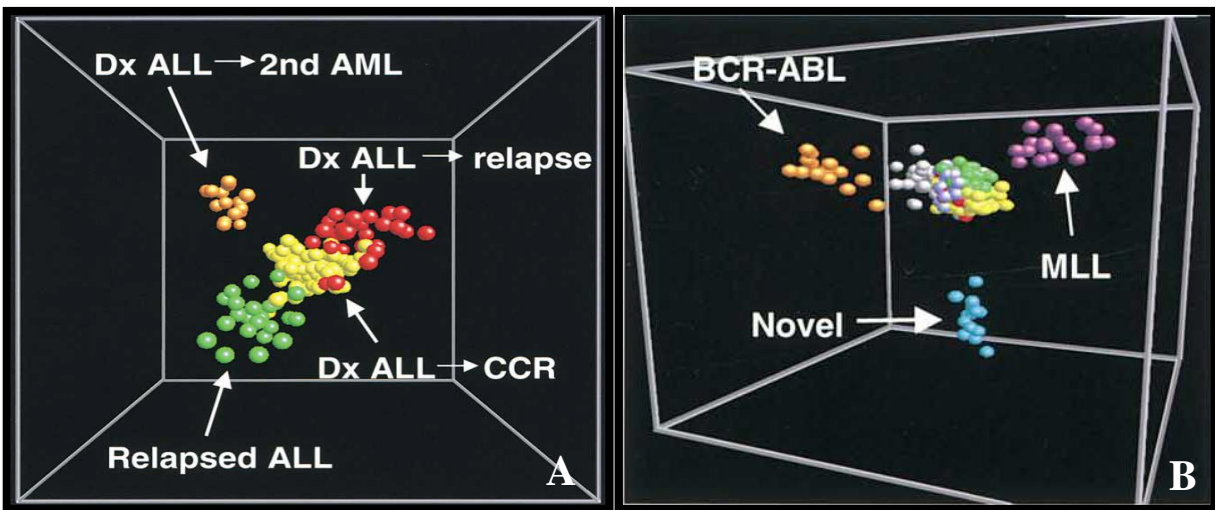


Fig. 5. Gráfica de escalamiento multidimensional [EMD] de los datos de expresión de pacientes con LAL infantil. **A.** Se distinguen subgrupos de pacientes con riesgo a recaída y pacientes en riesgo a desarrollar una segunda neoplasia de aquellos que alcanzarán la remisión clínica [n=274]. **B.** EMD que permite distinguir subtipos con translocaciones definidas e identificar nuevos subtipos no caracterizados [n=327]. Tomado y modificado de Yeoh et al., 2002 [87].

### Subtipos moleculares de LAL

La identificación del subtipo denominado “Philadelphia-like” (Ph-like), fue uno de los mayores hallazgos en el estudio de la LAL mediante microarreglos de expresión. Este subtipo, tiene un perfil de expresión similar a *BCR-ABL1*+ pero los pacientes son negativos a esta translocación [88, 89]. Ph-like se caracteriza por tener un gran número de alteraciones (que fueron detectadas mediante secuenciación de nueva generación) en proteínas activadoras de cinasas. Su frecuencia varía por etnicidad, siendo más común en poblaciones hispanas en EE.UU. [90, 91] [Fig. 6]. La identificación del subtipo Ph-like tiene gran relevancia clínica porque los pacientes positivos responden a tratamiento con ITC.

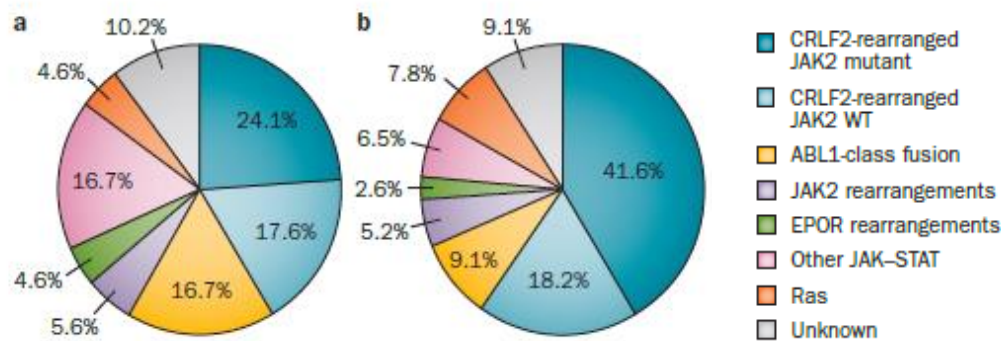


Fig. 6. Frecuencia de alteraciones genéticas presentes en niños [a] y adolescentes [b] con el subtipo Ph-like. Tomado y modificado de Roberts & Mullighan, 2015 [11].

Otros subtipos moleculares descritos mediante perfiles de expresión, son los caracterizados por rearrreglos del gen *CRFL2* (también observado en pacientes negativos a Ph-like) y por mutaciones en el gen *JAK*, las cuales facilitan la inducción constitutiva de la vía JAK-STAT ambas asociadas a mal pronóstico. Las mutaciones en el gen *ERG* y la amplificación del cromosoma 21 también definen firmas moleculares identificables mediante análisis de expresión [11].

### *Perfiles de expresión génica y recaída*

El análisis del transcriptoma también ha sido muy útil en el estudio de las recaídas. Se ha demostrado que los mecanismos moleculares implicados varían sustancialmente en función del tiempo en el que ocurre la recaída. Las recaídas tempranas, tienen perfiles de expresión muy similares a la observada al diagnóstico, en donde las vías alteradas son aquellas relacionadas con proliferación y supervivencia celular, principalmente. Lo anterior sugiere que la población de blastos que originan la recaída está presente desde el inicio de la enfermedad y que no fue erradicada por el tratamiento [92, 93].

Por lo anterior, los análisis de expresión han demostrado ser una herramienta útil no sólo para comprender los mecanismos biológicos de la enfermedad, sino también para la búsqueda de nuevos marcadores moleculares y blancos terapéuticos que impacten directamente en la clínica, con el fin de implementar una clasificación más asertiva que permita identificar oportunamente a aquellos pacientes con alto riesgo a recaída.

### **Epidemiología de LAL en México**

En 2012, las leucemias representaron aproximadamente el 49.8% del cáncer de la niñez en México, con una incidencia de 78 casos por millón de habitantes [94]; siendo La LAL la más prevalente (85% de todas las leucemias) [29]. En diversos estudios se ha reportado que México es uno de los países con mayor incidencia de LAL, con tasas de mortalidad que han ido en aumento y que son las mayores de cualquier país de América Latina [95]. La incidencia en nuestro país es diferente a poblaciones caucásicas y afroamericanas, pero similar a las poblaciones de hispanos en Estados Unidos, particularmente en la distribución de la LAL pre-B [96]. El grupo etario con mayor incidencia es el de 1-4 años de edad; sin embargo en nuestro país se han detectado picos de incidencia en niños de 6 a 8 años de edad (**Fig. 7**) [29]. La mortalidad por LAL también representa un gran problema en nuestro país, ya que mientras que en países desarrollados la supervivencia a 5 años es superior al 85%, en México existen reportes de supervivencia de solo 64% a 4 años de seguimiento [72]. A lo anterior se le suma la alta proporción de casos clasificados como alto riesgo, lo cual es significativamente mayor a lo reportado en países

desarrollados (58% vs 25%, respectivamente) [29, 97]. Estas tasas de mortalidad son a pesar de que en nuestro país se usan los mismos criterios de clasificación que se emplean en los países desarrollados. Por lo tanto, es posible que nuestra población con LAL tenga alteraciones genéticas intrínsecas a la heterogeneidad genética de la población mexicana que expliquen parcialmente el comportamiento en la mortalidad y en la proporción de pacientes con alto riesgo a recaer. De hecho, en México el grupo de bajo riesgo es el que tiene mayor frecuencia de recaídas, principalmente recaídas tempranas, en comparación con el grupo de alto riesgo (25.3% vs 19.2%) [72].

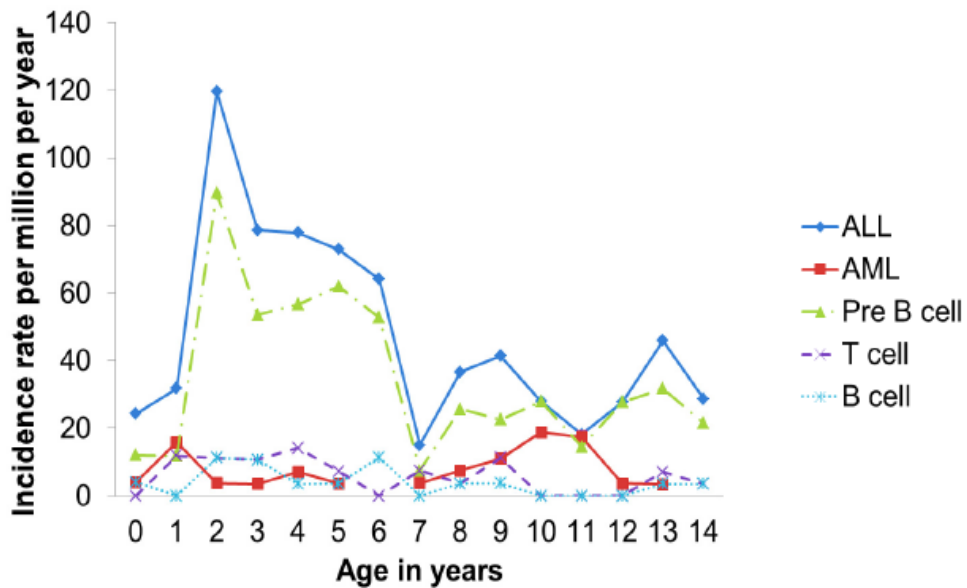


Fig. 7. Incidencia por grupo de edad de las leucemias infantiles reportadas en la Ciudad de México de 2006 a 2007. Tomado de Pérez Saldivar et al., 2011 [29].

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La LAL infantil es uno de los mayores éxitos en el tratamiento del cáncer en la actualidad y a nivel mundial se han logrado importantes avances en la disminución de las tasas de mortalidad por esta enfermedad. La clasificación de riesgo es probablemente la base de este éxito, bajo estos criterios se asigna un tratamiento de mayor intensidad a un paciente que se considera de alto riesgo a recaída. Sin embargo, aunque esta clasificación ha probado ser efectiva para establecer el pronóstico de un paciente, no es infalible y todavía un porcentaje de niños clasificados como de buen pronóstico recaen y mueren. Esto ha quedado demostrado en nuestro país, en donde bajo los mismos criterios de clasificación empleados en todo el mundo, la tasa de mortalidad de los niños mexicanos con LAL aún es elevada. Aún más, los casos clasificados como alto riesgo en nuestro país corresponden a poco más de la mitad de todos los casos, un porcentaje significativamente mayor a lo reportado en países desarrollados (58% vs 25%, respectivamente) [29, 97]. Así mismo, el grupo de bajo riesgo es el que tiene mayor frecuencia de recaídas (25.3% vs 19.2%) que el grupo de alto riesgo, principalmente recaídas tempranas y a MO aislada [72]. Por otro lado, diversos reportes en México apuntan a que las frecuencias de estas fusiones génicas de valor pronóstico es distinta en comparación con otras poblaciones, como el caso de *ETV6-RUNX1* (considerado de buen pronóstico) que está presente en el 7-11% en niños mexicanos con LAL vs 25% en el resto del mundo [36, 46]. Así, considerando que en nuestro país existe un alto porcentaje de casos de mal pronóstico y aunado a la baja frecuencia de biomarcadores moleculares de buen pronóstico, es posible que los criterios de clasificación de riesgo usado en nuestro país no sean lo suficientemente precisos. Además, existe la posibilidad de que existan biomarcadores privativos de la población mexicana. Sin duda, identificar mejores estrategias de clasificación permitirá mejorar los abordajes terapéuticos y evitar el sobre o subtratamiento de los pacientes con esta enfermedad. Los avances logrados en países desarrollados se deben en buena medida al uso de herramientas de análisis masivo como los análisis de expresión, que han servido para diseñar una estratificación pronóstica más precisa. En este proyecto se pretende identificar potenciales biomarcadores que permitan detectar pacientes con alto riesgo de recaída, con la finalidad de que estos puedan ser clasificados y tratados oportunamente, disminuyendo las probabilidades de recaída y por tanto incrementar su supervivencia.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Identificar genes diferencialmente expresados entre la leucemia aguda linfoblástica de bajo y de alto riesgo a recaída e identificar potenciales biomarcadores de recaída.

### Objetivos particulares

- 1) Determinar si los grupos de riesgo definidos clínicamente presentan distintos perfiles de expresión génica.
- 2) Correlacionar los perfiles de expresión génica con parámetros clínicos y moleculares a nivel pronóstico.
- 3) Identificar patrones de expresión génica en pacientes negativos a las fusiones génicas *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*.
- 4) Identificar perfiles de expresión génica potencialmente involucrados en recaída.
- 5) Validar los resultados obtenidos por microarreglos de expresión de los genes con mayor valor de significancia y anormalmente expresados en pacientes con recaída.

## ESTRATEGIA GENERAL

### Población de estudio

Se realizó un estudio de cohorte y multicéntrico, en el que se incluyeron pacientes pediátricos diagnosticados con LAL *de novo* que fueron tratados en diversos hospitales públicos de la Ciudad de México. El estudio incluyó a los pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de selección:

### Criterios de inclusion

1. Pacientes de 1 a 17 años con diagnóstico clínico de LAL *de novo*.



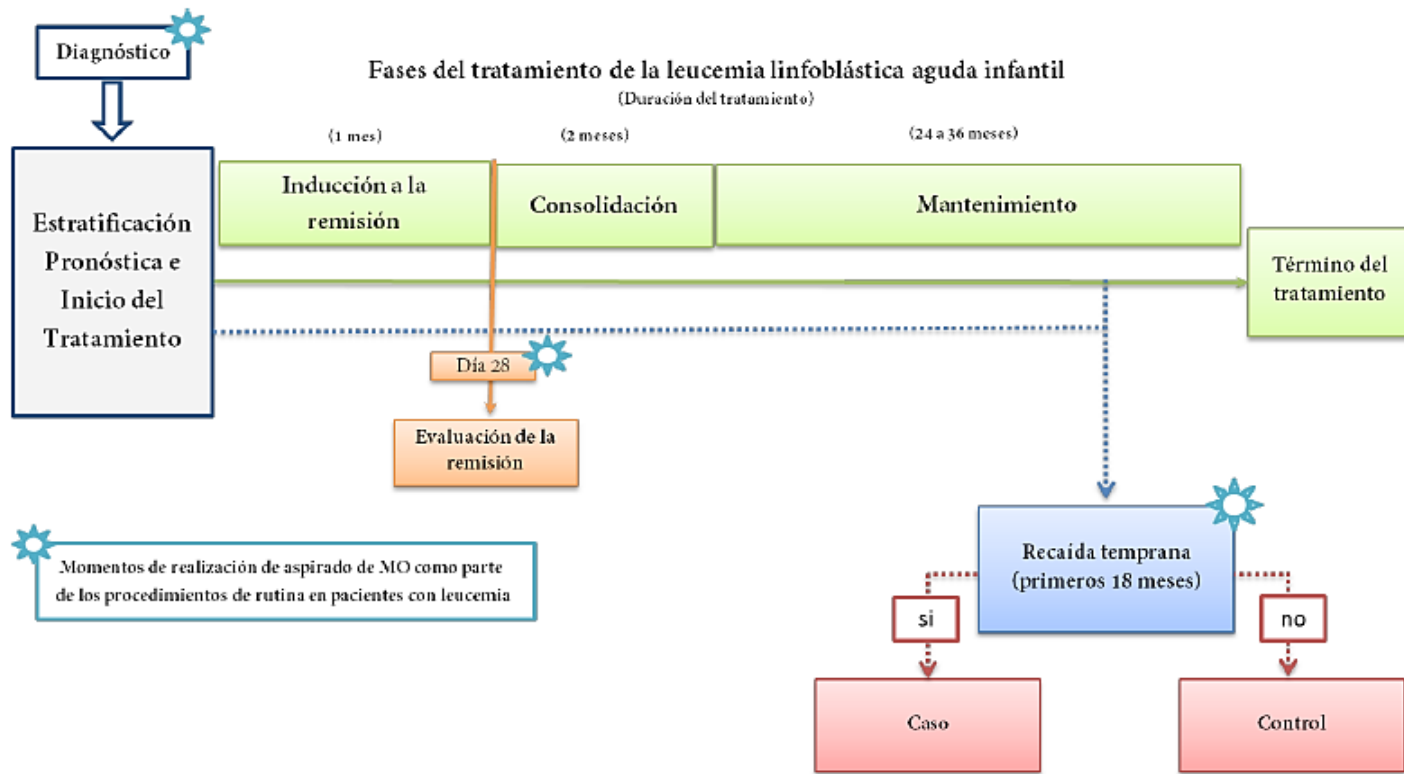
2. Pacientes con datos de inmunofenotipo pre-B y moleculares (*BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*).
3. Sin tratamiento previo de quimioterapia o prednisona.
4. Pacientes cuyos padres o tutores aceptaron participar en el estudio mediante firma de consentimiento informado.
5. De cualquier entidad federativa.

### **Criterios de exclusion**

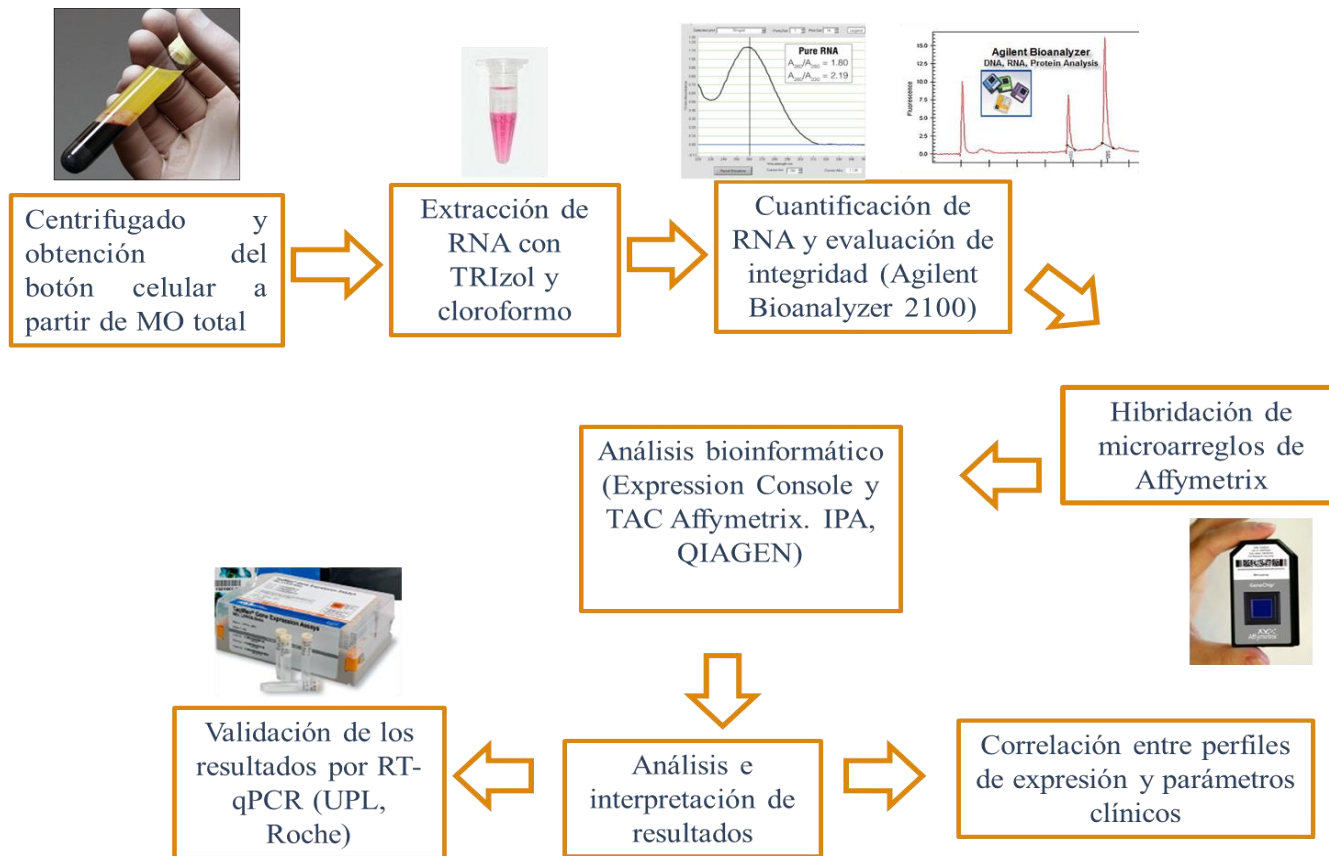
1. Pacientes con una entidad genética por aneuploidías cromosómicas (Síndrome de Down, Síndrome de Turner, etc).
2. Pacientes con entidades concomitantes a LAL (secundarias a infecciones como fiebre, dolor óseo, presencia de neoplasias secundarias).
3. Pacientes con trasplante de MO (por razones ajenas a LAL) dentro de los tres meses previos a la toma de muestra de MO.
4. Pacientes con diagnóstico de LAL como segunda neoplasia.
5. Pacientes con inmunofenotipo de linaje T.

### **Criterios de eliminación**

1. Pacientes que abandonaron el tratamiento.
2. Pacientes cuya muestra de RNA no cumplió con los criterios de calidad (concentración, integridad y pureza) para el análisis de expresión con microarreglos.
3. Pacientes cuyos padres no desearon continuar en el estudio después de la primera toma de muestra.



**Figura 8.** Fases de tratamiento de paciente pediátrico con LAL y momentos de toma de muestra de MO.



**Figura 9.** Metodología general del procesamiento de muestras, análisis de datos y obtención de resultados .

## METODOLOGÍA

### **Extracción y evaluación de la integridad del RNA**

A partir de muestras de MO almacenadas en TRIzol (Invitrogen, Life Technologies), se realizó la extracción de RNA mediante el método de fenol-cloroformo y siguiendo las especificaciones del proveedor [ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA]. La integridad del RNA fue evaluado por medio de electroforesis capilar mediante chips de bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara CA, EEUU). Para el análisis de microarreglos sólo se incluyeron las muestras con un valor de integridad de RNA (RIN) > 6.5.

### **Detección de los trascritos quiméricos más comunes**

La detección de los transcritos quiméricos *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL* se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología “Dr. Daniel Méndez Hernández” en el Centro Médico Nacional La Raza (IMSS). Se empleó la técnica de RT-PCR convencional, con los primers y condiciones de termociclado descritas en los protocolos previamente publicados por Bekker y cols [47, 52] .

### **Preparación del RNA e hibridación en microarreglos de expresión**

Para la síntesis de primera cadena de DNA complementario (cDNA) se utilizaron 200 ng de RNA total. La síntesis del cDNA se realizó mediante el kit Superscript II reverse transcriptase y utilizando oligonucleótidos poli (T) como primers. Posterior a la síntesis de la segunda cadena de cDNA, se realizó la síntesis y amplificación de cRNA incorporando dUTPs biotinilados y después se fragmentó con métodos enzimáticos (uracil-DNA glicosilasa, purin-pirimidin endonucleasa). En el análisis de expresión se utilizó el microarreglo de alta resolución Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) de Affymetrix, el cual evalúa la expresión de 67528 genes diferentes, entre los que se incluyen transcritos codificantes y no codificantes, isoformas, y uniones exón-exón [98]. El procesamiento de las muestras se realizó mediante GeneChip WT PLUS de Affymetrix de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Para la hibridación en el

microarreglo, se agregaron los controles endógenos y las sondas biotiniladas, seguido de procesos de lavado y tinción con el complejo estreptavidina-ficoeritrina como reportero fluorescente.

### **Procesamiento de datos crudos**

Para el análisis de datos se utilizó el software GeneChip Command de Affymetrix para la transformación de datos de fluorescencia y generación de archivos CEL. Se empleó el método de normalización por cuantiles de los archivos de intensidad con el algoritmo Robust Multi-array Average (RMA) [99].

### **Análisis exploratorios de datos, expresión diferencial y agrupamiento jerárquico**

El análisis exploratorio de los datos por componentes principales (PCA) fue realizado con el software R. Los genes diferencialmente expresados entre los distintos grupos clínicos y moleculares analizados se realizaron con el software Transcriptome Analysis Console (TAC) de Affymetrix, y se seleccionaron los genes con un fold-change (FC) de 1.2 y un ANOVA *p-value*  $\leq 0.05$  como estadísticamente significativos. Como control estadístico adicional, se aplicó la corrección por False Discovery Rate (FDR) para múltiples comparaciones (método de Benjamini-Hochberg), considerando a los genes con un *p-value* ajustado por  $FDR < 0.1$  como estadísticamente significativos [100]. Los análisis de agrupamiento jerárquico supervisado y no supervisado se realizaron con los softwares TAC y Morpheus (Broad Institute), respectivamente. El análisis de componentes principales se realizó con R (función “prcomp” y paquete rgl). Los análisis de enriquecimiento de procesos biológicos y moleculares se realizaron con los softwares de libre acceso Gene Ontology [GO] y GOrilla [101]. En el análisis de enriquecimiento de vías para identificar vías canónicas y redes biológicas representadas se utilizó el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN Redwood City).

### **Validación de los datos obtenidos por microarreglos mediante RT-qPCR**

Los resultados derivados del estudio de expresión con microarreglos fueron validados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). La comparación se realizó sólo entre las muestras al diagnóstico de pacientes con recaída temprana *versus* muestras de pacientes sin

recaída en una relación 2:1 y pareados por el grupo de riesgo al que pertenecían las recaídas. Se realizó la cuantificación absoluta (AQ) utilizando el método de curva estándar, donde el resultado promedio fue reportado. Los primers fueron diseñados con la plataforma ProbeFinder assay design software V. 2.50 (<http://www.universalprobelibrary.com>). Se emplearon sondas de hidrolisis UPL de la plataforma Universal Probe Library (Roche), y el LightCycler probe master mix (Roche). El método de cuantificación Cq (comparative cycle of quantification) fue usado para determinar el nivel de expresión génica del gen de interés. El cDNA se sintetizó a partir de 250 ng de RNA total usando random primers y el kit First strand cDNA Synthesis Kit (Roche), en una reacción a 20 µl de volumen final. El programa de termociclado fue el siguiente: 95°C por 10 min, 45 ciclos a 95°C por 10 s, 60 ciclos por 30s y 72°C por 1 segundo en el equipo LightCycler 480. *HPRT* fue usado como gen de referencia.

### **Análisis Estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS versión 21, Chicago, IL, USA, Se utilizaron las pruebas estadísticas ji-cuadrada y prueba exacta de Fisher cuando era apropiado para comparar las características clínicas, demográficas entre los grupos con y sin recaída muy temprana (RMT). Se consideró para este fin como estadísticamente significativo un valor de *p* menor a 0.05. Las pruebas de t de Student, ANOVA ( $p < 0.05$ ) y la prueba Benjamini-Hochberg se utilizaron para comparar el nivel de expresión génica entre los subgrupos analizados.

## **RESULTADOS**

### **Características clínicas y demográficas de la cohorte**

Previa autorización de los comités de ética y de investigación de los hospitales participantes se inició con la conformación de la cohorte. El momento cero de la cohorte fue al diagnóstico de primera vez de LAL, iniciando la inclusión de pacientes el 1 de agosto de 2014 al 30 de julio de 2016 (**Fig. 8**). Durante este periodo, se diagnosticaron un total de 496 niños con LAL *de novo* en todos los hospitales participantes de la Ciudad de México.

## Hospitales participantes

1. Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS).
2. Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez Santos” (Secretaría de Salud).
3. Hospital Juárez de México (Secretaría de Salud).
4. Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional la Raza (IMSS).
5. Hospital Pediátrico Moctezuma (Secretaría de Salud).
6. Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga" (Secretaría de Salud).
7. Hospital General Regional No. 1 “Carlos McGregor Sánchez Navarro” (IMSS).
8. Centro Médico Nacional 20 de Noviembre (ISSSTE)

**Inmunofenotipo:** De esta cohorte, el 90.9% de los casos fueron de linaje pre-B, mientras que el 6.9% fueron linajes T y 2.2% bifenotípicas. El 2.5% presentó infiltración a SNC al diagnóstico. En un alto porcentaje de pacientes (83.7%) no se detectó ninguno de los rearrreglos génicos analizados (*ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL1*, *TCF3-PBX1*, *MLL-r*). La fusión génica más frecuente fue *ETV6-RUNX1* representando el 8.5%, seguido de *TCF3-PBX1* (6%). *BCR-ABL1* y *MLL-r* representaron menos del 5% de los casos.

**Clasificación de riesgo:** Acorde a los criterios del NCI de clasificación de riesgo, el 47.7% de los casos fueron clasificados como alto riesgo al momento del diagnóstico.

**Mortalidad y recaídas muy tempranas:** Durante el primer año de tratamiento murieron un total de 54 pacientes (11%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de pacientes clasificados como bajo riesgo y alto riesgo ( $p=0.35$ ). Las principales causas de muerte fueron choque séptico, choque hemorrágico y progresión tumoral. El seguimiento se realizó para identificar a las recaídas muy tempranas (durante los primeros 18 meses del tratamiento). De igual manera, no hubo diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de recaída entre ambos grupos ( $p= 0.03$ )

## **Características clínicas de la cohorte incluida en el análisis de expresión**

En el presente estudio se tomó una muestra representativa de la cohorte original, compuesta por 63 pacientes. De 53 de ellos se obtuvo muestra de MO sólo al diagnóstico, de seis pacientes se obtuvo muestra al diagnóstico y a la recaída (muestras pareadas, una de ellas al día 28) y de cuatro casos sólo se obtuvo muestra al momento de la RMT. La proporción de casos del género masculino fue mayor en comparación con la población femenina (61.9% vs 38.1% respectivamente), con una media de edad de 8.91 años (mediana= 7.66 años). El 61.9% de estos pacientes fueron clasificados como de alto riesgo (61.9%), de los 42.85% fueron mayores de 10 años y 38.1% presentaron una cuenta leucocitaria mayor a  $50 \times 10^9 /L$  al diagnóstico (**Tabla 3**).

Dieciséis pacientes presentaron RMT y 51 pacientes no presentaron recaída. Las recaídas ocurrieron en promedio a los 10.6 meses después de la confirmación del diagnóstico por LAL. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la edad, sexo, cuenta leucocitaria, grupo de riesgo y rearrreglos génicos entre los grupos con y sin recaída, excepto para la mortalidad. Ésta última fue mayor en los pacientes que recayeron en comparación con el grupo control (62.5% vs 12.76%, respectivamente). Trece pacientes presentaron cuenta leucocitaria  $>100 \times 10^9 /L$  (mediana=  $154 \times 10^9 /L$ ), de los cuales el 38.5% recayó tempranamente.

Para los análisis de expresión, se recomienda controlar la variabilidad incluyendo muestras de pacientes con alto porcentaje de blastos cuando se emplea MO total [71]. El porcentaje mínimo de blastos en MO para nuestro análisis de expresión fue de 50%; sin embargo sólo 6 (5 al diagnóstico y 1 recaída) muestras presentaron menos de 75% de blastos en MO al diagnóstico. No se observaron diferencias en la variabilidad de los perfiles de expresión atribuibles al porcentaje de blastos.

## **Perfiles de expresión en pacientes de alto y bajo riesgo**

El primer objetivo fue conocer si los pacientes clasificados como de AR y BR bajo los criterios de clasificación del NCI, son definidos por perfiles de expresión. Para ello se condujo un análisis empleando solo muestras al diagnóstico (n=59), comparando los pacientes clasificados clínicamente como AR (n=35) contra los de BR (n=24).



Tabla 3. Características de la población de estudio para el análisis de expresión

Características clínicas y moleculares	n (%)
<b>Género</b>	
M	39 (61.9)
F	24 (38.1)
<b>Edad (años)</b>	
< 1	2 (3.15)
1 – 9.99	34 (54.0)
≥ 10	27 (42.85)
<b>WBC al dx (x 10<sup>9</sup> / L)</b>	
<10	19 (30.15)
10-49.99	20 (31.75)
50-99.99	8 (12.70)
≥ 100	16 (25.40)
<b>Blastos al dx (%)</b>	
≥70	59 (93.65)
<70	4 (6.35)
<b>Rearreglos génicos al dx</b>	
<i>ETV6-RUNX1</i>	6 (9.52)
<i>TCF3-PBX1</i>	5 (7.94)
<i>BCR-ABL1</i>	6 (9.52)
No detectados (ND)	46 (73.02)
<b>Clasificación de riesgo (NCI)</b>	
Alto riesgo (AR)	39 (61.90)
Bajo riesgo (BR)	24 (38.10)
<b>Recaída (muy temprana)</b>	
Sí	16 (25.40)
No	47 (74.60)
<b>Muerte</b>	
Sí	16 (25.40)
<b>Total</b>	
	63 (100)

WBC = White blood cell count (conteo leucocitario en sangre periférica)

NCI = National Cancer Institute

Mediante análisis de agrupamiento jerárquico supervisado se observó la formación de clusters correspondientes a cada grupo de riesgo y algunos pacientes mostraron un perfil de expresión correspondiente a un grupo de riesgo distinto al asignado clínicamente. Doce pacientes clasificados como AR se mezclan dentro del grupo mayoritariamente compuesto por pacientes de BR, de los cuales un tercio murió tempranamente (n=4, 33.3%) (**Fig. 10**). Este análisis demostró que 80 genes (47 codificantes y 33 no codificantes) estaban diferencialmente expresados (FC 2,

$p < 0.05$ ), de los cuales 13 genes se encontraron sobre-expresados y 67 sub-expresados en el grupo de AR.

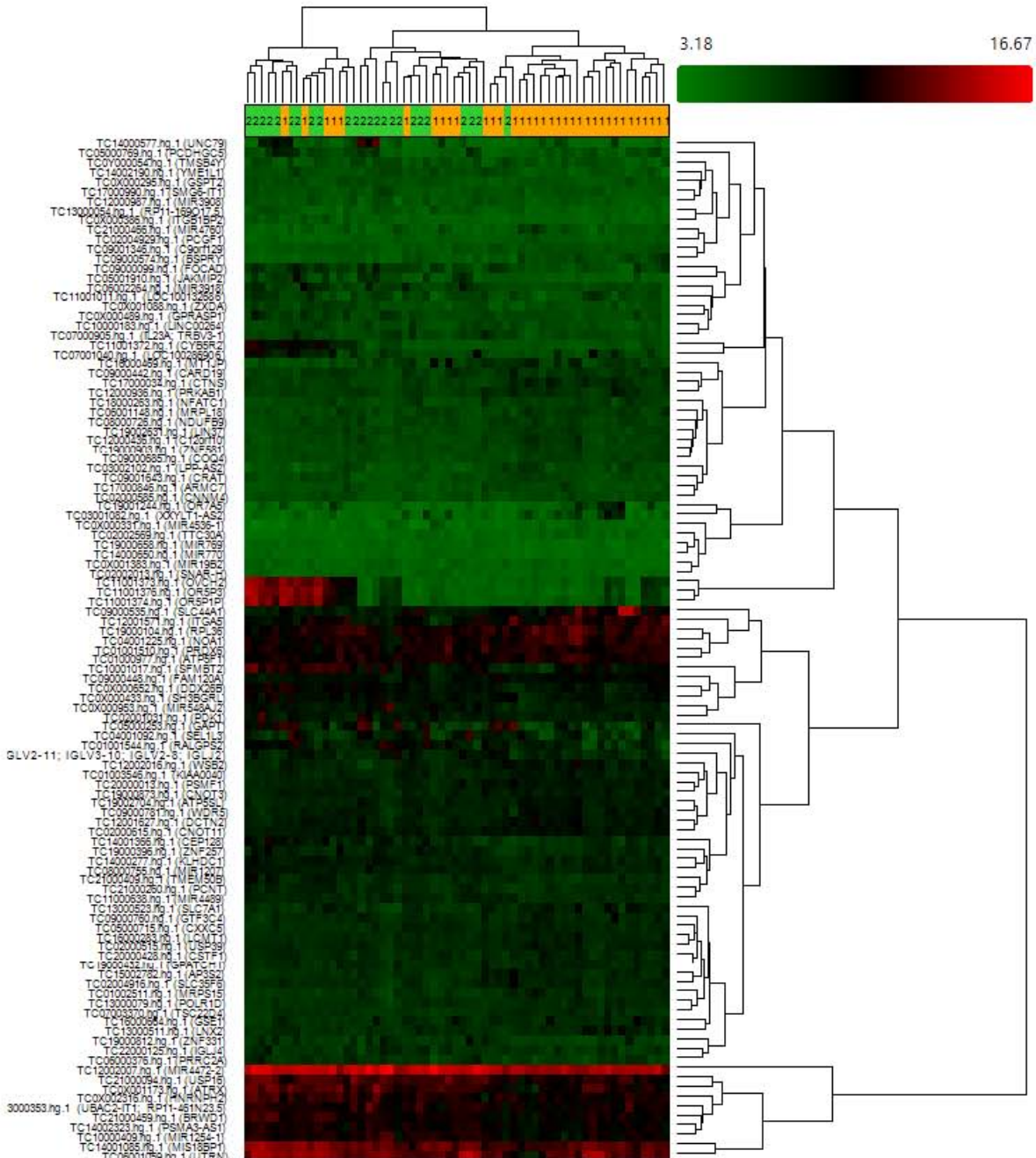


Figura 10. Perfiles de expresión entre pacientes de AR vs BR. Mapa de calor que muestra los 107 genes codificantes más diferencialmente expresados (FC 1.2,  $p < 0.01$ ) entre pacientes de AR vs BR, empleando solo muestras al diagnóstico. Las columnas representan pacientes (1 naranja= AR, 2 verde= BR) y las filas representan genes (rojo = sobreexpresado, verde= subexpresado en pacientes de AR). La intensidad del color refleja el nivel de expresión.

Entre los genes más sobre-expresados se encontraron *MUC4*, *MTIX*, *IKZF2*, *TAGLN2*, *SORT1* e *ITGA5* ( $FC > 2$ ), mientras que algunos de los genes sub-expresados fueron genes de receptores olfatorios (*OR5P3*, *OR5P1P*, *OR5P2*), *EPHA7*, *FYB*, *IFI44L*, *GAPT*, y *FLT3*. Sin embargo, ninguno alcanzó un valor de FDR significativo ( $p_{adj} > 0.05$ ) (Tabla 4). El análisis de ontología génica (GO) mostró que los GDE están involucrados en procesos biológicos como metabolismo de RNAs no codificantes ( $p = 3.87e-7$ ) y adhesión célula-sustrato ( $2.84e-4$ ).

Tabla 4. Lista de los genes con mayor expresión diferencial en pacientes de AR bajo los criterios del NCI.

Símbolo	Nombre	Fold Change (lineal)	ANOVA <i>p</i> -value	FDR adj <i>p</i> -value
<b>Genes sobreexpresados</b>				
<i>MUC4</i>	Mucin 4, cell surface associated	8.76	0.000942	0.977692
<i>MTIX</i>	Metallothionein 1X	2.63	0.015577	0.977692
<i>IKZF2</i>	IKAROS family zinc finger 2	2.54	0.018498	0.977692
<i>TAGLN2</i>	Transgelin 2	2.37	0.012977	0.977692
<i>SORT1</i>	Sortilin 1	2.36	0.043485	0.977692
<i>ITGA5</i>	Integrin alpha 5	2.11	0.005440	0.977692
<i>PBX3</i>	pre-B-cell leukemia homeobox 3	2.07	0.010149	0.977692
<i>IGFBP7</i>	Insulin like growth factor binding protein 7	2.05	0.028837	0.977692
<i>RPS26</i>	Ribosomal protein S26	2.03	0.003146	0.977692
<b>Genes subexpresados</b>				
<i>FLT3</i>	fms-related tyrosine kinase 3	-2.87	0.039815	0.977692
<i>NEGR1</i>	neuronal growth regulator 1	-3.31	0.021458	0.977692
<i>CYB5R2</i>	cytochrome b5 reductase 2	-3.37	0.000641	0.765953
<i>PYHIN1</i>	pyrin and HIN domain family, member 1	-3.53	0.029865	0.805756
<i>CYBB</i>	cytochrome b-245, beta polypeptide	-3.94	0.044588	0.817681
<i>GAPT</i>	GRB2-binding adaptor protein, transmembrane	-5.10	0.000162	0.684407
<i>IFI44L</i>	interferon-induced protein 44-like	-5.28	0.043997	0.977692
<i>EPHA7</i>	EPH receptor A7	-5.49	0.044170	0.817681
<i>FYB</i>	FYN binding protein	-7.27	0.005530	0.765953
<i>DDX3Y</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box helicase 3, Y-linked	-10.88	0.025863	0.794446
<i>OR5P3</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 3	-13.31	0.000624	0.765953
<i>OR5P2</i>	olfactory receptor, family 5, subfamily P, member 2	-25.30	0.001384	0.765953

AR= Alto riesgo

BR= Bajo riesgo

NCI= National Cancer Institute

## Identificación de perfiles de expresión asociados a cuadro clínico de hiperleucocitosis

Un parámetro considerado de alto riesgo a recaída bajo la clasificación del NCI es la cuenta leucocitaria superior a los  $50 \times 10^9$  /L leucocitos en sangre periférica al momento del diagnóstico. No se observaron diferencias en los perfiles de expresión entre pacientes con un conteo leucocitario igual o superior a los  $50 \times 10^9$  /L. Sin embargo, fue posible la identificación de un perfil de expresión génica en pacientes con hiperleucocitosis (aquellos con un conteo leucocitario mayor o igual a  $100 \times 10^9$  /L al diagnóstico). Trece pacientes presentaron hiperleucocitosis (mediana=  $154 \times 10^9$  /L), de los cuales el 38.5% recayó tempranamente. Se encontró que 407 genes se expresan diferencialmente, de los cuales 301 estaban sobre-expresados y 106 sub-expresados ( $FC 1.2, p < 0.01$ ) (**Fig. 11**).

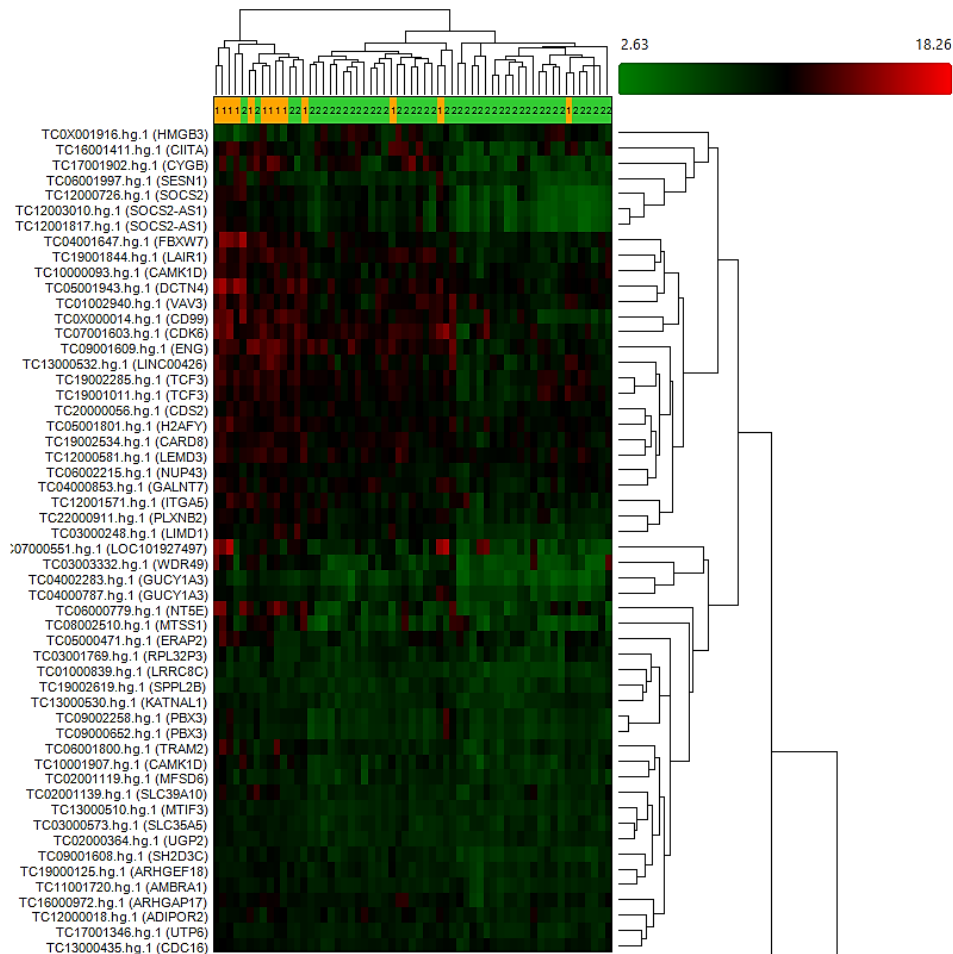


Figura 11. Perfiles de expresión en pacientes con hiperleucocitosis. Mapa de calor que muestra una lista representativa de los genes más diferencialmente expresados ( $FC 1.5, p < 0.005$ ) en pacientes con hiperleucocitosis ( $\geq 100 \times 10^9$  /L) empleando solo muestras al diagnóstico ( $n = 58$ ).

1 naranja=  $\geq 100 \times 10^9$  /L leucocitos en sangre periférica al diagnóstico

2 verde=  $< 100 \times 10^9$  /L leucocitos en sangre periférica al diagnóstico

Rojo = sobre-expresado, verde= sub-expresado en pacientes con cuenta leucocitaria  $\geq 100 \times 10^9$  /L. La intensidad del color refleja el nivel de expresión.

Sin embargo, al igual que el análisis comparando grupos de riesgo, ninguno alcanzó un valor de FDR significativo ( $p_{adj} > 0.3$ ). En pacientes con hiperleucocitosis, *SEMA6A*, *ADGRF1*, *MUC4*, *NT5E*, *WDR49*, *SOCS2-AS1*, *CYGB* son algunos de los genes que se encontraron más sobre-expresados, mientras que *HDGFRP3*, *IFI44L*, *ARHGEF12*, *IGLC7*, *HMGB3*, *IGHJ5* y *SLC2A3* estaban sub-expresados (**Tabla 5**). Los principales procesos biológicos alterados en pacientes con hiperleucocitosis están relacionados con adhesión celular ( $p=1.76e-6$ ) y transducción de señales ( $p=1.04e-5$ ).

Tabla 5. Lista de los genes con mayor expresión diferencial entre pacientes con hiperleucocitosis  $>100 \times 10^9 /L$ .

Símbolo	Nombre	Fold Change (lineal)	ANOVA p-value	FDR adj p-value
<b>Genes sobreexpresados</b>				
<i>SEMA6A</i>	sema domain (semaphorin) 6A	18.62	0.005243	0.779917
<i>ADGRF1</i>	adhesion G protein-coupled receptor F1	13.31	0.000614	0.414678
<i>MUC4</i>	mucin 4, cell surface associated	10.79	0.009954	0.81125
<i>NT5E</i>	5-nucleotidase, ecto (CD73)	9.45	0.000135	0.317488
<i>WDR49</i>	WD repeat domain 49	8.91	0.000866	0.476642
<i>SOCS2-AS1</i>	SOCS2 antisense RNA 1	6.25	0.000309	0.365615
<i>CYGB</i>	cytoglobin	5.67	0.003199	0.683294
<i>SOCS2</i>	suppressor of cytokine signaling 2	5.59	0.001286	0.560661
<i>EMP1</i>	epithelial membrane protein 1	4.98	0.001128	0.532663
<i>MTSS1</i>	metastasis suppressor 1	4.47	0.003800	0.710843
<b>Genes subexpresados</b>				
<i>EPSTI1</i>	epithelial stromal interaction 1 (breast)	-2.59	0.005476	0.779917
<i>TSPYL2</i>	TSPY-like 2	-2.61	0.008776	0.81125
<i>UAP1</i>	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	-3.04	0.003620	0.695816
<i>SLC2A3</i>	solute carrier family 2 member 3	-3.36	0.008542	0.81125
<i>IGHJ5</i>	immunoglobulin heavy joining 5	-3.37	0.004446	0.758077
<i>HMGB3</i>	high mobility group box 3	-3.87	0.000418	0.381372
<i>IGLC7</i>	immunoglobulin lambda constant 7	-4.02	0.003504	0.687056
<i>ARHGEF12</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 12	-4.78	0.009700	0.81125
<i>IFI44L</i>	interferon-induced protein 44-like	-5.12	0.002130	0.625979
<i>HDGFRP3</i>	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	-6.67	0.000290	0.349792

### Identificación de subgrupos moleculares mediante agrupamiento jerárquico no supervisado

Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado con los datos derivados del estudio de las muestras obtenidas al diagnóstico (n=53), ello con el fin de determinar si la presencia de los rearrreglos génicos definen a un solo subtipo molecular (*BCR-ABL1*, *ETV6-*

*RUNX1*, *TCF3-PBX1*) o hay heterogeneidad biológica intragrupo, además de identificar nuevos subgrupos de LAL. Utilizando los 500 genes con mayor expresión diferencial, no fue posible observar claramente los perfiles de expresión correspondientes a cada subtipo, existiendo gran heterogeneidad en cada subgrupo (**Fig. 12**). Mediante análisis de componentes principales se comprobó que *ETV6-RUNX1* es el grupo con mayor variabilidad en su perfil de expresión en comparación a las otras fusiones génicas, siendo el grupo *TCF3-PBX1*+ el que presentó mayor homogeneidad.

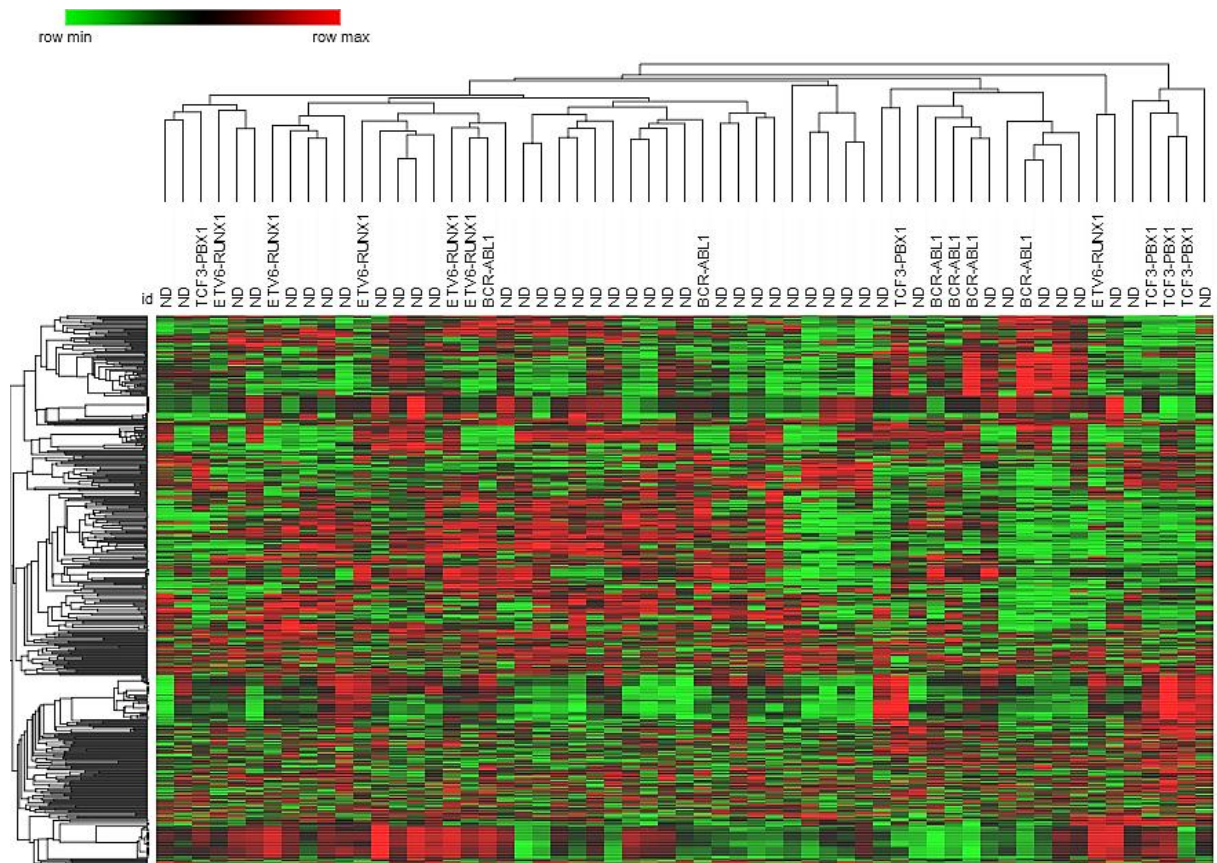


Figura 12. Análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado de los datos de expresión por subtipo molecular. Mapa de calor que muestra los 500 genes (filas) más diferencialmente expresados empleando solo muestras al diagnóstico (n=58, columnas). (rojo = sobre-expresión , verde= sub-expresión). La intensidad del color refleja el nivel de expresión.

### Identificación de perfiles de expresión Ph like

En este trabajo y por su relevancia clínica, un grupo de interés era la identificación de pacientes Ph-like. Estos casos, tienen un perfil de expresión (identificado con microarreglos) similar a los pacientes que son positivos a *BCR-ABL1*+ pero no tienen la t(9;22). Para ello, se

realizó un análisis de agrupamiento jerárquico supervisado comparando las muestras *BCR-ABL1*+ contra todas aquellas que resultaron negativas a transcritos quiméricos. Cuatro pacientes negativos a *BCR-ABL1* forman un cluster junto con 6/7 muestras *BCR-ABL1*+ lo cual hace sugerir la posibilidad de que sean *BCR-ABL1 like* (Fig. 13).

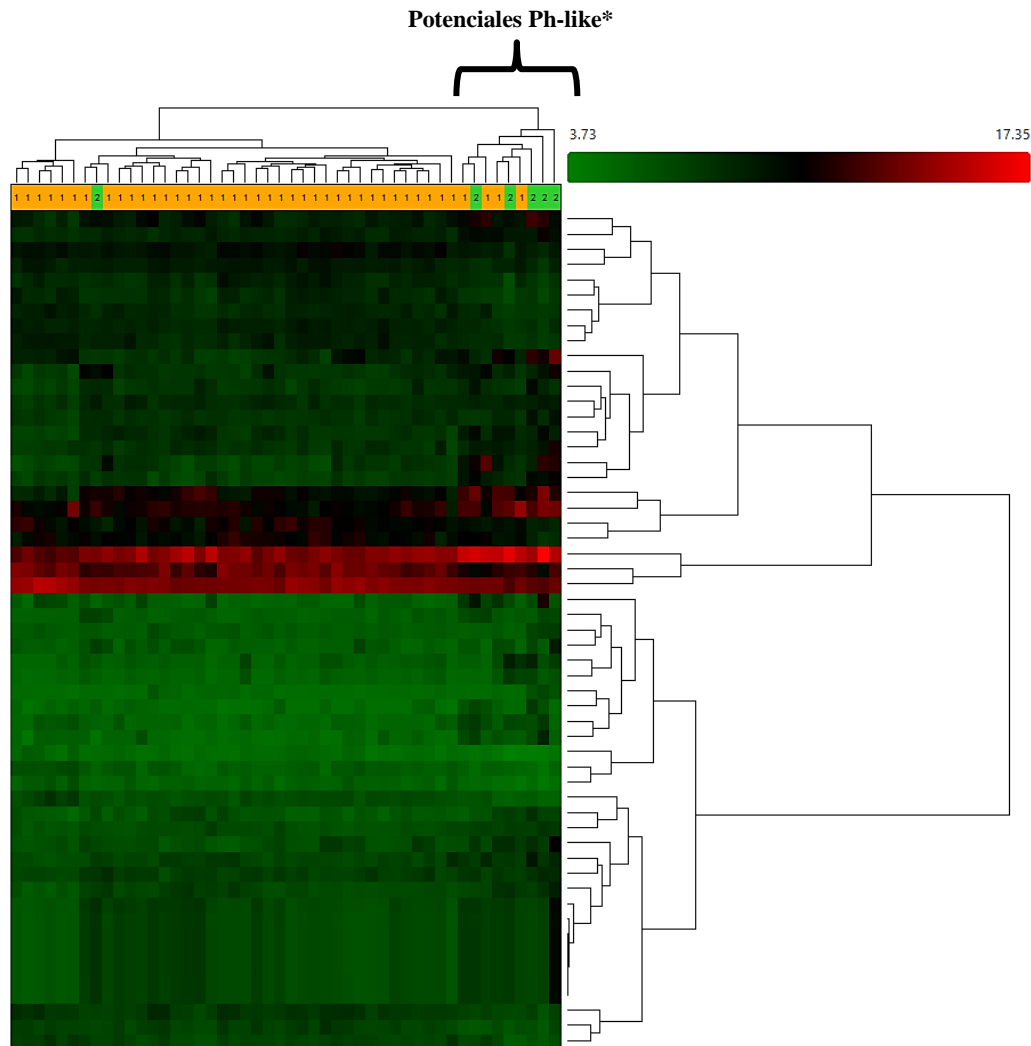


Figura 13. Perfil de expresión *BCR-ABL1*+. Mapa de calor (heatmap) que muestra los 53 genes con mayor expresión diferencial entre pacientes *BCR-ABL1*+ vs pacientes negativos a translocaciones comunes (FC 1.5,  $p < 0.005$ ). Las columnas representan pacientes y las filas representan genes (rojo = sobreexpresado, verde = subexpresado).

1 naranja= Pacientes negativos a translocaciones comunes

2 verde= Pacientes *BCR-ABL1*+

\* Los casos negativos a translocaciones (color naranja) dentro del corchete son considerados pacientes potenciales Ph-like.

## Identificación de biomarcadores de recaída muy temprana

Con el objetivo de identificar a potenciales biomarcadores de RMT se compararon los perfiles de expresión al diagnóstico de aquellos pacientes que presentaron este evento (n=12, considerados casos) contra los que no la presentaron (n=47, considerados controles) durante los primeros 18 meses posteriores al inicio del tratamiento. Durante el seguimiento de la cohorte, solo 12 muestras de pacientes al diagnóstico que presentaron RMT contaron con los criterios de calidad de RNA necesarios para el análisis de microarreglos. En este análisis, 641 genes se expresan diferencialmente entre ambos grupos (FC 1.2,  $p < 0.01$ ). En pacientes con RMT, 340 y 301 genes están sobre y sub-expresados, respectivamente (**Fig. 14**). Algunos de los genes con mayor expresión diferencial fueron *TFPI*, *ANKRD20A4*, *ANKRD20A3*, *SNX10*, *GOLGA8A*, *RAB27B* y *KIT*; mientras que *BLK*, *EBF1*, *BLNK*, *MSH6*, *TCL1A*, *RASD1*, y *UBASH3B* se encontraron sub-expresados. De estos, 208 genes mantuvieron la significancia estadística después de corregir por múltiples comparaciones ( $p_{adj} < 0.1$ ) (**Fig. 14, 15 y Tabla 6**).

Tabla 6. Lista de los genes con mayor expresión diferencial entre pacientes con y sin RMT.

Símbolo	Nombre	Fold Change (lineal)	ANOVA $p$ -value	FDR adj $p$ -value
<b>Genes sobreexpresados</b>				
<i>TFPI</i>	Tissue factor pathway inhibitor	5.12	0.000222	0.0458
<i>ANKRD20A4</i>	Ankyrin repeat domain 20 family, member A4	3.72	0.000002	0.00211
<i>ANKRD20A3</i>	Ankyrin repeat domain 20 family, member A3	3.66	7.01E-07	0.001043
<i>KIT</i>	v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog	3.04	1.91E-04	0.041477
<i>CD36</i>	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	2.43	0.001481	0.098804
<i>LINC00152</i>	Long intergenic non-protein coding RNA 152	2.09	0.000156	0.03745
<i>FUCA2</i>	Fucosidase, alpha-L- 2, plasma	1.96	0.001073	0.085296
<i>OR2J2</i>	Olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2	1.94	0.000152	0.037055
<i>EPS8</i>	Epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	1.9	0.000454	0.059405
<i>TLR3</i>	Toll-like receptor 3	1.78	0.000058	0.024425
<b>Genes subexpresados</b>				
<i>BTK</i>	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase	-2.57	0.001096	0.086252
<i>ADA</i>	Adenosine deaminase	-2.6	0.001291	0.093419
<i>LY9</i>	Lymphocyte antigen 9	-2.81	0.001222	0.091917
<i>JUP</i>	Junction plakoglobin	-2.94	0.00102	0.085012
<i>CD19</i>	CD19 molecule	-3.37	0.000797	0.075558
<i>INSR</i>	Insulin receptor	-3.38	0.000945	0.08284
<i>LINC00341</i>	Long intergenic non-protein coding RNA 341	-3.98	0.000029	0.014784
<i>BLK</i>	BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-5.14	0.00014	0.034858
<i>RASD1</i>	RAS, dexamethasone-induced 1	-9.17	0.000718	0.072543
<i>UBASH3B</i>	Ubiquitin associated and SH3 domain containing B	-11.5	0.000017	0.011517



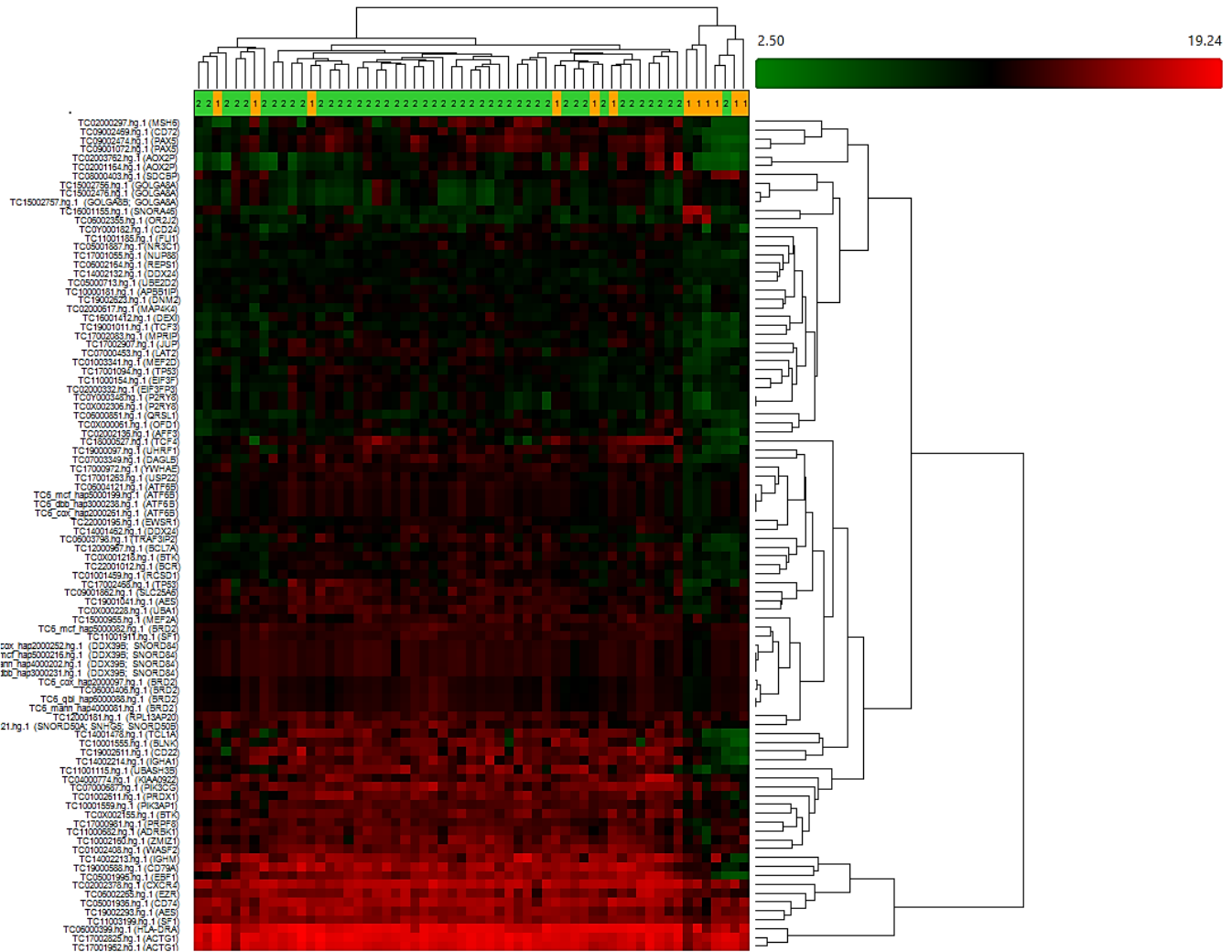


Figura 14. Perfiles de expresión en pacientes con recaída muy temprana (RMT). Mapa de calor de los perfiles de expresión en pacientes con RMT y pacientes sin RMT. Lista representativa de 94 genes (FC 1.2,  $p < 0.01$ ). Fila = pacientes (1 o naranja = Pacientes con RMT; 2 o verde = Pacientes sin RMT). Rojo = sobre-expresado, verde = sub-expresado. La intensidad del color refleja el nivel de expresión.

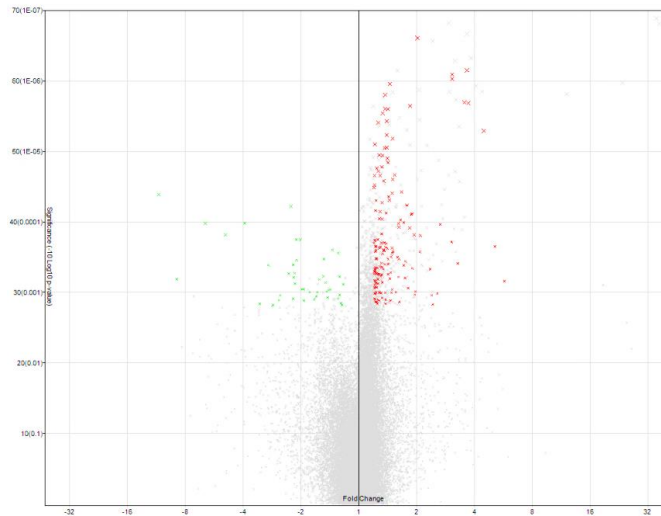


Figura 15. Plot de volcán de los genes diferencialmente expresados en pacientes con recaída muy temprana (RMT). Se representan aquellos genes con un FC > 1.2 y un valor de FDR < 0.1. Las cruces rojas y verdes representan genes sobre-expresados y sub-expresados en pacientes con RMT, respectivamente. En el eje de las X se representa el Fold Change mientras que el eje de las Y la significancia estadística ( $\log_{10} p \text{ value}$ ).

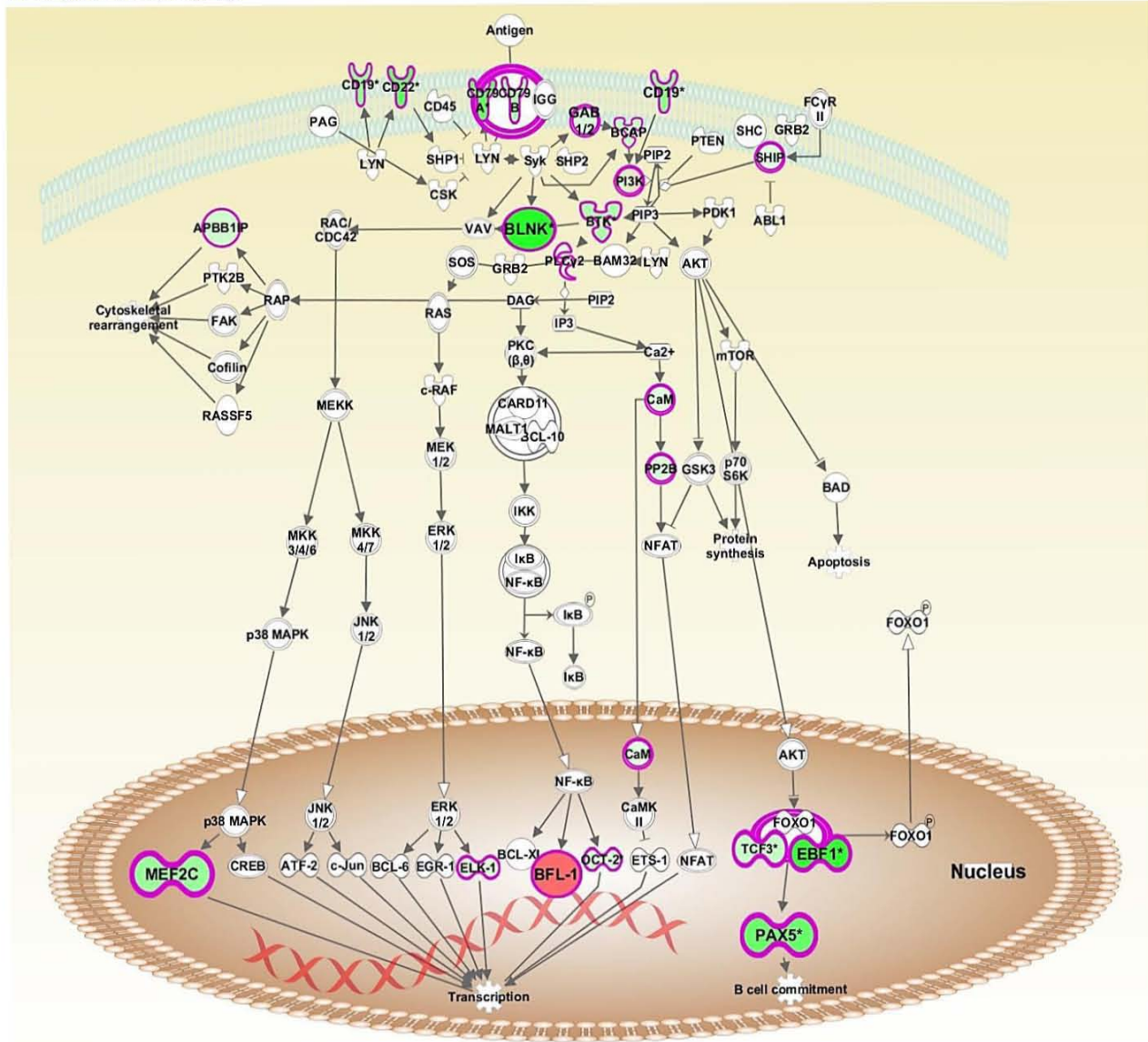
El análisis de enriquecimiento de vías mediante el software IPA mostró que en los casos con RMT, las principales vías canónicas afectadas son la del desarrollo de células B ( $p= 2.19\text{E-}06$ ), papel de NFAT en la regulación de la respuesta inmune ( $p= 2.23\text{E-}05$ ) y señalización del receptor de células B ( $5.31\text{E-}05$ ) (**Fig. 16**). Por otra parte, los principales genes reguladores río arriba fueron el complejo *NFκB* ( $4.59\text{E-}06$ ) y *TNF* ( $6.79\text{E-}06$ ). Las funciones celulares y moleculares fuertemente involucradas en RMT fueron aquellas relacionadas con la muerte y sobrevivencia celular, señalización e interacción célula-célula (**Fig. 17**).

### Validación de los GDE en pacientes con RMT

La validación de los GDE en casos con RMT se llevó a cabo mediante RT-qPCR, para lo cual se incluyeron dos controles por cada caso de RMT. Las características de los controles se eligieron considerando que pertenecieran al mismo grupo de riesgo, edad y cuenta leucocitaria similares. Los genes seleccionados fueron aquellos que presentaron una mayor expresión diferencial entre los grupos evaluados y tomando en cuenta los datos publicados relacionados con el desarrollo del cáncer, particularmente con LAL infantil. Dentro de éstos, se incluyeron a

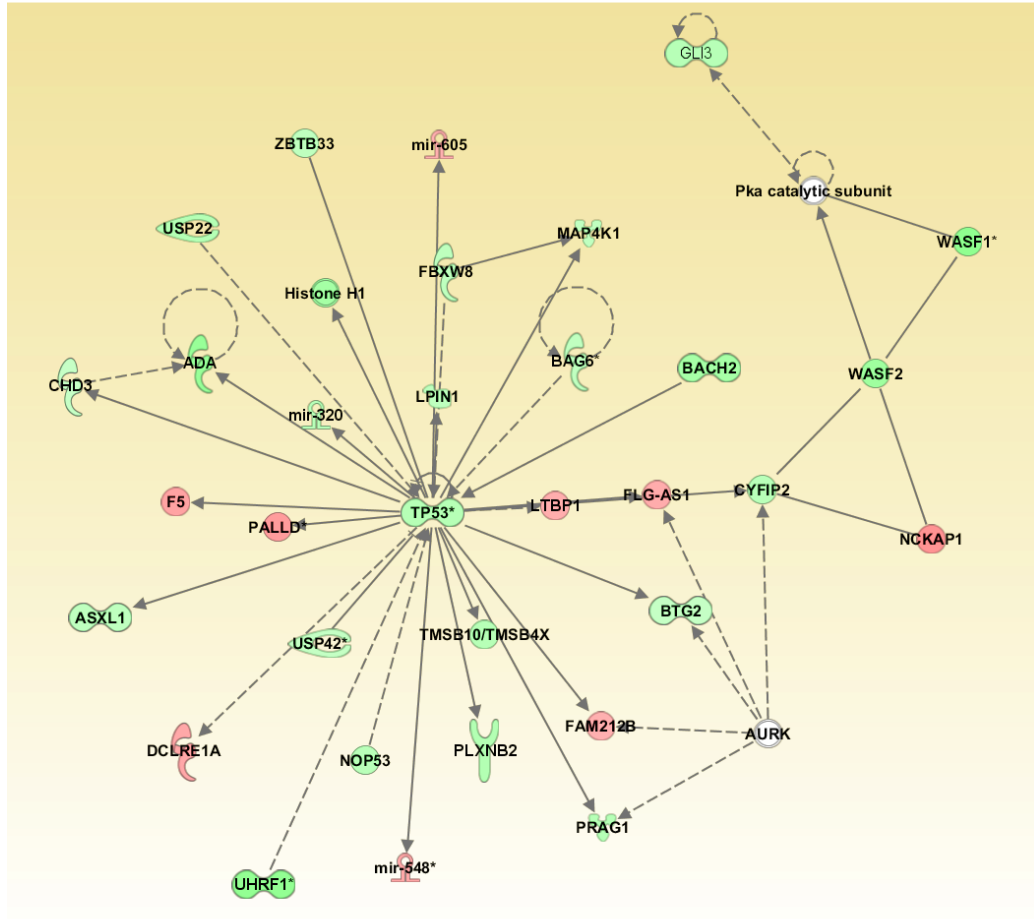
*BLNK*, *EBF1* y *ZCCHC7*. Este análisis confirmó los hallazgos observados mediante microarreglos de expresión (**Figura 18**).

Path Designer B Cell Receptor Signaling



© 2000-2017 CIAGEN. All rights reserved.

Figura 16. Vía de señalización del receptor de células B. En pacientes que desarrollaron RMT, *PAX5*, *EBF1*, *BLNK*, *MEF2C* y *BFL-1* se encontraron entre los genes más diferencialmente expresados. La intensidad de los colores verde y rojo representa el nivel de sub-expresión o sobre-expresión génica, respectivamente.



© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 17. Red de moléculas identificada mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA) que muestra a genes implicados en la supervivencia celular y resistencia a apoptosis. La intensidad de color (rojo = sobre-expresado, verde= sub-expresado) refleja el nivel de expresión.

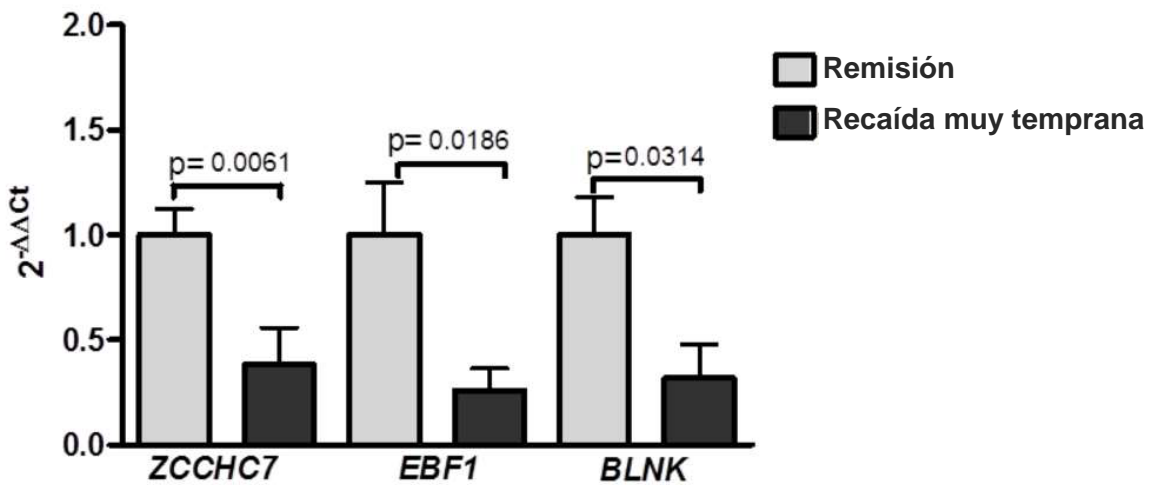


Figura 18. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR de *EBF1*, *BLNK*, y *ZCCHC7*. Los niveles de expresión fueron calculados mediante  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ . *HPRT* fue usado como el gen de referencia.

## Identificación de genes asociados con la recaída

Se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico supervisado contemplando solo las muestras pareadas (n=12) al diagnóstico y a la recaída, con el fin de identificar a los genes que potencialmente involucrados en la recaída. Se observa que las muestras al diagnóstico de niños que presentaron RMT tienen perfiles de expresión muy similares en ambos tiempos, por lo que las muestras al diagnóstico se agrupan con su correspondiente muestra al momento de la recaída (Fig. 19).

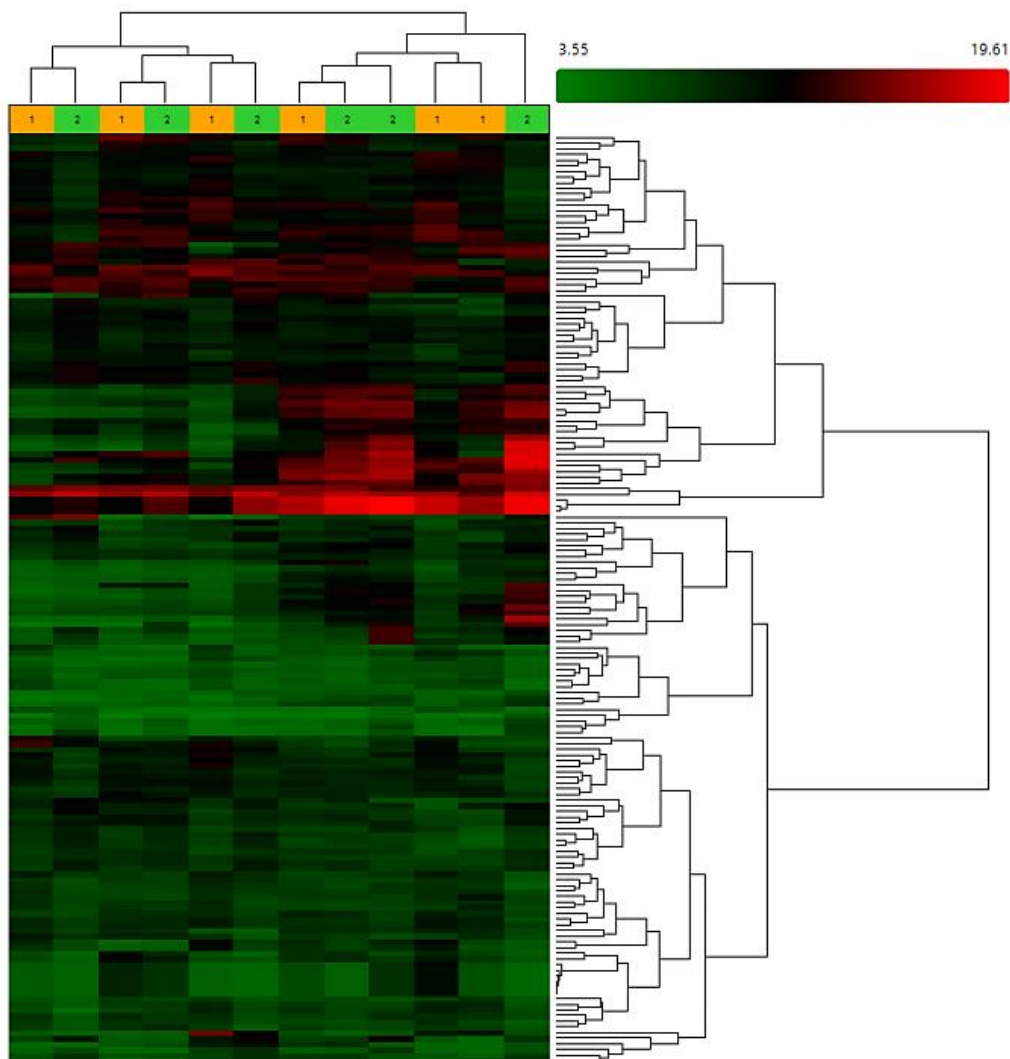


Figura 19. Perfiles de expresión en muestras pareadas al diagnóstico y a la RMT. Mapa de calor que muestra los 164 genes con mayor expresión diferencial de la comparación entre muestras pareadas (6 pacientes) ( $p < 0.05$ ).

1 naranja= Muestras al diagnóstico

2 verde= Muestras a la RMT

Rojo = sobre-expresado, verde= sub-expresado. La intensidad del color refleja el nivel de expresión.

El análisis de vías mostró que los principales procesos biológicos en la recaída se relacionan con supervivencia, crecimiento y proliferación celular, y resistencia a la apoptosis. Nuevamente, el complejo *NFκB* fue identificado como uno de los reguladores centrales en los procesos involucrados en la recaída de pacientes con LAL, y destacando la sobre-expresión de genes de estirpe mieloide como *ELANE* (FC=27.41,  $p=0.01$ ), *MPO* (FC=22.87,  $p=0.02$ ) y *LTF* (FC=4.39,  $p=0.02$ ) (Fig. 20).

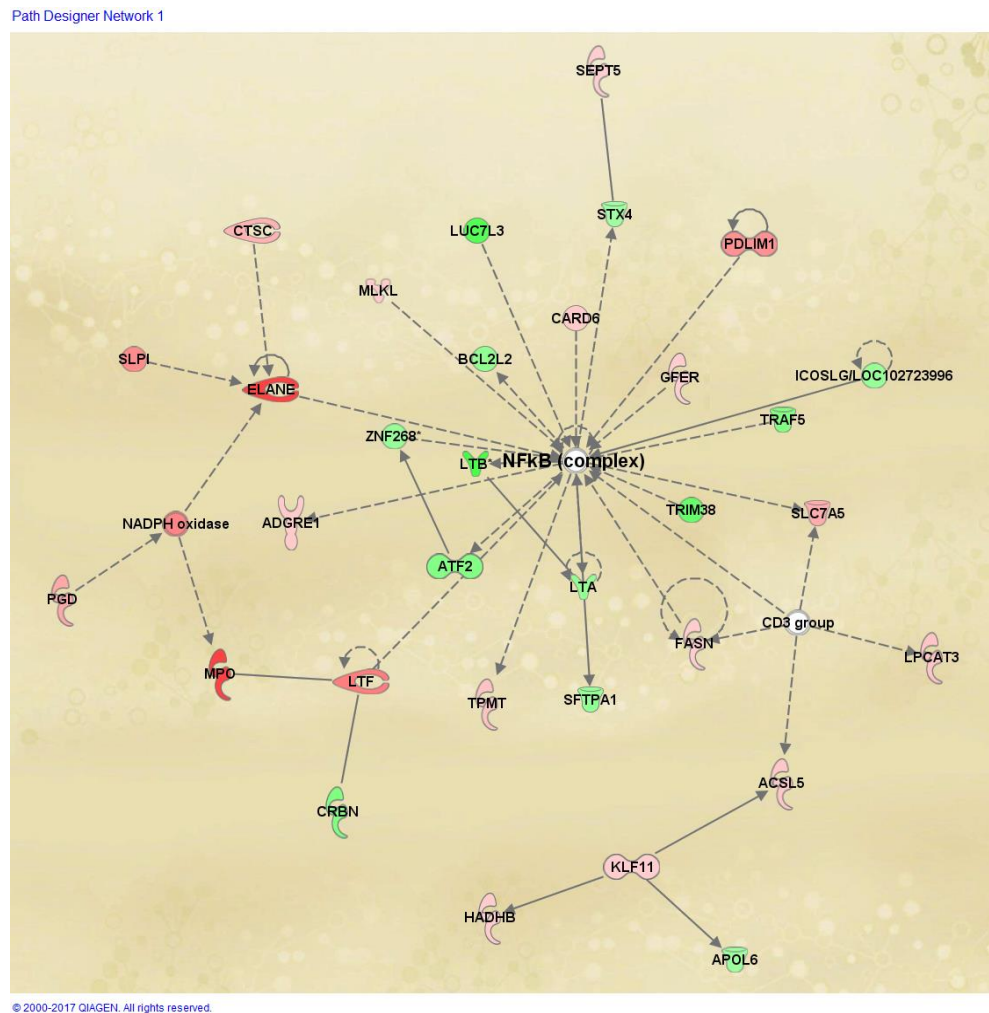


Figura 20. Complejo *NFκB* como regulador central en pacientes con RMT. Red de moléculas identificada mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA) que muestra al complejo *NFκB* como un regulador central en fenómenos de supervivencia, proliferación y crecimiento celulares, asociados a la RMT en pacientes con LAL pediátrica. La intensidad de color (rojo = sobre-expresado, verde= sub-expresado) refleja el nivel de expresión.

## Identificación de perfiles de expresión asociados a recaída y muerte

Finalmente, se buscó identificar a los genes involucrados en recaída y además muerte temprana. Del análisis anterior de 6 pacientes con muestra pareada (MO al diagnóstico y a la recaída), se realizó una comparación entre los casos que recayeron y murieron vs pacientes que recayeron pero permanecen con vida. Solo dos pacientes con RMT siguen vivos hasta este momento (4 muestras totales) (**Fig 21**). Entre los genes con mayor expresión diferencial están *MUC4* (FC= 136.37, FDR=0.05), *SOX4* (FC= 54.15, FDR=0.05), *IGLL1* (FC= 23.29, FDR= 0.03) y *HSH2D* (FC= 12.03, FDR= 0.08). El análisis de agrupamiento supervisado muestra que los pacientes con recaída y muerte muy tempranas tienen un perfil de expresión distinto a aquellos pacientes que recaen pero no mueren. Además, el análisis de vías biológicas identificó al gen *MYC* como uno de los reguladores centrales en pacientes que presentaron mortalidad temprana (**Fig. 22**).

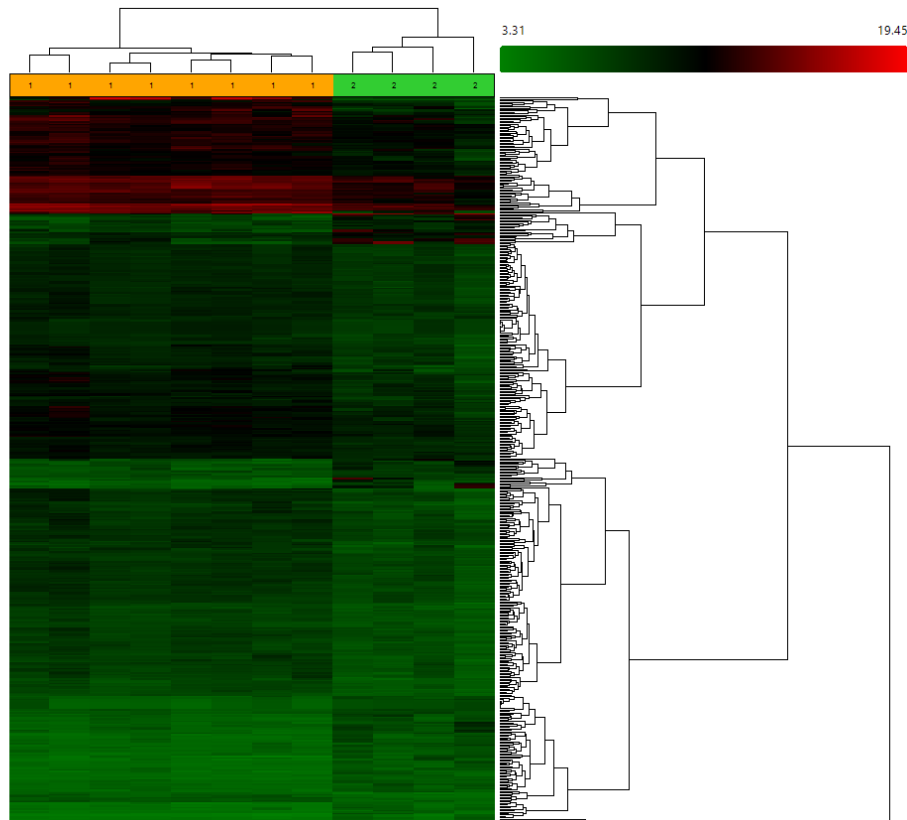
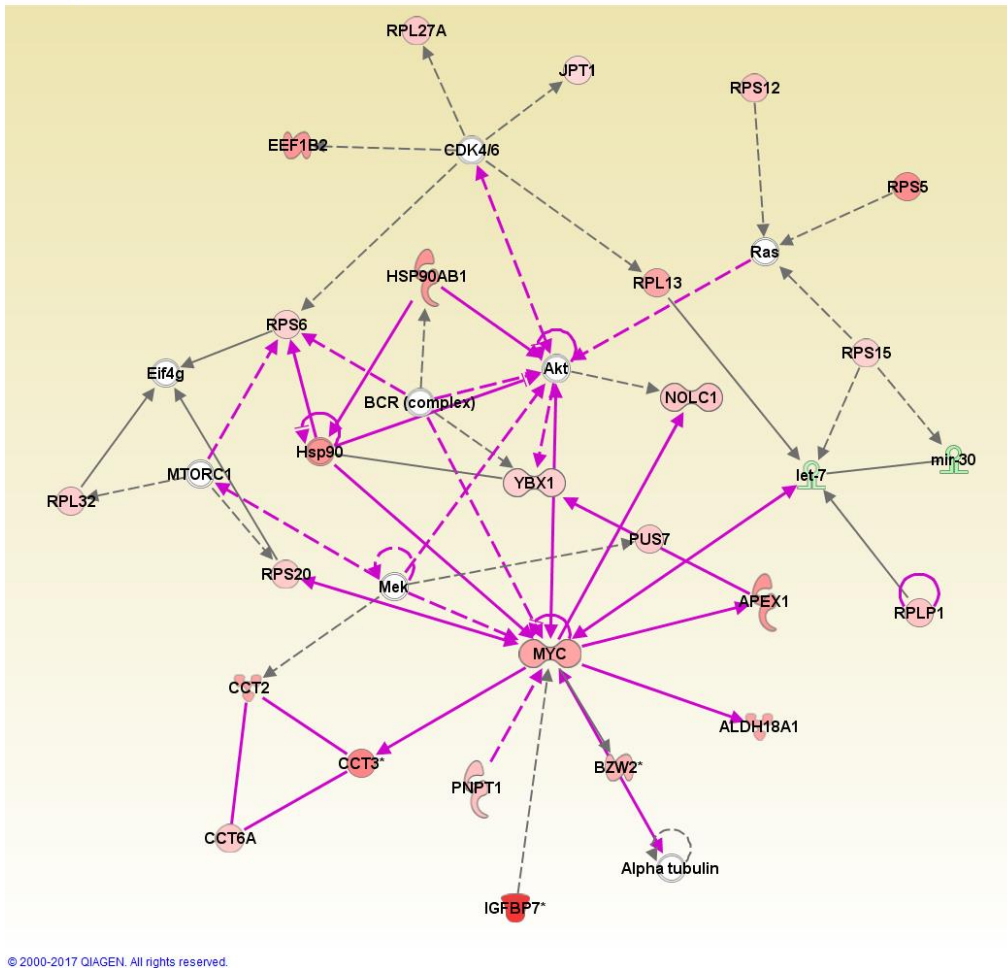


Figura 21. Perfil de expresión asociado a mortalidad por RMT. Mapa de calor que muestra la comparación de muestras pareadas (12 muestras totales) entre pacientes que murieron tempranamente (n=4) vs muestras pareadas de pacientes vivos (n=8) ( $p < 0.01$ ).

1 naranja= Muestras pareadas de pacientes que presentaron mortalidad temprana

2 verde= Muestras pareadas de pacientes con vida

Rojo = sobre-expresado, verde= sub-expresado. La intensidad del color refleja el nivel de expresión.



© 2000-2017 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 22. Gen *MYC* como regulador central en pacientes con mortalidad temprana. Red de moléculas identificada mediante Ingenuity Pathway Analysis (IPA) que muestra a *MYC* como regulador central en pacientes que murieron posterior a la RMT. La intensidad de color (rojo = sobre-expresado, verde= sub-expresado) refleja el nivel de expresión.



## DISCUSIÓN

La LAL es la principal causa de mortalidad por cáncer infantil y se encuentra entre los principales motivos de muerte en la población pediátrica de México. A la fecha, la SLE en países desarrollados alcanza hasta un 90%, cifras que mejoraron considerablemente gracias a los sistemas de clasificación de riesgo que se implementaron a principios de la década de los noventa [69, 102, 103]. Sin embargo, esta clasificación parece no ser tan eficiente en nuestro país, ya que las tasas de mortalidad por LAL se encuentran entre las más altas descritas a nivel mundial, incluso en comparación con países de Latinoamérica, que cuentan con una infraestructura de salud similar a la nuestra [95, 104]. Así mismo, existe una alta proporción de casos de AR en nuestra población en comparación con EEUU (47% vs 25% respectivamente) [105]. Además, un alto porcentaje de recaídas ocurren durante el primer año de la enfermedad (13.4 vs 4.5% en países desarrollados) [72, 106]. Las variables como el diagnóstico oportuno y el apego a los tratamientos, podrían explicar parcialmente este fenómeno, pero estudios moleculares realizados de manera independiente han documentado una frecuencia baja de biomarcadores de buen pronóstico en pacientes mexicanos [45-47]. Las nuevas tecnologías de análisis masivo como los microarreglos de expresión y secuenciación están haciendo posible el análisis de miles de genes en un sólo experimento, ofreciendo un contexto global de la enfermedad y con ello la posibilidad de identificar nuevos biomarcadores de pronóstico. Además, en el estudio de la LAL, los microarreglos han sido de gran utilidad para identificar genes y rutas biológicas implicadas en el desarrollo de la leucemia, caracterizar nuevos subtipos moleculares con relevancia pronóstica e identificar genes predictores de riesgo a recaída [84-86]. Para identificar GDE en pacientes con alto riesgo a recaída, se realizó un estudio de caso-control anidado en una cohorte en el que se incluyeron 63 casos diagnosticados con LAL con por lo menos 18 meses de seguimiento. A nuestro conocimiento, éste es el primer estudio del transcriptoma en niños mexicanos con LAL. Con la intención de ver si existía correlación entre la clasificación clínica de riesgo y los perfiles de expresión, se realizó un análisis comparativo entre las muestras de pacientes clasificados como AR vs BR bajo los criterios del NCI. La clasificación de riesgo adapta los esquemas de tratamiento con base en las probabilidades de riesgo a recaída, administrándose una quimioterapia más intensa para los pacientes con alto riesgo a recaída y reservando los esquemas más conservadores para niños con bajo riesgo a recaída evitando los efectos secundarios producto de la toxicidad de los fármacos [71]. Los

criterios de mayor valor pronóstico son la edad y la cuenta leucocitaria en sangre periférica al momento del diagnóstico; aunque estos parámetros son en cierta medida arbitrarios (alto riesgo para mayores de 10 años y/o cuenta leucocitaria superior a  $50 \times 10^9 /L$ ), siempre han sido buenos predictores independientes de recaída, en particular por su asociación con alteraciones genéticas desfavorables [71]. En la población de estudio, el 36% (n=13) de los pacientes de AR murieron. Anteriormente se reportó en México que en los pacientes de AR la frecuencia (22.4% vs 30.1%) de recaídas es menor que la de los pacientes de BR pero su proporción (37.2% vs 32.9% de mortalidad es mayor) [72]. El análisis de agrupamiento supervisado comparando los pacientes de AR vs BR muestra la formación de grupos en función de su clasificación de riesgo, aunque existe elevada heterogeneidad dentro de cada grupo (**Fig. 10**). Trece pacientes clasificados como AR se mezclaron en el grupo de BR, de los cuales 5 murieron. Por otra parte, solo un paciente de BR se agrupó en el cluster de pacientes de AR, mismo que no presentó recaída ni mortalidad a 18 meses de seguimiento después de iniciado el tratamiento (**Fig. 10**). Este análisis muestra que existen diferencias biológicas entre los grupos definidos clínicamente como de BR con respecto a los de AR, pero además sugiere que esta clasificación no es suficiente. Por ejemplo, los niños que fueron clasificados como de AR pero que tenían un perfil de expresión de BR, fueron sometidos innecesariamente a tratamientos más agresivos y es posible que ello influyera en un desenlace fatal. En este análisis, ningún gen alcanzó la significancia estadística mediante la corrección FDR ( $<0.1$ ). Sin embargo, algunos de los genes sobre-expresados en pacientes AR han sido previamente asociados a cáncer. Entre ellos están *MUC4* (FC 8.76,  $p=0009$ ), una glicoproteína de membrana abundantemente expresada en epitelios y cuya desregulación se ha observado en varios tipos de neoplasias [107]. Además, se ha encontrado altamente expresado en pacientes de alto riesgo a recaída y subtipos Ph-like, tanto en LAL pediátrica como del adulto [67, 108]. Otro gen anormalmente expresado fue *ITGA5* (FC=2.11,  $p=0.005$ ), el cual codifica para una proteína de la familia de las integrinas que están involucradas en funciones de adhesión celular y señalización [109]. En cáncer, estas funciones contribuyen al crecimiento tumoral, metástasis y resistencia a quimio y radioterapia; además de que su sobre-expresión tiene valor pronóstico en cáncer de ovario, melanoma, gástrico y pulmonar [110]. Asimismo, *PBX3* el cual también se encuentra anormalmente sobre-expresado en pacientes de AR, ha sido implicado en neoplasias hematológicas, específicamente en pacientes con leucemia aguda mieloide y su expresión aberrante (mediante mecanismos de desregulación epigenética) se asocia a mal

pronóstico, principalmente [111]. La heterogeneidad observada en nuestro análisis de agrupamiento ha sido reportada previamente en otros grupos de investigación, reflejando posibles huecos en el sistema de clasificación de riesgo. Sin embargo, también han concluido que las firmas de expresión entre grupos de AR o BR no han probado ser fiables prediciendo el riesgo a recaída y no reflejan diferencias moleculares claras entre ambos grupos [85].

Para el siguiente abordaje, decidimos emplear un parámetro que es fundamental en la clasificación de riesgo de la LAL, la cuenta leucocitaria al diagnóstico. Aunque los mecanismos biológicos involucrados en esta no son del todo conocidos, la hiperleucocitosis (definida por una cuenta leucocitaria  $>100 \times 10^9$  /L en sangre periférica) se asocia a elevada carga tumoral. En la clínica se presenta con leucostasis, hiperviscosidad y alteraciones metabólicas que generan complicaciones severas como hemorragias intracraneales, leucostasis pulmonar, y síndrome de lisis tumoral [71, 112]. Los pacientes con hiperleucocitosis tienen mayor riesgo de recaída y de muerte temprana [113]. Reportes en nuestro país indican que una cuenta superior a los  $100 \times 10^9$  /L es el principal factor asociado a eventos de recaída y muerte [72]. Interesantemente, los pacientes sin hiperleucocitosis que se agruparon con los pacientes con hiperleucocitosis, murieron, tres de ellos sin presentar RMT previa (**Fig. 11**). Mientras tanto, 2/3 pacientes con hiperleucocitosis que se agruparon en el grupo contrario, permanecen con vida hasta el momento (**Fig. 11**). En nuestro análisis que comparó pacientes con hiperleucocitosis  $>100 \times 10^9$  /L con respecto a los que presentaron, no se observaron GDE con un valor de FDR significativo ( $FDR > 0.3$ ), aunque varios de estos también se han asociado al cáncer y mal pronóstico. Un ejemplo es el gen *NT5E* (5-nucleotidasa, CD73), sobre-expresado en los pacientes con hiperleucocitosis ( $FC = 9.45$ ,  $p = 0.0001$ ), el cual codifica para una proteína que cataliza la conversión de nucleótidos extracelulares para su importación hacia las células; este gen, se ha encontrado altamente expresado en tumores de colon, pulmón, páncreas y ovario, y se ha demostrado que juega un papel importante en la modulación del microambiente tumoral mediante mecanismos que inhiben la respuesta inmune, por lo que su sobre-expresión está asociada a mal pronóstico [114, 115]. En leucemias, su expresión se ha relacionado con el subtipo y grado de diferenciación en LAL, pero también hay reportes de que su expresión diferencial no tiene un valor pronóstico en esta entidad [116]. *SEMA6A*, fue el gen con mayor sobre-expresión ( $FC = 18.62$ ,  $p = 0.005$ ) en casos con hiperleucocitosis. Este gen se ha encontrado sobre-expresado en pacientes pediátricos con LAL con muy alto riesgo a recaída [88, 117]. Al

igual que los pacientes de AR, genes como *ITGA5*, *PBX3* y *MUC4* (FC=1.95, 1.99 y 8.21, respectivamente) también están sobre-expresados en pacientes con hiperleucocitosis (**Tabla 5**). El análisis de GO mostró que los principales procesos biológicos afectados en hiperleucocitosis se relacionan con adhesión celular y transducción de señales. En conjunto, *ITGA4*, *ITGA5*, *MUC4*, *UBASH3B*, *NT5E* y *ENG* son algunos de los genes con participación en fenómenos de adhesión celular según el análisis de GO. Los procesos de adhesión e interacción célula-célula son cruciales en la interacción de células leucémicas con el nicho hematopoyético. Este nicho provee un “santuario” que protege a las células leucémicas del tratamiento, aumenta sus capacidades de sobrevivencia y estimula estados de quiescencia (de la misma forma en que ocurre con las células troncales hematopoyéticas) que les permiten evadir los efectos de la quimioterapia [118, 119]. De hecho el gen *FBXW7*, que se encuentra sobreexpresado (FC=2.6,  $p=0.004$ ) en pacientes con hiperleucocitosis se ha relacionado con funciones de mantenimiento de quiescencia en células troncales normales y tumorales, y su delección constitutiva en modelos animales promueve la apoptosis e inhibe la progresión tumoral de células leucémicas [120, 122]. Es interesante hacer notar que en la actualidad, las moléculas de adhesión como las integrinas, selectinas, cadherinas y factores solubles son ya considerados potenciales blancos terapéuticos [123].

El siguiente abordaje tuvo como objetivo el identificar las firmas de expresión por subtipo molecular, así como la identificación de subgrupos en pacientes negativos a translocaciones comunes. En nuestro estudio se incluyeron pacientes positivos a los rearrreglos génicos más comunes y con mayor relevancia pronóstica en la clínica (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, detectados por RT-qPCR), además de casos negativos a estos transcritos quiméricos. Primero se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado para identificar subgrupos moleculares basados en los perfiles de expresión. Con este análisis se observó una gran heterogeneidad biológica en las muestras analizadas, siendo el subgrupo *ETV6-RUNX1+* el más heterogéneo y el *TCF3-PBX1+* el más homogéneo. Además, algunas muestras negativas a estos genes quiméricos se agrupan con muestras que son positivas a los transcritos quiméricos evaluados (**Fig. 12**). Este mismo comportamiento se observó cuando se realizó el análisis jerárquico supervisado. En México, *ETV6-RUNX1* (considerado de buen pronóstico) tiene una de las frecuencias más bajas reportadas en todo el mundo, representando entre el 7 al 13.5% de los casos [45-47]. En nuestra cohorte, solo estuvo presente en el 8.5% de los casos. Aunque no

se descarta la posibilidad de que nuestros hallazgos estén influenciados por la presencia de linfocitos T y células mieloides no leucémicas en las muestras de MO (ya que no purificamos los linfocitos por la poca cantidad de muestra obtenida), la heterogeneidad biológica observada puede ser explicada por distintos factores. Una de ellas es la posible presencia de subtipos moleculares que recientemente se han identificados como *ETV6-RUNX1*-like y Philadelphia-like (Ph-like). En ambos casos, los pacientes tienen un perfil de expresión similar al de los casos positivos a *ETV6-RUNX1* y *BCR-ABL*, pero sin la presencia de las translocaciones t(12;21) y t(9;22), respectivamente, [88-90, 124]. Interesantemente, Lilljebjörn y cols. reportaron que 20% a 30% de la LAL pre-B no puede ser clasificada dentro de ninguno de los subtipos moleculares identificados a la fecha si no se usan herramientas de análisis masivo [124]. De hecho, en un estudio reciente de secuenciación del transcriptoma se reportó que 12% de la LAL pre-B presentan un fenotipo “*ETV6-RUNX1*-like” [125]. Estos pacientes se caracterizan por ser portadores de alteraciones en *IKZF* y *ETV6* [124]. De la misma manera, el subtipo Ph-like se ha descrito en el 10-15% de los casos con LAL pediátrica [11]. Este subtipo molecular fue identificado con microarreglos de expresión pero su confirmación de Ph-like se realiza mediante secuenciación masiva, dada la gran variedad de alteraciones genéticas que desregulan la actividad de distintos receptores de citocinas y proteínas tirosina cinasas [11]. Los pacientes Ph-like se clasifican como de mal pronóstico y alto riesgo a recaída son tratables con terapia dirigida con ITC y es un subtipo que se ha reportado como con alta prevalencia en poblaciones hispanas en EE.UU [90]. Considerando las implicaciones en el pronóstico de este subtipo molecular y para identificar a los pacientes posibles positivos a este fenotipo, realizamos un análisis supervisado comparando solo los pacientes *BCR-ABLI*+ contra los pacientes sin translocaciones génicas detectadas. Cinco de seis pacientes *BCR-ABLI*+ se agruparon en un cluster, con otros 4 (potenciales Ph-like) pacientes negativos a translocaciones mezclados dentro de este grupo (**Fig. 13**). El pronóstico de estos 4 pacientes (potenciales Ph-like) fue desfavorable, ya que todos presentaron RMT y tres de ellos murieron. Sin embargo, para confirmar este fenotipo es necesaria la secuenciación del transcriptoma de estos pacientes.

La recaída es indudablemente el mayor obstáculo para disminuir las tasas de mortalidad por LAL, ya que el pronóstico es desfavorable para los pacientes que recaen muy tempranamente, cuya SLE a 3 años no supera el 10% aún con el uso de los tratamientos más intensivos de quimioterapia [93, 126]. En nuestro país, el 26.2% de los pacientes con LAL presentan recaída, y

acorde a los datos recientes de nuestro grupo de investigación, la frecuencia de recaídas durante el primer año post-diagnóstico inicial es hasta tres veces mayor en comparación con lo que se ha descrito en países desarrollados (13.4 vs. 4.5%, respectivamente) [72, 106]. El análisis multivariado muestra que en nuestra cohorte la mortalidad en los pacientes con RMT es significativamente más alta que en pacientes que no la presentan ( $p= 0.03$ ). Los microarreglos de expresión han demostrado ser una herramienta útil para identificar a pacientes con alto riesgo a recaída y pobre respuesta al tratamiento [67, 86]. Con el objetivo de identificar biomarcadores que permitan predecir el riesgo a recaída en nuestra población y con ello reducir la mortalidad por LAL en México, se realizó un análisis supervisado comparando muestras al diagnóstico de pacientes que presentaron RMT contra aquellos que no la presentaron. Algunos de los genes con mayor expresión diferencial fueron *EBF1*, *BLNK*, *BLK* y *PAX5*, que se encuentran sub-expresados en pacientes con RMT (**Figs. 14-16**). Estos genes se encuentran frecuentemente alterados en LAL preB, y se ha descrito que mutaciones en estos genes son eventos cooperativos necesarios para el completo desarrollo de la leucemia [127, 128]. *PAX5* posee un rol dual, dirigiendo la activación de genes específicos de linaje B y reprimiendo la expresión de genes de otros linajes hematopoyéticos [129]. Diferentes tipos de alteraciones (deleciones, mutaciones puntuales, fusiones génicas) resultan en la pérdida de su función [130, 131]. Aunque *PAX5* está mutado en alrededor del 30% de los casos, algunos grupos de investigación han descrito que no tiene significancia pronóstica de riesgo a recaída [61, 89]. Sin embargo, su sobre expresión en nuestro estudio sí parece estar asociada a RMT. Por otra parte, *EBF1* (FC= -5.34,  $p=0.001$ ), que también es esencial para el desarrollo linfoide (estadios pre-proB) e induce la transcripción de *PAX5*, es un blanco frecuente de deleciones en recaída y la pérdida de su función se asocia a un alto riesgo a recaída y resistencia al tratamiento [89]. Además, en modelos *in vitro* e *in vivo* se ha observado que la disminución o pérdida total en la función de *EBF1* genera daño al DNA y activa la expresión de genes de estirpe mieloide [132]. Otros genes sub-expresados en pacientes con RMT fueron *BLNK* (FC= -5.61,  $p=0.002$ ) y *BLK* (FC= -5.14,  $p= 9.9E-5$ ) (**Fig 16**). *BLNK* codifica para una proteína adaptadora de la vía de señalización del receptor BCR, y mutaciones en este gen generan un bloqueo completo de la diferenciación de linfocitos en la etapa de transición pro-B a pre-B en humanos [133, 134]. En ratones, la pérdida de su función resulta en la activación. Por su parte, el gen *BLK* es considerado como un protooncogen por su actividad tirosina cinasa y su papel en la proliferación y diferenciación de células B. Sin embargo,

recientemente se reportó que *BLK* actúa como supresor tumoral y que su inhibición favorece la proliferación de células troncales leucémicas de linaje mielóide [135]. La sub-expresión de estos genes cruciales para el desarrollo del linfocito B, parecen apuntar a que los blastos leucémicos en pacientes con RMT tienen un mayor grado de des-diferenciación que los pacientes que no recaen. Por eso, llama nuestra atención la disminución en la expresión de genes como *BLK* o *FBXW7*, que han sido asociados a fenotipos troncales en otros tipos de leucemia. Este modelo de célula troncal tumoral, en el cual una población reducida de células tumorales con capacidades troncales es capaz de iniciar y recapitular la enfermedad (análogo al proceso de la hematopoyesis) ha sido complicado de caracterizar en la LAL, en buena medida por la diversidad genética de la enfermedad y/o a modelos inapropiados para la identificación de estas poblaciones celulares en este tipo de leucemia [136, 137]. De hecho se cree que algunos tipos de LAL, especialmente aquellos que co-expresan marcadores linfoides y mieloides (linajes mixtos), surgen de progenitores hematopoyéticos más inmaduros. En este contexto, otro fenómeno importante a considerar es el de la plasticidad celular, como ha sido documentado el origen de linajes mixtos y expresión de marcadores mieloides en recaídas de leucemias linfoides [138]. Dado que existe una desregulación en el programa de diferenciación de linfocitos B, no resulta extraño que la ausencia de estos factores de transcripción vaya a la par de la presencia de marcadores de otros linajes hematopoyéticos, especialmente mieloides. En nuestro estudio, genes como *KIT* y *MPO*, asociados a estirpes mieloides, también se encontraron sobre-expresados en pacientes con RMT. De hecho *KIT* fue uno de los genes más sobre-expresados (FC=3.04,  $p=1.91E-04$ ), y concuerda con reportes previos en los que su expresión se considera un marcador de mal pronóstico [139]. Esto puede ser relevante, considerando que existe ensayos en fase preclínica que están evaluando el uso de inhibidores de KIT para el tratamiento del cáncer [140]. Como es característico del cáncer, la resistencia a apoptosis y la sobrevivencia celular, también fueron rutas biológicas alteradas en pacientes con RMT (**Fig. 17**). El complejo *NFκB*, así como *p53*, fueron identificados como algunos de los reguladores centrales de estos mecanismos. La familia de factores de transcripción *NFκB*, puede inducir la expresión de proteínas anti-apoptóticas como BCL-XL y BFL-1 y suprimir la actividad de proteínas inductoras de apoptosis de la familia BAX [141, 142]. Este conocimiento puede ser de relevancia terapéutica, dado que el uso de terapias dirigidas que inhiban la activación de este complejo es una alternativa que debe ser considerada [143, 144].

Por otro lado, una de las causas fundamentales de la recaída es la resistencia intrínseca al tratamiento; aunado a ello, los blastos leucémicos suelen ser más resistentes a la quimioterapia durante la recaída [80]. Con estudios cuyo objetivo fue el rastrear el origen clonal de la enfermedad, se ha sugerido que los blastos leucémicos que conducen a la recaída están presentes desde el diagnóstico (en bajos niveles) y que fue resistente al tratamiento de inducción o que son clonas que adquirieron resistencia por la acumulación de alteraciones genómicas post-tratamiento [63]. En nuestro estudio, genes como *RASD1* (Ras-related dexametasone induced 1), *MSH6*, *BLVRB*, *NR3C1* y *S100A9*, los cuales han sido asociados a resistencia, se encuentran anormalmente expresados desde el diagnóstico en pacientes que recayeron. Uno de los genes con mayor expresión diferencial fue *RASD1*, cuya sub-expresión se relaciona con resistencia a dexametasona. El producto de este gen forma parte de la familia de GTPasas pequeñas de la familia Ras, promueve la apoptosis e inhibe el crecimiento celular [145]. Se ha reportado en mieloma múltiple que el silenciamiento de *RASD1* por metilación puede jugar un papel en la resistencia a la dexametasona, mientras que su sobre-expresión en líneas celulares de glioma inhibe la invasión y migración mediante la inactivación de la vía AKT/mTOR [146, 147]. *MSH6* es otro de los genes más sub-expresados en pacientes con RMT es un componente de la vía de reparación del DNA por mismatch y en modelos *in vitro*, la reducción en su expresión en LAL fue asociada con resistencia a la mercaptopurina y prednisona [83]. Este gen es blanco frecuente de deleciones a la recaída, por lo que no descartamos que los hallazgos de sub-expresión de *MSH6* en nuestros pacientes sea consecuencia de la presencia de deleciones de *MSH6* en ellos [80]. Por otra parte, el gen *BLVRB* es un receptor de membrana que participa en el catabolismo del grupo hemo [148]. Su sobre-expresión también ha sido asociada con resistencia a prednisona en líneas celulares de leucemia [149, 150]. Dado que la prednisona, mercaptopurina y dexametasona son fármacos de primera línea en el tratamiento de los niños con LAL, la alteración en la expresión de *RASD1*, *MSH6*, *BLVRB*, *NR3C1* y *S100A9* es un factor serio a considerar antes de iniciar el tratamiento con esquemas terapéuticos que incluyan estos fármacos [151].

Aunque es necesario validar los resultados en una muestra independiente, nuestros hallazgos aportan evidencia de que la clona leucémica que conduce a la RMT se encuentra desde el inicio de la enfermedad y que existe resistencia intrínseca en los blastos leucémicos que conducen a la recaída. Estas observaciones también se vieron fortalecidos por los resultados derivados del



análisis comparativo de los perfiles de expresión obtenidos de las muestras que se colectaron al diagnóstico y de las muestras de recaída. En este análisis pudimos observar que estas muestras tienden a estar agrupadas (**Fig. 19**), es decir las muestras del mismo individuo (diagnóstico y recaída) presentan perfiles de expresión similares (**Fig. 19**). Lo anterior concuerda con un estudio en donde reportaron que es más probable que los perfiles de expresión de las recaídas tempranas sean más parecidos a su correspondiente muestra al diagnóstico [92]. El aumentar el número de muestras, así como una validación apropiada en una cohorte independiente fortalecerá la propuesta de emplear estos genes como potenciales biomarcadores de riesgo a RMT.

Finalmente, identificamos que los perfiles de expresión también son útiles para detectar diferencias biológicas entre los pacientes con recaída y muerte muy temprana y los casos que sólo sólo presentaron RMT (**Fig. 21**). En este análisis los genes *MUC4*, *SOX4* e *IGLL1* fueron los más sobre-expresados en los pacientes que murieron tempranamente. Estas diferencias son incluso observables desde el momento del diagnóstico, como es el caso del gen *MYC* que fue identificado mediante análisis de vías como uno de los principales reguladores transcripcionales, así como *SOX4*, cuya expresión correlaciona con mal pronóstico en LAL y LAM [152, 153]. *MYC*, uno de los oncogenes mejor caracterizados en cáncer y marcador de diagnóstico en cáncer de mama, linfoma no hodgkin agresivo y cáncer oral [154]. *MYC* se encuentra sobre-expresado desde el momento del diagnóstico en pacientes que presentaron RMT y que posteriormente murieron (**Fig. 22**).

Hay que resaltar que uno de los motivos por los cuales es conveniente realizar este tipo de estudios en pacientes mexicanos con LAL se debe a que, aún con los avances logrados, existe discrepancia entre los resultados obtenidos por microarreglos de expresión entre distintos grupos de investigación [155]. Presentamos el primer estudio del transcriptoma en población pediátrica mexicana con LAL, y a nuestro conocimiento es apenas el segundo en el mundo que se realiza en pacientes con LAL y RMT [156]. En el estudio realizado por Kirschner-Schwabe y cols., se dedicaron a identificar diferencias entre los perfiles de expresión de recaídas tardías y muy tempranas, por lo que nuestro estudio es el primero en realizarlo para identificar potenciales casos con riesgo a RMT desde el momento del diagnóstico. Por otra parte, en un meta-análisis realizado por Chow y cols., en el que mediante un minado de bases de datos analizaron los perfiles de expresión de muestras pareadas de LAL preB (al diagnóstico y a la recaída) [153]. Comparando nuestro análisis con los genes obtenidos de ese estudio, *LTF*, *CXCL12*, *CEACAM6*,

*MPO*, *HLA-DQB1* fueron los únicos genes replicados en ambas cohortes, además de otros genes involucrados en inhibición de apoptosis y regulación del ciclo celular como *AURKA*, *BIRC5* y *CCNB2*, cuya expresión se encuentra alterada a la recaída. Diferencias en estos hallazgos pueden estar influenciadas por el uso de MO total total en nuestro estudio, por lo que la purificación de células leucémicas debe ser priorizada en futuros análisis, especialmente para la validación de potenciales biomarcadores.

Es necesario seguir destinando esfuerzos para realizar análisis genómicos en niños mexicanos con LAL, ampliar los tamaños de muestra de tal manera que los hallazgos se traduzcan en conocimiento aplicable en la clínica y que impacte en la salud de los pacientes con LAL de nuestra población, ya que muchos de los genes aquí identificados pueden considerarse como potenciales biomarcadores de alto riesgo a RMT, así como blancos terapéuticos para el tratamiento de la recaída por LAL.

## CONCLUSIONES

1. Con base en los perfiles de expresión, no es posible observar diferencias al comparar grupos basados en la clasificación de riesgo. No obstante, algunos genes como *MUC4*, *ITGA5* y *PBX3* han sido previamente asociados a grupos de alto riesgo a recaída en pacientes con LAL infantil.
2. Los pacientes con hiperleucocitosis ( $>100 \times 10^9 /L$ ), los cuales tienen alto riesgo a recaída y muerte, tienen un perfil de expresión definido caracterizado por la sobreexpresión de genes relacionados con señalización y adhesión celular (*ITGA4*, *ITGA5*, *SEMA6A*, *MUC4*, *NT5E*), y por la presencia de genes que han sido asociados al mantenimiento de quiescencia e inhibición de la apoptosis (*FBXW7*).
3. Existe gran heterogeneidad genómica en los subtipos moleculares evaluados, definidos por las translocaciones presentes (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*). Es necesario prestar especial atención a *ETV6-RUNX1*, rearrreglo génico de buen pronóstico que define un subtipo altamente heterogéneo en nuestro estudio y que no posee un perfil de expresión definido.
4. Existe la presencia de subtipos moleculares reflejados a nivel de expresión en pacientes negativos a translocaciones comunes, lo que lleva a la necesidad de seguir empleando herramientas genómicas para la identificación de subtipos no descritos en nuestra población con relevancia pronóstica.
5. El subtipo *BCR-ABL1* define un perfil de expresión que incluye pacientes negativos a las translocaciones evaluadas. Estos casos, potenciales *BCR-ABL1* -like (Ph-like), presentaron RMT y tres de ellos murieron. La secuenciación del transcriptoma es necesaria para establecer el diagnóstico de Ph-like así como la identificación de las alteraciones genéticas presentes.
6. Genes relacionados con la diferenciación linfoide (*EBF1*, *BLNK*, *BLK*), resistencia al tratamiento (*MSH6*, *BLVRB*, *RASD1*, *S100A9*, *NR3C1*) y procesos antiapoptóticos (genes de la vía *NfκB*, *p53*) están asociados a la RMT. En estas recaídas, las evidencias apuntan

a una resistencia intrínseca al tratamiento, por lo que estos genes deben ser más estudiados para conocer su contribución al fenómeno de quimiorresistencia.

7. Los perfiles de expresión en pacientes con RMT son muy similares a su contraparte al diagnóstico, por lo que se sugiere la presencia de una población residual de células leucémicas o la presencia de una subclona preleucémica pueden estar relacionadas en el desarrollo de la RMT.
8. Los pacientes que recaen y mueren muy tempranamente durante el tratamiento tienen un perfil de expresión distinto a los que recaen pero permanecen vivos. El gen *MYC* es un regulador central en procesos de supervivencia en pacientes con mortalidad temprana.

## **PERSPECTIVAS**

1. Validar en una cohorte independiente los perfiles de expresión asociados con AR, hiperleucocitosis, RMT y mortalidad temprana.
2. Mediante secuenciación de transcriptoma con RNA-seq, confirmar el perfil Ph-like.
3. Caracterizar las alteraciones genéticas presentes en pacientes negativos a las translocaciones comunes.
4. Mediante RNA-seq, identificar las alteraciones estructurales presentes en los pacientes con RMT, especialmente de los genes involucrados en el desarrollo linfoide y resistencia al tratamiento.

## LITERATURA CITADA

1. World Health Organization. "IARC International Childhood Cancer Day: Much remains to be done to fight childhood cancer." Press Release No. 241. Lyon, Francia, 15 de Febrero de 2016. Disponible en línea en: [https://www.acco.org/wp-content/uploads/2016/02/pr241\\_E.pdf](https://www.acco.org/wp-content/uploads/2016/02/pr241_E.pdf)
2. Steliarova-Foucher E, Colombet M, Ries LAG, Hesselning P, Moreno F, Shin HY, Stiller CA, editores (2017). International Incidence of Childhood Cancer, Volume III (version electrónica). Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <http://iicc.iarc.fr/results/>, accessed [2017].
3. Ortega JJ (2006). "Leucemias agudas infantiles". En Sans-Sabrafen J (editor), Hematología Clínica (pp. 437-448). Madrid, España: Elsevier.
4. Kawamoto H, Katsura Y. A new paradigm for hematopoietic cell lineages: revision of the classical concept of the myeloid-lymphoid dichotomy. *Trends Immunol.* 2009 May; 30(5):193-200.
5. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 2009 Jul 30;114(5):937-51.
6. Parkin, D.M., Kramarova, E., Draper et al. (1998) International Incidence of Childhood Cancer, Vol. II. IARC Scientific Publications, Lyon, France.
7. Robison LL, Bhatia S. Late-effects among survivors of leukaemia and lymphoma during childhood and adolescence. *Br J Haematol.* 2003 Aug;122(3):345-59.
8. Medina-Sansón A (2016). "Chapter 1 Introduction: Childhood Leukemia". En Mejía-Aranguré JM (editor), Etiology of Acute Leukemias in Children (pp. 1-48). Springer International Publishing Switzerland, DOI: 10.1007/978-3-319-05798-9. Disponible en línea en: <http://www.springer.com/la/book/9783319057972>.
9. Pelayo R, Dorantes-Acosta E, Vadillo E. y Fuentes-Panana E (2012). "From HSC to B-Lymphoid Cells in Normal and Malignant Hematopoiesis". En Pelayo R., Advances in Hematopoietic Stem Cell Research (pp. 277-298). InTech, DOI: 10.5772/32213. Disponible en línea en: <https://www.intechopen.com/books/advances-in-hematopoietic->

stem-cell-research/from-hsc-to-b-lymphoid-cells-in-normal-and-malignant-hematopoiesis.

10. Larson RA (2016). "Acute Lymphoblastic Leukemia". En Kaushansky, K., & Williams, W. J. Williams Hematology (pp. 1505-1526). New York, EEUU., McGraw-Hill Medical.
11. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015 Jun;12(6):344-57.
12. Redaelli A, Laskin BL, Stephens JM. A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Eur J Cancer Care (Engl)*. 2005 Mar;14(1):53-62.
13. Weiss NS, Katz JA, Frankel LS, Lloyd LE, McClain KL, Torges K, et al. Incidence of childhood and adolescent cancer in Texas. *Texas Medicine*. 1996; 92:54–60.
14. Bhatia S, Sather HN, Heerema NA et al. Racial and ethnic differences in survival of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):1957-64.
15. Goggins WB, Lo FF. Racial and ethnic disparities in survival of US children with acute lymphoblastic leukemia: evidence from the SEER database 1988-2008. *Cancer Causes Control*. 2012 May;23(5):737-43.
16. Aldrich MC, Zhang L, Wiemels JL et al. Cytogenetics of Hispanic and White children with acute lymphoblastic leukemia in California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Mar;15(3):578-81.
17. Pui CH, Boyett JM, Relling MV et al. Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 1999 Mar;17(3):818-24.
18. Chiaretti S, Zini G, Bassan R. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2014; 6(1): e2014073.
19. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008 Mar 22;371(9617):1030-43.
20. Eguiguren JM1, Schell MJ, Crist WM et al. Complications and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis. *Blood*. 1992 Feb 15;79(4):871-5.
21. Bunin NJ, Pui CH, Hustu HO et al. Unusual extramedullary relapses in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr*. 1986 Oct;109(4):665-8.

22. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 1981 Apr;47(4):553-61.
23. Roganovic J. (2013). “Acute Lymphoblastic Leukemia in Children”. En Guenova M & Balatzenko G “Leukemia”. InTech, DOI: 10.5772/45914. Disponible en línea en: <https://www.intechopen.com/books/leukemia/acute-lymphoblastic-leukemia-in-children>
24. Edwards JC, Cambridge G. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006 May;6(5):394-403.
25. Dorantes-Acosta E, Medina-Sanson A, Dávila-Ornelas K et al. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (*European Group for the Immunological Classification of Leukemia*). *Gaceta Mexicana de Oncología.* 2013;12(3):136-142.
26. Quero-Hernández A, Estrada-Correa R, Pacheco-Pérez I et al. Características clínicas e inmunofenotípicas en un grupo de niños con leucemia aguda linfoblástica. *Pediatría de México* Vol. 14 Núm. 4 – 2012.
27. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol.* 1997 Feb; 70:130-9.
28. Zhou Y, Zhang S, Li Z et al. Maternal benzene exposure during pregnancy and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis of epidemiologic studies. *PLoS One.* 2014 Oct 15;9(10):e110466.
29. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos R et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer.* 2011 Aug 17;11:355. doi: 10.1186/1471-2407-11-355.
30. Hjalgrim LL, Westergaard T, Rostgaard K et al. Birth weight as a risk factor for childhood leukemia: a meta-analysis of 18 epidemiologic studies. *Am J Epidemiol.* 2003 Oct 15;158(8):724-35.
31. Hertzberg L, Vendramini E, Ganmore I et al. 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.* 2010 Feb 4;115(5):1006-17.



32. Yang JJ, Cheng C, Yang W et al. Genome-wide interrogation of germline genetic variation associated with treatment response in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2009 Jan 28;301(4):393-403.
33. Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet*. 2013 Dec;45(12):1494-8.
34. Xu H, Yang W, Perez-Andreu V et al. Novel susceptibility variants at 10p12.31-12.2 for childhood acute lymphoblastic leukemia in ethnically diverse populations. *J Natl Cancer Inst*. 2013 May 15;105(10):733-42.
35. Yang JJ, Cheng C, Devidas M. Genome-wide association study identifies germline polymorphisms associated with relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2012 Nov 15; 120(20): 4197–4204.
36. Bekker-Méndez VC, Núñez-Enríquez JC, Torres Escalante JL et al. ARID5B, CEBPE and PIP4K2A Germline Genetic Polymorphisms and Risk of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexican Patients: A MIGICCL Study. *Arch Med Res*. 2016 Nov;47(8):623-628.
37. Chokkalingam AP, Hsu LI, Metayer C et al. Genetic variants in ARID5B and CEBPE are childhood ALL susceptibility loci in Hispanics. *Cancer Causes Control*. 2013 Oct;24(10):1789-95.
38. Paulsson K, Johansson B. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Aug; 48(8):637-60.
39. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2007; 110(4):1112-1115.
40. Hof J, Krentz S, van Schewick C et al. Mutations and deletions of the TP53 gene predict nonresponse to treatment and poor outcome in first relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011 Aug 10;29(23):3185-93.
41. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012; 2012:389-96.
42. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, Morel F et al. ETV6 fusion genes in hematological malignancies: a review. *Leuk Res*. 2012 Aug; 36(8):945-61.

43. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, et al. The TEL/ETV6 gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* 1998 Aug 1;12(15):2392-402.
44. Fenrick R, Amann JM, Lutterbach B et al. Both TEL and AML-1 contribute repression domains to the t(12;21) fusion protein. *Mol Cell Biol.* 1999 Oct;19(10):6566-74.
45. Pérez-Vera P, Mújica-Sánchez M, Carnevale A et al. Cytogenetics in acute lymphoblastic leukemia in Mexican children: an institutional experience. *Arch Med Res.* 2001 May-Jun;32(3):202-7.
46. Jiménez-Morales S, Miranda-Peralta E, Saldaña-Alvarez Y et al. BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk Res.* 2008 Oct;32(10):1518-22.
47. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study-report from the Mexican Interinstitutional Group for the identification of the causes of childhood leukemia. *Biomed Res Int.* 2014;2014:210560.
48. Aspland SE, Bendall HH, Murre C. The role of E2A-PBX1 in leukemogenesis. *Oncogene.* 2001 Sep 10;20(40):5708-17.
49. Lu Q, Kamps MP. Heterodimerization of Hox proteins with Pbx1 and oncoprotein E2a-Pbx1 generates unique DNA-binding specificities at nucleotides predicted to contact the N-terminal arm of the Hox homeodomain--demonstration of Hox-dependent targeting of E2a-Pbx1 in vivo. *Oncogene.* 1997 Jan 9;14(1):75-83.
50. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 142:1497. 1960.
51. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med.* 2006 Jun 15; 354(24):2531-41.
52. Daniel-Cravioto A, Gonzalez-Bonilla CR, Mejia-Arangure JM et al. "Genetic rearrangement MLL/AF4 is most frequent in children with acute lymphoblastic leukemias in Mexico City," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 50, no. 8, pp. 1352–1360, 2009.
53. Mesquita DR, Córdoba JC, Magalhaes IQ et al., "Molecular and chromosomal mutations among children with B-lineage lymphoblastic leukemia in Brazil's Federal District," *Genetics and Molecular Research*, vol. 8, no. 1, pp. 345–353, 2009.

54. Salesse S, Verfaillie CM. BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene*. 2002 Dec 9; 21(56):8547-59.
55. Leoni V, Biondi A. Tyrosine kinase inhibitors in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2015 Mar; 100(3): 295–299.
56. Ziemer-van der Poel S, McCabe NR, Gill HJ. Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Dec 1; 88(23):10735-9.
57. Schraets D, Lehmann T, Dingermann T. MLL-mediated transcriptional gene regulation investigated by gene expression profiling. *Oncogene*. 2003 Jun 5; 22(23):3655-68.
58. Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL et al. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood*. 1996 Apr 1;87(7):2870-7.
59. Andersson AK, Ma J, Wang J et al. The landscape of somatic mutations in infant MLL-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet*. 2015 Apr;47(4):330-7.
60. Parker H, An Q, Barber K et al. The complex genomic profile of ETV6-RUNX1 positive acute lymphoblastic leukemia highlights a recurrent deletion of TBL1XR1. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008 Dec;47(12):1118-25.
61. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2007 Apr 12;446(7137):758-64.
62. Hogan LE, Meyer JA, Yang J et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood*. 2011 Nov 10;118(19):5218-26.
63. Mullighan CG, Phillips LA, Su X et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 2008 Nov 28;322(5906):1377-80.
64. Zandi S, Mansson R, Tsapogas P et al. EBF1 is essential for B-lineage priming and establishment of a transcription factor network in common lymphoid progenitors. *J Immunol*. 2008 Sep 1;181(5):3364-72.
65. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 2012 Jan 11;481(7380):157-63.

66. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2009 Feb;10(2):147-56.
67. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X et al. 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.* 2010 Dec 2;116(23):4874-84.
68. Schultz KR, Pullen DJ, Sather HN et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: a combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood.* 2007 Feb 1;109(3):926-35.
69. Smith M, Arthur D, Camitta B et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 1996 Jan;14(1):18-24.
70. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2008 Mar 22;371(9617):1030-43.
71. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ et al. (2003). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program,* 102-131.
72. Jiménez-Hernández E, Jaimes-Reyes EZ, Arellano-Galindo J et al. Survival of Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia under Treatment with the Protocol from the Dana-Farber Cancer Institute 00-01. *Biomed Res Int.* 2015;2015:576950.
73. Pui CH, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2013 Jul;50(3):185-96.
74. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A. et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: a children's oncology group study. *J Clin Oncol.* 2009 Nov 1;27(31):5175-81.
75. Aricò M, Valsecchi MG, Camitta B et al. Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2000 Apr 6; 342(14):998-1006.

76. Bailey LC, Lange BJ, Rheingold SR et al. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2008 Sep;9(9):873-83.
77. Gaynon PS, Qu RP, Chappell RJ et al. Survival after relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: impact of site and time to first relapse--the Children's Cancer Group Experience. *Cancer.* 1998 Apr 1;82(7):1387-95.
78. Rivera GK, Zhou Y, Hancock ML et al. Bone marrow recurrence after initial intensive treatment for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2005 Jan 15;103(2):368-76.
79. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia.* 2008 Dec;22(12):2142-50.
80. Bhojwani D, Pui CH. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol.* 2013 May;14(6):e205-17.
81. Meyer JA, Wang J, Hogan LE et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* 2013 Mar;45(3):290-4.
82. Mullighan C, Zhang J, Kasper LH et al. CREBBP mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature.* 2011 Mar 10; 471(7337): 235–239.
83. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2008 Nov 15;112(10):4178-83.
84. Raetz EA, Moos PJ, Szabo A et al. Gene expression profiling. Methods and clinical applications in oncology. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001 Oct;15(5):911-30, ix.
85. Moos PJ, Raetz EA, Carlson MA et al. Identification of gene expression profiles that segregate patients with childhood leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002 Oct;8(10):3118-30.
86. Ross ME, Zhou X, Song G et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood.* 2003 Oct 15;102(8):2951-9.
87. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell.* 2002 Mar;1(2):133-43.

88. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* 2009 Feb;10(2):125-34.
89. Mullighan CG, Su X, Zhang J, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2009 Jan 29;360(5):470-80.
90. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, et al. 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.* 2010 Jul 1;115(26):5312-21.
91. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med.* 2014 Sep 11;371(11):1005-15.
92. Bhojwani D, Kang H, Moskowitz NP, et al. Biologic pathways associated with relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2006 Jul 15;108(2):711-7.
93. Eckert C, Flohr T, Koehler R, et al. Very early/early relapses of acute lymphoblastic leukemia show unexpected changes of clonal markers and high heterogeneity in response to initial and relapse treatment. *Leukemia.* 2011 Aug;25(8):1305-13.
94. Rivera-Luna R, Shalkow-Klincovstein J, Velasco-Hidalgo L, et al. Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC Cancer.* 2014 Oct 29;14:790.
95. Curado MP, Pontes T, Guerra-Yi ME, et al. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica.* 2011 Feb;29(2):96-102.
96. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, et al. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood.* 2012 Jan 5;119(1):34-43.
97. Mejía-Aranguré J, Fajardo-Gutiérrez A., Bernaldéz-Rios R, et al. Nutritional state alterations in children with acute lymphoblastic leukemia during induction and consolidation of chemotherapy. *Arch Med Res* 1997;28:273-279.

98. Palermo M, Driscoll H, Tighe S, et al. Expression Profiling Smackdown: Human Transcriptome Array HTA 2.0 vs. RNA-Seq. *J Biomol Tech.* 2014 May; 25(Suppl): S20–S21.
99. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* 2003 Apr;4(2):249-64.
100. Benjamini Y, Yekutieli D. False Discovery Rate: Adjusted Multiple Confidence Intervals for Selected Parameters. *Journal of the American Statistical Association.* Vol. 100, No. 469 (Mar., 2005), pp. 71-93
101. Eden E, Navon R, Steinfeld I, et al. GOrilla: A Tool For Discovery And Visualization of Enriched GO Terms in Ranked Gene Lists", *BMC Bioinformatics* 2009, 10:48.
102. Trigg ME, Sather HN, Reaman GH, et al. Ten-year survival of children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2008; 49:1142.
103. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V., et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol* 2016;34:2591-2601.
104. Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C., et al. Childhood cancer mortality in America, Asia, and Oceania, 1970 through 2007. *Cancer.* 2010 Nov 1;116(21):5063-74.
105. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, et al. Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Münster. *Leukemia.* 2000 Dec;14(12):2205-22.
106. Krishnan S, Wade R, Moorman AV., et al. Temporal changes in the incidence and pattern of central nervous system relapses in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on four consecutive Medical Research Council trials, 1985-2001. *Leukemia.* 2010;24:450-459.
107. Carraway KL, Theodoropoulos G, Kozloski GA, et al. Muc4/MUC4 functions and regulation in cancer. *Future Oncol.* 2009 Dec;5(10):1631-40.

108. Juric D, Lacayo NJ, Ramsey MC, et al. Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Oncol*. 2007 Apr 10;25(11):1341-9.
109. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002 Sep 20;110(6):673-87.
110. Zutter MM. Integrin-mediated adhesion: tipping the balance between chemosensitivity and chemoresistance. *Adv Exp Med Biol*. 2007;608:87-100.
111. Guo H, Chu Y, Wang L., et al. PBX3 is essential for leukemia stem cell maintenance in MLL-rearranged leukemia. *Int J Cancer*. 2017 Jul 15;141(2):324-335.
112. Harousseau JL, Tobelem G, Schaison G, et al. High risk acute lymphocytic leukemia: a study of 141 cases with initial white blood cell counts over 100,000/cu mm. *Cancer*. 1980;46:1996–2003.
113. Kong SG, Seo JH, Jun SE., et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperleukocytosis at presentation. *Blood Res*. 2014 Mar; 49(1): 29–35.
114. Beavis PA, Stagg J, Darcy PK, et al. CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. *Trends Immunol*. 2012 May;33(5):231-7.
115. Zhang B. CD73: a novel target for cancer immunotherapy. *Cancer Res*. 2010 Aug 15;70(16):6407-11.
116. Wieten E, van der Linden-Schrever BE, Sonneveld E, et al. CD73 (5'-nucleotidase) expression has no prognostic value in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2011 Aug; 25(8):1374-6.
117. Kang H, Chen IM, Wilson CS, et al. 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*. 2010 Feb 18;115(7):1394-405.
118. Bradstock K, Makrynika V, Bianchi A, et al. Analysis of the mechanism of adhesion of precursor-B acute lymphoblastic leukemia cells to bone marrow fibroblasts. *Blood*. 1993 Dec 1;82(11):3437-44.
119. Barwe SP, Quagliano A, Gopalakrishnapillai A. Eviction from the sanctuary: Development of targeted therapy against cell adhesion molecules in acute lymphoblastic leukemia. *Semin Oncol*. 2017 Apr;44(2):101-112.



120. Takeishi S, Nakayama KI. Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells. *Br J Cancer*. 2014 Sep 9;111(6):1054-9.
121. King B, Trimarchi T, Reavie L, et al. The ubiquitin ligase FBXW7 modulates leukemia-initiating cell activity by regulating MYC stability. *Cell*. 2013 Jun 20;153(7):1552-66.
122. Reavie L, Buckley SM, Loizou E, et al. Regulation of c-Myc ubiquitination controls chronic myelogenous leukemia initiation and progression. *Cancer Cell*. 2013 Mar 18;23(3):362-75.
123. Hsieh YT, Gang EJ, Geng H, et al. Integrin alpha4 blockade sensitizes drug resistant pre-B acute lymphoblastic leukemia to chemotherapy. *Blood*. 2013 Mar 7;121(10):1814-8.
124. Lilljebjörn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017 Sep 21;130(12):1395-1401.
125. Zaliouva M, Kotrova M, Bresolin S, et al. ETV6/RUNX1-like acute lymphoblastic leukemia: A novel B-cell precursor leukemia subtype associated with the CD27/CD44 immunophenotype. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017 Aug;56(8):608-616.
126. Szczepanek J, Styczyński J, Haus O, et al. Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2011 Feb;59(1):61-8.
127. Mori H, Colman SM, Xiao Z, et al. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jun 11;99(12):8242-7.
128. Hong D, Gupta R, Ancliff P. Initiating and cancer-propagating cells in TEL-AML1-associated childhood leukemia. *Science*. 2008 Jan 18;319(5861):336-9.
129. Cobaleda C, Schebesta A, Delogu A, et al., Pax5: the guardian of B cell identity and function. *Nat Immunol*. 2007 May;8(5):463-70.
130. Kawamata N, Pennella MA, Woo JL, et al. Dominant-negative mechanism of leukemogenic PAX5 fusions. *Oncogene*. 2012 Feb 23;31(8):966-77.
131. Fortschegger K, Anderl S, Denk D, et al. Functional heterogeneity of PAX5 chimeras reveals insight for leukemia development. *Mol Cancer Res*. 2014 Apr;12(4):595-606.

132. Prasad MA, Ungerbäck J, Åhsberg J, et al. Ebf1 heterozygosity results in increased DNA damage in pro-B cells and their synergistic transformation by Pax5 haploinsufficiency. *Blood*. 2015 Jun 25;125(26):4052-9.
133. Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science*. 1999 Dec 3;286(5446):1954-7.
134. Nakayama J, Yamamoto M, Hayashi K, et al. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood*. 2009 Feb 12;113(7):1483-92.
135. Zhang H, Peng C, Hu Y, et al. The Blk pathway functions as a tumor suppressor in chronic myeloid leukemia stem cells. *Nat Genet*. 2012 Jul 15;44(8):861-71.
136. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4793-807.
137. Bomken S, Fiser K, Heidenreich O, et al. Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer*. 2010 Aug 10;103(4):439-45.
138. Dorantes-Acosta E, Pelayo R. Lineage switching in acute leukemias: a consequence of stem cell plasticity? *Bone Marrow Res*. 2012;2012:406796.
139. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, et al. The reliability and specificity of c-kit for the diagnosis of acute myeloid leukemias and undifferentiated leukemias. The European Group for the Immunological Classification of Leukemias (EGIL). *Blood*. 1998 Jul 15;92(2):596-9.
140. Abbaspour Babaei M, Kamalidehghan B, Saleem M, et al. Receptor tyrosine kinase (c-Kit) inhibitors: a potential therapeutic target in cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*. 2016;10:2443-2459.
141. Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*. 2002;3:221-227.
142. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li Z-W. NF-kB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002;2:301-310.
143. Wei TW, Wu PY, Wu TJ, et al. Aurora A and NF-kB Survival Pathway Drive Chemoresistance in Acute Myeloid Leukemia via the TRAF-Interacting Protein TIFA. *Cancer Res*. 2017 Jan 15;77(2):494-508.

144. Gupta SC, Sundaram C, Reuter S, et al. Inhibiting NF- $\kappa$ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. *Biochim Biophys Acta*. 2010 Oct-Dec;1799(10-12):775-87.
145. Vaidyanathan G, Cismowski MJ, Wang G, et al. The Ras-related protein AGS1/RASD1 suppresses cell growth. *Oncogene*. 2004 Jul 29;23(34):5858-63.
146. Nojima M, Maruyama R, Yasui H, et al. Genomic screening for genes silenced by DNA methylation revealed an association between RASD1 inactivation and dexamethasone resistance in multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2009 Jul 1;15(13):4356-64.
147. Gao S, Jin L, Liu G, et al. Overexpression of RASD1 inhibits glioma cell migration/invasion and inactivates the AKT/mTOR signaling pathway. *Sci Rep*. 2017 Jun 9;7(1):3202.
148. O'Brien L, Hosick PA, John K, et al. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2015 Apr;26(4):212-20.
149. Silveira VS, Scrideli CA, Moreno DA, et al. Gene expression pattern contributing to prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:310e314.
150. Kim SS, Seong S, Lim SH, et al. Targeting biliverdin reductase overcomes multidrug resistance in leukemia HL60 cells. *Anticancer Res* 2013;33:4913e4919.
151. Dördelmann M, Reiter A, Borkhardt A et al. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1999 Aug 15;94(4):1209-17.
152. Ramezani-Rad P, Geng H, Hurtz C, et al. SOX4 enables oncogenic survival signals in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2013 Jan 3; 121(1): 148–155.
153. Lu JW, Hsieh MS, Hou HA, et al. Overexpression of SOX4 correlates with poor prognosis of acute myeloid leukemia and is leukemogenic in zebrafish. *Blood Cancer J*. 2017 Aug 25;7(8):e593.
154. Cai Q, Jeffrey Medeiros L, Xu X, et al. MYC-driven aggressive B-cell lymphomas: biology, entity, differential diagnosis and clinical management. *Oncotarget*. 2015 Nov 17; 6(36): 38591–38616.

155. Chow YP, Alias H, Jamal R. Meta-analysis of gene expression in relapsed childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *BMC Cancer*. 2017 Feb 10;17(1):120.
156. Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Tödling J, et al. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006 Aug 1;12(15):4553-61.

## ANEXOS

### ANEXO A: Publicación de artículo científico

1. Arch Med Res. 2016 Nov;47(8):644-655. doi: 10.1016/j.arcmed.2016.12.005.

Gene Expression Profiling of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Very Early Relapse.

Núñez-Enríquez JC, Bárcenas-López DA, Hidalgo-Miranda A, Jiménez-Hernández E, Bekker-Méndez VC, Flores-Lujano J, Solís-Labastida KA, Martínez-Morales GB, Sánchez-Muñoz F, Espinoza-Hernández LE, Velázquez-Aviña MM, Merino-Pasaye LE, García Velázquez AJ, Pérez-Saldívar ML, Mojica-Espinoza R, Ramírez-Bello J, Jiménez-Morales S, Mejía-Aranguré JM; MIGICCL.

**Background and Aims.** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer worldwide. Mexican patients have high mortality rates, low frequency of good prognosis biomarkers (i.e., *ETV6-RUNX1*) and a high proportion is classified at the time of diagnosis with a high risk to relapse according to clinical features. In addition, very early relapses are more frequently observed than in other populations. The aim of the study was to identify new potential biomarkers associated with very early relapse in Mexican ALL children through transcriptome analysis.

**Methods.** Microarray gene expression profiling on bone marrow samples of 54 pediatric ALL patients, collected at time of diagnosis and/or at relapse, was performed. Eleven patients presented relapse within the first 18 months after diagnosis. Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) was used to perform gene expression analysis. Annotation and functional enrichment analyses were carried out using Gene Ontology, KEGG pathway analysis and Ingenuity Pathway Analysis tools.

**Results.** *BLVRB*, *ZCCHC7*, *PAX5*, *EBF1*, *TMOD1* and *BLNK* were differentially expressed (fold-change >2.0 and *p-value*<0.01) between relapsed and non-relapsed patients. Functional analysis of abnormally expressed genes revealed their important role in cellular processes related to the development of hematological diseases, cancer, cell death and survival and in cell-to-cell signaling interaction.

Conclusions. Our data support previous findings showing the relevance of *PAX5*, *EBF1* and *ZCCHC7* as potential biomarkers to identify a subgroup of ALL children in high risk to relapse.  
2016 IMSS. Published by Elsevier Inc.



## ORIGINAL ARTICLE

## Gene Expression Profiling of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children with Very Early Relapse

Juan Carlos Núñez-Enríquez,<sup>1</sup> Diego Alberto Bárcenas-López,<sup>2</sup> Alfredo Hidalgo-Miranda,<sup>3</sup> Elva Jiménez-Hernández,<sup>4</sup> Vilma Carolina Bekker-Méndez,<sup>4</sup> Janet Flores-Lujano,<sup>5</sup> Karim Anastacia Solís-Labastida,<sup>6</sup> Gabriela Bibiana Martínez-Morales,<sup>7</sup> Fausto Sánchez-Muñoz,<sup>7</sup> Laura Eugenia Espinoza-Hernández,<sup>8</sup> Martha Margarita Velázquez-Aviña,<sup>9</sup> Laura Elizabeth Merino-Pasaye,<sup>1</sup> Alejandra Jimena García Velázquez,<sup>1</sup> María Luisa Pérez-Saldívar,<sup>10</sup> Raúl Mojica-Espinoza,<sup>1</sup> Julián Ramírez-Bello,<sup>11</sup> Silvia Jiménez-Morales,<sup>12</sup> Juan Manuel Mejía-Aranguré,<sup>1,11</sup> and MIGICCL<sup>13</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, UNAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional (CMN) "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

<sup>2</sup>Laboratorio de Genética del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), Mexico City, Mexico

<sup>3</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital General "Cuauhtémoc Cárdenas", Centro Médico Nacional (CMN) "La Raza", IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>4</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Epidemiología, Hospital de Epidemiología "Dr. Daniel Alcázar Valdez", "La Raza", IMSS, Mexico City, Mexico

<sup>5</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, UNAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional (CMN) "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

<sup>6</sup>Departamento de Hematología, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" (INCC), Mexico City, Mexico

<sup>7</sup>Servicio de Onc-Pediatría, Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud (SSA), Mexico City, Mexico

<sup>8</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Centro Médico Nacional (CMN) "20 de Noviembre", Instituto de Seguridad Social del Estado de los Trabajadores del Estado (ISSTE), Mexico City, Mexico

<sup>9</sup>Servicio de Oncología, Hospital Pediátrico de Morelos, Secretaría de Salud del IFE, Mexico City, Mexico

<sup>10</sup>Unidad de Genotipificación y Análisis de la Expresión, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Mexico City, Mexico

<sup>11</sup>Unidad de Investigación de Enfermedades Metabólicas y Endocrinas, Hospital Juárez de México, Mexico City, Mexico

<sup>12</sup>Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico

<sup>13</sup>Mexican Inter-Institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia, Instituto Mexicano del Seguro Social, Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado, Secretaría de Salud, Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal, Mexico City, Mexico

Received for publication October 2, 2016; accepted November 24, 2016 (DOI: 10.1016/j.amr.2016.09.007)

**Background and Aims:** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer worldwide. Mexican patients have high mortality rates, low frequency of good prognosis biomarkers (i.e., *ETV6-RUNX1*) and a high proportion is classified at the time of diagnosis with a high risk to relapse according to clinical features. In addition, very early relapses are more frequently observed than in other populations. The aim of the study was to identify new potential biomarkers associated with very early relapse in Mexican ALL children through transcriptome analysis.

**Methods:** Microarray gene expression profiling on bone marrow samples of 54 pediatric ALL patients, collected at time of diagnosis and/or at relapse, was performed. Eleven patients presented relapse within the first 18 months after diagnosis. Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) was used to perform gene expression analysis.

Address reprint request to: Dr. Silvia Jiménez Morales, Laboratorio de Genética del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Parfitero Sur 4800, Arzobal Tepicua, 04610 Ciudad de México, México. Tel. 53501900 - 1115, Fax: 53501999; Email: [sjimenez@inmegen.gob.mx](mailto:sjimenez@inmegen.gob.mx); Dr. Juan Manuel Mejía-Aranguré, Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, UNAE Hospital de Pediatría, Centro Médico

Nacional (CMN) "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Mexico City, Mexico and Coordinación de Investigación en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Foro Académico Nacional de Medicina, 4to piso, Av. Cuauhtémoc 230, 06726 México, DF, México. Phone: +52 55 36276900 - 21294, FAX: +52 55 33616848, E-mail: [juan.mejia@inmegen.gob.mx](mailto:juan.mejia@inmegen.gob.mx), [mejiaj@inmegen.gob.mx](mailto:mejiaj@inmegen.gob.mx)

Annotation and functional enrichment analyses were carried out using Gene Ontology, KEGG pathway analysis and Ingenuity Pathway Analysis tools.

**Results.** *BLVRB*, *ZCCHC7*, *PAX5*, *EBF1*, *TMOD1* and *BLNK* were differentially expressed (fold-change >2.0 and *p* value <0.01) between relapsed and non-relapsed patients. Functional analysis of abnormally expressed genes revealed their important role in cellular processes related to the development of hematological diseases, cancer, cell death and survival and in cell-to-cell signaling interaction.

**Conclusions.** Our data support previous findings showing the relevance of *PAX5*, *EBF1* and *ZCCHC7* as potential biomarkers to identify a subgroup of ALL children in high risk to relapse. © 2016 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Acute lymphoblastic leukemia, Gene expression profiling, Children, Very early relapse, Biomarkers.

## Introduction

Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer worldwide (1). Mexico has one of the highest ALL incidence rates reported (2) and it is one of the few countries in which mortality has not been reduced despite of using the same chemotherapy regimens than in developed countries (3,4). In previous studies, we reported that at the time of diagnosis, almost half of ALL Mexican children are classified as having high risk of relapse according to clinical criteria (5,6) and <20% are identified as positive for one of the four most common gene rearrangements (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* and *MLL* rearrangements) associated with ALL prognosis (5). On the other hand, in developed countries, only one third of patients are classified as having a high risk of relapse at the time of diagnosis (7) and in 32% one of the four most common gene rearrangements mentioned above is detected (8).

Moreover, relapse is one of the main obstacles for achieving better survival rates in our population. Relapses occur in 26.2% of Mexican ALL pediatric patients (9). Noteworthy, they frequently occur in patients of standard risk group (55%) and very early during treatment (9), highlighting the importance of improving current clinical and molecular prognostic stratification in Mexican children with ALL.

Global gene expression profiling has been used in other populations to identify new potential genetic biomarkers associated with relapse in ALL pediatric patients (10–12). This methodology has also revealed possible mechanisms involved in relapse (13,14). *FLT3*, *XIAP*, *CCNB2*, *IKBKG*, *LIMS1*, *TEGT*, *DEFA1-3*, *SH3*, *BP5*, *TOSO*, *survivin*, *TOP2A*, *cyclin B1*, etc. are some examples of genes that have been reported as abnormally expressed in relapsed ALL (15–17). The aim of this study was to perform a transcriptome analysis in very early relapsed ALL children in order to identify new potential biomarkers associated with this outcome in our population.

## Materials and Methods

### Patients

Mexican Inter-Institutional Group for the Identification of Causes of Childhood Leukemia (MIGICCL) conducted a

multicenter cohort study of patients aged <17 years with newly diagnosed ALL between August 1, 2014 and July 30, 2016 treated in Mexico City public hospitals. Diagnosis of ALL was based on the morphologic and immunophenotypic features of leukemic cells. Bone marrow samples (BMS) at the time of diagnostic confirmation and/or at the time of very early relapse (VER) were gathered.

### Clinical Data Collection

Information regarding gender, age at diagnosis, white blood cell count (WBC), percentage of leukemic blasts in bone marrow, immunophenotype, and dates of ALL diagnosis, treatment initiation, last visit, death, and relapse was collected from the patients' clinical charts.

Risk classification at the time of diagnosis was based on the National Cancer Institute (NCI) risk criteria. Patients between 1 and 10 years old and with a leukocyte count <50 × 10<sup>9</sup>/L were classified as NCI standard-risk, whereas those aged ≥10 years or with a leukocyte count ≥50 × 10<sup>9</sup>/L were classified as NCI high-risk, as previously was described (6).

Very early bone marrow relapse was defined when a patient who reached first complete remission (CR) presented ≥25% lymphoblasts in a bone marrow aspirate within the first 18 months after diagnostic confirmation. Very early central nervous system (CNS) relapse was characterized as the presence of morphologically identified lymphoblasts on smears of cerebrospinal fluid (CSF) cytocentrifuged preparations with a CSF mononuclear cell count >5/μl or as the evidence of tumor infiltration in the CNS following the first CR during the first 18 months after ALL diagnosis (18).

Approval by the National Scientific Research and Ethics Committee was obtained with the number R-2013-785-068. Written informed consent was obtained from the child's parents and assent was obtained from patients ≥8 years of age.

### RNA Isolation and Gene Rearrangement Detection

White blood cells from bone marrow were treated with TRIzol reagent (Invitrogen Life Technologies) and stored at –80°C. Total RNA was extracted and purified using standard protocols. With a conventional RT-PCR, chimeric



gene detection (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*) was performed based on protocols previously published (5).

#### RNA Preparation for Microarrays

RNA integrity was evaluated by capillary electrophoresis using the Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Only those BMS with a RNA integrity number (RIN) >7.0 were included in microarray analysis (MA). MA was conducted according to manufacturer protocols (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA). Briefly, the first-strand cDNA, was synthesized from 200 ng of RNA and using Superscript II reverse transcriptase primed with a poly (T) oligomer that incorporated T7 promoter. To obtain cRNA, the second strand cDNA synthesis was followed by *in vitro* transcription. This cRNA was used as template for a second cDNA synthesis cycle with incorporated dUTPs into the new strand. After cDNA fragmentation using uracil-DNA glycosylase and purin-pyrimidin endonuclease; fragments were biotin-labeled (hybridization 45°C for 16 h), stained (streptavidin-phycoerythrin conjugate), washed and scanned also following Affymetrix HTA 2.0 chips protocol. All GeneChips were visually inspected for irregularities. The global method of scaling, or normalization, was applied to all GeneChips. Quality measures, likewise the percentage of present genes and the ratio of endogenous genes, indicated a high overall quality of samples and assays.

#### Gene Expression Profiling

Gene expression analysis (GEA) was done using the high-resolution array of Affymetrix GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0), which evaluates the expression of 67,528 different genes. This array was designed to interrogate all transcript isoforms in the human transcriptome with >6 million probes targeting coding transcripts, exon-exon splice junctions, and non-coding transcripts (19). Sample processing, labeling and hybridization were performed using the Affymetrix GeneChip WT PLUS with the WT Terminal Labeling Kit, according to the manufacturer's guidelines (Affymetrix). Scanning and data extraction of the microarray were followed by the transformation of fluorescence data into CEL files employing the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software.

#### Data Normalization and Analysis Plan

Background correction, probe set signal integration, and quantile normalization were performed through Robust Multichip Analysis (RMA) algorithm, which is implemented in Affymetrix Expression Console (ECS) software (20).

*Unsupervised analysis.* To identify a set of genes that might define molecular subtypes profiles and potential genes that might constitute evidence for VER in ALL patients, we performed an unsupervised clustering analysis of gene expression using R software (Bioconductor package), without considering

any clinical features or molecular information. Those genes whose levels of expression highly differed (up- or downregulated) from the geometric mean were selected for a further cluster analysis. Afterwards, pre-treatment chip files were also analyzed by Affymetrix Transcriptome Analysis Console (TAC) software to detect differentially expressed genes (DEGs).

*Supervised analysis.* This approach was conducted to identify differentially expressed genes from:

- i) BMS at the time of diagnosis from patients who eventually relapsed within the period of study vs. those who did not.
- ii) BMS at the time of diagnosis, indistinctly if patients relapsed or not vs. BMS at relapse.
- iii) BMS from patients who relapsed, matching BMS from diagnosis with their corresponding BMS at relapse.

Genes whose fold-change (FC) between each comparative group was  $\geq 2.0$  (with a  $p$  value cut-off of  $< 0.01$ ) were selected. In addition, false discovery rate (FDR) was applied for multiple hypotheses testing using Benjamini-Hochberg correction (21). Genes with a FDR-adjusted  $p$  value (adjusted  $p$  value)  $\leq 0.05$  were accepted. Enrichment analysis on gene sets was performed using Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, <http://www.genome.jp/kegg/>) and the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/tools.jsp>) (free available web tools).

The pathways and functional analyses were generated through the use of QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)) in order to characterize the cellular and molecular functions and to identify the enriched canonical pathways/networks for the selected candidate gene list.

#### Validation of Microarray Data

Microarray results were validated using quantitative real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR). For this purpose, we determined the level of gene expression of DEGs differentially expressed ( $FC > 2$ ,  $p < 0.01$ , adjusted  $p$  value  $\leq 0.05$ ) between diagnosis of BMS of relapsed and non-relapsed patients (1:2), matched based on NCI risk group. Absolute quantification (AQ) was performed using the standard curve method and the average result was reported.

Probes of Human Universal ProbeLibrary and target-specific PCR primers were selected using the ProbeFinder assay design software v.2.50 (<http://www.universalprobelibrary.com>) (Supplementary Table 1). The comparative cycle of quantification (Cq) method was used to determine gene expression levels. FC for each gene was calculated using delta Ct' ( $\Delta\Delta Ct$ ) values. Reactions were performed using standard protocols. cDNA was prepared from 250 ng of total RNA for each sample using random primers and the first strand cDNA Synthesis Kit (Roche). Reactions were performed in

a final volume of 20  $\mu$ l under the following conditions: at 95°C for 10 min, 45 cycles at 95°C for 10 s, 60 cycles for 30 s and 72°C for 1 sec in a LightCycler 480 using the LightCycler probe master reagent (Roche) (22). *HPRT* gene was used as a control reference gene.

#### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed by using SPSS IBM (Statistical Package for the Social Sciences, Inc., v.21, Chicago, IL).  $\chi^2$  or Fisher exact tests were calculated when appropriate to compare demographic, clinical and molecular characteristics between groups (VER/not VER); *p* values <0.05 were considered statistically significant. Student *t*-test and ANOVA were used to compare gene expression levels between subgroups. Adjusted *p* values <0.05 were considered as statistically significant.

## Results

### Study Population

Samples of 54 patients diagnosed with novo ALL were analyzed in the present study. Thirty patients (55.6%) were male and had a median age of 89 months (7.4 years) with a range of 2–195 months. Eleven patients belonged to the group of very early relapse and the remaining 43 to non-relapse group. No statistically significant differences between these groups regarding gender, age at diagnosis, leukocyte count, immunophenotype, risk classification and/or frequency of gene rearrangements studied were observed (Table 1). However, mortality was higher in the VER group in comparison with those patients who did not develop VER in the first 18 months of treatment (Table 1).

Isolated bone marrow (iBM) relapses occurred in nine patients and only two patients had isolated CNS relapse.

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of Mexican acute lymphoblastic leukemia children included

Clinical features	ALL children				<i>p</i> *
	No relapse		Very early relapse		
	Group		Group		
	<i>n</i> = 43		<i>n</i> = 11		
	<i>n</i>	%	<i>n</i>	%	
Gender					
Male	23	53.5	7	63.6	0.39
Female	20	46.5	4	36.4	
Age at diagnosis in months					
Median (min-max)	80 (2-195)		152 (44-187)		
Age group (years)					
<1	2	4.7	—	—	0.07
1-9.99	26	60.5	3	27.3	
≥10	15	34.9	8	72.7	
WBC at diagnosis ( $\times 10^9/L$ )					
Median (min-max)	23.37 (2.88-670)		11.18 (0.81-52.17)		
<10	14	32.6	5	45.5	0.57
10-49.99	12	27.9	1	9.1	
50-99.99	5	11.6	2	18.2	
≥100	12	27.9	3	27.3	
Immunophenotype					
Pre-B Cell	43	100	10	91	0.20
T Cell	—	—	1	9.1	
BM blast at diagnosis (%)					
<90	15	34.9	3	27.3	0.46
≥90	28	65.1	8	72.7	
NCI risk group					
High risk	26	60.5	9	81.8	0.16
Standard risk	17	39.5	2	18.2	
Gene rearrangement					
<i>ETV6-RUNX1</i>	8	18.6	2	18.2	0.40
<i>TCF3-PBX1</i>	6	14.0	—	—	
<i>BCR-ABL1</i>	3	7.0	—	—	
Not Detected	26	60.5	9	81.8	
Death					
Yes	7	16.3	5	45.5	0.03

WBC, white blood cell count; BM, bone marrow; NCI, National Cancer Institute; SR, standard risk; HR, high risk.

\*Chi square or Fisher exact test when appropriate.

On average, relapses occurred 10.6 months after diagnosis. In two patients, the first relapse occurred within the fourth month after treatment initiation; they relapsed to bone marrow and were classified with a pre-B immunophenotype and as high risk according to the criteria of the NCI at diagnosis. One of the patients died 2 months after relapse occurred (Table 2).

Patients who relapsed and died ( $n = 5$ ) presented isolated bone marrow relapse. Survival after relapse was 3 months (range 0–8 months) for this group. Noteworthy, a subgroup of two patients who had been classified as standard risk relapsed, and even *ETV6-RUNX1* gene rearrangement was detected in one of them (Table 2).

#### Quality Control Assessment

From BMS analyzed at the time of diagnosis, four did not pass quality control assessment, leaving a total of 50 BMS to be considered for microarray expression analysis. These four corresponded to patients who relapsed.

From BMS analyzed at relapse, only 9/11 approved quality control examination. Therefore, five pairs of samples for the expression analysis at diagnosis and relapse were available (Table 2).

#### Gene Expression Data and Molecular Subtypes

An unsupervised hierarchical cluster analysis was performed in 50 BM samples at the time of diagnosis that passed quality control. The aim for this was to identify groups within the data set without pre-assigning labels. However, no gene expression profile that corresponded to molecular leukemia subtypes (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* group or undetected gene rearrangement) was observed.

#### GEA for Potential Biomarkers Associated with Very Early Relapse Recognition

The first supervised analysis conducted to compare gene expression profiles was done between BMS at the time of diagnosis from patients who eventually relapsed ( $n = 7$ ) within the period of study and those who did not ( $n = 50$ ); 87 coding genes were differentially expressed ( $FC > 2$ ,  $p < 0.01$ ), finding 23 downregulated and 68 upregulated. The most significant upregulated coding genes were *DOCK5*, *KIT*, *ALAS2*, *TFP1*, *SLC4A1*, and *SLC25A37* and downregulated significantly expressed genes were *PAX5*, *EBF1*, *CD22*, *UBASH3B*, *BANK1*, *CD79A*, *ZCCHC7* and *BLK* (Table 3). Nevertheless, none of these genes passed the FDR correction test, but *BLVRB* and *TMOD1* ( $FC = 4.05$  and  $2.24$ ; adjusted  $p$  value =  $0.0077$  and  $0.048$ , respectively) did. Gene expression functional enrichment analysis elucidated that these DEGs were mainly involved in the development of hematological diseases ( $p = 0.032$ ) and cancer ( $p = 2.07E-07$ ). Apoptosis, B-cell

Table 2. Clinical and molecular characteristics at the time of diagnosis and relapse of Mexican children with ALL who relapsed during the first 18 months of treatment

Patient ID	Gender	Age at diagnosis (months)	WBC at diagnosis ( $\times 10^9/L$ )	Immunophenotype	BM blast at diagnosis (%)	NCI-risk group	Gene rearrangement detected at diagnosis	Time to relapse occurrence (months)	Site of relapse	BM blast at relapse (%)	WBC at relapse ( $\times 10^9/L$ )	Death (months)	BMS included in GEA <sup>a</sup>		
													BMS at diagnosis	BMS at relapse	
1	M	187	62.8	Pre-B Cell	90	HR	ND	8	iBM	100	185.0	yes	9	yes	no
2	M	169	97.6	Pre-B Cell	96	HR	ND	4	iBM	85	685.0	yes	6	yes	no
3	F	173	52.1	Pre-B Cell	20	HR	ND	17	iBM	45	12.5	yes	25	yes	no
4	M	44	8.9	Pre-B Cell	97	SR	<i>ETV6-RUNX1</i>	6	iBM	30	10.5	no	22	yes	yes
5	F	146	11.1	Pre-B Cell	74	HR	ND	17	iBM	26	0.8	no	25	yes	yes
6	M	51	8.2	Pre-B Cell	20	SR	ND	9	iCNS	0	2.6	no	10	no	yes
7	M	156	105.2	Pre-B Cell	98	HR	ND	16	iBM	90	15.8	yes	20	no	yes
8	F	152	6.1	T-Cell	100	HR	ND	15	iBM	25	10.5	no	17	yes	yes
9	M	143	119.4	Pre-B Cell	90	HR	ND	4	iBM	95	125.1	no	25	no	yes
10	M	60	521.8	Pre-B Cell	100	HR	ND	7	iCNS	3	3.2	no	9	no	yes
11	F	168	0.8	Pre-B Cell	100	HR	<i>ETV6-RUNX1</i>	14	iBM	76	36.0	yes	14	yes	yes

M, male; F, female; WBC, white blood cell count in peripheral blood; BMS, bone marrow samples; GEA, gene expression analysis; iBM, isolated bone marrow relapse; NCI, National Cancer Institute; SR, standard risk; HR, high risk; ND, non-detected; iCNS, isolated central nervous systems relapse.  
<sup>a</sup>Because they approved quality control examination.

**Table 3.** Top-ranked differentially expressed genes by comparing BMS at the time of diagnosis from patients who eventually relapsed within the first 18 months of treatment and those who did not

Gene symbol	Description	Fold change	<i>p</i>	FDR-adjusted <i>p</i>
<i>CP</i>	Ceruloplasmin (ferroxidase)	2.2	3.97E-11	0.000003
<i>CXCL12</i>	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12	4.44	1.85E-09	0.000021
<i>RAB32</i>	RAB32, member RAS oncogene family	10.16	7.15E-09	0.000051
<i>FABP4</i>	Fatty acid binding protein 4, adipocyte	2.05	1.57E-08	0.000088
<i>MAPKAPK3</i>	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	2.62	5.68E-08	0.000274
<i>LTBP1</i>	Latent transforming growth factor beta binding protein 1	3.85	1.58E-07	0.000592
<i>VCAM1</i>	Vascular cell adhesion molecule 1	4.43	3.40E-07	0.000958
<i>NFE2</i>	Nuclear factor, erythroid 2	5.44	4.54E-07	0.000958
<i>PRSS57</i>	Protease, serine, 57	8.77	4.77E-07	0.000977
<i>TALDO1</i>	Transaldolase 1	7.25	9.08E-07	0.001368
<i>MIER3</i>	Mesoderm induction early response 1, family member 3	-3.22	9.81E-07	0.00141
<i>CD33</i>	CD33 molecule	3.48	0.000001	0.001822
<i>STON2</i>	Stonin 2	3.19	0.000001	0.001822
<i>TRAPPC8</i>	Trafficking protein particle complex 8	-2.46	0.000002	0.002368
<i>GGTA1P</i>	Glycoprotein, alpha-galactosyltransferase 1 pseudogene	2.18	0.000003	0.003227
<i>KLHL24</i>	Kelch-like family member 24	-3.1	0.000003	0.003034
<i>NIDI</i>	Nidogen 1	2.04	0.000003	0.003034
<i>ZNF644</i>	Zinc finger protein 644	-2.97	0.000003	0.003034
<i>BLVRB</i>	Biliverdin reductase B	4.96	0.000005	0.004127
<i>GLBI</i>	Galactosidase beta 1; transmembrane protein with metallophosphoesterase domain	2.25	0.000005	0.004127

GEPs, gene expression profiles; BMS, bone marrow samples.

and T-cell activation, EGF and FGF receptor signaling are the principal pathways in which these genes play a role. *GATA1* showed a low level of differential expression; however, this was one of the master regulator genes. Glutathione biosynthesis was also a highly affected canonical pathway ( $p = 0.0122$ ).

#### Finding Candidate Biomarkers for VER

A second supervised analysis was performed by comparing BMS at the time of diagnosis, indistinctly if patients relapsed or not ( $n = 50$ ), vs. BMS at relapse ( $n = 9$ ); 970 differential expressed probes between groups ( $FC > 2$ ,  $p = 0.01$ ) were observed of which 743 coding genes were tested. From these, 337 were abnormally expressed genes after FDR correction test was applied (adjusted  $p$  value  $< 0.05$ ). Upregulated genes were almost as many as down-regulated genes (168 and 169, respectively) (data not shown). *ELANE* ( $p = 0.000056$ ), *PRTN3* ( $p = 0.000006$ ), *CTSG* ( $p = 0.000012$ ), *PAX5* ( $p = 0.000483$ ), *ZCCH7* ( $p = 0.000139$ ) and *EBF1* ( $p = 0.000173$ ) showed the highest FCs (Supplementary Table 2).

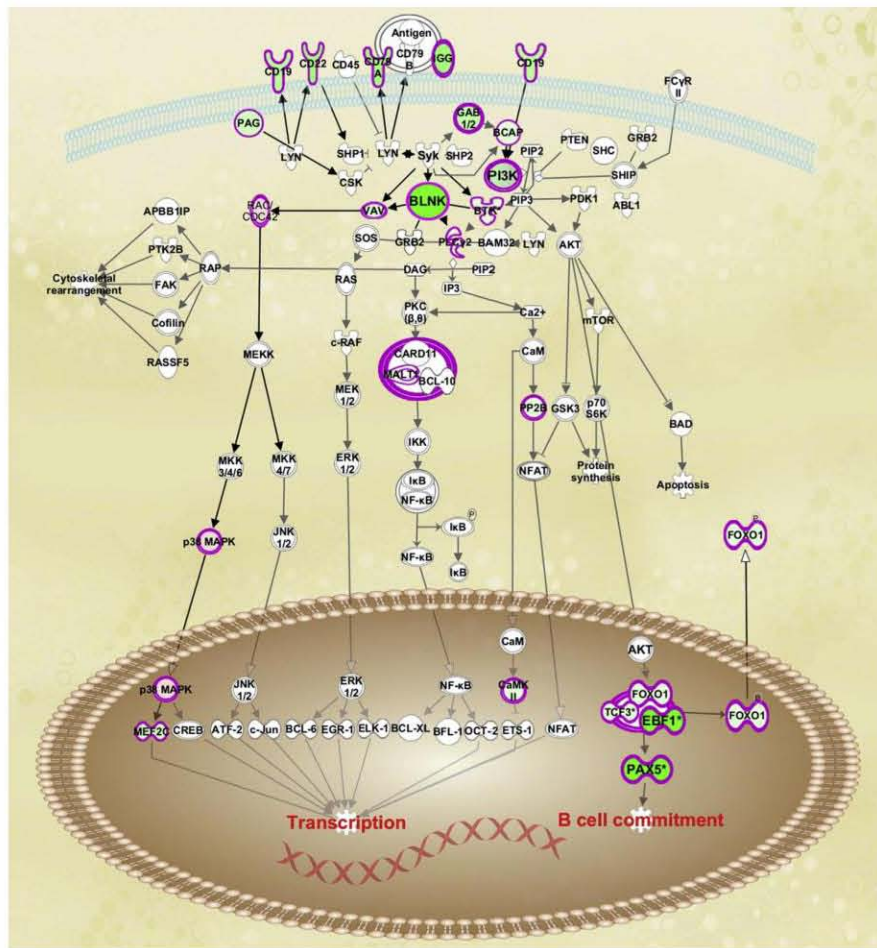
Functional analysis exhibited these genes are involved in the hematological system development and function ( $p = 0.0023$ ), lymphoid tissue structure and development ( $p = 0.00188$ ) and in immune cell trafficking ( $p = 0.00213$ ) process. Based on their molecular and cellular function, 204 genes were related with cell death and survival ( $p = 0.035$ ); 104 with cellular development (0.00251); 201 linked to cellular growth and proliferation

(0.0024); 147 with cell-to-cell signaling and interaction ( $p = 0.0024$ ) and 119 genes associated with cellular movement (0.0021). Gene expression profile suggested that *CEBPA* ( $p = 1.99E-09$ ), *TGM2* ( $p = 2.59E-09$ ), *GATA1* ( $p = 5.7E-07$ ) and *CCL5* ( $p = 4.57E-05$ ) pathways were activated, whereas *SOX11* (1.98E-03) was inhibited. Notably, *PAX5* pathway also was observed as high-enriched gene signaling pathway, consequently to highly abnormal expression of *EBF1* and *BLNK* genes (Figure 1).

The third supervised approach included BMS from patients who relapsed, matching BMS from diagnosis with their corresponding BMS at relapse (five pairs). A total of 145 genes were differentially expressed ( $FC > 2$  and  $p < 0.01$ ) of which 103 were downregulated and 32 upregulated. None of these genes passed the FDR test (adjusted  $p$  value  $> 0.05$ ). Nevertheless, 15 upregulated genes and 34 downregulated genes clustered in relapsed samples (Figure 2). GO enrichment analysis showed that these altered genes are involved in metabolic processes ( $p = 0.46$ ) and alternative splicing ( $p = 0.00013$ ). Pathway analysis exhibited that most were involved in DNA replication ( $p = 0.0473$ ) and B cell activation ( $p = 0.00405$ ).

#### Validation of DEGs Associated with VER by Quantitative RT-PCR

To validate some DEGs associated with VER (*BLNK*, *EBF1* and *ZCCH7*) we used qRT-PCR. These genes were also



**Figure 1.** B-cell receptor signaling pathway. *PAX5*, *EBF1* and *BLNK* were among the highest differentially expressed genes in Mexican acute lymphoblastic leukemia children with very early relapse. Green and red colors signify downregulated and upregulated genes, respectively; color intensity reflects the level of gene expression. This figure was generated through the use of QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis.

included in this validation analysis based on previous data reporting abnormal expression in childhood ALL (23). Gene expression directions change for those selected for validation, consistent with results obtained in microarray analysis. *BLNK*, *EBF1* and *ZCCHC7* expressions were downregulated in patients with VER (Figure 3).

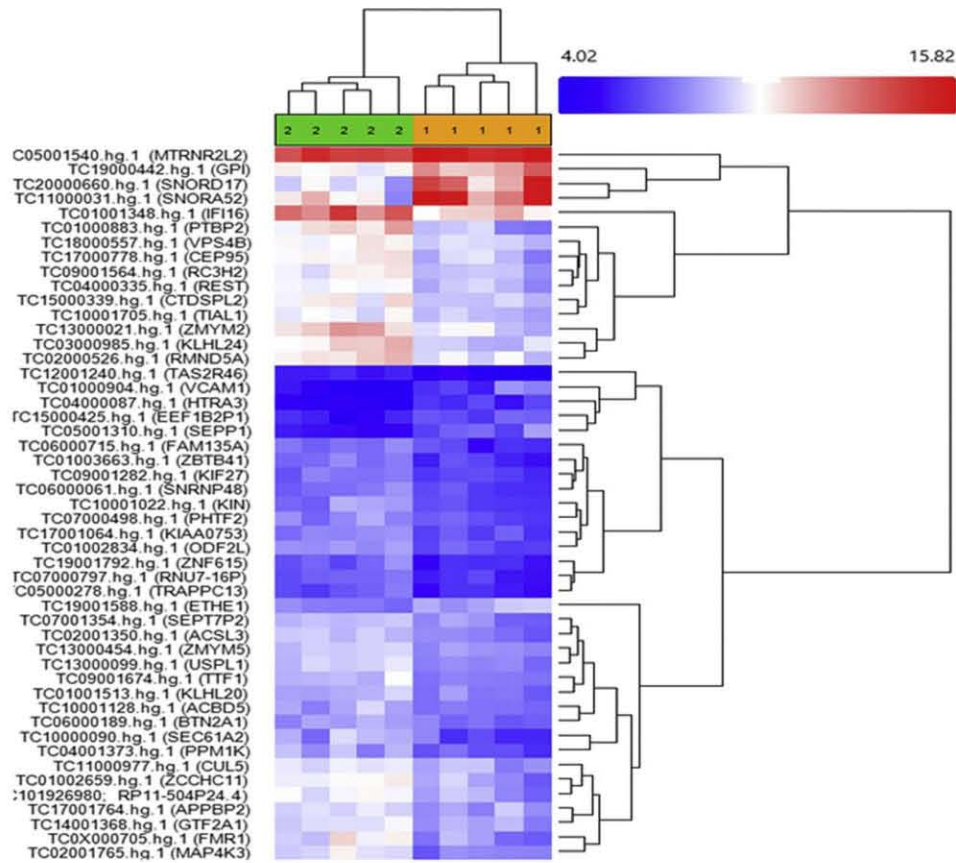
## Discussion

To the best of our knowledge, this study is the first reporting results from a transcriptomic analysis in Mexican ALL

pediatric patients in order to identify new biomarkers associated with VER.

In developed countries, 5-year event-free survival is ~90% (24,25). In contrast, Mexico has one of the highest mortality rates not only in Latin America but also around the world (3,4) and relapses occur in 26.2% of patients (9).

Currently, in public Mexico City hospitals where ALL pediatric patients are treated, the prognostic stratification and allocation treatment are carried out considering clinical factors such as age at diagnosis, leukocyte count in the peripheral blood, the presence or absence of CNS infiltration, immunophenotype, presence of any of the four



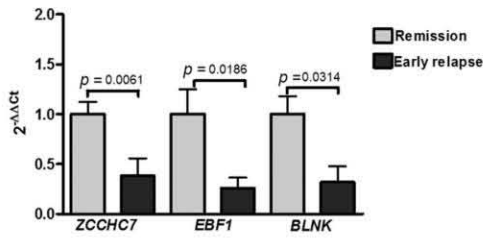
**Figure 2.** Gene expression profiling of very early relapse ALL patients. Heat map displaying the top 15 upregulated genes and top 34 downregulated genes from patients who relapsed, matching BMS from diagnosis (green color) with their corresponding BMS at relapse (orange color). Blue and red colors indicate downregulated and upregulated genes, respectively; color intensity reflects the level of gene expression.

gene rearrangements most frequently associated with ALL prognosis (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* and *MLL-r*) as well as response to prednisone. However, risk stratification seems insufficient to predict which patients will relapse during early stages of treatment because, according to a previous study by our research group (MIGICCL), relapse occurring within the first year after diagnosis is approximately three-fold higher than reported in developed countries in ALL children (13.4 vs. 4.5%, respectively) (26).

It is well known that prognosis of patients who relapse is worse than those who do not. Furthermore, extremely low survival rates are reported in specific subgroups, those relapsing during the first 18 months after diagnosis, those who present iBM and those occurring in NCI high-risk patients (27–30).

In the present study, VER patients died in a significantly higher proportion than patients in the relapse-free group. In addition, five relapsed patients who died presented iBM recurrent disease and had been classified as NCI high-risk patients. Such deaths occurred within the first 8 months after relapse and two died during the first 15 days of re-induction chemotherapy. This highlights once again the need to identify specific biomarkers for our population in order to predict these events and reduce mortality in our children with ALL.

Microarray technology has proven to be a useful approach to identify genes, pathways, and systems involved in leukemogenic processes and also to discover prognosis-related biomarkers (31,32). In the present study we used cDNA microarrays in order to identify gene expression signatures related to a high risk of VER in Mexican ALL.



**Figure 3.** Real-time PCR validation of some DEGs associated with VER (*EBF1*, *BLNK*, and *ZCCH*) in BMS of patients in remission (without relapse) and relapse. mRNA levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . *HPRT* was used as the reference gene. Graphs are presented as mean ( $\pm$ SD) and differences between groups were evaluated by unpaired *t*-test; *p* value was determined.

pediatric patients. We included in this analysis the most common clinical and molecular subgroups of ALL children, except for *MLL* rearrangements (*MLL-r*) subgroup.

It has also been reported that GEA, using high-density microarrays, is a powerful tool for diagnosing and classifying ALL subtypes (33). However, we observed an absence of clustering among BM diagnostic samples regarding molecular subgroups. These findings could be explained by heterogeneity due to a small sample size. Moreover, a variety of other risk-related factors such as gender, age, and leukocyte count might have prevented a distinct signature from being identified.

When we looked for a set of genes associated with a high risk of VER we identified 87 DEGs, which are key molecules related to oncogenesis, apoptosis, B-cell activation and angiogenesis. *BLVRB* was one of the two most significantly abnormally expressed genes at diagnosis of BM samples of patients with VER. This is a cell surface membrane receptor, which participates in the heme-group catabolism (34). Loss-of-function mutations result in exaggerated reactive oxygen species accumulation as a putative metabolic signal leading to differential hematopoietic lineage commitment (35). Likewise, abnormal expression of *BLVR* appeared to be important because it has been identified as a major cryoprotectant. Data in leukemia HL60 cells have shown that overexpression of this gene correlates with prednisolone therapy resistance (12,35).

*TMOD1* was also significantly overexpressed in this analysis. This gene codifies for an erythrocyte membrane protein and is expressed in differentiated cells. In spite of this, direct evidence that *TMOD1* is a leukemogenic mediator has not been documented (36). However, its role as a relevant participant in ALL relapse could be related with cancer cell proliferation because this gene regulates thin filament lengths (37) and abnormal expression of specific isoforms have been associated with a transformed phenotype (38).

*BLNK* resulted as one of the main downregulated genes in VER patients ( $FC = 32.4$ , adjusted *p* value = 0.05) associated with *PAX5* pathway (Figure 1). It is a pivotal adaptor protein in

transduction B cell antigen receptor (BCR) signaling in apoptotic cell death processes (39). As a matter of fact, mutations in this gene completely block B-cell development in humans (40). Because *Blnk*-null mutant mice present a reduction of mature B-cells in the peripheral blood and a pre-B cell accumulation in the bone marrow, it has been proposed that deficient expression of *Blnk* has a primary role in the development of B-cell ALL in mice. Additionally, Hayashi et al. reported that 5–10% of *Blnk* knockout developed pre-B-cell ALL at 4–20 weeks of age (41). Although a lost *BLNK* protein expression has been documented in 50% of the childhood B-lineage ALL cases (42), this gene is not the only responsible gene in human ALL, taking into account that *BLNK* expression is influenced by other relevant genes in leukemia progression such as *EBF1* and *PAX5* (Figure 1) (43). In the present research, both *PAX5* and *EBF1* were among the group with the highest abnormally expressed genes in BMS from children who developed VER. Notably, *EBF1* expression is dependent on *PAX5* and it has been reported that *EBF1* deletions cooperate in leukemogenesis of Down syndrome ALL patients (44).

*PAX5* gene is essential in the lymphopoiesis process because it controls the identification and development of B cells by repressing or activating specific genes in early and late stages. *PAX5* is maintained at a remarkably stable level throughout the life of a B-cell (45). Suppression of *PAX5* expression in hematopoietic compartment of mice induces B-ALL and the restoration of its endogenous expression induces normal B-cell differentiation (46). This was the highest downregulated gene in our relapsed patients. Molecular mechanisms by which *PAX5* is underexpressed in our ALL relapsed patients are unknown. In a recent study conducted by Rosales-Rodríguez et al. (2016, in press) in Mexican ALL children, a high frequency (16.67%) of *PAX5* somatic deletions was found. Therefore, we hypothesize that mono-allelic deletions could be an important mechanism for *PAX5* inactivation in our patients. However, further investigation is required to elucidate this. In addition, fusion translocation and point mutations that disrupt *PAX5* DNA binding or transcriptional regulators have also been reported (47–50). It is important to highlight that almost 50% of the *BCR-ABL1* and *BCR-ABL* like ALL patients (a subpopulation with high risk of relapse) carrier somatic mutations in *PAX5* (48,50).

Noteworthy, *PAX5* also regulates *FLT3* gene, whose increased expression results in a pronounced diminution in bone marrow B lymphopoiesis. Loss of *PAX5* enables early lymphoid and myeloid developmental potential to be influenced by other signals and thus the commitment to alternative lineages at the expense of B cells in an *FLT3* mediated way (51), which could explain the abnormal expression of myeloid lineage genes such as myeloperoxidase (*MPO*) gene in our patients. By definition, ALL blasts are negative for MPO; nevertheless, low level MPO positivity without expression of other myeloid markers has been detected in ALL cases, particularly in cases that entail *BCR-ABL1* translocation. Accordingly,

MPO expression has been suggested as an additional biomarker for minimal residual disease monitoring (52).

As expected, we observed that a set of genes were abnormally expressed (*PAX5*, *EBF1*, *ZCCCH37* and *BLK*) either at diagnosis or at relapse BMS of children with VER. In addition, statistically significant differences in their expression between diagnosis-relapse BMS were also observed, highlighting the importance for further evaluation of these genes as potential minimal residual disease biomarkers or as therapeutic targets in order to prevent relapses. As a matter of fact, *BLK* gene is a potential therapeutic target of drugs currently used in non-small lung cell cancer treatment, osimertinib, because *in vitro* these have shown the capacity of osimertinib to inhibit the activity of *BLK* at clinically relevant concentrations (53).

Finally, matched GEA between diagnosis and relapse samples in VER patients revealed a certain genetic profile with a small set of genes which, in the future, could provide additional information about the biological basis of VER in ALL children. We cannot identify a particular mechanism possibly involved in VER development. We do not rule out that relapse phenotype results in the selection of resistant-therapy minor clones present at diagnosis rather than being due to a direct adaptation of the original disease (54,55).

Our study still has limitations. We cannot disregard that several differentially expressed genes were actually derived from contaminating non-leukemic cells, particularly myeloid cells and T-lymphocytes. Therefore, purification of the ALL cells should be implemented to validate all potential biomarkers (54). Furthermore, additional validation on independent samples seems necessary.

The results of this study point to the need for biomarkers at the time of ALL diagnosis to be identified in Mexican children. Nowadays, these children are being misclassified, resulting in a poor outcome. Even though the high costs that routine genetic biomarker-seeking protocols may imply, cost-benefit assessment considering the implications in reducing mortality rates in our country is worthy of being acknowledged.

Therefore, it is likely that gene expression profiling may also be used in prognostic risk stratification schemes of Mexican ALL children. As a matter of fact, our data revealed some genes as potential predictive biomarkers associated with the development of VERs in ALL children.

To conclude, initial evaluation of children with ALL must include every available predictive tool so that better treatment results can be achieved. This is the best investment.

#### Mexican Inter-institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukaemia

Vilma Carolina Bekker-Méndez, José Refugio Torres-Nava, Janet Flores-Lujano, Karina Anastacia Solís-Labastida, Gabriela Bibiana Martínez-Morales, Fausto Sánchez-Muñoz, Aurora

Medina-Sansón, Nora Nancy Núñez-Villegas, José Gabriel Peñaloza-Gonzalez, Victoria Bolea-Murga, Luz Victoria Flores-Villegas, Raquel Amador-Sanchez, Laura Eugenia Espinoza-Hernández, Rosa Martha Espinosa-Elizondo, Jorge Alfonso Martín Trejo, Martha Margarita Velázquez-Aviña, Laura Elizabeth Merino-Pasaye, Nancy Carolina Reyes-Zepeda, Raúl Mojica-Espinosa, César Raúl González-Bonilla, Mónica Patricia Ortiz Maganda, Ana Itamar González-Ávila, Ruy Xavier Pérez Casillas, Alejandra Jimena García Velázquez, Haydeé Rosas-Vargas, Angélica Rangel-López, Ana Elena Gil-Hernández, María Luisa Pérez-Saldívar, Dulce López Sánchez, Silvia Jiménez-Morales, and Juan Manuel Mejía-Aranguré.

#### Acknowledgments

We thank to the Mexican Inter-Institutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukaemia members: José Refugio Torres-Nava; Aurora Medina-Sansón; Nora Nancy Núñez-Villegas; José Gabriel Peñaloza-Gonzalez; Victoria Bolea-Murga; Luz Victoria Flores-Villegas; Raquel Amador-Sanchez; Rosa Martha Espinosa-Elizondo; Jorge Alfonso Martín Trejo; Nancy Carolina Reyes-Zepeda; César Raúl González-Bonilla; Mónica Patricia Ortiz Maganda; Ana Itamar González-Ávila; Ruy Xavier Pérez Casillas; Haydeé Rosas-Vargas; Angélica Rangel-López; Ana Elena Gil-Hernández; Dulce López Sánchez.

We are so very grateful to the patients and their parents, as well as to the technical expertise of the staff of the Microarray Unit, National Institute of Genomic Medicine (INMEGEN) for their participation during microarray experiments. Funding was provided by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) through its programs, Convocatoria de Proyectos de Investigación para Atender Problemas Nacionales 2013 (PDCPN2013-01-215726, FIS/IMSS/PROT/1364); Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social (SALUD 2007-1-71223/FIS/IMSS/PROT/592; SALUD 2010-1-141026/FIS/IMSS/PROT/895; SALUD 2015-1- 262190/FIS/IMSS/PROT/1533); by Fondo Sectorial de Investigación para la Educación (CB-2007-1-83949/FIS/IMSS/PROT/616 and CB-2015-1-258042, FIS/IMSS/PROT/1548); by Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/PRI0/11/017, FIS/IMSS/PROT/PRI0/14/031, FIS/IMSS/PROT/G10/846, FIS/IMSS/PROT/G12/1134, FIS/IMSS/PROT/G11/951, FIS/IMSS/PROT/MD13/1254, FIS/IMSS/PROT/MD15/1504, FIS/IMSS/PROT/G15/1477 and FIS/IMSS/PROT/PRI0/15/048) and by the Internal Research Program of the Instituto Nacional de Medicina Genómica.

Conflict of Interest: The authors declare no conflict of interest.

#### Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.armed.2016.12.005>.

#### References

1. Siegel R, DeSantis C, Virgo KL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012;62:220–241.



2. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bermúdez-Ríos R, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011;17:355.
3. Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C, et al. Childhood cancer mortality in America, Asia, and Oceania, 1970 through 2007. *Cancer* 2010;116:5063–5074.
4. Curado MP, Pontes T, Guerra-Yi ME, et al. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Rev Panam Salud Publica* 2011;29:96–102.
5. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC, et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican children with acute lymphoblastic leukemia: a population study-report from the Mexican Interinstitutional Group for the identification of the causes of childhood leukemia. *Biomed Res Int* 2014;2014:210560.
6. Martín-Trejo JA, Núñez-Enríquez JC, Fajardo-Gutiérrez A, et al. Early mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in a developing country: the role of malnutrition at diagnosis. A multicenter cohort MIGICCL study. *Leuk Lymphoma*; 2016. [Epub ahead of print].
7. Pui CH, Campana D, Pei D, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med* 2009;360:2730–2741.
8. Pui CH, Mullighan CG, Evans WE, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood* 2012;120:1165–1174.
9. Jiménez-Hernández E, Jaimes-Reyes EZ, Arellano-Galindo J, et al. Survival of Mexican children with acute lymphoblastic leukaemia under treatment with the protocol from the Dana-Farber Cancer Institute 00-01. *Biomed Res Int* 2015;2015:576950.
10. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 2002;1:133–143.
11. Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003;102:2951–2959.
12. Silveira VS, Scrideli CA, Moreno DA, et al. Gene expression pattern contributing to prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2013;54:310–314.
13. Bailey LC, Lange BJ, Rheingold SR, et al. Bone-marrow relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* 2008;9:873–883.
14. Kirschner-Schwabe R, Lottaz C, Tödling J, et al. Expression of late cell cycle genes and an increased proliferative capacity characterize very early relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2006;12:4553–4561.
15. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer* 2006;46:570–578.
16. Szczepanek J, Styczyński J, Haus O, et al. Relapse of acute lymphoblastic leukemia in children in the context of microarray analyses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2011;59:61–68.
17. Chang YH, Yang YL, Chen CM, et al. Apoptosis pathway signature for prediction of treatment response and clinical outcome in childhood high risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Am J Cancer Res* 2015;5:1844–1853.
18. Ceppi F, Cazzaniga G, Colombini A, et al. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Rev Hematol* 2015;8:57–70.
19. Palermo M, Driscoll H, Tighe S, et al. Expression profiling smack-down: human transcriptome array HTA 2.0 vs. RNA-Seq. *J Biomol Tech* 2014;25(Suppl):S20–S21.
20. Purdom E, Simpson KM, Robinson MD, et al. FIRMA: a method for detection of alternative splicing from exon array data. *Bioinformatics* 2008;24:1707–1714.
21. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B* 1995;57:289–300.
22. Hardiman G. *Microarray Innovations: Technology and Experimentation*. 1<sup>st</sup> ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2009. pp. 156–161.
23. Imai C, Ross ME, Reid G, et al. Expression of the adaptor protein BLNK/SLP-65 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2004;18:922–925.
24. Trigg ME, Sather HN, Reaman GH, et al. Ten-year survival of children with acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Leuk Lymphoma* 2008;49:1142.
25. Pieters R, de Groot-Kruseman H, Van der Velden V, et al. Successful Therapy Reduction and Intensification for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Based on Minimal Residual Disease Monitoring: Study ALL10 From the Dutch Childhood Oncology Group. *J Clin Oncol* 2016;34:2591–2601.
26. Krishnan S, Wade R, Moorman AV, et al. Temporal changes in the incidence and pattern of central nervous system relapses in children with acute lymphoblastic leukaemia treated on four consecutive Medical Research Council trials, 1985–2001. *Leukemia* 2010;24:450–459.
27. Roy A, Cargill A, Love S, et al. Outcome after first relapse in childhood acute lymphoblastic leukaemia—lessons from the United Kingdom R2 trial. *Br J Haematol* 2005;130:167.
28. Nguyen K, Devidas M, Cheng SC, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008;22:2142.
29. Beyersmann B, Agthe AG, Adams HP, et al. Clinical features and outcome of children with first marrow relapse of acute lymphoblastic leukemia expressing BCR-ABL fusion transcripts. *BFM Relapse Study Group. Blood* 1996;87:1532.
30. Lawson SE, Harrison G, Richards S, et al. The UK experience in treating relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia: a report on the medical research council UKALLR1 study. *Br J Haematol* 2000;108:531.
31. Van der Velden VH, de Launay D, de Vries JF, et al. New cellular markers at diagnosis are associated with isolated central nervous system relapse in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2016;172:769–781.
32. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:344–357.
33. Bhojwani D, Moskowitz N, Raetz EA, et al. Potential of gene expression profiling in the management of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Paediatr Drugs* 2007;9:149–156.
34. O'Brien L, Hosick PA, John K, et al. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab* 2015;26:212–220.
35. Kim SS, Seong S, Lim SH, et al. Targeting biliverdin reductase overcomes multidrug resistance in leukemia HL60 cells. *Anticancer Res* 2013;33:4913–4919.
36. Liu P, Barb J, Woodhouse K, et al. Transcriptome profiling and sequencing of differentiated human hematopoietic stem cells reveal lineage-specific expression and alternative splicing of genes. *Physiol Genomics* 2011;43:1117–1134.
37. Gokhin DS, Ochala J, Domenighetti AA, et al. Tropomodulin 1 directly controls thin filament length in both wild-type and tropomodulin 4-deficient skeletal muscle. *Development* 2015;142:4351–4362.
38. Helfman DM, Flynn P, Khan P, et al. Tropomyosin as a regulator of cancer cell transformation. *Adv Exp Med Biol* 2008;644:124–131.
39. Nakayama J, Yamamoto M, Hayashi K, et al. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* 2009;113:1483–1492.
40. Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E, et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* 1999;286:1954–1957.

41. Hayashi K, Yamamoto M, Nojima T, et al. Distinct signaling requirements for Dmu selection, IgH allelic exclusion, pre-B cell transition, and tumor suppression in B cell progenitors. *Immunity* 2003;18: 825–836.
42. Jumaa H, Bossaller L, Portugal K, et al. Deficiency of the adaptor SLP-65 in pre-B-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2003; 423:452–456.
43. Revilla-I-Domingo R, Bilic I, Vilagos B, et al. The B-cell identity factor Pax5 regulates distinct transcriptional programmes in early and late B lymphopoiesis. *EMBO J* 2012;31:3130–3146.
44. Hanada I, Terui K, Ikeda F, et al. Gene alterations involving the CRLF2-JAK pathway and recurrent gene deletions in Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia in Japan. *Genes Chromosomes Cancer* 2014;53:902–910.
45. Holmes ML, Pridans C, Nutt SL. The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol* 2008;86:47–53.
46. Liu GJ, Cimmino L, Jude JG, et al. Pax5 loss imposes a reversible differentiation block in B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Dev* 2014;28:1337–1350.
47. Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007;21:1258–1266.
48. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012;22:153–166.
49. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446:758–764.
50. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008; 453:110–114.
51. Griffith M, Griffith OL, Krysiak K, et al. Comprehensive genomic analysis reveals FLT3 activation and a therapeutic strategy for a patient with relapsed adult B-lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol* 2016;44:603–613.
52. Sánchez J, Serrano J, García-Castellano JM, et al. Detection of myeloperoxidase by flow cytometry in acute lymphoblastic leukaemias with BCR-ABL gene rearrangement. *Leukemia* 2001;15: 1671–1672.
53. U.S. Food and Drug Administration; 2015. Available at: [http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2015/208065s0001b1.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/208065s0001b1.pdf). Accessed September 30, 2016.
54. Staal FJ, van der Burg M, Wessels LF, et al. DNA microarrays for comparison of gene expression profiles between diagnosis and relapse in precursor-B acute lymphoblastic leukemia: choice of technique and purification influence the identification of potential diagnostic markers. *Leukemia* 2003;17:1324–1332.
55. Beesley AH, Cummings AJ, Freitas JR, et al. The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: implications for mechanisms of therapy failure. *Br J Haematol* 2005; 131:447–456.

## **ANEXO B. Asistencia a congreso internacional**

Este trabajo fue presentado en la Conferencia Europea de Genética Humana 2017 (modalidad de póster) organizada por la Sociedad Europea de Genética Humana (ESHG por sus siglas en inglés) que se llevó a cabo del 27 al 30 de Mayo de 2017 en Copenhague, Dinamarca, con el título “ Myeloid gene expression in acute lymphoblastic leukemia with very early relapse”.

### **ABSTRACT**

**Introduction:** Acute lymphoblastic leukemia (ALL) is the most common childhood cancer in Mexico, where a high mortality rate has also been reported. Very early relapse (within 18 months from diagnosis) is one of the main causes of death from ALL. To identify genes involved early relapse as well as potential prognostic biomarkers we performed a whole gene expression analysis in Mexican pediatric patients.

**Materials and methods:** We obtained 57 total bone marrow samples (49 at diagnosis and 8 at very early relapse) from patients under 18 years old with pre-B ALL. Gene expression analysis was carried out using oligonucleotide microarrays HTA 2.0 (Affymetrix). To identify differentially expressed genes in relapse samples we used TAC software (Affymetrix). Genes with a fold change of 1.5 and FDR <0.05 were considered statistically significant. Pathway enrichment analysis and biological processes were performed with IPA (QIAGEN) and Gene Ontology (GO).

**Results:** We found 288 differentially expressed genes in the relapse group, of which, genes (*EBF1*, *BLNK*, *PAX5* and *DNTT*) involved in B-cell differentiation were down regulated. Meanwhile, myeloid lineage genes such as *CEBPA*, *S100A9*, *RAB31* and *MPO* ( $p < 0.02$ ,  $0.004$ ,  $0.0007$ ,  $0.001$  respectively) were up regulated. Other differential expressed genes were related with infectious and respiratory diseases.

**Conclusion:** Our analysis support previous studies suggesting that low expression of *PAX5* and *EBF1* switches from B-cell to myeloid lineage gene expression during ALL relapses and exhibited them as potential biomarkers in ALL with very early relapse. More studies are needed to validate these findings.



# 2017

Copenhagen, Denmark - May 27-30

Reg No.: 2976

## CERTIFICATE OF ATTENDANCE CONFIRMATION OF PAYMENT

This is to confirm that

**Diego Alberto BÁRCENAS LÓPEZ**

has participated in the European Human Genetics Conference 2017,  
May 27 – 30, 2017 in Copenhagen, Denmark  
and has paid the registration fee in the amount of

**EUR 150** ,-

*free of VAT according to §2/paragraph 5/Zi.2/USiG*

For the conference organising office

ESHG 2017  
c/o Vienna Medical Academy  
Alser Strasse 4  
1090 Vienna, Austria

*The European Society of Human Genetics is accredited by the European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME) to provide the following CME activity for medical specialists. The EACCME is an institution of the European Union of Medical Specialists (UEMS), [www.uems.net](http://www.uems.net).*

*The European Human Genetics Conference is designated for a maximum of 22 European CME credits. Each medical specialist should claim only those hours of credit that he/she actually spent in the educational activity.*

*EACCME credits are recognized by the American Medical Association towards the Physician's Recognition Award (PRA). Information on the process to convert EACCME credit to AMA credit can be found at [www.ama-assn.org/go/internationalcme](http://www.ama-assn.org/go/internationalcme).*

**Organiser:**  
European Society of Human Genetics

**Congress Office:**  
ESHG 2017  
c/o Vienna Medical Academy  
Alser Str. 4  
1090 Vienna, Austria

**Contact:**  
p: +43 1 405 13 83 11  
f: +43 1 407 82 74  
m: [conference@eshg.org](mailto:conference@eshg.org)  
[www.eshg.org/eshg2017](http://www.eshg.org/eshg2017)

