



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
CAMPO DE CONOCIMIENTO PEDIATRÍA**

**“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES EN NIÑOS CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA DE BUEN PRONÓSTICO PARA DETECTAR CASOS
CON ALTO RIESGO DE RECAÍDA”**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DE DOCTOR EN CIENCIAS MÉDICAS**

**PRESENTA
JUAN CARLOS NÚÑEZ ENRÍQUEZ**

**TUTOR PRINCIPAL
DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI, IMSS
DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA**

CIUDAD DE MÉXICO., MAYO 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.

Contenido

Contenido	2
Abreviaturas	3
Resumen.....	5
Antecedentes	6
Aspectos genéticos y moleculares de LLA	6
Recaída por LLA.....	9
Sobrevida en niños con LLA.....	10
Estratificación pronóstica en pacientes con LLA.....	10
Planteamiento del problema.....	12
Pregunta de investigación	12
Objetivo General:.....	13
Objetivos Particulares:	13
Hipótesis	13
Metodología	14
Variables.....	16
Análisis estadístico.....	19
Resultados	21
Discusión.....	33
Anexos	45

Abreviaturas

HTA 2.0	Human Transcriptome Array 2.0
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
GMIICLN	Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños
MO	Médula Ósea
AMO	Aspirado de Médula Ósea
FDR	False Discovery Rate
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
SNC	Sistema Nervioso Central
LCR	Líquido Cefalorraquídeo
SLE	Sobrevida Libre de Eventos
QT	Quimioterapia
Pre-B	Precursor de Células B
RNA	Ácido Ribonucleico
RC	Remisión completa
IR	Inducción a la Remisión
MTX	Metotrexato
6-MP	6-mercaptopurina
mRNA	Ácido Ribonucleico de tipo mensajero
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementario
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa en Tiempo Real
PCA	Análisis de Componentes Principales
GDE	Genes Diferencialmente Expresados
AQ	Cuantificación Absoluta

NCI	National Cancer Institute
MMO	Muestras de Médula Ósea
GO	Gene Ontology
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
EROs	Especies Reactivas de Oxígeno
RMT	Recaídas muy tempranas
MPO	Mieloperoxidasa

Resumen

Antecedentes. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer infantil más común. México, tiene las tasas de incidencia y de mortalidad por LLA más altas del mundo. Recientemente, en un estudio multicéntrico realizado en hospitales públicos de la Ciudad de México se reportó que, los niños con LLA tienen una baja frecuencia de rearrreglos génicos asociados a un buen pronóstico (*ETV6-RUNX1*) y una elevada frecuencia de rearrreglos génicos asociados a mal pronóstico (*TCF3-PBX1*). Una elevada proporción (54%) de niños mexicanos con LLA son clasificados al momento del diagnóstico como de alto riesgo de recaer y morir, en comparación con lo reportado para niños de países desarrollados (~30%). Asimismo, se ha reportado que las recaídas en los niños mexicanos ocurren muy tempranamente en alta proporción (17%) durante el primer año de tratamiento. Hasta un 50% de niños que recaen, corresponden al grupo clasificado como de buen pronóstico (riesgo estándar), quienes reciben una quimioterapia menos intensa. **Objetivo:** Identificar biomarcadores en niños con leucemia linfoblástica aguda para detectar casos con alto riesgo de recaída. **Metodología:** Se diseñó un estudio de casos y controles anidado en una cohorte, prospectivo, multicéntrico, en ocho hospitales públicos de la Ciudad de México que atienden niños con LLA. Se realizó un análisis de perfiles de expresión génica por microarreglos utilizando Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) en 54 niños con LLA. De éstos 54 pacientes, once con recaída muy temprana (primeros 18 meses de tratamiento) y 43 pacientes sin recaída. Se buscaron los genes diferencialmente expresados (fold-change >2.0 y valor de p <0.01). Se utilizaron las herramientas Gene Ontology, KEGG pathway analysis and Ingenuity Pathway Analysis. **Resultados.** Los genes identificados en pacientes con recaída muy temprana fueron: *BLVRB*, *ZCCHC7*, *PAX5*, *EBF1*, *TMOD1* y *BLNK*. El análisis de funcionalidad y enriquecimiento mostró que dichos genes juegan un papel importante en procesos celulares relacionados al desarrollo del sistema hematopoyético, cáncer, muerte celular y apoptosis. **Conclusiones:** Los genes identificados en el presente estudio han sido previamente reportados como asociados a la recaída de la enfermedad y a resistencia a fármacos usados en la quimioterapia de niños con LLA.

Palabras clave: leucemia, expresión génica, recaída, biomarcadores, niños.

Antecedentes

El cáncer infantil constituye uno de los principales problemas de salud pública en México y en todo el mundo debido a su elevada letalidad. En México, el cáncer infantil, y en particular la leucemia linfoblástica aguda (LLA), representa la segunda causa de muerte en niños de 5-14 años de edad, solo superada por los accidentes [1-4]. Asimismo, de acuerdo a un reporte de la Organización Panamericana de la Salud en el año 2011, nuestro país es de los pocos de América Latina que no ha podido reducir la mortalidad por esta enfermedad en los últimos 20 años; y que incluso se observa una tendencia al incremento de la mortalidad por este tipo de cáncer en nuestra población [5].

Sin embargo, la LLA no solo tiene una elevada mortalidad en nuestra población, sino también una de las incidencias más elevadas de todo el mundo, y similar a la reportada para hispanos que viven en los Estados Unidos. De acuerdo con un estudio realizado en los nueve hospitales públicos de la Ciudad de México por el Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños (GMIICLN), se reportó que, la tasa de incidencia para LLA fue de 49.5 casos por millón de niños menores de 15 años [7]. A diferencia de la incidencia de LLA en población caucásica y afroamericana de Estados Unidos en donde la incidencia de LLA es de 33 y 15 casos por millón de niños menores de 15 años, respectivamente [6-7].

La LLA comprende alrededor del 30% de todos los tipos de cáncer en niños, y el 80% de los casos de leucemia aguda que ocurren en la edad pediátrica. Es una entidad clínica y biológicamente heterogénea caracterizada por la proliferación desordenada de células inmaduras de la serie linfóide (linfoblastos) que infiltran la médula ósea (MO) y cualquier otro órgano (sistema nervioso central, testículos, ovarios, bazo, etc.). La infiltración por linfoblastos en la MO, provocan la sustitución de la hematopoyesis normal dando lugar al cuadro clínico de la enfermedad, el cual está caracterizado por cinco síndromes: a) síndrome anémico, b) hemorrágico, c) febril, d) infiltrativo y d) metabólico [8-11].

El diagnóstico de la LLA se realiza de acuerdo con el cuadro clínico de la enfermedad, características morfológicas de las células leucémicas en el aspirado de médula ósea (AMO) (tinción de Wright-Giemsa), por sus propiedades en la tinción citoquímica (PAS positivo y mieloperoxidasa, Sudán negro B, α -naftil acetato esterasa y α -naftil butirato esterasa negativos) así como por sus características de inmunofenotipo de linaje B (HLA-DR+, CD34+, TdT+, CD79a+, CD19+, CD20+, CD22+, CD10+, Igc+; células B madura: CD79a+, CD19+, CD10+/-, CD20+, Igc-, IgS+) y/o de linaje T: CD7, CD2, CD3, CD5, CD1a) [9-11]. Aproximadamente, el 80% de las LLA son pre-B, 3% son B maduras, 9% pre-B transicionales y el restante son de linaje T. Una diferencia en estas proporciones corresponde a las descritas para poblaciones descendientes de africanos e hispanos en donde la frecuencia de LLA de linaje T es mayor que en otras poblaciones [8-11].

Aspectos genéticos y moleculares de LLA

Las alteraciones genéticas más comunes en pacientes con LLA son las aneuploidias. Entre ellas, se encuentra la hiperdiploidía (más de 50 cromosomas) y la hipodiploidía (menos de 44 cromosomas) que se presentan aproximadamente en el 40% y 3% de los pacientes, respectivamente [12].

Por otro lado, se encuentran las alteraciones estructurales como las translocaciones cromosómicas que pueden derivar en la expresión de genes quiméricos, también llamados rearrreglos génicos. Los cuatro rearrreglos génicos más prevalentes y para los cuáles se han diseñado esquemas de quimioterapia o existen fármacos específicos son: *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)* o *t(12;21)*; *BCR-ABL1 menor (Cromosoma Filadelfia)* o *t(9;22)*; *E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)* o *t(1;19)*, y las fusiones que involucran al gen *MLL* (principalmente *MLL-AF4*) [13].

La fusión génica *ETV6-RUNX1* se ha reportado hasta en el 44% de los casos; mientras que, el cromosoma Filadelfia *t(9;22) (BCR-ABL1 menor)* se detecta en el 3-5% de los casos y el *TCF3-PBX1* y *MLL-AF4* se han descrito en el 5% y 6% de los niños con LLA, respectivamente [14-15].

Dichas frecuencias corresponden a lo descrito para niños de países desarrollados. Sin embargo, en dos estudios independientes realizados en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) por Jiménez-Morales y en el Centro Médico Nacional La Raza por Daniel-Cravioto y cols., se reportaron importantes diferencias en las frecuencias de estos rearrreglos [16-17].

Posteriormente, en un estudio multicéntrico realizado por el GMIICLN en ocho hospitales públicos de la Ciudad de México durante 2010-2012, incluyendo 282 niños con LLA, se observó una baja frecuencia del rearrreglo *ETV6-RUNX1* (7.4%) el cual está asociado a un buen pronóstico de la enfermedad y por el otro lado, una elevada frecuencia para *TCF3-PBX1* (7.1%) el cuál está asociado con el mayor riesgo de recaídas a sistema nervioso central y bajas tasas de supervivencia, confirmando la presencia de importantes diferencias con respecto a otros grupos étnicos en la frecuencia de estos marcadores moleculares asociados al pronóstico [17].

Con relación a la LLA de linaje T, cerca del 30% de los casos presentan translocaciones que involucran a los cromosomas 10, 11 y 14, así como rearrreglos en los genes *TLX1 (HOX11)*, *TLX3 (HOX11L2)*, *LYL1*, *TAL1*, *MLL* y mutaciones en el gen *NOTCH1* [16, 18,19].

Aunque las aneuploidias y los rearrreglos génicos son marcadores comunes que apoyan al clínico en la estratificación pronóstica y en el tratamiento de los niños con LLA, las herramientas genómicas también han permitido evidenciar que mutaciones puntuales, deleciones/inserciones (InDel), duplicaciones y las variaciones en el número de copias (CNVs, del inglés copy number variations) son altamente recurrentes en esta neoplasia y podrían servir en un futuro como marcadores asociados al pronóstico [15, 19-22]. Asimismo, se ha reportado que la naturaleza y frecuencia de las alteraciones genómicas dependen del subtipo de LLA que se esté estudiando. Por ejemplo, la LLA con cariotipos hipodiploides, frecuentemente porta mutaciones en los genes *IKAROs*, *IKZF2*, *CRLF2* y en genes involucrados de la ruta de señalización de *RAS* [13, 22-25]; o por ejemplo, las leucemias positivas para los rearrreglos génicos *BCR-ABL1* y *TEL-AML1* presentan con mayor frecuencia deleciones en relación a las leucemias positivas para el rearrreglo *MLL-AF4* [14,26-28].

Los genes comúnmente afectados son aquellos que participan en la diferenciación de los linfocitos B (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1* y *LMO2*), los genes denominados supresores de tumor y reguladores del ciclo celular (*CDKN2A/CDKN2B*, *PTEN* y *RB1*), así como los genes reguladores de la transcripción y co-activadores (*TBL1XR1*, *ETV6* y *ERG*), entre otros [14,15,29,30]. Por otro lado, se ha descrito que cuando la LLA no presenta anomalías

citogenéticas, ésta se caracteriza por presentar mutaciones en la familia de los factores de transcripción ETS.

Los estudios de expresión génica por microarreglos han revolucionado la investigación del cáncer y han exhibido la complejidad genética de la LLA infantil [31]. Se ha utilizado para la identificación de nuevos subgrupos moleculares, el descubrimiento de potenciales biomarcadores asociados al pronóstico de la enfermedad en particular para recaídas, y se ha utilizado como herramienta de apoyo en el diagnóstico y estratificación pronóstica de los niños con LLA que en conjunto con el uso de otras herramientas genómicas y de métodos para detectar enfermedad mínima residual han permitido lograr grandes avances en el tratamiento de pacientes de países desarrollados en la última década [31-34].

Particularmente, se ha descrito que algunos rearrreglos génicos como *ETV6-RUNX1* y *BCR-ABL1*, así como en los casos hipodiploides se asocian con perfiles de expresión únicos, lo cual ha favorecido la identificación de nuevos subgrupos moleculares entre aquellos pacientes con ausencia de alteraciones numéricas y/o estructurales. De hecho, los estudios de expresión de todo el genoma sugieren que existen por lo menos 7 subtipos de leucemia y que esto puede o no estar asociado a anomalías cromosómicas específicas [14,31]. Así fue como por ejemplo, se observó que existía similitud en el perfil de expresión entre casos *BCR-ABL1* positivos y algunos casos negativos a dicho rearrreglo, que posteriormente tras identificar las mutaciones asociadas a este perfil parecido al del Cromosoma Filadelfia es como se logra identificar a los casos Ph-like los cuales responden adecuadamente al tratamiento con imatinib utilizado también en el tratamiento de pacientes *BCR-ABL1* positivos [31-36].

Con relación al uso de los perfiles de expresión génica por microarreglos como una herramienta que ha permitido la identificación de potenciales biomarcadores asociados a la recaída de los pacientes pediátricos con LLA se han llevado a cabo múltiples estudios. Para su identificación, se han considerado como potenciales biomarcadores aquellos genes sobre-expresados (>2 veces) o sub-expresados (<2 veces) ajustados por un false discovery rate (FDR) <0.05 entre la muestra de la recaída y su control. Como muestras que han sido utilizadas como controles se encuentran aquellas obtenidas en un momento previo a la recaída, sobre todo se han utilizado las muestras del mismo paciente al momento del diagnóstico (muestras pareadas: diagnóstico-recaída) en donde el paciente es su propio control, y también se han utilizado muestras correspondientes al momento de la confirmación diagnóstico de pacientes sin recaída. Además, dichos genes deben jugar un papel importante desde el punto de vista del comportamiento biológico de la enfermedad. Por ejemplo, aquellos involucrados en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN, apoptosis, oncogénesis, resistencia a la quimioterapia y metástasis [34-37].

Algunos de los potenciales biomarcadores que han sido identificados en los últimos años a través de análisis de expresión génica por microarreglos asociados a la recaída de niños con LLA son *BRCA2*, *TOP2A*, *KIF 11*, *RAD51*, *CCNB2*, *LIMS1*, *TEGT*, *TOSO*, *CD79a*, *TPX2*, *KIFC1*, entre otros [34-37].

Por otra parte, con dicha tecnología Beesley cols., describieron una firma de expresión génica asociada a las recaídas tardías (aquellas que ocurrieron después de 6 meses de haber concluido la quimioterapia) de niños con LLA, la cual estaba compuesta por los genes *BSG*, *GRP58*, *GTF2F1*, *RPN1*, *SOX4*, *PBX2*, *PIP5K1A*, *TYMS*, entre otros, que

fueron los 20 genes con la mayor expresión diferencial entre muestras pareadas (diagnóstico-recaída) de 11 niños con LLA [38].

En otro estudio realizado por Kang y cols., en 97 niños con LLA se identificaron tres biomarcadores altamente predictivos para el riesgo de recaída, independientes de la edad al momento del diagnóstico y de la presencia del rearrreglo génico *MLL*. Los genes *FLT3*, *IRX2* y *TACC2* fueron identificados mediante expresión génica por microarreglos. Mientras que, una baja expresión de *FLT3* se asoció con un buen pronóstico de la enfermedad, los genes *IRX2* y *TACC2* se asociaron un alto riesgo para recaer. Además, los investigadores identificaron una firma de expresión compuesta por siete genes la cual estaba asociada con un riesgo incrementado para recaer [39].

Recaída por LLA

De un veinte a un veinticinco por ciento de los pacientes pediátricos con LLA tienen falla terapéutica secundaria a recaída. El pronóstico de los pacientes que presentan recaída es peor que aquellos que no la presentan. El principal sitio a donde recaen los pacientes con LLA es a la médula ósea (MO, recaída hematológica), en segundo lugar, las recaídas ocurren al sistema nervioso central (SNC), en tercer lugar, ocurren a testículos en hombres y a ovarios en las mujeres. El momento para que ocurra una recaída a cualquiera de estos órganos es variable siendo las recaídas muy tempranas (primeros 18 meses de tratamiento) las que tienen el peor pronóstico, con tasas de sobrevida global menores al 30% (Tabla 1) [40].

Tabla 1. Momentos en que pueden ocurrir las recaídas en los pacientes con LLA
Recaídas muy tempranas
< 18 meses después del diagnóstico
Recaídas tempranas
> 18 meses después del diagnóstico
< 6 meses después de finalizada la quimioterapia de 1ª línea
Recaídas tardías
> 6 meses después de finalizada la quimioterapia de 1ª línea

El tratamiento de las recaídas se basa en el uso de quimioterapia (QT) que previamente no se había utilizado, es más intensiva y se conoce como QT de reinducción e intensificación.

La recaída por LLA se sospecha cuando reaparecen signos, síntomas o hallazgos de laboratorio propios de la enfermedad tras haberse logrado la remisión completa. La remisión completa de la enfermedad se define como una cuenta de blastos en médula ósea menor al 5% al día 30 del inicio de la primera fase de quimioterapia (inducción a la remisión) [40].

Como mencionamos anteriormente, la recaída a MO es la más común de las recaídas con el 40% y se manifiesta clínicamente por citopenias persistentes detectadas mediante un estudio de biometría hemática y confirmadas con aspirado de médula ósea en donde se observa una supresión inexplicable de una o más líneas celulares que persisten durante

tres a cuatro semanas aproximadamente aunado a una proliferación excesiva de blastos [41].

El 20-30% de las recaídas ocurren al SNC; éste tipo de recaída es generalmente asintomática, sin embargo, pueden presentarse síntomas de hipertensión endocraneana (vómito en proyectil, cefalea intensa, rigidez de nuca, parálisis de nervios craneales y papiledema principalmente). El diagnóstico de la recaída se confirma mediante la presencia de blastos en el citocentrifugado de LCR y/o por hallazgos por tomografía (TAC) o por resonancia magnética nuclear (RMN) que lo sugieran [41].

La recaída a nivel testicular ocurre en menos del 5% de los casos y se presenta en la mayoría de los casos como crecimiento testicular no doloroso unilateral y su confirmación se realiza a través de una biopsia [42]. Otros sitios extra medulares en los que puede presentarse la recaída son: riñones, ovarios, piel y ojo, sin embargo, representan frecuencias menores al 1% [42-44].

Sobrevida en niños con LLA

La tasa de sobrevida libre de eventos (SLE) en los pacientes con LLA ha mejorado sustancialmente en los países desarrollados desde 1980. En donde la SLE a 5 años ha sido del 80% y a 10 años del 60%; sin embargo, en países en desarrollo las tasas de curación son menores al 35% [45-51].

En general, las tres principales causas que ocasionan la muerte en los pacientes con LLA son: a) las recaídas b) la progresión misma de la enfermedad (incluye la refractariedad a la QT); y por último c) las relacionadas al tratamiento (infecciones, hemorragia, toxicidad, etc.) [52]; La mayor parte de las muertes que ocurren relacionadas al tratamiento se presentan durante el primer año después del diagnóstico, específicamente en la fase de inducción a la remisión (muerte temprana) y representan del 2.6 al 5% para los países desarrollados y hasta del 12% en países en desarrollo [53-57].

El abandono también se ha considerado como una de las principales causas de muerte en países en desarrollo, ya que al suspender el tratamiento los pacientes presentar una mayor afectación por la enfermedad. Entre los factores que favorecen el abandono en diferentes estudios se encuentra el tener un bajo nivel socioeconómico y una LLA de alto riesgo [57,58].

Estratificación pronóstica en pacientes con LLA

Las características clínicas, citomorfológicas, inmunofenotípicas y moleculares de las LLA son parámetros importantes que permiten valorar el riesgo de recaída y ofrecer el tratamiento más adecuado con el fin de lograr la curación de la enfermedad. Según los criterios del Instituto Nacional de Cáncer (National Cancer Institute) de los Estados Unidos, los niños LLA menores de 1 año o ≥ 10 años de edad, del sexo masculino, con cuentas de leucocitos $> 50,000 \text{ xmm}^3$ al diagnóstico, de inmunofenotipo B o T, hipodiploides, *BCR-ABL* positivos o que co-expresen antígenos mieloides en blastos linfoides (My+ ALL) son considerados como pacientes con un mal pronóstico o con alto riesgo de recaída [9,10,14,22,57]. Dichos pacientes son candidatos para recibir una quimioterapia más intensiva, con un mayor número de fármacos antineoplásicos e incluso algunos llegan a requerir de trasplante hematopoyético durante la primera remisión; o en los casos *BCR-ABL* positivos se recomienda el uso de un inhibidor de la cinasa (imatinib) para mejorar sus expectativas de vida [14,58-60]. Así mismo dentro de este grupo de pacientes de alto riesgo, el subgrupo de casos con LLA pre-Cél. T sin rearrreglos cromosómicos, pero con

mutaciones en el gen *IKZF1*, *NOTCH1* y deleciones en *CDKN2A/B* requieren de protocolos terapéuticos todavía más intensos [14,25,27].

Por otro lado, se encuentran los pacientes con LLA de buen pronóstico o de riesgo bajo de recaída. Estos pacientes presentan un inmunofenotipo pre-B, tienen una edad mayor de 1 año o menores de 10 años, presentan una cuenta leucocitaria al diagnóstico $<50,000 \times \text{mm}^3$, son del sexo femenino, con ausencia de compromiso testicular (sexo masculino), y de infiltración al sistema nervioso central (SNC), que presenten hiperdiploidía y que sean *TEL-AML1* positivos, así como tener ausencia de la fusión BCR/ABL [11,14,22]. Particularmente los pacientes de buen pronóstico *TEL-AML1* positivos tienen una SLE de más del 90% a 5 años con protocolos basados en asparaginasa [1,2-4,7].

El tratamiento basado en la estratificación de riesgo o de pronóstico a recaída, ha contribuido substancialmente a mejorar la sobrevida de los pacientes, alcanzando una supervivencia de hasta el 95% a 5 años en países desarrollados [2,8]. Por ejemplo, la tasa de mortalidad en nuestro país durante la fase de inducción a la remisión (mortalidad temprana) es del 6-15% mientras que en países como Estados Unidos es tan baja como del 3%. Lo anterior puede deberse a que en el 61% de los niños mexicanos con LLA son de mal pronóstico [61-63]. A este respecto, se ha referido consistentemente en la literatura científica que los factores socioeconómicos en cada país explican parcialmente estos hallazgos. Pero, por otro lado, existen datos de que pacientes considerados de buen pronóstico o riesgo estándar que nunca alcanzan la remisión, presentan recaídas tempranas o mueren durante la fase de consolidación por complicaciones al tratamiento, son portadores de mutaciones específicas [63-65]. Así y, es posible que existe evidencia cada vez mayor acerca de que existen otros factores genéticos involucrados en las diferencias de las tasas de mortalidad entre poblaciones y que a su vez, pueden tener un valor pronóstico distinto [66-70].

Planteamiento del problema

A pesar de los grandes avances en el conocimiento y tratamiento de las leucemias en países desarrollados, esta entidad sigue siendo una causa importante de muerte en niños mexicanos a pesar del uso de los mismos protocolos de quimioterapia de países desarrollados. Recientemente, se ha reportado que, el principal obstáculo para lograr mejores tasas de supervivencia lo representan las recaídas muy tempranas (primeros 18 meses de tratamiento) que ocurren tres veces más frecuentemente en niños mexicanos en comparación con otras poblaciones.

En estudios previos, se ha observado que al momento del diagnóstico, al menos la mitad de los pacientes mexicanos presentan características asociadas con alto riesgo de recaída, y que solo en el 17% de los casos se detecta alguno de los cuatro rearrreglos génicos asociados al pronóstico de la enfermedad (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *MLL-AF4*). Esto es muy diferente a lo que sucede en países desarrollados, en donde los pacientes con características de alto riesgo de recaída representan un tercio, y en donde éstos mismos cuatro rearrreglos se detectan en más del 40% de los casos y les ayuda a los clínicos a dirigir el tratamiento de quimioterapia.

Por otro lado, se ha observado que entre los niños mexicanos que recaen muy tempranamente, el 55% habían sido clasificados de acuerdo a criterios establecidos como de riesgo estándar y quienes recibieron una quimioterapia menos intensa. Lo cual resalta la importancia de mejorar la estratificación pronóstica de nuestros pacientes, y sobre todo de aquellos en quienes se podría incrementar la intensidad de la dosis como es el caso de los niños de riesgo estándar. Para ello, es necesario identificar si existen biomarcadores que permitan detectar pacientes con alto riesgo de recaída, con la finalidad de que estos pacientes puedan ser tratados con los esquemas de quimioterapia adecuados y con ello evitar las recaídas y disminuir las tasas de mortalidad por esta enfermedad en nuestra población.

Pregunta de investigación

¿Cuáles son los biomarcadores que permiten detectar casos con alto riesgo de recaída en niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda?

Objetivo General:

Identificar biomarcadores en niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda para detectar casos con alto riesgo de recaída.

Objetivos Particulares:

1. Comparar el nivel de expresión entre muestras de Médula Ósea (MMO) tomadas al momento del diagnóstico de pacientes que posteriormente recayeron vs. MMO al diagnóstico de pacientes que no recayeron tempranamente.
2. Comparar la expresión génica entre aquellas MMO tomadas al momento del diagnóstico de pacientes con y sin recaída vs. todas las muestras disponibles de MMO tomadas al momento de la recaída.
3. Comparar la expresión génica entre las MMO del diagnóstico vs MMO de la recaída en pacientes que recayeron.

Hipótesis

Se identificarán nuevos biomarcadores asociados a la recaída de niños mexicanos con leucemia linfoblástica aguda.

Metodología

Diseño: Estudio de casos y controles anidado a una cohorte, observacional, longitudinal, prospectivo y comparativo. Se consideraron como casos a aquellos pacientes que hubieran presentado recaída muy temprana ocurrida durante los primeros 18 meses de tratamiento. Los controles fueron seleccionados entre aquellos pacientes sin recaída con características clínicas similares a los casos y con un seguimiento de al menos 18 meses a partir del momento de la confirmación del diagnóstico (Figura 1).

Periodo de estudio: 1 de agosto de 2014 al 30 de julio de 2016

Universo de trabajo: Pacientes pediátricos con diagnóstico de novo de LLA residentes de la Ciudad de México y atendidos en los hospitales públicos participantes.

Tabla 2. Criterios de selección		
Criterios de inclusión	Criterios de exclusión	Criterios de eliminación
-Niños con diagnóstico de <i>novo</i> de LLA pre-B --Cualquier sexo - Sin tratamiento de quimioterapia previo. -Sin tratamiento previo con esteroides -Atendidos en los hospitales participantes.	-Pacientes que cursen con una entidad genética conocida como síndrome de Down, síndrome de Turner, etcétera). - Pacientes con diagnóstico de LLA como segunda neoplasia.	Pacientes cuya muestra de RNA no cumpla con los criterios de calidad (concentración, integridad y pureza) para su análisis. Pacientes que abandonaron el tratamiento. Padres que manifestaron no querer continuar el estudio Seguimiento incompleto

Hospitales participantes:

- Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI (IMSS)
- Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez Santos (SS)
- Hospital Juárez de México (SS)
- Hospital General Dr. Gaudencio González Garza del Centro Médico Nacional la Raza (IMSS)
- Hospital Pediátrico Moctezuma (SS)
- Hospital General de México (SS)
- Hospital General Regional 1 Dr. Carlos McGregor Sánchez Navarro (IMSS)
- Hospital 20 de Noviembre (ISSSTE)

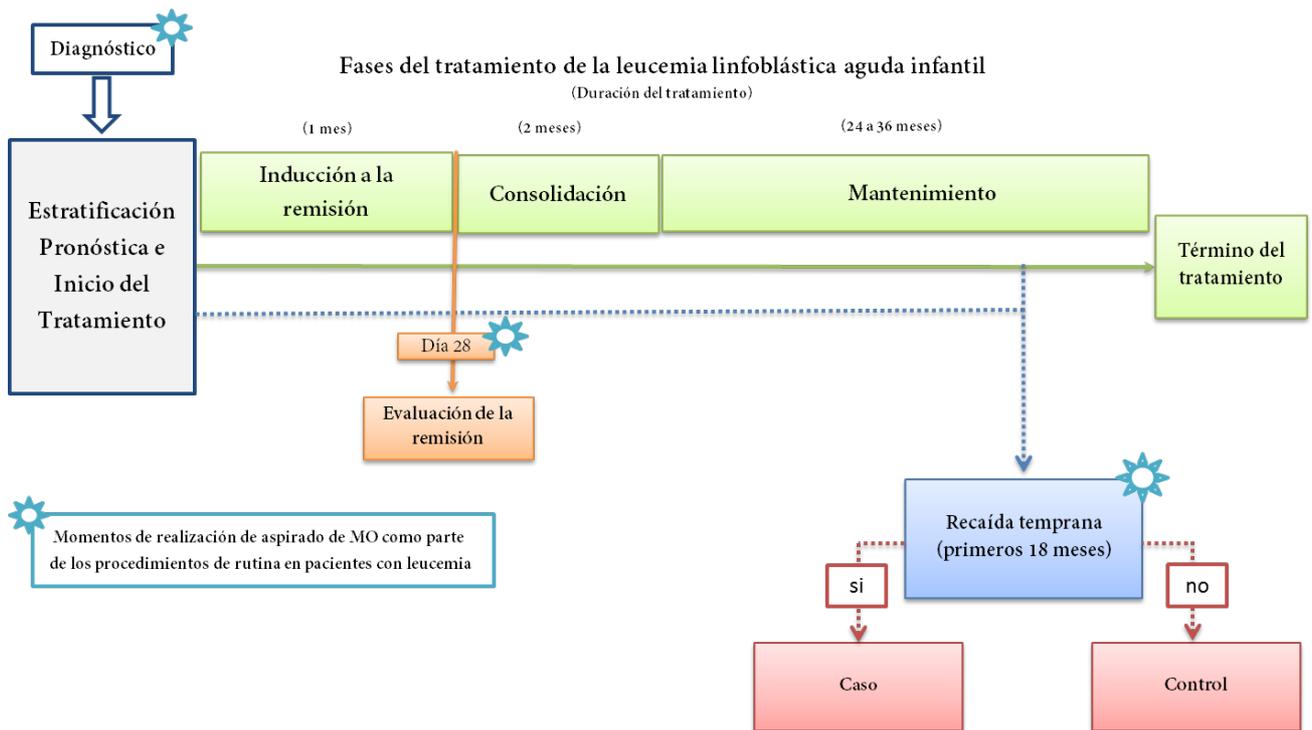


Figura 1. Diseño del estudio de casos y controles anidado en una cohorte.

Variables

Variable dependiente: Recaída muy temprana. Escala de medición: Dicotómica (presente/ausente). Reaparición de signos y síntomas de la enfermedad en los primeros 18 meses de tratamiento tras haber logrado la remisión completa de la enfermedad, así como la presencia de blastos en más del 25% del aspirado de médula ósea (recaída a médula ósea), y/o infiltración por blastos al SNC (recaída a SNC), testículos (recaída testicular), ovario (recaída a ovario). La infiltración por blastos en el SNC se corroboró mediante estudio citológico y citoquímico del LCR; mientras que la infiltración a testículo y ovario se determinó mediante reporte histopatológico.

Variable independiente: Perfil genético (biomarcadores). Los genes cuyo fold-change (FC) entre cada grupo comparativo fue >2 ($p < 0.01$). Además, se aplicó la tasa de falsos positivos denominado (FDR, por sus siglas en inglés false discovery rate) para pruebas de hipótesis múltiples usando el método de corrección de Benjamini-Hochberg. Los genes asociados a la recaída fueron aquellos con un valor p ajustado por FDR <0.05 .

Variables demográficas, de control y confusoras:

1. Edad del paciente al momento del diagnóstico
Definición operacional: Se tomará del expediente clínico y se corroborará con el número de carnet del IMSS.
Tipo de variable: cuantitativa
Escala de medición: discreta
Indicador: años.
2. Sexo
Definición operacional. Identificación del sexo, consignado en el expediente clínico al examen físico.
Tipo de variable. Cualitativa
Escala de medición. Nominal dicotómica
Indicador. Hombre/mujer.
3. Clasificación de riesgo
Definición operacional: De acuerdo con los criterios del Instituto Nacional de Cáncer (National Cancer Institute) de los Estados Unidos, los niños con LLA menores de 1 año o ≥ 10 años de edad, o con cuentas de leucocitos $> 50,000 \times \text{mm}^3$ al diagnóstico, son considerados como de Alto riesgo de recaída. Aquellos pacientes con menos de 50,000 leucocitos y edad entre 1-9.9 años al momento del diagnóstico serán clasificados como de Bajo Riesgo de recaída o también denominado de Riesgo Estándar.
4. Inmunofenotipo
Definición operacional: Está determinado por el patrón de expresión de antígenos de membrana, y en algunos casos citoplásmicos y nucleares, los cuales reflejan el linaje y el estadio de maduración en que ocurrió la transformación leucémica. Desde este punto de vista las leucemias se clasifican en dos subgrupos principales: de precursores de células B y de células T, cada uno de estos subgrupos es heterogéneo y sus características inmunofenotípicas pueden corresponder a progenitores de células T o B más o menos inmaduros. Los dos subgrupos mencionados, se incluirán para fines de este estudio.
5. Rearreglo génico. Si se detectó o no alguno de los cuatro rearreglos génicos ETV6-RUNX1, BCR-ABL1m, MLL-AF4 y TCF3-PBX1.

Definiciones:

A. Fases del tratamiento de Niños con LLA

Inducción a la remisión (IR), consolidación, mantenimiento y vigilancia.

- a. **Inducción a la remisión (IR).** Es la primera fase del tratamiento de los niños con LLA. El objetivo de esta etapa es inducir la remisión morfológica completa de la enfermedad y restaurar la hematopoyesis normal tras 4-6 semanas de tratamiento. La IR consta de al menos tres fármacos (por ejemplo: un esteroide, vincristina, L-asparaginasa) así como de medicamentos que se administran en QT intratecal. La adición de una antraciclina como un cuarto fármaco durante esta fase, es debido a que el paciente fue clasificado como de alto riesgo.
- b. **Consolidación ó tratamiento dirigido al sistema nervioso central (SNC).** Una vez que el paciente logra la remisión completa tras la IR, continúa con la fase de consolidación la cual tiene por objetivo en prevenir las recaídas al SNC y reducir la carga tumoral a nivel sistémico. Habitualmente, se logra a través de administrar semanalmente terapia intratecal en conjunto con QT sistémica la cual consta de altas dosis de metotrexate (MTX) y de 6-mercaptopurina (6-MP). Algunos grupos utilizan otros fármacos como la ciclofosfamida y la citarabina en esta fase con la finalidad de disminuir aún más la carga tumoral en el paciente.
- c. **Mantenimiento.** Es la tercera fase de quimioterapia en niños con LLA. La duración de esta fase varía de 2 a 3 años y es más prolongada en el sexo masculino debido al alto riesgo por el que tienen de recaer. Consiste en la administración semanal de fármacos como la 6-MP y MTX. En algunos protocolos se utilizan dosis de esteroides y vincristina intratecal.
- d. **Vigilancia.** Es el periodo posterior al término de la fase de mantenimiento. En esta fase, no se administra ningún fármaco de quimioterapia, solamente se realiza un seguimiento periódico de cada paciente con citas semanales, mensuales, bimestrales o semestrales con la finalidad de evaluar mediante estudios de laboratorio y examen físico si el paciente se encuentra sin manifestaciones clínicas y/o de laboratorio compatibles con la reaparición de la enfermedad.

B. Remisión completa (RC)

Definición operacional: Se define mediante estudio morfológico de la médula ósea (MO) tras finalizar la quimioterapia de IR. Un paciente se dice está en remisión morfológica completa cuando el porcentaje de blastos en MO es menor al 5%.

Descripción General del Estudio de Cohorte

1. Conformación de la cohorte incipiente e inicio de la inclusión de pacientes. Se conformó una cohorte incipiente de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. Para ello, se captaron a los pacientes, en los 8 hospitales participantes, se anotó su nombre, edad, sexo, fecha de diagnóstico, tipo morfológico de la LLA, inmunofenotipo, clasificación de riesgo, al momento de la confirmación del diagnóstico.
2. El diagnóstico de leucemia fue confirmado por los médicos hematólogos y oncólogos mediante estudio morfológico de la médula ósea e inmunofenotipo.
3. Previo consentimiento informado de los padres y asentimiento informado de los niños mayores de 8 años, se realizó la entrevista inicial para obtener las variables demográficas.
4. Posteriormente, se obtuvieron las muestras al diagnóstico previo al inicio de esteroide (primera fase del tratamiento), asimismo, en caso de sospecha de recaída y antes de la quimioterapia de reinducción se tomaron las muestras correspondientes a la recaída.
5. El seguimiento fue prospectivo a partir de la fecha de la confirmación del diagnóstico y durante los primeros 18 meses de tratamiento. Las variables de estudio se recolectaron de los expedientes clínicos de los pacientes.

Análisis molecular

Extracción y evaluación de la integridad del RNA

La extracción de RNA de muestras de médula ósea (MO) se realizó con el kit RNeasy siguiendo las especificaciones del proveedor (QIAGEN, Valencia, USA). La integridad del RNA fue evaluada por medio de electroforesis capilar utilizando en bioanalizador de Agilent 2100. Aquellas muestras con un número de integridad de RNA (RIN) mayor a 6.5 fueron incluidas en los microarreglos. En total, se utilizaron 300ng de RNA para el análisis de expresión (Affimetrix).

Detección de los transcritos quiméricos más comunes

La detección de los transcritos quiméricos *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL* y *MLL-AF4* se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediada por la enzima transcriptasa reversa y utilizando oligos dT como iniciadores de la transcripción del mRNA a cDNA. Los primers y las condiciones de termociclado han sido publicados previamente [18].

Perfiles de expresión génica

Para el análisis de expresión se utilizó un microarreglo de alta resolución GeneChip Human Transcriptome Array 2.0 (HTA 2.0) de Affymetrix el cual evalúa la expresión de 67528 transcritos. Tanto el procesamiento de las muestras como el marcaje y la hibridación se realizaron mediante GeneChip WT PLUS de Affymetrix de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

Análisis de datos de microarreglos

Para el análisis de datos se utilizó el software GeneChip Command de Affymetrix. Asimismo, la normalización de los datos (corrección de fondo para eliminar hibridación no específica) se realizó mediante el algoritmo Robust Multichip Analysis (RMA). La expresión diferencial entre subgrupos clínicos y moleculares, así como entre aquellos pacientes con y sin recaída fue evaluada mediante el software Transcriptome Analysis Console (TAC) también de Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Los genes seleccionados como significativos fueron aquellos que mostraron tasas de cambio (FC, del Inglés fold-change) < 2 en valores absolutos, valor de $P < 0.001$ y valor de P ajustado por múltiples comparaciones (FDR, del Inglés False discovery rate) < 0.05 .

Para el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados (GDE) y la generación de redes biológicas se utilizó el programa Ingenuity Pathway Analysis (IPA®, QIAGEN Redwood City, <http://www.ingenuity.com/>). Las redes de estos genes se generaron algorítmicamente sobre la base de su conectividad. El color del nodo indica una regulación ascendente (rojo: sobreexpresión) o descendente (verde: sub-expresión) y la intensidad está asociada con grado de regulación. Es importante señalar que los genes que no aparecieron coloreados es porque no están dentro de los GDE en el estudio. Sin embargo, el software los integra a las redes generadas, por el hecho de que existen evidencias (bases de datos públicas) que indican que son relevantes para la red o ruta biológica.

Validación de los datos obtenidos por microarreglos

Los resultados obtenidos en el análisis de microarreglos de expresión fueron validados mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). La comparación de los niveles de expresión se hizo entre muestras del diagnóstico *versus* muestras de la recaída en 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 la curva estándar y doble delta Ct ($\Delta\Delta Ct$). Los primers fueron diseñados mediante el programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) y las sondas se seleccionaron utilizando el programa ProbeFinder assay design V. 2.50 (<http://www.universalprobelibrary.com>).

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. Para este fin se consideró como estadísticamente significativo un valor de p menor a 0.05. Las pruebas de t de Student y ANOVA se utilizaron para comparar el nivel de expresión génica entre los subgrupos. Para eliminar variables externas que pudieran influir en los resultados (datos aberrantes) se controló la calidad de los datos entre muestras del mismo paciente y entre los grupos mediante un análisis de componentes principales (PCA). En el análisis de expresión diferencial se consideraron un $FC > 2$, $P < 0.001$ y $FDR < 0.05$ como significativos.

Aspectos éticos y financiamiento

El estudio fue presentado y autorizado por los Comités Locales de cada hospital participante. Fue autorizado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social por ser un estudio multicéntrico con el número de registro: R-2013-785-068. Se solicitó consentimiento a los padres o tutores de los pacientes, y asentimiento a los pacientes mayores de 8 años.

El proyecto recibió financiamiento dentro de la Convocatoria 2013 de Proyectos de Investigación para Atender Problemas Nacionales PDCPN2013-01-215726, FIS/IMSS/PROT/1364 en donde el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré, tutor principal de esta tesis es el investigador responsable.

Resultados

Características clínicas y demográficas de la cohorte

La cohorte estuvo conformada por 496 pacientes pediátricos diagnosticados con LLA de novo. De ellos, 275 (55.5%) fueron del género masculino. Diez (2%) de los casos fueron menores a 1 año de edad, 298 (60%) entre 1 a 10 años de edad y 188 (38%) mayores de 10 años de edad. La edad promedio de la población fue de 95.2 meses (DE \pm 56.2).

Inmunofenotipo y características moleculares

De acuerdo al inmunofenotipo, 452 (91%) casos correspondieron a pacientes con LLA pre-B, 33 (7%) de linaje T y 11 (2%) LLA bifenotípica (Tabla 3). En un elevado porcentaje (83.7%) no se detectó ninguno de los cuatro rearrreglos génicos más frecuentes reportados en pacientes pediátricos con LLA (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, *MLL-AF4*). El rearrreglo génico más frecuente fue el *ETV6-RUNX1*, 48 (10%) casos fueron positivos, seguido del *TCF3-PBX1* que se encontró en 34 (7%) pacientes. Los rearrreglos génicos asociados con un pronóstico desfavorable en niños con LLA (*BCR-ABL1* y *MLL-AF4*) se presentaron en menos del 5% de los casos (Tabla 3).

Clasificación de riesgo

Con respecto a la clasificación pronóstica de acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (NCI risk classification, USA), 244 (49%) correspondieron a niños de riesgo estándar por tener una edad entre 1 a 9.99 años y una cuenta de leucocitos en sangre periférica menor a 50,000x mm^3 al momento de la confirmación del diagnóstico. El grupo de alto riesgo estuvo representado por 252 (51%) casos.

Seguimiento

La tasa de recuperación de muestras de MO pre-tratamiento de los pacientes de la cohorte fue del 93.5% (n=464). Las principales razones por las que no se pudo obtener la muestra de MO al diagnóstico fueron tanto la dificultad para extraer una mayor cantidad de muestra en pacientes menores a 5 años, como el estado de gravedad del paciente. A partir de la confirmación del diagnóstico de LLA, se siguió de forma prospectiva a todos los casos de la cohorte. Para ello, se estandarizó a personal encuestador quienes fueron asignados a cada uno de los hospitales participantes y quienes llevaban a cabo recorridos diarios por las áreas en donde estos pacientes son atendidos; así como también realizaban la revisión de los expedientes clínicos.

Recaídas y mortalidad muy temprana en la cohorte

Con relación a la mortalidad temprana durante el primer año de tratamiento murieron un total de 54 pacientes (11%). No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la probabilidad de morir, entre aquellos pacientes clasificados como de bajo riesgo vs los de alto riesgo (p=0.35). Entre las causas de muerte se encontraron: choque séptico, choque hemorrágico y progresión tumoral.

Tabla 3. Características clínicas de la cohorte y muestra estudiada.

Características Clínicas	Niños con LLA						p*	
	Población no analizada	Analizados por Microarreglos				n		%
		Grupo Sin Recaída		Grupo con Recaída Muy Temprana				
		n=442	n=43	n=11	n=11			
N	%	N	%	n	%			
Género								
Masculino	245	55.5	23	53.5	7	63.6	0.39	
Femenino	197	44.5	20	46.5	4	36.4		
Grupo de edad (años)								
<1	8	1.8	2	4.7	---	---	0.07	
1-9.99	269	60.9	26	60.5	3	27.3		
≥10	165	37.3	15	34.9	8	72.7		
Leucocitos al Dx. (x10⁹/L)								
<10	206	46.7	14	32.6	5	45.5	0.57	
10-49.99	129	29.2	12	27.9	1	9.1		
50-99.99	55	12.6	5	11.6	2	18.2		
≥100	52	11.5	12	27.9	3	27.3		
Inmunofenotipo								
Linaje B	399	90.3	43	100	10	91	0.2	
Linaje T	32	7.2	---	---	1	9.1		
Bifenotípica	11	2.5	---	---	---	---		
% Blastos en Médula Ósea al Diagnóstico de LLA								
<90	119	27	15	34.9	3	27.3	0.46	
≥90	323	73	28	65.1	8	72.7		
Clasificación de riesgo (NCI)								
Alto riesgo	217	49.2	26	60.5	9	81.8	0.16	
Riesgo Estándar	225	50.8	17	39.5	2	18.2		
Rearreglo génico								
<i>ETV6-RUNX1</i>	38	8.5	8	18.6	2	18.2	0.4	
<i>TCF3-PBX1</i>	28	6	6	14	---	---		
<i>BCR-ABL1</i>	14	3.5	3	7	---	---	0.03	
No detectado	357	80.9	26	60.5	9	81.8		
<i>MLL-AFF1</i>	5	1.1	---	---	---	---		
Mortalidad	49	11.3	7	16.3	5	45.5		

NCI, National Cancer Institute; * ji cuadrada o prueba exacta de Fisher entre el grupo con recaída vs grupo sin recaída

Se identificaron once recaídas muy tempranas (primeros 18 meses del tratamiento), de las cuales, nueve fueron a MO y dos al SNC. No hubo diferencias estadísticamente significativas en el riesgo de recaída entre los pacientes clasificados como de bajo riesgo vs alto riesgo (p=0.60).

Identificación De Biomarcadores

Características clínicas, de inmunofenotipo y moleculares de los pacientes analizados por microarreglos de expresión

Para el estudio de la identificación de biomarcadores se incluyeron 54 muestras, 11 de las cuales de pacientes con recaída y 43 sin recaída (controles). Los controles fueron elegidos de la cohorte original tomando en cuenta que tuvieran características similares a los pacientes del grupo con recaída en relación a variables con impacto pronóstico ya conocido como la edad, sexo, cuenta de leucocitos, tipo de riesgo, inmunofenotipo y tipo de tratamiento (Tabla 3).

Las recaídas, ocurrieron en promedio a los 10.6 meses después de la confirmación del diagnóstico de la LLA. En dos pacientes se presentaron dos eventos de recaída, la primera ocurrió a los 4 meses de tratamiento y fue a la MO, tenían inmunofenotipo pre-B y fueron clasificados como de alto riesgo de recaída de acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cancer. Uno de ellos, falleció a los dos meses de haber ocurrido la segunda recaída.

Además, hubo un subgrupo de pacientes que recayeron y murieron después de la primera recaída (n=5). La mediana de supervivencia tras la recaída fue de 3 meses (rango: 0-8 meses). Dos de estos pacientes, pertenecían al grupo clasificado como de buen pronóstico o riesgo estándar y uno de ellos había sido positivo al diagnóstico para el rearrreglo génico *ETV6-RUNX1*.

Resultados de la evaluación de la calidad del RNA de las muestras de médula ósea de los 54 pacientes incluidos en el análisis de microarreglos

Del total de muestras de médula ósea tomadas al momento del diagnóstico (n=54), cuatro de ellas no pasaron los controles de calidad para el análisis de microarreglos. Dichas muestras correspondieron a las muestras del diagnóstico de pacientes que recayeron. Con respecto a las muestras de médula ósea tomadas al momento de la recaída, nueve de once muestras pasaron los controles de calidad. Quedando un total de 5 pares de muestras de médula ósea diagnóstico-recaída, de los 11 pacientes que recayeron (Tabla 4).

Tabla 4. Características clínicas, de inmunofenotipo y moleculares de pacientes con LLA que recayeron tempranamente durante los primeros 18 meses de tratamiento

Paciente ID	Género	Edad al diagnóstico (meses)	Leucocitos al diagnóstico (x10 ⁹ /L)	Inmunofenotipo	% blastos en MO al diagnóstico	Clasificación de riesgo	Rearreglo génico al diagnóstico	Tiempo (ocurrió la recaída) (meses)	Sitio de recaída	% blastos en MO a la recaída	Murió	Tiempo de seguimiento (meses)	Analizado por expresión génica	
													MMO* del Dx.	MMO de la recaída
1	M	187	62.8	Pre-B	90	Alto	ND	8	MO	100	si	9	si	no
2	M	169	97.6	Pre-B	96	Alto	ND	4	MO	85	si	6	si	no
3	F	173	52.1	Pre-B	20	Alto	ND	17	MO	45	si	25	si	si
4	M	44	8.9	Pre-B	97	Bajo	<i>ETV6-RUNX1</i>	6	MO	30	no	22	si	si
5	F	146	11.1	Pre-B	74	Alto	ND	17	MO	26	no	25	si	si
6	M	51	8.2	Pre-B	20	Bajo	ND	9	SNC	0	no	10	no	si
7	M	156	105.2	Pre-B	98	Alto	ND	16	MO	90	si	20	no	si
8	F	152	6.1	Cel.T	100	Alto	ND	15	MO	25	no	17	si	si
9	M	143	119.4	Pre-B	90	Alto	ND	4	MO	95	no	25	no	si
10	M	60	521.8	Pre-B	100	Alto	ND	7	SNC	3	no	9	no	si
11	F	168	0.8	Pre-B	100	Alto	<i>ETV6-RUNX1</i>	14	MO	76	si	14	si	si

Abreviaturas M, masculino; F, femenino. ND, no determinado; MO, recaída aislada a médula ósea; SNC, recaída aislada a sistema nervioso central; Dx., diagnóstico; MMO, muestra de médula ósea.

Análisis supervisado de expresión génica

El plan de análisis supervisado para identificar los genes diferencialmente expresados asociados a la recaída fue el siguiente (Fig. 2):

1. Comparar el nivel de expresión entre muestras de Médula Ósea (MMO) tomadas al momento del diagnóstico de pacientes que posteriormente recayeron vs. MMO al diagnóstico de pacientes que no recayeron tempranamente (primer análisis).
2. Entre aquellas MMO tomadas al momento del diagnóstico de pacientes con y sin recaída vs. todas las muestras disponibles de MMO tomadas al momento de la recaída (segundo análisis).
3. Entre las MMO del diagnóstico vs MMO de la recaída en pacientes que recayeron (tercer análisis).

Aquellos genes que se expresaron diferencialmente (fold-change ≥ 2.0 con un valor de $p < 0.01$) fueron seleccionados. Además, se calculó el false discovery rate (FDR) como una medida de ajuste de los datos. Los genes con un valor de p ajustado ≤ 0.05 de acuerdo al FDR fueron seleccionados.

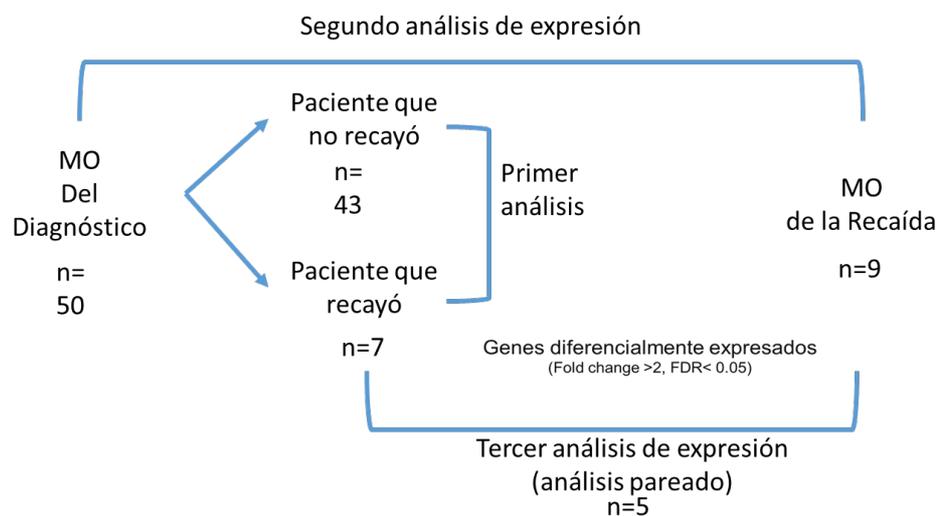


Figura 2. Plan de Análisis de Expresión entre Muestras de Médula Ósea de pacientes con y sin recaída (controles)

El primer análisis comparativo como se mencionó anteriormente se realizó entre muestras de MO al momento del diagnóstico de pacientes con ($n=7$) y sin recaída ($n=50$) expresándose diferencialmente un total de 87 genes codificantes, la mayoría de ellos sobre expresados ($n=68$) en pacientes con recaída muy temprana. Los genes sobre-expresados más significativos fueron: *DOCK5*, *KIT*, *ALAS2*, *TFP1*, *SLC4A1*, y *SLC25A37*; mientras que, entre los sub-expresados se encontraron los genes *PAX5*, *EBF1*, *CD22*, *UBASH3B*, *BANK1*, *CD79A*, *ZCCHC7* y *BLK* (Tabla 5). Sin embargo, ninguno de ellos tuvo un FDR < 0.05 . Los genes *BLVRB* y *TMOD1* tuvieron un FC= 4.05 y 2.24; valor de p ajustado= 0.0077 y 0.048, respectivamente. El análisis de enriquecimiento funcional mostró que estos genes diferencialmente expresados estaban involucrados principalmente en el desarrollo de enfermedades hematológicas ($P= 0.032$) y cáncer ($p= 2.07E-07$) siendo las principales vías de señalización en donde participan la de apoptosis, la activación de las células B y

células T, la señalización de los receptores EGF y FGF (Figura 3). Otra vía canónica de las principalmente afectadas fue la vía de la biosíntesis del glutatión.

Tabla 5. Lista de los genes más diferencialmente expresados tras comparar las MMO al momento del diagnóstico entre pacientes que recayeron vs aquellos que no recayeron durante los primeros 18 meses de tratamiento.

Gen	Descripción	Fold Change	p	FDR P ajustada
<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>NID1</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>GLB1</i>	galactosidase beta 1	2.25	0.000005	0.004127

MMO: Muestra de médula ósea

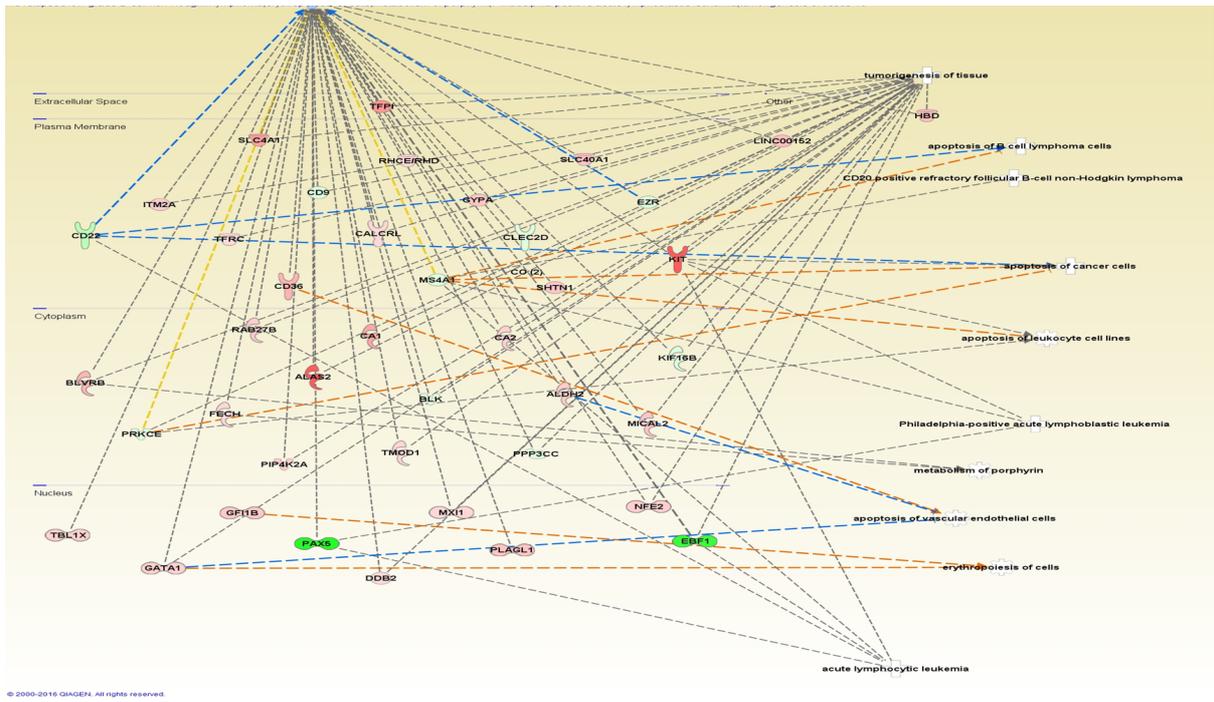
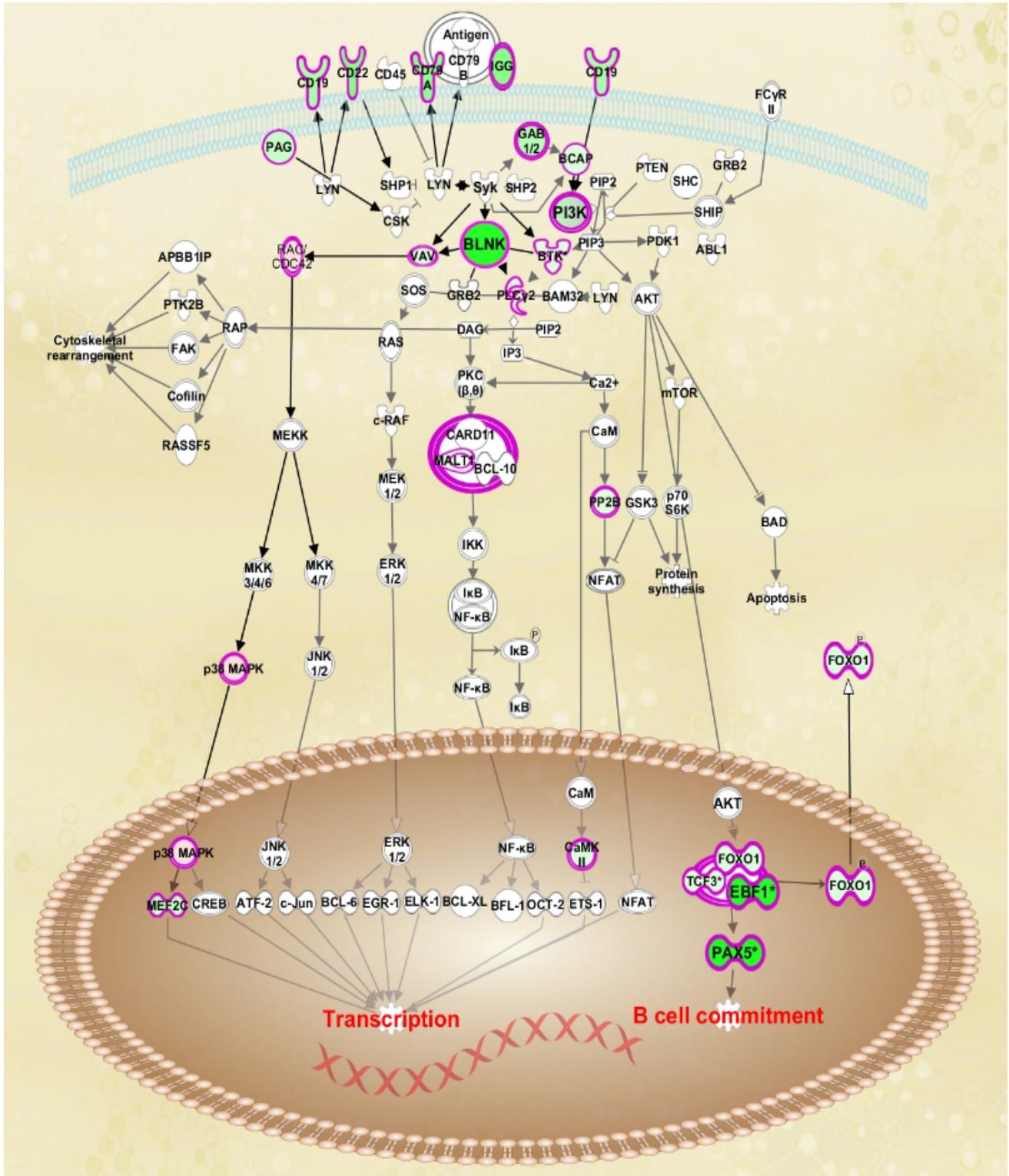


Figura 3. El análisis de enriquecimiento funcional mostró que estos genes diferencialmente expresados estaban involucrados principalmente en el desarrollo de enfermedades hematológicas ($P= 0.032$) y cáncer ($p= 2.07E-07$) siendo las principales vías de señalización en donde participan la de apoptosis, la activación de las células B y células T, la señalización de los receptores EGF y FGF.

En el segundo análisis, comparando todas las MMO disponibles al momento del diagnóstico (incluyendo muestras de pacientes con sin recaída) (n=50) vs. todas las muestras de MO disponibles al momento de la recaída (n=9), se obtuvieron 970 genes diferencialmente expresados (FC>2, P=0.01) de los cuáles un total de 743 correspondían a genes codificantes. De éstos, 337 se expresaron diferencialmente considerando un valor de p ajustado por el FDR menor a 0.05 (168 sobre-expresados; 169 sub-expresados). Los genes más diferencialmente expresados fueron: *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) (Tabla 6). En el análisis funcional se observó que estos genes se encuentran involucrados con el desarrollo y función del sistema hematopoyético, en la formación y desarrollo del sistema linfóide (p= 0.0023) y del sistema inmune (p= 0.00188). Basado en la función celular molecular, un total de 204 genes diferencialmente expresados estaban relacionados con procesos de muerte celular, 104 con el desarrollo celular, 201 ligados al crecimiento y proliferación celular; 147 con la señalización inter-celular y la interacción inter-celular, y 119 genes asociados con el movimiento de la célula. Además, el perfil de expresión génica sugiere que las vías *CEBPA* (p= 1.99E-09), *TGM2* (p= 2.59E-09), *GATA1* (P= 5.7E-07) y *CCL5* (p= 4.57E-05) se encuentran activadas; mientras que la vía de *SOX11* se encontraba inactivada. Resalta que, la vía de *PAX5* fue una de las más altamente enriquecidas, a consecuencia de una elevada expresión de los genes *EBF1* y *BLNK* (Figura 4).



© 2000-2016 QIAGEN. All rights reserved.

Figura 4. Vía de señalización del receptor de células B. PAX5, EBF1 y BLNK se encontraron entre los genes más diferencialmente expresados en niños mexicanos con LLA que desarrollaron recaída muy temprana. El nivel de intensidad de los colores verde y rojo representa el nivel de sub o sobre-expresión génica, respectivamente.

Tabla 6. Lista de los genes más diferencialmente expresados tras comparar las MMO al diagnóstico de los pacientes con y sin recaída vs MMOs de la recaída muy temprana.

Gen	Descripción	Fold Change	P
<i>DOCK5</i>	dedicator of cytokinesis 5	11.47	0.004
<i>KIT</i>	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase	9.14	0.0002
<i>ALAS2</i>	5'-aminolevulinate synthase 2	9.1	0.003
<i>TFPI</i>	tissue factor pathway inhibitor	5.89	0.002
<i>SLC4A1</i>	solute carrier family 4 member 1 (Diego blood group)	5.25	0.002
<i>HGSNAT</i>	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase	4.87	0.001
<i>CA1</i>	carbonic anhydrase 1	4.85	0.001
<i>PRAM1</i>	PML-RARA regulated adaptor molecule 1	4.72	0.009
<i>CD36</i>	CD36 molecule	4.24	0.0001
<i>SLC25A37</i>	solute carrier family 25 member 37	4.2	0.002
<i>MS4A1</i>	membrane spanning 4-domains A1	-6.42	0.007
<i>CD9</i>	CD9 molecule	-6.64	0.005
<i>BLNK</i>	B-cell linker	-7.32	0.022
<i>BLK</i>	BLK proto-oncogene, Src family tyrosine kinase	-7.34	0.001
<i>ZCCHC7</i>	zinc finger CCHC-type containing 7	-9.61	0.003
<i>CD79A</i>	CD79a molecule	-10.06	0.005
<i>BANK1</i>	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	-10.14	0.001
<i>UBASH3B</i>	ubiquitin associated and SH3 domain containing B	-12.25	0.007
<i>CD22</i>	CD22 molecule	-15.1	0.001
<i>EBF1</i>	early B-cell factor 1	-42.28	0.003
<i>PAX5</i>	paired box 5	-47.65	0.008

MMO: muestras de médula ósea

En el tercer análisis, en donde se realizó un análisis pareado entre muestras de MO al diagnóstico y de muestras de MO a la recaída de los pacientes con recaída, se encontraron diferencialmente expresados un total de 145 genes, de los cuales, 103 se encontraban sub-expresados 32 sobre-expresados. Ninguno de ellos, tuvo un valor de p ajustado menor a 0.05. Sin embargo, 15 genes sobre-expresados y 34 sub-expresados se agruparon en todas las muestras de recaída (figura 4). En el análisis de enriquecimiento utilizando Gene Ontology (GO) mostró que dichos genes se encuentran involucrados en diferentes procesos metabólicos ($p= 0.46$) y de splicing alternativo ($p= 0.00013$). Además, el análisis de vías de señalización exhibió que la mayoría de estos genes jugaban un papel importante en la replicación del ADN ($p= 0.0473$) y en la activación de las células B ($p= 0.00405$) (Figura 5).

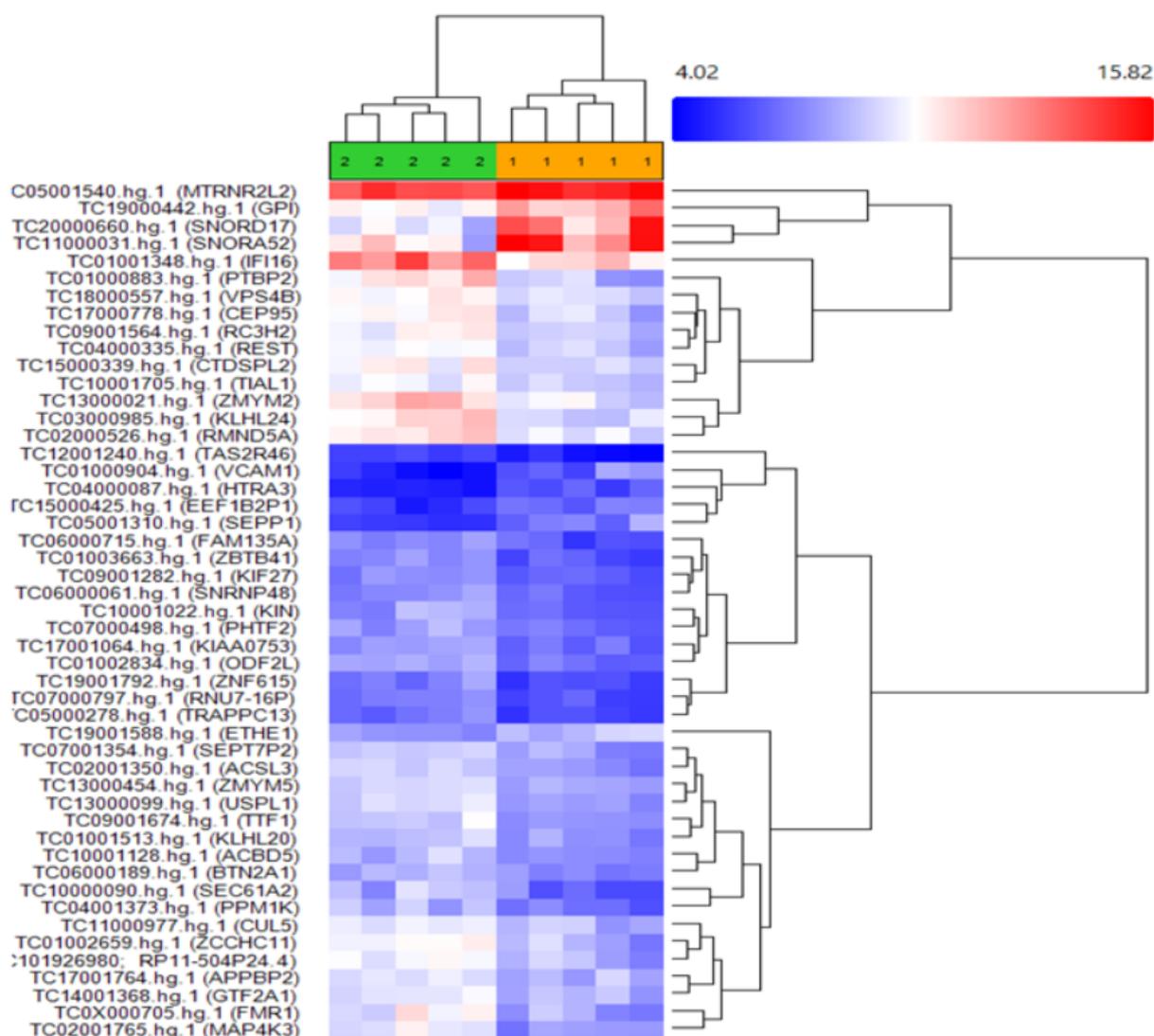


Figura 5. Perfil de expresión génica de pacientes con LLA y recaída muy temprana. El mapa de calor muestra los 15 genes más sobre-expresados y los 34 genes más sub-expresados entre las muestras del diagnóstico (en color verde) y su correspondiente de la recaída (en color anaranjado). El nivel de intensidad de los colores azul y rojo representa el nivel de sub o sobre-expresión génica, respectivamente.

Validación de los genes diferencialmente expresados en las muestras de pacientes con recaída muy temprana

Se realizó la validación de algunos genes diferencialmente expresados asociados con recaída muy temprana (*BLNK*, *EBF1* y *ZCCHC7*) mediante qRT-PCR. Estos genes fueron seleccionados para ser incluidos en la validación debido a que previamente habían sido asociados como potenciales biomarcadores de recaída en niños con LLA y al encontrarnos con la limitante de la cantidad de muestra de casos y controles para realizar la validación de los otros genes asociados a la recaída. La dirección (sobre o sub-expresión) que se observó en el análisis de expresión por microarreglos de todos estos genes, se mantuvo en el análisis de validación. Es decir, *BLNK*, *EBF1* y *ZCCHC7* se encontraron sub-expresados en las muestras de recaída en comparación con la de los pacientes sin recaída (controles) pareadas 2:1 (Figura 6).

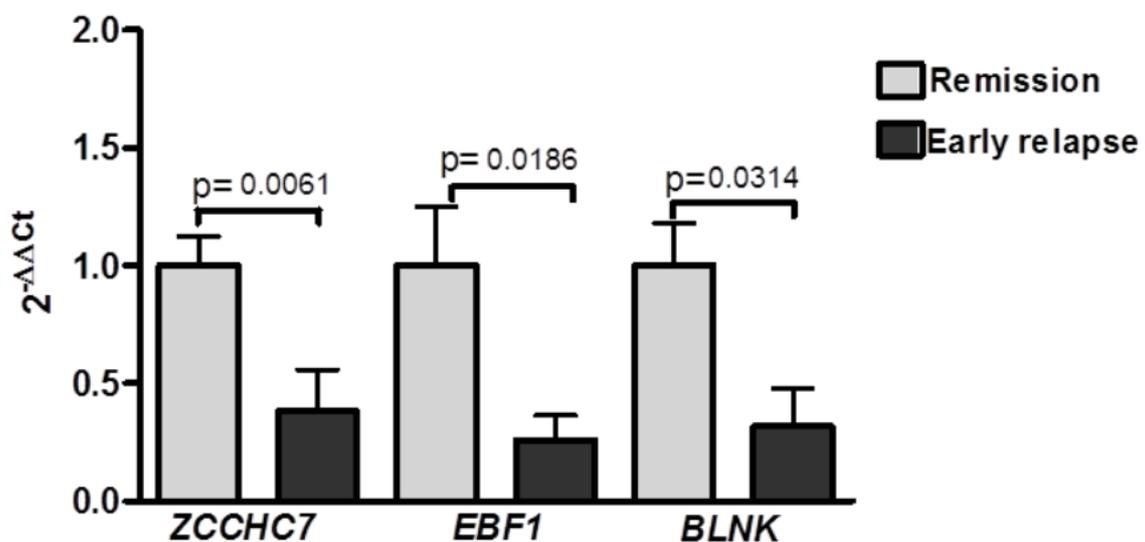


Figura 6. Resultados de la validación por PCR cuantitativa en tiempo real de algunos de los genes diferencialmente expresados en pacientes con recaída muy temprana (*EBF1*, *BLNK*, y *ZCCH*). Los niveles de RNAm fueron calculados mediante $2^{-\Delta\Delta Ct}$. El gen *HPRT* fue usado como el gen de referencia. Las gráficas se representan como medias y sus desviaciones estándar, las diferencias entre grupos fueron evaluadas mediante la prueba de t de Student y se calculó el valor de p.

Discusión

A nuestro entendimiento, este es el primer estudio en reportar resultados de un análisis del transcriptoma de niños mexicanos con LLA con la finalidad de identificar biomarcadores genéticos asociados con recaídas muy tempranas en los primeros 18 meses de tratamiento, la cual es un tipo de recaída asociada a bajas tasas de supervivencia en niños mexicanos.

En países desarrollados, la tasa de sobrevida libre de eventos es aproximadamente del 90% [47,71-73]. En contraste, México tiene una de las tasas de mortalidad más elevadas no solo de Latinoamérica sino de todo el mundo [74] y las recaídas ocurren aproximadamente en el 26.2% de los pacientes [75].

Actualmente, la elección del tratamiento en niños con LLA de hospitales públicos de la Ciudad de México, se lleva a cabo mediante estratificación pronóstica que incluye factores clínicos, de inmunofenotipo y moleculares como la edad al momento del diagnóstico, la cuenta de leucocitos en sangre periférica, la presencia/ausencia de infiltración al sistema nervioso central al diagnóstico, el inmunofenotipo, la respuesta a la ventana esteroidea así como la presencia de alguno de los cuatro rearrreglos génicos asociados al pronóstico de la enfermedad (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *MLL-AF4*). Sin embargo, dicha estratificación parece ser inadecuada para predecir qué pacientes van a recaer durante etapas tempranas del tratamiento ya que según reportes de estudios multicéntricos llevados a cabo en hospitales públicos de la Ciudad de México por el Grupo de Investigación para la Identificación de las Causas de la Leucemia Infantil la frecuencia de recaídas durante el primer año de tratamiento es tres veces más elevada que lo que se reporta en países desarrollados (13.4% vs. 4.5%, respectivamente) [76].

Además, en diferentes series, se ha reportado que el pronóstico de los pacientes que recaen muy tempranamente es peor que el de los pacientes que recaen posterior a los 18 meses de tratamiento. Asimismo, aquellos pacientes que recaen aisladamente a la médula ósea y no a otros sitios, así como aquellos pacientes clasificados como de alto riesgo al momento del diagnóstico por tener una edad menor a 1 año, mayor a 10 años o con una cuenta de leucocitos $>50,000 \text{ xmm}^3$ presentan el peor pronóstico con tasas de sobrevida extremadamente bajas, menores al 10% (38, 77-80).

En el presente estudio, los pacientes que recayeron muy tempranamente murieron en una elevada proporción en comparación con aquellos que no presentaron esta complicación, y esta diferencia fue estadísticamente significativa. De los pacientes que recayeron y posteriormente fallecieron, un total de cinco pacientes habían presentado recaída a médula ósea y pertenecían al grupo clasificado como de alto riesgo; dichas muertes ocurrieron dentro de los primeros 8 meses de tratamiento y dos de ellos murieron durante los primeros 15 días de la re-inducción, todo lo anterior aunado a haber recibido la quimioterapia más intensa que se le pueda dar a un paciente con LLA en nuestra población. Lo anterior, resalta una vez más la necesidad de identificar biomarcadores específicos que puedan servir como predictores de recaídas de muy mal pronóstico como son las recaídas muy tempranas y lo cual, puede a su vez disminuir las tasas de mortalidad tan elevadas que observamos en nuestros niños.

Por otro lado, la distribución de los rearrreglos génicos de relevancia pronóstica *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *MLL-AF4* fue similar a los descrito previamente, con un alto porcentaje (83.7%) de casos negativos a ellos. Por lo que su utilidad como

biomarcadores de pronóstico en la población pediátrica mexicana con LLA, se ve reducida [16,18]. Nuestros hallazgos, aunados a los diversos estudios moleculares realizados previamente, y al hecho de que no se identificaron perfiles de expresión que definieran a los subtipos moleculares como el ETV6-RUNX1 (mismo que fue altamente heterogéneo en su perfil de expresión), sugieren la existencia de un enriquecimiento de subtipos moleculares poco estudiados o la presencia de biomarcadores propios de la población mexicana. Se sabe que la población mexicana es compleja en su estructura genética, con importantes diferencias entre las diferentes regiones geográficas del país, en términos de sus principales componentes ancestrales, caucásica, amerindia y africana. De hecho, aunque la mayoría de los individuos de la Ciudad de México son mestizos, ellos tienen una proporción de ancestría caucásica que va desde 35 a 71% [81]. Lo anterior resalta la necesidad de encontrar biomarcadores que permitan establecer el diagnóstico de riesgo con mayor precisión para definir las estrategias terapéuticas más adecuadas y con ello mejorar las expectativas de vida de los niños con LLA.

La tecnología de microarreglos de expresión ha surgido como una herramienta útil para identificar nuevos biomarcadores genéticos y las vías de señalización involucrados tanto en el proceso de desarrollo de la leucemia como en el pronóstico de la enfermedad [82,83]. En la presente investigación utilizamos microarreglos de cDNA con la finalidad de identificar el perfil de expresión génica relacionado con un alto riesgo de recaída muy temprana en niños mexicanos con LLA. Incluimos en este análisis a una muestra representativa de la cohorte original que se pareciera a ésta con respecto al género, edad, cuenta de leucocitos, frecuencia de rearrreglos génicos y tipo de riesgo, excepto por la falta de inclusión de pacientes con el rearrreglo génico *MLL* el cuál se encontró en menos del 3% de la cohorte original y el cuál se asocia con un alto riesgo de recaída temprana.

En total, identificamos 87 genes diferencialmente expresados en los pacientes con recaída muy temprana como potenciales biomarcadores predictores para este desenlace y los cuales estaban asociados con procesos como la oncogénesis, apoptosis, la activación de los linfocitos B y la angiogénesis. *BLVRB*, *TMOD1*, *BLNK*, *PAX5*, *EBF1*, *MPO* y *BLVRB* fueron los que mostraron mayor significancia estadística después de múltiples comparaciones

La resistencia a los fármacos de quimioterapia ha sido reportada como uno de los principales mecanismos asociados a las recaídas tempranas de niños con leucemia. Uno de los mecanismos por los cuales los fármacos utilizados en quimioterapia logran sus efectos citotóxicos en las células neoplásicas es a través de lograr la apoptosis por medio de inducir estrés oxidativo al generar especies reactivas de oxígeno (EROs) [84]. Sin embargo, también se ha descrito que a mayor tiempo de exposición de las células al fármaco antineoplásico, incrementa la expresión de genes de enzimas con propiedades antioxidantes que llevan a la disminución de la producción de EROs, y por ende, a una disminución en la efectividad del tratamiento. La enzima biliverdina reductasa (*BLVRB*) a través de sus propiedades antioxidantes es considerada como uno de los principales contribuyentes a la resistencia múltiple a fármacos antineoplásicos en las leucemias, sobre todo a la prednisona, contribuyendo así a la disminución de la efectividad de la quimioterapia y a la aparición de recaídas [84,85].

En el presente estudio, identificamos que *BLVRB* está sobre-expresado significativamente al momento de las RMT de niños con LLA y el potencial mecanismo involucrado tiene que ver con la disminución de las EROs generadas por la quimioterapia. Lo anterior, tiene relación a lo reportado previamente por Silveira y cols., (2013) en donde la sobre-expresión

de BLVRB se asoció con una mayor cuenta de leucocitos al momento del diagnóstico y a una resistencia a la prednisona, la cual, se utiliza durante la fase de quimioterapia denominada inducción a la remisión de niños mexicanos con LLA [86].

Otro de los mecanismos que se ha descrito como involucrado en las recaídas de niños con LLA tiene que ver con la transformación de la clona existente al momento del diagnóstico. *TMOD1* (*Tropomodulin 1*) el cual se observó sobre-expresado en las muestras de pacientes con recaída, codifica para una proteína de membrana de los eritrocitos y se ha reportado que juega un papel importante en las recaídas de pacientes con LLA a través de un mecanismo no bien conocido, pero que, parece tener relación con la proliferación de la célula neoplásica y la transformación de la clona original por una con un fenotipo diferente [87-88].

BLNK resultó ser uno de los principales genes sub-expresados en las muestras de médula ósea de los pacientes con recaída y se encuentra asociado a la vía de *PAX5* (Figura 1). *BLNK* es una proteína adaptadora muy importante para la transducción de señales del receptor del antígeno de la célula B en el proceso de muerte celular por apoptosis [89]. Las mutaciones en este gen son las responsables del bloqueo por completo del desarrollo de la célula B en seres humanos [90]. Los ratones knockout *BLNK* presentan una reducción en los niveles de células B maduras en sangre periférica y a su vez una acumulación de los precursores de la célula B en la médula ósea. Además, se ha propuesto que la expresión deficiente de *BLNK* juega un papel primario e importante en el desarrollo de la célula B en ratones. Asimismo, Hayashi y cols., (2003) reportaron el el 5-10% de los ratones *BLNK* knockout desarrollaron LLA pre B a las 4 a 20 semanas de edad [91]. Por otro lado, ha sido reportado también que aproximadamente en el 50% de los pacientes con LLA de linaje B no se expresa el gen *BLNK* [92], por lo que este gen no puede considerarse como el único responsable en el desarrollo de LLA en humanos. Además, la expresión de *BLNK* también se encuentra influenciada por otros genes relevantes desde el punto de vista de su participación en la progresión de la leucemia como el *ENF1* y el *PAX5* (Figura 1) [93]. En el presente estudio, tanto el *PAX5* como *EBF1* se encontraban entre los genes más diferencialmente expresados en las muestras de médula ósea de los pacientes que desarrollaron recaída muy temprana. Notablemente, la expresión de *EBF1* es dependiente de *PAX5* y se ha mencionado que las deleciones en *EBF1* son cooperadoras en la leucemogénesis de niños con síndrome de Down [94].

Por su parte, el gen *PAX5* es esencial en el proceso de linfopoyesis por el papel que juega en la identificación y desarrollo de las células B directamente a través de activar o inhibir la acción de genes específicos en estadíos tempranos y tardíos del desarrollo de la célula B [95]. Los niveles de expresión de dicho gen permanecen estables a través de todo el periodo de vida de la célula B [96]. La supresión de la expresión de *PAX5* en el compartimento hematopoyético de los ratones inducen LLA de linaje B, mientras que, su restauración induce que se lleve a cabo la diferenciación normal de dicha célula [96]. *PAX5* fue el principal gen sub-expresado en nuestra muestra de pacientes con LLA y recaída muy temprana. Sin embargo, los mecanismos moleculares que expliquen esta baja expresión no se han descrito. En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, en donde se está realizando citogenética molecular mediante microarreglos, se encontró una elevada frecuencia de deleciones somáticas en *PAX5* (16.67%) por lo que, una posibilidad es que las deleciones monoalélicas podrían estar jugando un papel importante en la inactivación de *PAX5* en nuestros pacientes solo que se requiere de un mayor estudio al respecto para elucidar esta hipótesis. En un estudio reciente, las mutaciones puntuales o translocaciones asociadas a *PAX5* a nivel de reguladores transcripcionales han sido también reportadas en

niños con LLA [20,23,28,79]. Un ejemplo muy claro de esto, es la asociación de mutaciones en *PAX5* en pacientes con el rearrreglo génico *BCR-ABL1* (cromosoma filadelfia) con los pacientes que presentan el rearrreglo *Ph-like* (*BCR-ABL1-like*) [28,97].

Otro aspecto importante, tiene que ver con el mecanismo de regulación que tiene *PAX5* para el gen *FLT3*, el cual a una elevada expresión resulta en una disminución significativa de la linfopoyesis de las células B en la médula ósea [98] lo cual podría explicar que la expresión anormal de genes del linaje mielóide como el gen de la *mieloperoxidasa* (*MPO*) que se observó en nuestra muestra (datos no mostrados). Por definición, los blastos de tipo LLA son negativos a la tinción de *mieloperoxidasa* en el frotis de sangre proveniente de la médula ósea, sin embargo, la positividad aislada de *MPO* a un bajo nivel ha sido detectada en algunos casos de LLA, particularmente en el subgrupo de pacientes con la translocación *BCR-ABL1* [99]. Aún más, nuestros hallazgos relacionados con la expresión de genes de linaje mielóide podría ser resultado un cambio en la dirección de la diferenciación de los blastos leucémicos, de linfóide a mielóide. Se ha reportado que mutaciones o deleciones que eliminan la expresión de *PAX5* en células progenitoras de linaje B, conducen a la diferenciación celular mielóide.

Entre los genes anormalmente expresados tanto en las muestras del diagnóstico y de la recaída en pacientes con recaída muy temprana encontramos a los genes *PAX5*, *EBF1*, *ZCCH37* y *BLK*, lo cual, resalta la importancia de continuar la evaluación de estos genes como potenciales biomarcadores de recaída muy temprana en una cohorte independiente. Incluso, como potenciales marcadores de enfermedad mínima residual tras la inducción a la remisión en el primer mes de tratamiento y con ello poder prevenir de forma oportuna las recaídas tempranas que ocurren en nuestros pacientes con LLA. Interesantemente, el gen *BLK* actualmente se encuentra en estudio en otras partes del mundo como potencial blanco terapéutico en pacientes con cáncer de células no pequeñas de pulmón en adultos, utilizando al medicamento osimertinib como aquel que podría actuar directamente en la expresión génica de *BLK* [100].

Biomarcadores potencialmente involucrados en respuesta a tratamiento

Para identificar genes potencialmente involucrados en la respuesta al tratamiento, comparamos los perfiles de expresión de las muestras al diagnóstico versus a la recaída. Se observó que la mayoría de los GDE se encuentran involucrados con el desarrollo y función del sistema hematopoyético, en la formación y desarrollo del sistema linfóide. En este grupo se identificaron a los genes *ELANE*, *PRTN3*, *CTSG*, *MPO*, *PAX5*, *ZCCH7*, *EBF1* dentro de los más diferencialmente expresados. Es de hacer notar que cuatro de ellos, *ELANE*, *PRT3*, *CTSG* y *MPO* están sobrerregulados en linfocitos T resistentes a metilprednisona [101]. Además, la elastasa (*ELANE*) juega un papel relevante en el desarrollo de neutropenia y mutaciones germinales se asocian al desarrollo de entidades hematológicas incluyendo leucemia mielóide y síndromes mielodispásicos [102]. Incluso, existen evidencias de que mutaciones que afectan la actividad de *ELANE* podrían incrementar la apoptosis de las células linfoides, por lo que su sobreexpresión correlacionaría con menor apoptosis y por ende resistencia al tratamiento [103].

Otra observación importante de este análisis fue el hecho de que los genes *PAX5* y *EBF1* estaban más afectados en su expresión (a la baja) en la muestras de MO tomadas a la recaída en comparación con las muestras de MO tomadas al diagnóstico. Estos hallazgos exponen el potencial de *PAX5* y *EBF1* no sólo como biomarcadores predictivos de recaída, o para evaluar la enfermedad mínima residual durante el seguimiento del paciente. Además, podrían estar implicados en la resistencia al tratamiento.

Fortalezas y limitaciones del estudio

Las principales fortalezas de esta investigación son: 1) conformar la cohorte prospectiva de LLA infantil más grande realizada en México para evaluar recaída y mortalidad temprana e identificar nuevos biomarcadores asociados a la recaída, 2) las muestras incluidas fueron representativas de cada una de las instituciones participantes, mismas que atienden al 76% de los casos de leucemia de la Ciudad de México, 3) las recaídas tempranas ocurrieron en la misma proporción entre las instituciones participantes (independientemente del esquema terapéutico), 4) error tipo I reducido por la astringencia del análisis ($FC > 2$, $P < 0.001$), y de gran relevancia 5) los potenciales biomarcadores identificados aquí, pueden ser analizados por RT-PCR en cualquier institución de salud pública o privada de México, sin necesidad de contar con personal altamente calificado o infraestructura tecnológica de vanguardia. Dentro de las principales limitaciones del trabajo se incluyen el pequeño tamaño de muestra evaluado por microarreglos y el número reducido de casos con recaída que fueron diagnosticados como de buen pronóstico al inicio de la investigación. La identificación de los biomarcadores asociados a recaída en una cohorte independiente de pacientes permitirá fortalecer nuestros hallazgos.

Hasta nuestro conocimiento, este es el primer análisis que se realiza con la finalidad de identificar biomarcadores de recaída y de potenciales predictores de resistencia a tratamiento en niños mexicanos con LLA. Reportar los resultados del estudio del transcriptoma de nuestros pacientes, constituyó un esfuerzo multiinstitucional para mejorar el conocimiento de la LLA en nuestro país y encontrar mecanismos que permitan la traslación del conocimiento hacia una medicina personalizada. Llevar el conocimiento generado en el laboratorio a la práctica clínica, sin duda derivará no sólo en un incremento en la sobrevida y en la calidad de vida (menos efectos colaterales negativos) de los pacientes; además coadyuvará a la reducción en los costos socioeconómicos (erario público y gasto familiar) que implican el manejo de niño con LLA.

Conclusiones

1. Los biomarcadores identificados en pacientes con recaída muy temprana fueron: *BLVRB*, *MPO*, *ZCCHC7*, *PAX5*, *EBF1*, *TMOD1* y *BLNK*.
2. El análisis de funcionalidad y enriquecimiento mostró que dichos genes juegan un papel importante en procesos celulares relacionados al desarrollo del sistema hematopoyético, cáncer, muerte celular y apoptosis.

Referencias

1. Altekruse S, Kosary C, Krapcho M, et al (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2007, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/
2. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2012; 62:220-41.
3. Perdigón-Villaseñor G, Fernández-Cantón SB. Hospital Infantil de México Federico Gómez. Principales motivos de egresos hospitalarios durante el periodo 1994-2007. *Medigraphic* 2009; 66: 99-101.
4. Información obtenida en línea en “10 principales causas de mortalidad en hombres y mujeres por grupo de edad 2007”, en <http://www.sinais.salud.gob.mx/>, visitada el día 31 de diciembre 2012.
5. Curado MP, Pontes T, Guerra-Yi ME, et al. Leukemia mortality trends among children, adolescents, and young adults in Latin America. *Revista Panam Salud Pub* 2011; 29:96–102.6
6. Pérez-Saldivar ML, Fajardo-Gutiérrez A, Bernáldez-Ríos RM, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011; 11:355.
7. Dores GM, Devesa SS, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. Acute leukemia incidence and patient survival among children and adults in the United States, 2001-2007. *Blood* 2012; 119: 34-43.
8. Labardini-Méndez JR, Cervera Ceballos E, López-Navarro OG, et al. Oncoguía: Leucemia aguda linfoblástica. *Cancerología* 2011; 111-15.
9. GPC de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México: Secretaría de Salud; 2009.
10. Quero-Hernandez 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* 2012; 14: 166-71.
11. Kadan-Lottick NS, Ness KK, Bhatia S, et al. Survival variability by race and ethnicity in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA* 2003; 290: 2008.
12. Verduzco-Rodríguez L, Verduzco-Aguirre HE, López-Ariza L. Leucemia linfoblástica aguda hiperdiploide en niños. *Rev Hematol Mex* 2012; 13:172-76
13. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003:102-31.
14. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008; 371:1030-43.
15. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2012; 389-96.
16. 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; 32:1518-22.
17. 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. *Leuk Lymphoma* 2009; 50:1352-60.
18. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC, Olarte-Carrillo I, Guerra-Castillo FX, Pompa-Mera EN, Ocaña-Mondragón A, Rangel-López A, Bernáldez-Ríos R, Medina-Sanson A, Jiménez-Hernández E, Amador-Sánchez R, Peñaloza-González JG, de Diego Flores-Chapa J, Fajardo-Gutiérrez A, Flores-Lujano J, Rodríguez-Zepeda Mdel C, Dorantes-Acosta EM, Bolea-Murga V, Núñez-Villegas N, Velázquez-Aviña MM, Torres-Nava JR, Reyes-Zepeda NC, González-

- Bonilla C, Mejía-Aranguré JM. 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.
19. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest* 2012; 122:3398-406.
 20. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446:758–64
 21. 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; 116:4874-84.
 22. Hogan LE, Meyer JA, Yang J, et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood* 2011; 118: 5218-26.
 23. Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, et al. IKZF1 deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia* 2010; 24:1258-64.
 24. Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. JAK mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106:9414-18.
 25. 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; 115:5312-21.
 26. Kuster L, Grausenburger R, Fuka et al. ETV6/RUNX1-positive relapses evolve from an ancestral clone and frequently acquire deletions of genes implicated in glucocorticoid signaling. *Blood* 2011; 117: 2658-67.
 27. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009; 27:5202-07.
 28. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008; 453:110-14.
 29. Nebral K, Denk D, Attarbaschi A, et al. Incidence and diversity of PAX5 fusion genes in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2009; 23:134–143.
 30. Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, et al. The PAX5 gene is frequently rearranged in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Haematologica* 2010; 95:1683–90.
 31. Strefford J, Van Delft F, Robinson HM, Worley H, Selzer R, Young BD, Saha V, Harrison CJ. Patients with RUNX1 (AML1) amplification exhibit consistent genomic amplification, chromosome instability and a distinct gene expression signature. *J Med Genet.* 2005a;42:S65.
 32. 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; 1:133-43.
 33. Ross ME, Zhou X, Song G, et al. Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood* 2003; 102:2951–9.
 34. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, et al. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood.* 2012;119:1872–81.

35. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Moskowitz N, Raetz EA. Childhood acute lymphoblastic leukemia in the age of genomics. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 May 1;46(5):570-8.
36. Smith M, Hunger SP, Willman CL. 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*. 2010b;116:4874-84.
37. Staal FJ, van der Burg M, Wessels LF, Barendregt BH, Baert MR, van den Burg CM, van Huffel C, Langerak AW, van der Velden VH, Reinders MJ, van Dongen JJ. 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 Jul;17(7):1324-32.
38. Beesley AH, Cummings AJ, Freitas JR, Hoffmann K, Firth MJ, Ford J, de Klerk NH, Kees UR. The gene expression signature of relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia: implications for mechanisms of therapy failure. *Br J Haematol*. 2005 Nov;131(4):447-56.
39. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, Chen IM, Murphy MH, Atlas SR, Bedrick EJ, Devidas M, Carroll AJ, Robinson BW, Stam RW, Valsecchi MG, Pieters R, Heerema NA, Hilden JM, Felix CA, Reaman GH, Camitta B, Winick N, Carroll WL, Dreyer ZE, Hunger SP, Willman CL. Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2012 Feb 23;119(8):1872-81.
40. 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; 130:67.
41. Martinez-Mancilla M, Rodriguez-Aguirre I, Tejocote-Romero I, Medina-Sanson A, Ocadiz-Delgado R, Gariglio P. Clinical relevance of the fusion transcripts distribution pattern in mexican children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013; 35(3):170-3.
42. Quaranta BP, Halperin EC, Kurtzberg J, et al. The incidence of testicular recurrence in boys with acute leukemia treated with total body and testicular irradiation and stem cell transplantation. *Cancer* 2004; 101:845.
43. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, et al. Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. German-Austrian-Swiss ALL-BFM Study Group. *Blood* 2000; 95:3310.
44. Pui CH, Dahl GV, Bowman WP, et al. Elective testicular biopsy during chemotherapy for childhood leukaemia is of no clinical value. *Lancet* 1985; 2:410.
45. Chessells JM, Veys P, Kempinski H, et al. Long-term follow-up of relapsed childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 123:396.
46. Borgmann A, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Unrelated donor stem cell transplantation compared with chemotherapy for children with acute lymphoblastic leukemia in a second remission: a matched-pair analysis. *Blood* 2003; 101:3835.
47. Einsiedel HG, von Stackelberg A, Hartmann R, et al. Long-term outcome in children with relapsed ALL by risk-stratified salvage therapy: results of trial acute lymphoblastic leukemia-relapse study of the Berlin-Frankfurt-Münster Group 87. *J Clin Oncol* 2005;23:7942.

48. 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.
49. Nandakumar A, Anantha N, Venugopal T, et al. Descriptive epidemiology of lymphoid and haemopoietic malignancies in Bangalore, India. *Int J Cancer* 1995; 63:37.
50. Metzger ML, Howard SC, Fu LC, et al. Outcome of childhood acute lymphoblastic leukaemia in resource-poor countries. *Lancet* 2003; 362:706.
51. Howard SC, Pedrosa M, Lins M, et al. Establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource-poor area. *JAMA* 2004; 291:2471.
52. Millot F, Suciú S, Philippe N, et al. Value of high-dose cytarabine during interval therapy of a Berlin-Frankfurt-Munster-based protocol in increased-risk children with acute lymphoblastic leukemia and lymphoblastic lymphoma: results of the European Organization for Research and Treatment of Cancer 58881 randomized phase III trial. *J Clin Oncol* 2001; 19:1935.
53. Matloub Y, Bostrom BC, Hunger SP, et al. Escalating intravenous methotrexate improves event-free survival in children with standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2011; 118:243.
54. Visser JH, Wessels G, Hesseling PB, et al. Prognostic value of day 14 blast percentage and the absolute blast index in bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2001; 18:187.
55. Uckun FM, Sensel MG, Sun L, et al. Biology and treatment of childhood T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 91:735.
56. Steinherz PG, Gaynon PS, Breneman JC, et al. Treatment of patients with acute lymphoblastic leukemia with bulky extramedullary disease and T-cell phenotype or other poor prognostic features: randomized controlled trial from the Children's Cancer Group. *Cancer* 1998; 82:600.
57. Gupta S, Bonilla M, Fuentes SL, Caniza M, Howard SC, Barr R, Greenberg ML, et al. "Incidence and predictors of treatment-related mortality in pediatric acute leukemia in El Salvador". *B J Cancer* 2009; 100: 1026-1031.
58. Jasso-Gutiérrez L, Dorantes Acosta E, Rodríguez Ortega EE, Pasillas-Torres EM, Muñoz Hernández O. GPC de Diagnóstico y Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda, México: Secretaria de Salud; 2009. <http://www.cenetec.salud.gob.mx/interior/gpc.html>
59. Champagne MA, Capdeville R, Krailo M, et al. Imatinib mesylate (STI571) for treatment of children with Philadelphia chromosome-positive leukemia: results from a Children's Oncology Group phase 1 study. *Blood* 2004; 104:2655–60.
60. Koo HH. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Korean J Pediatr* 2011 Mar;54(3):106-10.
61. Dorantes-Acosta E, Zapata-Tarrés M, Miranda-Lora A, et al. Comparación de las características clínicas al diagnóstico de niños con leucemia linfoblástica aguda afiliados al Seguro Popular, con respecto al desenlace. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2012; 69: 190-6.
62. Metzger ML, Howard SC, Fu LC, Stefan R, Hankcock ML, Zhag Z, et al. "Outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia in resource-poor countries" *Lancet*. 2003 Aug 30; 362(9385):706-8.
63. Howard SC, Pedrosa M, Lins M, Pedrosa A, Pui CH, Ribeiro RC, et al. "establishment of a pediatric oncology program and outcomes of childhood acute lymphoblastic leukemia in a resource poor area" *JAMA* 2004; 291: 2471-2475.

64. Tzortzatou-Stathopoulou F, Papadopoulou AL, Moschovi M, Botsonis A, Tsangaris GT. Low relapse rate in children with acute lymphoblastic leukemia after risk-directed therapy. *J Pediatr Hematol Oncol* 2001; 23:591-7.
65. Franca R, Rebora P, Basso G, et al. Glutathione S-transferase homozygous deletions and relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: a novel study design in a large Italian AIEOP cohort. *Pharmacogenomics* 2012; 13:1905-16
66. Meyer JA, Wang J, Hogan LE, et al. Relapse-specific mutations in NT5C2 in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2013; 45: 290-4.
67. Ribeiro KB, Buffler PA, Metayer C. Socioeconomic status and childhood acute lymphocytic leukemia incidence in São Paulo, Brazil. *Int J Cancer*. Oct 15 2008;123(8):1907-12.
68. Bhatia S. Disparities in cancer outcomes: lessons learned from children with cancer. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56:994-02.
69. Xu H, Cheng C, Devidas M, et al. ARID5B genetic polymorphisms contribute to racial disparities in the incidence and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2012; 30:751-7.
70. 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.
71. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, et al Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 1998; 351:550-4.
72. Inskip PD, Curtis RE. New malignancies following childhood cancer in the United States, 1973-2002. *Int J Cancer* 2007; 121: 2233-40.
73. 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.
74. Chatenoud L, Bertuccio P, Bosetti C., et al. Childhood cancer mortality in America, Asia, and Oceania, 1970 through 2007. *Cancer* 2010;116:5063-5074.
75. Jiménez-Hernández E, Jaimes-Reyes EZ., et al. Arellano-Galindo J. 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.
76. Martín-Trejo JA, Núñez-Enríquez JC, Fajardo-Gutiérrez A, Medina-Sansón A, Flores-Lujano J, Jiménez-Hernández E, Amador-Sanchez R, Peñaloza-Gonzalez JG, Alvarez-Rodriguez FJ, Bolea-Murga V, Espinosa-Elizondo RM, de Diego Flores-Chapa J, Pérez-Saldivar ML, Rodriguez-Zepeda MD, Dorantes-Acosta EM, Núñez-Villegas NN, Velazquez-Aviña MM, Torres-Nava JR, Reyes-Zepeda NC, González-Bonilla CR, Flores-Villegas LV, Rangel-López A, Rivera-Luna R, Paredes-Aguilera R, Cárdenas-Cardós R, Martínez-Avalos A, Gil-Hernández AE, Duarte-Rodríguez DA, Mejía-Aranguré JM. 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*. 2017;58(4):898-908.
77. 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.
78. 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.

79. Beyermann 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.
80. 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.
81. Guardado-Estrada M, Juarez-Torres E, Medina-Martinez I. A great diversity of Amerindian mitochondrial DNA ancestry is present in the Mexican mestizo population. *J Hum Genet* 2009; 54(12):695-705.
82. Van der Velden VH, de Launaij 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.
83. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:344-357.
84. O'Brien L, Hosick PA, John K., et al. Biliverdin reductase isozymes in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2015;26:212-220.
85. Kim SS, Seong S, Lim SH., et al. Targeting biliverdin reductase overcomes multidrug resistance in leukemia HL60 cells. *Anticancer Res* 2013;33:4913-4919.
86. Silveira VS, Scrideli CA, Moreno DA, Yunes JA, Queiroz RG, Toledo SC, Lee ML, Petrilli AS, Brandalise SR, Tone LG. Gene expression pattern contributing to prognostic factors in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2013 Feb;54(2):310-4.
87. Gokhin DS, Ochala J, Domenighetti AA, Fowler VM., et al. Tropomodulin 1 directly controls thin filament length in both wild-type and tropomodulin 4-deficient skeletal muscle. *Development* 2015;142:4351-4362.
88. Helfman DM, Flynn P, Khan P., et al. Tropomyosin as a regulator of cancer cell transformation. *Adv Exp Med Biol* 2008;644:124-131.
89. Nakayama J, Yamamoto M, Hayashi K., et al. BLNK suppresses pre-B-cell leukemogenesis through inhibition of JAK3. *Blood* 2009; 113:1483-1492
90. Minegishi Y, Rohrer J, Coustan-Smith E., et al. An essential role for BLNK in human B cell development. *Science* 1999;286:1954-1957.
91. 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.
92. 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.
93. 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.
94. 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
95. Holmes ML, Pridans C, Nutt SL. The regulation of the B-cell gene expression programme by Pax5. *Immunol Cell Biol* 2008;86:47-53.
96. 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.
97. 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.
98. 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.
99. 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
100. U.S. Food and Drug Administration; 2015. (Accessed September 30, 2016, available at http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/208065s000lbl.pdf)
101. De Andres C, García MI, Goicoechea H, Martínez-Ginés ML, García-Domínguez JM, Martín ML, Romero-Delgado F, Benguría A, Sanjurjo M, López-Fernández LA. Genes differentially expressed by methylprednisolone in vivo in CD4 T lymphocytes from multiple sclerosis patients: potential biomarkers. *Pharmacogenomics J*. 2018;18(1):98-105.
102. Bellanné-Chantelot C, Clauin S, Leblanc T, et al. Mutations in the ELA2 gene correlate with more severe expression of neutropenia: a study of 81 patients from the French Neutropenia Register. *Blood* 2004; 103:4119–4125.
103. Makaryan V, Zeidler C, Bolyard AA, et al. The diversity of mutations and clinical outcomes for ELANE-associated neutropenia. *Current opinion in hematology* 2015; 22(1):3-11.

Anexos

Carta de Consentimiento Informado

Título: “Identificación de biomarcadores en niños con leucemia linfoblástica aguda de buen pronóstico para detectar casos con alto riesgo de recaída”.

En este formato se le informa acerca del estudio de investigación al que le estamos invitando a participar, Léalo cuidadosamente y tome el tiempo que considere necesario, además puede usted realizar todas las preguntas al respecto.

Justificación y propósito del estudio

Le estamos invitando a participar en este estudio de investigación porque sabemos que su hijo(a) fue recientemente diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda. Al igual que a usted, se invitará a participar a padres de 196 niños con esta enfermedad que son atendidos en el “Hospital Infantil de México Federico Gómez de la Secretaría de Salud” y en el “Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social”.

La Leucemia es uno de los tipos de cáncer más frecuentes en la infancia. Cada niño con leucemia responde de forma diferente al tratamiento de quimioterapia y esto pudiera deberse a que existe alguna alteración en sus genes. El propósito de la presente investigación es buscar si existe alguna alteración en los genes de su hijo(a) y en caso de encontrarse alguna alteración genética, estudiar si esta alteración influye o no en la respuesta al tratamiento de quimioterapia.

Descripción general del estudio y Procedimientos

Si usted autoriza que su hijo participe se realizará lo siguiente:

- a) Usted y su pareja responderán a un cuestionario. El cuestionario incluye preguntas acerca de sus nombres completos, fecha de nacimiento, características de su vivienda, escolaridad, ocupación, ingreso económico y número de hijos, etc.
- b) En segundo lugar, Se tomará a una cantidad extra de la sangre y de su médula ósea a su hijo(a) las cuales son parte de los exámenes que por rutina se le realizarán a su hijo(a); además de una muestra de su saliva. Para la muestra de saliva y si su hijo(a) es mayor a 5 años de edad, se le solicitará que haga buches y escupa en un tubo estéril de 2 ml; en cambio, si su hijo (a) tiene menos de 5 años de edad, se utilizará un hisopo especial, para obtener la saliva de su boca. Además y si usted así lo autoriza, una cantidad de las muestras se conservarán por 5 años para otros estudios con fines de investigación y serán manejadas, procesadas y almacenadas bajo la supervisión de la Dra. Silvia Jiménez Morales en el Laboratorio de Inmunogenómica y Enfermedades Metabólicas del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Riesgos e inconvenientes relacionados con el estudio

En cuanto a la entrevista, ni usted ni su pareja ni su hijo corren algún riesgo; realizaremos la entrevista en este Hospital y lo haremos en un lugar privado. Nadie más que los

investigadores, conocerá la información que usted nos proporcione. En cuanto a las muestras de sangre y de saliva, los 5 ml de sangre extra se obtendrán de la misma toma de muestra que se le realice a su hijo para otras pruebas de sangre que su médico tratante indique. Para el caso de la muestra de saliva, serán tomadas con guantes estériles mediante un hisopo estéril y limpio, que es especial para estas muestras. Las molestias de la toma de saliva serán mínimas y no le ocasionará dolor.

Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.

Usted(es) no obtendrá(n) un beneficio directo al participar en este estudio. Los resultados del presente estudio podrían contribuir a que se conozca más acerca de esta enfermedad desde el punto de vista genético. Además usted ni su hijo recibirán un pago por participar en esta investigación.

Confidencialidad

Toda la información recolectada de su niño(a) para este estudio se considerará confidencial de acuerdo con la Ley General de Salud en Materia de Investigación en Seres Humanos. Para proteger la privacidad de usted y de su niño(a), los registros se manejarán usando un número de folio y no se utilizará ni su nombre, dirección, ni teléfono, con la finalidad de no descubrir la identidad de su hijo ni de ustedes. La información de usted y del (la) menor recabada en este estudio sólo será utilizada para fines del mismo y no aparecerán en reportes, conferencias ni en informes publicados relacionados con esta investigación.

Resultados

Usted no recibirá los resultados de este estudio. Sin embargo, sus médicos tratantes tendrán de manera oportuna los resultados de su hijo (a). Si usted en cualquier momento de la investigación, requiriera de mayor información, podrá(n) contactar en cualquier momento, a su médico tratante y/ a los investigadores principales cuyos datos se encuentran al final de esta carta de consentimiento informado. Cabe mencionar que no revelaremos por ningún motivo los resultados de las pruebas genéticas ni de los datos de la entrevista a ninguno de sus parientes ni a ninguna otra persona. Los resultados obtenidos de esta investigación no serán comercializados con fines de lucro.

Participación o retiro

Queremos hacer de su conocimiento, el compromiso que tenemos de dar respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación. Su participación en este estudio es completamente voluntaria y sin costo. Si usted decide no participar, su hijo recibirá la atención médica que suele recibir todo niño con esta enfermedad en esta Institución Hospitalaria. Esto quiere decir, que no afectará su relación con este hospital ni el derecho que su hijo(a) tiene para obtener una atención adecuada.

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento, es decir puede solicitar que se destruya y no se analice la muestra de su hijo, y puede también solicitar que los datos de la entrevista no se utilicen en la investigación. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como paciente de esta

Institución, solo tendría que ponerse en contacto con los investigadores principales a los teléfonos o en la dirección que aparecen al final de este documento.

Personal de contacto para dudas y aclaraciones

Si usted(es) tiene(n) dudas, preguntas o quieren tener contacto con los investigadores principales del presente estudio, ustedes podrán comunicarse con el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré, que es el investigador responsable del estudio al teléfono: 56276900 Ext. 21216, quien se encuentra en el tercer piso de la Coordinación de Investigación en Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, ubicada en Avenida Cuauhtémoc 330, 06720. México, DF.; o con la Dra. Aurora Medina Sanson. Jefa del Departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con domicilio en Dr. Márquez No. 162, C.P. 06720 México D.F. Teléfono: 52289917 en la ext. 9015.

Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

En caso de dudas sobre sus derechos como participante en investigación se podrá comunicar al Comité de Ética, al 56276900 extensión 21230 en la Ciudad de México o por correo electrónico: comisioneticainterno@gmail.com.mx o comité.eticainv@imss.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México D.F.

Declaración de consentimiento informado

Se me ha explicado con claridad en qué consiste este estudio, además he leído (o alguien me ha leído) el contenido de este formato de consentimiento. Se me han dado la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas han sido contestadas a mi satisfacción. Se me ha dado una copia de este formato.

Al firmar este formato estoy de acuerdo en participar en la investigación que aquí se describe.

Nombre del Paciente

Nombre del papá o Tutor

Firma del papá o Tutor

Fecha

Nombre de la mamá o Tutora

Firma de la mamá o Tutora

Fecha

Firma del encargado de obtener el consentimiento informado

Le he explicado el estudio de investigación al participante y he contestado todas sus preguntas. Creo que el/ella entiende la información descrita en este documento y libremente da su consentimiento a participar en este estudio de investigación.

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

Firma de los testigos

Mi firma como testigo certifica que el/la participante firmó este formato de consentimiento informado en mi presencia, de manera voluntaria.

Nombre del Testigo 1

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

Nombre del Testigo 2

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

Existe la posibilidad de que en un futuro se puedan utilizar en otros estudios las muestras de su hijo(a) para el estudio de genes (Por favor marque con una X una de las opciones cajas que se presentan abajo).

Autorizo que se conserve la muestra a mi hijo (a) para utilizarla en las pruebas genéticas de sangre y de saliva de este y de otros estudios: Si No

Con copia para los padres del participante.

Carta de Asentimiento Informado

(Para niños mayores a 8 años)

Nombre del Estudio: "Identificación de biomarcadores en niños con leucemia linfoblástica aguda de buen pronóstico para detectar casos con alto riesgo de recaída".

Hola, mi nombre es _____ (*nombre de quien solicita el asentimiento*). Quiero invitarte a participar en un estudio en donde buscamos estudiar los genes que se están en tu saliva. Los genes son lo que heredamos de nuestros abuelos y de nuestros padres y que nos hace diferentes a otras personas, estos genes están en nuestra sangre, en nuestra saliva y en todo nuestro cuerpo.

Si tú quieres puedes estar en nuestro estudio, el cual se trata de tomarte un poco de saliva con un algodoncito; lo cual será rápido. Después de tomar un poco de tu saliva nosotros revisaríamos en un laboratorio los genes que hay en tu saliva. De esta forma tú ayudarás a que se conozca más acerca de la leucemia. Debo decirte que ni tú ni tus papás ni nadie más que las personas que hacen este estudio sabrán cómo están tus genes, es decir no se te dará ni a ti ni a tus papás el resultado de este estudio.

Tu(s) papás (papá/mamá) saben que te estamos invitando a que seas parte de este estudio y a ellos también se les preguntará si nos dejarían tomarte saliva con el algodoncito para estudiar tus genes. Si ellos dicen que SI, y tú también dices que SI te tomaremos un poco de tu saliva.

Si tú no quieres estar en mi estudio nadie se enojará contigo o si primero dices que si quieres estar en el estudio y después te arrepientes también te respetaremos y no te tomaremos ninguna muestra de saliva, o en caso de que ya te la hubiéramos tomado no la usaremos para nuestro estudio.

Para estar en mi estudio, tienes que poner tu nombre en esta hoja después de leer la siguiente Declaratoria:

He decidido estar en este estudio aun cuando sé que no recibiré nada a cambio. _____ (*nombre de quien solicita el asentimiento*), me ha explicado y ha contestado las preguntas que yo le hice.

Nombre del participante

_____/_____/_____
Fecha

Nombre y Firma de quien solicita el asentimiento

_____/_____/_____
Fecha

Personal de contacto para dudas y aclaraciones

Si tienes dudas, preguntas o quieres tener contacto con los investigadores principales del presente estudio, podrás comunicarte con el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré, que es el investigador responsable del estudio al teléfono: 56276900 Ext. 21216, quien se encuentra en el tercer piso de la Coordinación de Investigación en Salud del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, ubicada en Avenida Cuauhtémoc 330, 06720. México, D.F.; o con la Dra. Aurora Medina Sansón. Jefa del Departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, con domicilio en Dr. Márquez No. 162, C.P. 06720 México D.F. Teléfono: 52289917 en la ext. 9015.

Personal de contacto para dudas sobre sus derechos como participante en un estudio de investigación

En caso de dudas sobre tus derechos como participante en investigación podrás comunicarte al Comité de Ética, al 56276900 extensión 21230 en la Ciudad de México o por correo electrónico: comisioneticainerno@gmail.com o comité.eticainv@imss.gob.mx. La Comisión de Ética se encuentra ubicada en el Edificio del Bloque B, Unidad de Congresos piso 4, Centro Médico Nacional XXI, Av. Cuauhtémoc 330 Colonia Doctores, C.P. 06725, México