



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

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

**“Frecuencia de alteraciones genéticas y bioquímicas  
de la leucemia linfoblástica aguda de subtipo  
Philadelphia-like en pacientes pediátricos de riesgo  
clínico estándar y alto”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A:**

**Jessica García Islas**

**DIRECTOR**

**Dra. María del Rocío Juárez Velázquez**

**ASESOR**

**Dr. Juan José Rodríguez Mercado**

**Ciudad de México, Octubre 2019**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

A la Facultad de Estudios superiores Zaragoza de la Universidad Autónoma de México por formarme y darme la oportunidad de realizar mis estudios en la licenciatura de Biología

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

Proyecto CONACYT PDCPN-2014/248591.

Beca para tesis de licenciatura del proyecto No. PDCPN-2014/248591.

A los fondos federales para la investigación del Instituto Nacional de Pediatría por el apoyo económico brindado al proyecto 2016/019.

Al Instituto Nacional de Pediatría, por darme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis de Licenciatura.

A los servicios de Oncología y Hematología del Instituto Nacional de Pediatría, al servicio de Oncología del Hospital Infantil de México "Federico Gómez" y al Hospital Infantil Teletón Oncología, por el acceso al material biológico para este proyecto.

A mis compañeros Daniel Anaya, Oscar Soler, Adrián Hernández, Dafné Moreno y Adriana Reyes por permitirme utilizar sus datos obtenidos, para presentarlos en este proyecto.

### **Agradecimientos a título personal**

A la doctora Rocío Juárez por su confianza, enseñanza, apoyo y amistad, así como por haberme tenido toda la paciencia para guiarme durante todo el proceso de mi proyecto de tesis.

A la doctora Patricia Pérez por haberme dado la oportunidad de ser parte del laboratorio de genética y cáncer y brindarme su apoyo.

A las doctoras Dafne, Adriana y mi amigo Alejandro por todo su apoyo y amistad, hicieron que el proceso fuera divertido y con mucho aprendizaje.

A todo el equipo que conforma el laboratorio de Genética y Cáncer, que me ayudaron en mi formación académica y personal, son un estupendo equipo de trabajo.

A mi familia, lo mejor y lo más importante que tengo. Mis padres Yolanda y Martín por estar conmigo en todos mis pasos, caídas y por apoyarme en todo. A mi hermana Ale por tus consejos, ánimos y regaños durante toda mi vida, para ser una mejor persona. Esto es para ustedes.

A mis tíos Erika, Mau, Chely, Chema, Lety y Julio por siempre poder contar con ustedes y por los consejos que me brindan.

A mi compañero de vida Alan, gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas y por poder recorrer este camino juntos.

A mis compañeros de carrera Ulises, Denisse, Brenda, Carlos, Wendy, Joshua y Alfredo, por confiar en mí y por poder vivir una de las mejores etapas de mi vida, con ustedes.

A los niños que fueron parte de este proyecto, ustedes son el principal motivo de este trabajo.

**“Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes”**

**James Watson**

## Índice

Resumen	10
1. Introducción	12
1.1 Cáncer	12
1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda	14
1.2.1 Diagnóstico y manifestaciones clínicas de la leucemia linfoblástica aguda	15
1.2.2 Clasificación genética de la leucemia linfoblástica aguda	18
1.2.3 Clasificación de riesgo en leucemia linfoblástica aguda de células B	22
1.3 LLA-B del subtipo <i>BCR-ABL1</i> o Philadelphia positivo	23
1.4 Descubrimiento del subtipo Ph-like	24
1.4.1 Incidencia del subtipo Ph-like	28
1.4.2 Alteraciones genéticas del subtipo Ph-like	29
1.4.3 Genes sobre expresados	29
1.4.4 Alteraciones en el gen <i>CRLF2</i>	31
1.4.5 Alteraciones en el gen <i>IKZF1</i>	34
1.4.6 Vías de señalización alteradas en el subtipo Ph-like	36
1.4.7 Identificación y opciones de tratamiento para el subtipo Ph-like	37
1.5 Planteamiento del problema	40
1.6 Justificación	41
1.7 Objetivos	42
1.7.1 General	42
1.7.2 Particulares	42
1.8 Hipótesis	42
2. Material y Método	43
2.1 Población de estudio	43
2.2 Reclutamiento de datos clínicos y de laboratorio	44
2.3 Procesamiento de muestras	44
2.3.1 Extracción de RNA	44
2.3.2 Síntesis de cDNA	45
2.3.3 Verificación de síntesis de cDNA por PCR de <i>GAPDH</i>	45
2.4 Determinación de los niveles de expresión génica por qRT-PCR	46
2.4.1 Cuantificación génica	47
2.5 Alteraciones en el gen <i>CRLF2</i>	48
2.6 Isoformas dominantes negativas del gen <i>IKZF1</i>	48
2.7 Vías de señalización	49
2.8 Análisis de resultados	50
3. Resultados	51
3.1 Población de estudio, características clínicas y clasificación de riesgo de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B	51
3.2 Frecuencia del perfil de expresión génica característico del subtipo Ph-like	52

3.3 Frecuencia de alteraciones en el gen <i>CRLF2</i>	56
3.4 Frecuencia de isoformas dominantes negativas del gen <i>IKZF1</i>	58
3.5 Frecuencia de activación de vías de señalización	60
3.6 Frecuencia de alteraciones características del subtipo Ph-like	65
4. Discusión	69
4.1 Candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like por perfil de expresión génica positivo	70
4.2 Candidatos Ph-like por alteraciones en <i>CRLF2</i>	71
4.3 Isoformas dominantes negativas del gen <i>IKZF1</i> en pacientes candidatos Ph-like	72
4.4 Vías de señalización en pacientes candidatos Ph-like	73
4.5 Propuesta de algoritmo para la clasificación de pacientes con LLA del subtipo Ph-like	74
5. Conclusiones	80
6. Perspectivas	81
7. Bibliografía	82

## Índice de Figuras y Cuadros

Figura 1. Muertes registradas para los principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años	13
Figura 2. Translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el cromosoma 22	21
Figura 3. Incidencia de leucemia linfoblástica aguda del subtipo Ph-positivo y Ph-like de acuerdo a la edad	28
Figura 4. Arreglos del gen <i>CRLF2</i>	33
Figura 5. Representación esquemática de las isoformas del gen <i>IKZF1</i>	35
Figura 6. Características clínicas de la cohorte de 55 pacientes	51
Figura 7. Distribución de los pacientes por características clínicas	52
Figura 8. Verificación del material genético para el perfil de expresión génica	53
Figura 9. Perfil de expresión génica representado en mapa de calor	54
Figura 10. Frecuencia de pacientes positivos al perfil de expresión génica	55
Figura 11. Frecuencia de activación de vías de señalización en pacientes clasificados por edad de riesgo estándar y alto	62
Figura 12. Frecuencia de activación de vías de señalización en pacientes clasificados por cuenta leucocitaria	62
Figura 13. Frecuencia de activación de vías de señalización en pacientes clasificados por riesgo clínico estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria $<5 \times 10^4$ células/ $\mu$ l) y alto ( $\geq 10$ años con o sin cuenta leucocitaria $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu$ l)	63
Figura 14. Frecuencia de alteraciones genéticas características del subtipo Ph-like de manera individual en pacientes “otros B” positivos para la activación de alguna vía de señalización ABL, JAK-STAT5 y RAS	63
Figura 15. Frecuencia de alteraciones individuales en pacientes “otros B” pediátricos con riesgo clínico estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria $<5 \times 10^4$ células/ $\mu$ l) y alto ( $\geq 10$ años con o sin cuenta leucocitaria $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu$ l). PEG+ (perfil de expresión génica positivo)	68
Figura 16. Frecuencia de combinaciones de alteraciones en pacientes “otros B” con riesgo clínico estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria $<5 \times 10^4$ células/ $\mu$ l) y alto ( $\geq 10$ años con o sin cuenta leucocitaria $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu$ l)	68
Figura 17. Estrategias propuestas para la identificación del subtipo Ph-like	74
Figura 18. Propuesta de algoritmo para la clasificación de pacientes con leucemia linfoblástica aguda del subtipo Philadelphia-like	77

Cuadro1. Distribución de pacientes afectados con leucemia captados por el seguro popular en el periodo 2007-2010	15
Cuadro 2. Clasificación morfológica franco-británica americana de la leucemia linfoblástica aguda	16
Cuadro 3. Clasificación inmunológica de la leucemia linfoblástica aguda	17
Cuadro 4. Frecuencia de alteraciones genéticas en pacientes con leucemia linfoblástica aguda del subtipo Ph-like por grupos de edad en niños y adolescentes	37
Cuadro 5. Secuencias de oligonucleótidos para los genes <i>CRLF2</i> , <i>SEMA6A</i> , <i>PON2</i> , <i>IGJ</i> , <i>BMPR1B</i> , <i>TSPNA7</i> y <i>GUSβ</i>	47
Cuadro 6. Secuencia de oligonucleótidos para el estudio de isoformas dominantes negativas de <i>IKZF1</i>	49
Cuadro 7. Frecuencia de alteraciones de <i>CRLF2</i> en pacientes “otros B” clasificados por edad	56
Cuadro 8. Frecuencia de alteraciones de <i>CRLF2</i> en pacientes “otros B” clasificados por cuenta de leucocitos	57
Cuadro 9. Frecuencia de alteraciones de <i>CRLF2</i> en pacientes “otros B” clasificados por riesgo clínico estándar y alto	57
Cuadro 10. Frecuencia de isoformas dominantes negativas de <i>IKZF1</i> en pacientes “otros B” clasificados por edad	59
Cuadro 11. Frecuencia de isoformas dominantes negativas de <i>IKZF1</i> en pacientes “otros B” clasificados por cuenta de leucocitos	59
Cuadro 12. Frecuencia de isoformas dominantes negativas de <i>IKZF1</i> en pacientes “otros B” clasificados por riesgo clínico estándar y alto	60
Cuadro 13. Alteraciones genéticas características del subtipo Ph-like en pacientes “otros B” positivos para la activación de alguna de las vías de señalización ABL, JAK-STAT5 y RAS	64
Cuadro 14. Frecuencia de alteraciones del subtipo Philadelphia-like de pacientes “otros B” clasificados por edad de riesgo estándar y alto	65
Cuadro 15. Frecuencia de alteraciones del subtipo Philadelphia-like de pacientes “otros B” clasificados por cuenta leucocitaria con riesgo estándar y alto	66
Cuadro 16. Frecuencia de alteraciones del subtipo Ph-like en pacientes “otros B” con riesgo clínico estándar y alto	67

## Abreviaturas

<b>LLA</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda
<b>LLA-B</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda de células B
<b>LLA pre-B</b>	Leucemia Linfoblástica Aguda de células precursoras B
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>MO</b>	Medula Ósea
<b>FAB</b>	Franco Británica Americana
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>FISH</b>	“Fluorescence in Situ Hybridization” (Hibridación Fluorescente <i>in situ</i> )
<b>DNA</b>	“Deoxyribonucleic Acid” (Ácido desoxirribonucleico)
<b>TKI</b>	“Tyrosine Kinase Inhibitor” (Inhibidores de tirosina cinasa)
<b>CCEG</b>	“Childhood Cancer Epidemiology Group” (Grupo de epidemiología de cáncer infantil)
<b>NCI</b>	“National Cancer Institute” (Instituto Nacional de Cáncer)
<b>PCR</b>	“Polymerase Chain Reaction” (Reacción en cadena de la polimerasa)
<b>LCM</b>	Leucemia Mieloide Crónica
<b>SLE</b>	Supervivencia Libre de Enfermedad
<b>COG</b>	“Childhood Oncology Group” (Grupo de oncología infantil)
<b>TARGET</b>	“Therapeutically Applicable Research to Generate Effective Treatments” (Investigación Terapéutica Aplicada para Generar Tratamientos Efectivos)
<b>NIH</b>	“National Institute of Health” (Instituto Nacional de la Salud)
<b>LDA</b>	“Low Density Array” (Micro arreglo de Baja Densidad)
<b>ERM</b>	Enfermedad Mínima Residual
<b>RNA</b>	“Ribonucleic Acid” (Ácido Ribonucleico)
<b>cDNA</b>	Cadena complementaria de DNA

<b>dNTP's</b>	Desoxinucleótidos
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
<b>PB</b>	Pares de Bases
<b>PEG</b>	Perfil de Expresión Génica
<b>IDN</b>	Isoforma Dominante Negativa

## Resumen

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una enfermedad oncohematológica que representa cerca del 52% del total de casos de cáncer en pacientes pediátricos en México. La LLA de células B (LLA-B) es la más común y puede ser clasificada genéticamente mediante fusiones génicas recurrentes; sin embargo, existe un grupo de pacientes nombrados "otros B" que carecen de estas alteraciones. Recientemente se identificó un nuevo subgrupo nombrado Philadelphia-like (Ph-like), que se caracteriza por presentar un perfil de expresión génica similar al grupo *BCR-ABL1* o Philadelphia positivo, pero sin tener la fusión génica. La frecuencia de este subtipo incrementa conforme a la edad y se asocia con características clínicas de mal pronóstico. Este subtipo Ph-like se caracteriza por alteraciones en receptores de cinasas que causan la activación de las vías ABL, JAK-JAK-STAT5 y RAS, las alteraciones más frecuentes involucran al gen *CRLF2* y es común que se acompañen con deleciones en el gen *IKZF1*. En México se desconoce la frecuencia de la LLA-B subtipo Ph-like, lo cual es relevante debido a que este subtipo está asociado con un mal pronóstico, además de ser susceptible a tratamiento blanco específico con inhibidores de cinasas. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue clasificar pacientes pediátricos con LLA pre-B en grupos de riesgo y determinar su posible pertenencia al subtipo de LLA Ph-like.

Se captaron pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA, negativos a fusiones génicas recurrentes que tuvieran expediente con datos clínicos completos y con análisis de alteraciones genéticas del subtipo Ph-like completo (perfil de expresión génica, alteraciones del gen *CRLF2* (sobre expresión, fusión *P2RY8-CRLF2*, translocación *IGH-CRLF2*) presencia de isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1*); se completó el análisis del perfil de expresión génica en los pacientes pendientes de este estudio, además se consideró a los pacientes con análisis bioquímico de activación de las vías de señalización de JAK-JAK-STAT5, ABL1 y RAS. Este estudio fue de tipo ambispectivo para el cual se construyó una base de datos con las características clínicas, genética y bioquímicas de los pacientes con LLA-B. Se formaron grupos de

riesgo clínico de acuerdo a la edad y la cuenta leucocitaria y se determinaron las frecuencias de cada uno de los parámetros genéticos y bioquímicos, así como la asignación de pacientes probables a pertenecer al subtipo Ph-like mediante diferentes combinaciones de alteraciones características del subtipo.

Se obtuvo un total de 55 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, el 40% se clasificó dentro del riesgo estándar y el 60% con riesgo alto. Los parámetros genéticos y bioquímicos, se presentaron en el grupo de riesgo estándar de la siguiente manera, el 73% fueron positivos para el perfil de expresión génica, 59% contó con alteraciones en el gen *CRLF2*, el 82% mostró isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1* y el 64% presentó alguna vía de señalización activa. En cuanto a la presencia de alteraciones dentro de los grupos clasificados, en el grupo de riesgo alto el 64% de los pacientes fueron positivos al perfil de expresión, 58% tuvieron alguna alteración en *CRLF2*, 88% contó con isoformas dominantes negativas de *IKZF1* y 67% presentaron alguna vía de señalización activa. Se encontró que el 35% del total de los pacientes pertenecen al subtipo Ph-like por la presencia de la translocación *IGH-CRLF2* o por la activación de alguna de las vías de señalización JAK-JAK-STAT5, ABL1 o RAS, de los cuales, el 53% se estratificó dentro del grupo de riesgo alto y el 47% con riesgo estándar. Por otro lado, el 22% de los pacientes fueron considerados fuertes candidatos a pertenecer al subtipo por presentar diferentes combinaciones de alteraciones características, sin embargo, hace falta asegurar su pertenencia con métodos validados que confirmen el subtipo, el 42% de estos pacientes se estratificó dentro del grupo de riesgo alto y el 58% con riesgo estándar. En conclusión, nuestro estudio demuestra que la presencia de alteraciones características del subtipo Ph-like se encuentran en ambos grupos de riesgo clínico estudiados, lo cual refleja que el riesgo clínico no determina una mayor frecuencia de alteraciones genéticas y bioquímicas características del subtipo Ph-like.

## **Introducción**

### **1.1. Cáncer**

El término cáncer es utilizado para definir diferentes enfermedades en las que se producen células anormales con proliferación descontrolada y capacidad de invadir tejidos cercanos, migrando a través de los sistemas sanguíneos y linfáticos (1). Un cáncer es el resultado de dos procesos sucesivos, el aumento de la proliferación de un grupo de células denominado tumor o neoplasia, seguido de la adquisición de la capacidad invasiva de dichas células que les permite escapar de su sitio inicial en el organismo para colonizar y proliferar en otros tejidos u órganos, por medio del proceso conocido como metástasis (2).

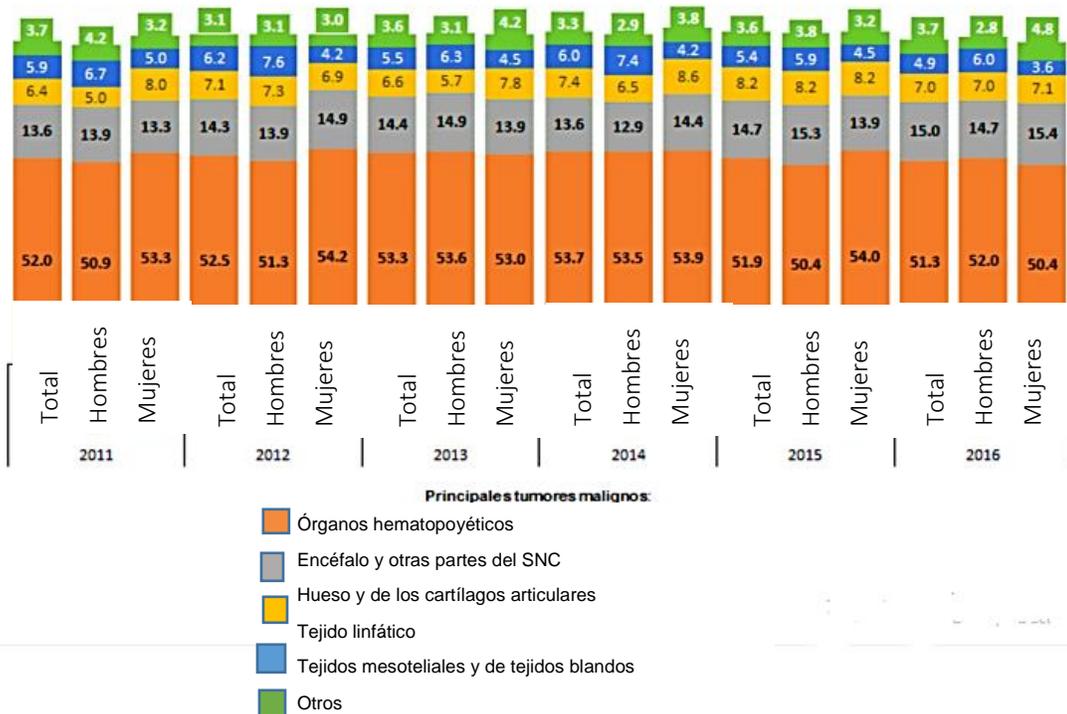
### **Incidencia de cáncer a nivel mundial**

La incidencia de cáncer durante el año 2018 se estimó en 18.1 millones de nuevos casos en 185 países del mundo, con 9.6 millones de muertes registradas por neoplasia durante este mismo año (3).

La agencia internacional para la investigación sobre el cáncer (IARC por sus siglas en inglés) indicó en el año 2016, que la incidencia de cáncer en la infancia a nivel global es significativamente mayor a la previamente reportada. Este reporte envuelve a más de 100 tipos de cáncer registrados en 68 países que refieren un rango de incidencia anual de 50-200 por millón de niños (0-14 años) y entre 90-300 por millón de adolescentes. El número de muertes estimadas por cáncer infantil es de 80 mil al año (4).

### **Cáncer pediátrico en México**

El cáncer en la infancia representa una de las principales causas de mortalidad en nuestro país, ocupando el segundo lugar entre las causas de muerte en el grupo con rango de edad de entre 5 a 14 años. Aproximadamente el 50% de las muertes observadas por tumores malignos en la población de 0 a 17 años fueron causadas por cáncer de órganos hematopoyéticos (conformado entre otros por la leucemia) durante el periodo de 2011 a 2016 (Figura 1) (5).



**Figura 1. Muertes registradas para los principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años.** Serie anual del periodo de tiempo del año 2011 al 2016 reportado por INEGI en el 2018. SNC, sistema nervioso central (Tomado de INEGI, 2018).

En un estudio realizado por Pérez R. y colaboradores en 2012, se analizaron 3821 casos de cáncer pediátrico reportados por 47 hospitales de diferentes estados del país afiliados al seguro popular durante el periodo de 2006 a 2009, se encontró que los niños afectados por cáncer de acuerdo a la edad de presentación se distribuyó dentro de una edad menor a un año en 6.2% de los pacientes, de uno a cuatro años en 35.1%, de cinco a nueve años en 26.5%, de diez a 14 años 22.3%, y 15 a 19 años 9.9%. La distribución de acuerdo al tipo de cáncer, la leucemia linfoblástica aguda afectó al 46.4% de los pacientes, la leucemia mieloide aguda al 7.4%, el linfoma de Hodgkin al 6.6%, el linfoma no-Hodgkin al 4.7%, los tumores óseos al 5.7%, los tumores del sistema nervioso central (SNC) al 8.2%, los tumores renales al 4.3% y el de retinoblastoma al 4.1%. La tasa de supervivencia a 36 meses para cada tipo de cáncer fue del 74.5% en linfoma de Hodgkin, seguido por el retinoblastoma con 59.2%, los

tumores renales con 58.4%, la leucemia linfoblástica aguda con 50%, el linfoma no Hodgkin con 40.1%, los tumores óseos con 33.4%, los tumores de SNC con 32.8%, la leucemia mieloide aguda con 30.5% y otros tumores sólidos con un 52.6% (6).

### **1.1 Leucemia Linfoblástica Aguda**

El término de leucemia comprende a una serie de neoplasias hematológicas originadas en las células formadoras de la sangre, esto ocurre cuando las células maduras o inmaduras se multiplican de forma descontrolada en la medula ósea. Las leucemias se clasifican como linfoides o mieloides, de acuerdo al tipo celular afectado. Se conocen como leucemias agudas aquellas que se caracterizan por tener una progresión significativamente rápida y con una predominancia de células inmaduras (blastos), las denominadas como leucemias crónicas presentan una progresión lenta y las células maduras son predominantes (7). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se define como una enfermedad maligna que surge de varias alteraciones genéticas cooperativas en un solo progenitor linfóide de células B o T, lo que conduce a alteraciones en la proliferación, supervivencia y maduración de células blásticas, y eventualmente conlleva a la acumulación de células leucémicas (8).

#### **Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda**

La incidencia de la LLA varía de acuerdo a la población y zona geográfica, a nivel mundial, las tasas más altas están reportadas para Italia, Suiza, Costa Rica, y Estados Unidos, en este último se estiman cerca de 4,000 diagnósticos de LLA anualmente y dos tercios corresponde a niños y adolescentes, por otro lado, las cifras más bajas se presentan en Asia y África. Con respecto al género y la edad, la frecuencia es ligeramente mayor en hombres y el pico de incidencia mayor se produce entre los dos y cinco años, con un pico más bajo después de los 50 años (9,10).

En México, Rivera y colaboradores encontraron 4500 casos de leucemias dentro de 8936 pacientes estudiados de 0-18 años de edad en un periodo comprendido de 2007 al 2010, en donde la LLA presentó la mayor incidencia dentro de este grupo, estas cifras se observan en el Cuadro 1 (11).

**Cuadro 1. Distribución de pacientes afectados con leucemia captados por el seguro popular en el periodo 2007-2010.**

<b>Tipo de enfermedad</b>	<b>Frecuencia; (%)</b>
<b>Leucemia Linfoblástica Aguda</b>	<b>3748 (83)</b>
<b>Leucemia Mieloide Aguda</b>	<b>645 (14.3)</b>
<b>Leucemia Mieloide Crónica</b>	<b>77 (1.7)</b>
<b>Síndromes Mielodisplásicos</b>	<b>45 (1)</b>
<b>Total</b>	<b>4515</b>

Tomado de Rivera-Luna, et. al., 2013

### **1.2.1 Diagnóstico y manifestaciones clínicas de la leucemia linfoblástica aguda**

A diferencia de las neoplasias solidas derivadas de precursores linfoides nombrados linfomas, en las leucemias se presenta infiltración a medula ósea (MO) como primer evento de la enfermedad, siendo necesario para la confirmación diagnóstica un mínimo de 20% de blastos leucémicos presentes en MO (12). Dentro de las manifestaciones clínicas más comunes de las leucemias agudas en niños se encuentran, aumento de temperatura o fiebre (causada por la leucemia o por infecciones graves secundarias a la presencia de neutropenia), fatiga, anemia, hemorragias, dolor óseo o articular, en la exploración física se pueden encontrar petequias y esquimosis. En los cuadros clínicos más graves se observa disnea, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatías,

infiltración al mediastino y al testículo, las cuales son reflejo de la disfunción medular y de infiltración blástica en órganos y tejidos extramedulares (13).

### **Clasificación de la leucemia linfoblástica aguda**

La LLA es clasificada clínicamente considerando diversos parámetros en los que se incluyen datos morfológicos, cito químicos, inmunohistoquímicos y genéticos de las células leucémicas.

### **Clasificación morfológica**

La clasificación franco-británica americana (FAB, por sus siglas en inglés), fue la primera clasificación con base en la morfología celular, la cual consiste en una tinción de hematoxilina-eosina, analizada mediante microscopia convencional para la identificación de las células leucémicas, clasificándolas dentro de la nomenclatura L1, L2 y L3, de acuerdo al tamaño celular, citoplasma, nucléolos, vacuolación y basofilia (Cuadro 2) (14). Sin embargo, en la actualidad los criterios morfológicos se consideran poco útiles en la clínica y de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) el mejor principio para la clasificación está basado en una combinación de características morfológicas, inmunofenotípicas, genéticas, clínicas y moleculares (15).

**Cuadro 2. Clasificación morfológica franco-británica americana de la leucemia linfoblástica aguda.**

<b>Característica</b>	<b>L1</b>	<b>L2</b>	<b>L3</b>
<b>Tamaño celular</b>	Pequeño	Grande	Grande
<b>Cromatina nuclear</b>	Fina	Fina	Fina
<b>Forma del núcleo</b>	Regular, puede tener hendiduras	Irregular, puede tener hendiduras	Regular, oval o redondo
<b>Nucléolo</b>	Indistinguible	Grande, prominente	Grande, prominente
<b>Citoplasma</b>	Escaso	Abundante	Abundante

Modificado de Bennett, et. al., 1976

## Clasificación inmunológica

El inmunofenotipo es un estudio indispensable para la clasificación de la leucemia, con el cual se identifica el origen de la población clonal de las células neoplásicas. Para esto se emplean paneles de anticuerpos que mediante citometría de flujo, permiten identificar múltiples marcadores celulares tanto de superficie como intracelulares, mismos que indican la estirpe celular y las etapas de maduración de las clonas leucémicas presentes (Cuadro 3) (16). De acuerdo con lo anterior, la LLA se clasifica principalmente en precursores de células B (pre-B), de células B maduras (B) y de células T maduras (T). A su vez, el subtipo pre-B se clasifica en pro-B, pre-B temprana y pre-B. Esta clasificación es utilizada para establecer un pronóstico clínico. Las leucemias de linajes T y B maduras son clasificadas como de mal pronóstico y alto riesgo a recaída, por otro lado, las leucemias pre-B temprana y pre-B, además de ser las más frecuentes (aproximadamente 80% de los casos), están asociadas con un riesgo estándar, bajo riesgo de recaída y buena respuesta al tratamiento. Dentro del presente trabajo se abordará de manera específica a la LLA de células pre-B (17).

**Cuadro 3. Clasificación inmunológica de la leucemia linfoblástica aguda**

Subtipo	Marcadores	Frecuencia (%)
<b>Precursores B</b>	CD19+, CD22+, CD79a+, clg±, slgμ+, HLA-DR+	
<b>Pro-B</b>	CD10-	5
<b>Pre-B temprana</b>	CD10+	63
<b>Pre-B</b>	CD10±, elg +	16
<b>B madura</b>	CD19+, CD22+, CD79a+, clg±, slgμ+, slgK+	3
<b>Linaje T</b>	CD7+, cCD3+	
<b>Células T</b>	CD2+, CD1±, CD4±, CD8±, TdT±, HLA-DR-	10
<b>Pre T</b>	CD2-, CD1-, CD4-, CD8-, TdT+, HLA-DR±	1
<b>Pre-T temprana</b>	CD1-, CD8, CD5, CD13+, CD33+, CD11b+, CD117+, CD65+, HLA-DR+	2

Modificado de First, 1986

### 1.2.2 Clasificación genética de la leucemia linfoblástica aguda pre-B

El estudio de alteraciones genéticas en la LLA juega un papel importante, Con estas alteraciones se pueden clasificar diferentes subtipos de esta neoplasia, y de acuerdo a la modificación puede darse un diagnóstico e inclusive una clasificación de riesgo bajo criterios genéticos y moleculares independiente de otras variables clínicas. Aproximadamente el 75% de los casos de LLA pediátrica presentan alteraciones cromosómicas detectadas por cariotipo, técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) o por técnicas moleculares. Dentro de las alteraciones genéticas de la LLA-B pediátrica se encuentran la pérdida o ganancia de cromosomas, translocaciones cromosómicas, inserciones o deleciones, mutaciones puntuales y variaciones en el número de copias de DNA (18).

#### Alteraciones numéricas

- ❖ **Hiperdiploidía:** Se entiende por hiperdiploidía a la presencia de células leucémicas con un cariotipo supernumerario mayor a 46 cromosomas, la alta hiperdiploidía está definida por la presencia de 51 a 65 cromosomas (19). Históricamente este cariotipo hiperdiploide se detecta entre el 23 al 42% de las leucemias linfoblásticas pediátricas recién diagnosticadas y en un 30% en la LLA de células precursoras B (20-22), caracterizado por la presencia de trisomías múltiples, mediante la ganancia usualmente de copias extras de los cromosomas X, 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18 y dos copias extra del cromosoma 21. La presencia de hiperdiploidía es considerado como de buen pronóstico en cuanto a la clasificación de riesgo en pacientes con LLA-B (23, 24).
  
- ❖ **Hipodiploidía:** Se entiende por hipodiploidía a la presencia de menos de 46 cromosomas en las células leucémicas, esta alteración se encuentra en pacientes con LLA con una frecuencia baja del 6% (25) y se considera con un pronóstico desfavorable en cuanto a la clasificación de riesgo (26,27). De manera más específica el peor pronóstico es atribuido a pacientes pediátricos con una cuenta cromosómica de entre 23 a 29 cromosomas (28,29).

## Alteraciones estructurales

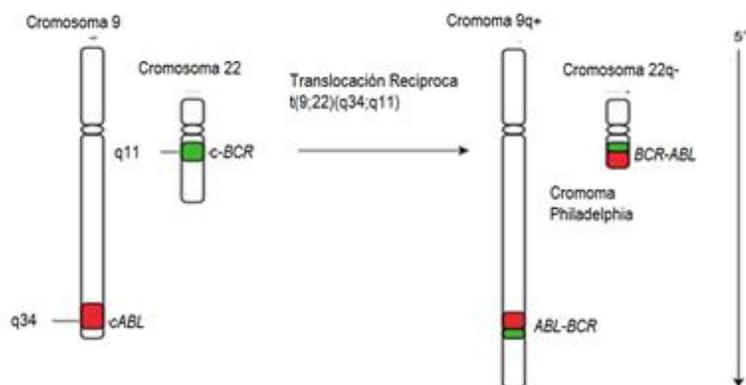
Dentro de las alteraciones cromosómicas estructurales, se incluyen diversas anomalías como las translocaciones, deleciones, duplicaciones, inversiones e isocromosomas, siendo las translocaciones las de mayor frecuencia, detectándose en un 60% de los casos de LLA-B, en este tipo de alteraciones se da un intercambio de material genético entre cromosomas no homólogos (30). A continuación, se describen brevemente las diferentes translocaciones cromosómicas recurrentes en la LLA-B.

- ❖ **ETV6-RUNX1.** La fusión génica *ETV6-RUNX1*, también designada como *TEL-AML1*, resulta en un factor de transcripción quimérico producto de la translocación cromosómica t(12;21) (p13.1;q22). Se cree que esta alteración es inducida por la demanda de DNA generada por señales apoptóticas. Es la anomalía genética más común en la LLA-B pediátrica, con una prevalencia de aproximadamente 25% de los casos (31). Se piensa que *ETV6-RUNX1* surge en la fase prenatal y puede estar precedida por una fase pre-leucémica. Se ha referido que la expresión de *ETV6-RUNX1* en células progenitoras de cordón umbilical causa el desarrollo de una población pre-leucémica por medio de una ventaja de crecimiento en presencia del factor de crecimiento transformante-β. Dentro de la transformación leucémica se presenta comúnmente la eliminación del gen *ETV6* que no participa en la translocación (32). Estudios *in vitro* en células de pacientes con LLA-B positivos para *ETV6-RUNX1* demostraron que estas células tienen un incremento en la sensibilidad a los fármacos anti-leucémicos como L-asparaginasa, doxorubicina y dexametasona comparado con otros subtipos de células leucémicas, por lo que desde su identificación en 1995 (33), la presencia de *ETV6-RUNX1* tiene un pronóstico favorable de forma independiente (34).
  
- ❖ **TCF3-PBX1.** La translocación t(1;19)(q23;13) se presenta en aproximadamente 5% de los casos con LLA-B, identificada por primera vez en 1984 (35) en esta fusión participan el gen *TCF3* situado en el cromosoma 19 (previamente

nombrado como *E2A*) con el gen *PBX1* en el cromosoma 1. *TCF3* codifica a las proteínas E12 y E47 las cuales son factores básicos de transcripción para que se lleve a cabo la maduración de células B, mientras que el gen *PBX1* se encuentra expresado en todos los tejidos, pero nunca en linfocitos B y T (36). Dicha translocación da como resultado la fusión *TCF3-PBX1*, la cual codifica a una proteína con propiedades transformantes. Esta translocación se ha clasificado con un pronóstico adverso en población pediátrica (37,38), sin embargo, se ha encontrado una buena respuesta con tratamiento convencional basado en terapia con anti metabolitos, pero se ha informado que este tratamiento puede conferir ventajas de supervivencia de las células leucémicas (39,40).

- ❖ ***BCR-ABL1***. Otra de las alteraciones presentes en LLA-B es el denominado cromosoma Philadelphia (Ph), el cual fue descubierto por Nowell y Hungerford en 1960 a través de técnicas de bandeo cromosómico (41). Esta translocación se produce cuando un fragmento del gen *ABL1* ubicado en el cromosoma 9 se inserta en el gen *BCR* situado en el cromosoma 22, involucrando a las regiones q34 y q11 respectivamente, dando como resultado la translocación *BCR-ABL1*. Esta alteración da origen a un punto de ruptura menor o m-bcr, en el exón e1 y e2 del gen *BCR* y en el exón a1 y a2 del gen *ABL1* (Figura 2) (42,43). El resultado es la producción de una proteína de fusión tirosina cinasa con actividad elevada, la cual le confiere propiedades de proliferación celular alta que conducen a la leucemogénesis (44). Esta alteración tiene una prevalencia de entre el 3% y 5% en la LLA pediátrica, es asociada con pronóstico adverso y los pacientes que albergan dicha alteración comúnmente presentan una remisión de corta duración (45,46). Una de las terapias alternativas para esta alteración es el uso de imatinib, fármaco de primera generación el cual actúa como un inhibidor de tirosina cinasa (TKI, por sus siglas en inglés) bloqueando las señales de proliferación y crecimiento de las células cancerígenas, junto con intensiva quimioterapia se ha reportado con una buena respuesta, sin embargo se han encontrado pacientes que crean una resistencia a este fármaco, debido probablemente a la sobre

expresión de la proteína o por mutaciones en el dominio cinasa, por lo cual otra alternativa de tratamiento es la implementación de dasatinib, tratamiento de segunda generación, el cual une los restos activos e inactivos de la proteína *BCR-ABL1* lo que le confiere una mayor especificidad contra la inactivación de la cinasa mutada (47, 48).



**Figura 2. Translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el cromosoma 22.** La  $t(9;22)(q34;q11)$  da como resultado al cromosoma conocido como Philadelphia (Modificado de Fentie, et. al., 2017).

- ❖ **Re arreglos en el gen *MLL*:** La LLA en la infancia tiene varias características clínicas distintivas en comparación con la LLA presente en la niñez, que incluyen hiperleucocitosis, hepatoesplenomegalia, enfermedades en SNC y una alta frecuencia de reordenación molecular del gen *MLL* en la banda cromosómica 11q23. Dicha alteración se presenta en 80% de la LLA-B durante la infancia y en un 10% de LLA-B durante la niñez. El gen *MLL* codifica a proteínas con actividad metiltransferasa, la cual es esencial para la expresión de genes como *HOXA* y *MEIS1* que contribuyen en la regulación hematopoyética. Dentro de los re arreglos más comunes que involucran a *MLL* se encuentran las translocaciones *MLL-AFF1*(AF4)  $t(4;11)(q21;q23)$ , *MLL-MLLT3*(AF9) situada en  $t(9;11)(p22;q23)$  y *MLL-ENL* en  $t(11;19)(q23;p13.3)$ , donde cerca del 50% de los casos con alteraciones en *MLL* albergan a la translocación  $t(4;11)(q21;q23)$  (49,50). De manera general los re arreglos que involucran a este gen se asocian con un

pronóstico adverso, donde se atribuye a la recaída y a una resistencia a fármacos (51, 52).

### **1.2.3 Clasificación de riesgo en leucemia linfoblástica aguda de células B**

El grupo de estudio de cáncer en niños (CCEG, por sus siglas en inglés) comenzó sus primeros estudios de tratamiento para la LLA en 1956. En 1971, durante los primeros análisis de los resultados obtenidos de los ensayos clínicos con una cohorte de 4896 pacientes con remisión completa (se refiere la desaparición de todos los signos de cáncer debido al tratamiento), los cuales tuvieron un seguimiento a 12 años a partir del diagnóstico, se hizo evidente que el resultado de la terapia, solo se podían demostrar estratificando a los pacientes según su edad al momento del diagnóstico con o sin el recuento leucocitario, esta clasificación pudo demostrar una mayor influencia de estas características para un valor pronostico al compararlos con los resultados de los regímenes de tratamiento, donde se encontró que los pacientes con una cuenta  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  tenían una supervivencia a 12 años mayor que los pacientes con una cuenta  $>1 \times 10^5$  células/ $\mu\text{L}$ , en cuanto a la edad se encontró que los pacientes con una edad  $<1$  año tenían una tasa de supervivencia pobre (20%), los niños con una edad 1-10 años su supervivencia era del 60% aproximadamente y en los pacientes con edad  $>10$  años su supervivencia era del 40%, con estos resultados se pudo definir a estas características clínicas como de gran importancia para proporcionar una apropiada terapia para los pacientes, donde los pacientes con alto riesgo debían de recibir terapias más agresivas en comparación con los pacientes con una supervivencia mayor, los cuales se clasificaron con riesgo bajo (53).

Actualmente, el mejor abordaje para el tratamiento de la LLA está basado en una clasificación que evalúa el riesgo de que un paciente recaiga en alguna etapa del tratamiento, además de que permite regular la intensidad del tratamiento. Esta clasificación considera características clínicas del paciente como son la edad al momento de inicio de la enfermedad, la cuenta de leucocitos circulantes en sangre periférica, el inmunofenotipo de blastos y de manera independiente la presencia de

alteraciones genéticas o moleculares (54). Con base en lo anterior y de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos (NCI, por sus siglas en inglés), los parámetros para clasificar a los pacientes dentro de un grupo de riesgo estándar a recaer son: edad entre 1-9 años y cuenta leucocitaria  $\leq 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  al diagnóstico, además de la presencia de alteraciones genéticas como *ETV-RUNX1* o hiperdiploidía e inmunofenotipo pre-B (55). Por otro lado, los pacientes que tienen edad de hasta 1 año o  $\geq 10$  años, cuenta leucocitaria  $> 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  e inmunofenotipo de células B maduras y bifenotípicas, con alteraciones genéticas como la fusión génica *BCR-ABL1*, arreglos en el gen *MLL* e hipodiploidía son considerados con mal pronóstico y riesgo alto (56).

### 1.3 LLA-B del subtipo *BCR-ABL1* o Philadelphia positivo

Como se mencionó anteriormente, la translocación *BCR-ABL1* o Philadelphia positivo se ha descrito con un pronóstico adverso, además se han reportado diferentes alteraciones con las que se suele acompañar a dicha translocación como la presencia de hiperdiploidía y la pérdida o ganancia de material genético de los cromosomas 1, 7 u 8; alteraciones puede ser identificadas por medio de cariotipo, FISH y PCR (57,58). Mullighan y colaboradores en 2008 (59) realizaron un estudio por medio del análisis de genoma completo de 304 pacientes con LLA incluidos a 43 con la translocación *BCR-ABL1* y 23 casos de leucemia mieloide crónica (LMC), donde se encontró de manera interesante que más del 80% de los pacientes con *BCR-ABL1* albergaban alguna deleción en el *IKZF1*, este gen codifica al factor de transcripción *IKAROS* involucrado en la regulación del desarrollo linfocitario (60), sin embargo no se encontró esta alteración en ningún caso de LMC, este porcentaje se observó de manera similar en un 75% dentro de una cohorte italiana con pacientes adultos, lo que indica una cooperación entre la translocación *BCR-ABL1* y la deleción de *IKZF1* para el desarrollo de la leucemogénesis (61).

### **Un nuevo subtipo de LLA pre-B: similar a *BCR-ABL1* o Philadelphia-like (Ph-like)**

En el 80% de los casos de LLA pediátrica se pueden identificar anomalías genéticas recurrentes por medio de análisis genéticos, cromosómicos y moleculares, donde dichas alteraciones pueden ser asociadas a una clasificación de riesgo. Sin embargo, el 20% de los pacientes restantes que no cuentan con alguna clasificación dependiente de alteraciones genéticas recurrentes son categorizados en el denominado grupo “otros B” (62). Este último grupo, ha sido de gran interés para la investigación actual ya que dentro de los pacientes que lo integran se encuentran algunos que tienen un alto riesgo a recaer. Recientemente se describió un nuevo subtipo dentro del grupo “otros B”, conocido como LLA de células precursoras B del subtipo similar a *BCR-ABL1* o Philadelphia-like (Ph-like).

#### **1.3.1 Descubrimiento del subtipo Ph-like**

En 2009 Den Boer y colaboradores, realizaron su estudio en oncología pediátrica donde se analizaron a 190 pacientes pediátricos diagnosticados con LLA, en este estudio se generó un modelo predictor mediante micro-arreglos de expresión génica, que pudiera clasificar a las alteraciones genéticas más comunes de la LLA (*ETV6-RUNX1*, hiperdiploidía, re arreglos de *TCF3*, *BCR-ABL1*, re arreglos en *MLL* o LLA-T). Los pacientes se agruparon en alguno de los seis subtipos de LLA, sin embargo se encontró a un grupo de 44 pacientes de un total de 154 casos de LLA pre-B que no contaba con alguna de las alteraciones genéticas recurrentes pero que quedaban agrupados en el grupo *BCR-ABL1* positivos debido a la similitud que presentaron en su perfil de expresión génica, dentro de los genes que se encontraron sobre expresados están *TSPAN7*, *SEMA6A*, *ECM1*, *PON2* y *BMPR1*. Además, se encontró que el 82% de estos pacientes tenían una o más deleciones en genes del desarrollo de células B, como el factor de transcripción *IKZF1* (*IKAROS*), *TCF3* (*E2A*), *EBF1*, *PAX5* y el receptor de células pre-B (pre-BCR), la frecuencia de estas alteraciones se presentaron de manera similar en el grupo positivo para *BCR-ABL1*, lo cual puede explicar la similitud

en la firma de expresión génica en ambos grupos, estos pacientes tuvieron un pronóstico adverso con un 59% de supervivencia libre de enfermedad (SLE) a 5 años, comparado con un 84% de los casos de LLA pre-B, y con base en lo anterior a este grupo se le confirió un nuevo subtipo nombrado como similar a *BCR-ABL1* (63).

Otro estudio, llevado a cabo simultáneamente por Harvey y colaboradores en 2010, dentro de grupo de oncología infantil (COG, por sus siglas en inglés) en colaboración con el hospital infantil St. Jude de Norte América, investigaron los perfiles de expresión génica de una cohorte estadounidense de 207 pacientes con diagnóstico de LLA pre-B con riesgo alto con el objetivo de identificar nuevos subgrupos genéticos. Algunos de los criterios tomados en cuenta fueron la presencia de una cuenta leucocitaria  $>5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  al diagnóstico, con rango de edades de entre uno a 20 años, la presencia de infiltración de blastos en SNC o testículo, además de no presentar translocaciones cromosómicas que confieran algún pronóstico, por ejemplo;  $t(12;21)/ETV6-RUNX1$  y  $t(9;22)/BCR-ABL1$  o hiperdiploidía). Los casos se agruparon por el perfil génico, obtenido por medio de un micro-arreglo de expresión de alta densidad, el cual evaluó los juegos de sondas seleccionados por tres diferentes métodos de análisis, además los pacientes fueron clasificados con etnia hispana/latina o con otra etnia. Como resultados, se obtuvo un conjunto de 257 juegos de sondas que agruparon a ocho grupos con un perfil de expresión característico. Un grupo que llamó la atención fue el número ocho que se componía de 24 pacientes de los cuales cerca del 60% eran de origen hispano/latino, este grupo tuvo una SLE a cuatro años del 21% comparado con el 66% de toda la corte, algunos genes que se reportaron con sobre expresión en este grupo de pacientes fueron *GAB1*, *MUC4*, *PON2*, *GPR110*, *SEMA6*, *BMPRI1*, también se encontró que 18 pacientes de este grupo contaban con arreglos en el gen *CRLF2* y deleciones en *IKZF1*, este subtipo fue nombrado por este grupo de investigación como Philadelphia negativo o Ph-like (64).

Los dos perfiles génicos iniciales para identificar a los pacientes Ph-like fueron posteriormente estudiados por Den Boer y colaboradores en 2015, utilizando cohortes de pacientes pediátricos alemanes y estadounidense, donde se reportó que las dos

firmas de expresión génicas solo coincidían en nueve conjuntos de sondas para siete genes (*CCND2*, *SH3BP5*, *ABL1*, *SOCS2*, *DUSP6*, *LST1*, *EGFL7*), además, se reportó que 33 de 146 pacientes de la cohorte europea fueron identificados con la firma de expresión estadounidense, mientras que 43 de 143 pacientes de la cohorte americana se identificaron por la firma de expresión europea, interesantemente todos los pacientes que fueron identificados pertenecían al grupo de riesgo alto de acuerdo a las características clínicas del NCI. Datos anteriores indican la persistente heterogeneidad genética entre poblaciones, además de las diferentes metodologías para desarrollar las firmas génicas, lo que da como resultado la difícil caracterización del subtipo Ph-like por medio de una sola firma génica, por lo cual es conveniente la determinación de una firma génica para cada población, además de la identificación de otras alteraciones genéticas que se han reportado dentro de este subtipo, como son la alteración de genes específicos y el estudio de la activación de vías de señalización involucradas que contribuyan a la identificación de subtipo (65).

La investigación terapéutica aplicada para generar tratamientos efectivos (TARGET, por sus siglas en inglés) es una colaboración entre COG y el instituto nacional de la salud (NIH), la cual desarrollo una tarjeta por medio de un micro-arreglo de expresión génica de baja densidad (LDA en inglés), para la identificación de pacientes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like, este estudio se utilizó en el diagnóstico clínico dentro del laboratorio usando transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR). El conjunto de sondas utilizado incluye a los genes *IGJ*, *SPATS2L*, *MUC4*, *CRLF2*, *CA6*, *NRXN3*, *BMPR1B*, *GPR110*, *CHN2*, *SEMA6A*, *PON2*, *SLC2A5*, *S100Z*, *TP53INP1* e *IFITM*, como resultado se obtuvo un alto grado de sensibilidad y especificidad para predecir a los pacientes pertenecientes al subtipo Ph-like. El COG utilizo recientemente esta tarjeta LDA en un análisis retrospectivo, donde demostró ser un indicador robusto para clasificar a la LLA Ph-like, ya que contiene a las mutaciones genómicas más frecuentes del subtipo. Como resultado de este trabajo el COG ha implementado esta tarjeta en sus ensayos clínicos actuales (66,67).

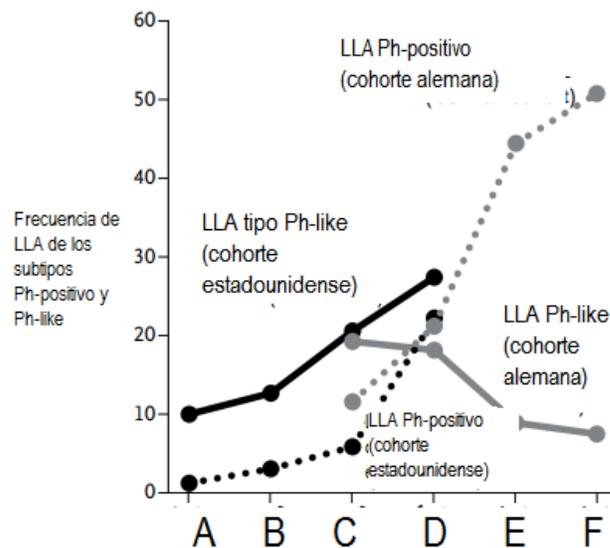
Como se ha mencionado la clasificación de riesgo clínico de acuerdo con el NCI toma características como la edad y la cuenta leucocitaria para determinar la probabilidad de que el paciente recaiga, sin embargo, aun cuando los pacientes presentan características de riesgo estándar, las recaídas se presentan en ambos grupos. Otros estudios que han llevado al mejoramiento y entendimiento de la estratificación de riesgo y no de la clasificación de algún subtipo por medio de análisis genéticos, han reportado alteraciones de algunos genes marcadores de pronóstico, donde algunos de ellos están integrados dentro de las firmas de expresión para la clasificación del subtipo Ph-like, algunos de estos trabajos se describen brevemente a continuación.

En 2008 Hoffman y colaboradores estudiaron a una cohorte de 55 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA pre-B los cuales tuvieron un seguimiento de 12 años, con el objetivo de identificar firmas de expresión génica para correlacionarlos con resultados a largo plazo, independientemente de los subtipos genéticos y proponer una estratificación de riesgo molecular. Como resultado al evaluar los perfiles de expresión se encontró a tres genes (*AZIN*, *GLUL* e *IGJ*) que discriminaban con una buena sensibilidad y especificidad a la estratificación clínica. Donde los genes *AZIN* y *GLUL* se encontraron a la baja e *IGJ* sobre expresado, además se encontró una sobrevida menor en los pacientes que tenían alterados estos genes. Llama la atención la presencia del gen *IGJ* como un posible marcador pronóstico, el cual se reportó dentro de la firma de expresión sugerente del subtipo Ph-like (68). Otro trabajo que ha contribuido al estudio de genes con un valor pronóstico es el realizado por Kang y colaboradores en 2010 en una cohorte de 207 pacientes diagnosticados con LLA pre-B y clasificados con riesgo alto del COG por medio de un micro-arreglo de alta densidad, con el objetivo de encontrar perfiles de expresión génica para mejorar la estratificación de riesgo, así como la predicción de los eventos de sobrevida en los pacientes. Dentro de los resultados se reportaron a 38 genes, los cuales tuvieron una mayor asociación a la supervivencia libre de recaída (periodo de 4 a 5 años sin la detección de células leucémicas después del tratamiento), donde los pacientes que tuvieron la sobrevida más pobre (29%), tenían a los genes sobre expresados *BMPR1B*, *CTGF*, *TTYH2*, *IGJ*,

*PON2*, *CD73*, *CDC42EP3*, *TSPAN7* y *SEMA6A* (69). Algunos de estos genes fueron reportados por Den Boer y Harvey dentro de la firma de expresión que clasificaba al subtipo Ph-like, lo cual sugiere la relación entre la presencia de estos genes y baja supervivencia que se encontró en estos pacientes.

### 1.3.2 Incidencia del subtipo Ph-like

En 2016 dentro de la sesión de revisión de clasificación de leucemias, la OMS reconoció e incorporó dentro de la LLA pre-B al subtipo similar a *BCR-ABL1* o Philadelphia like (Ph-like), esto reafirma la importancia clínica de este subtipo (70), el cual ha sido estudiado previamente por diferentes grupos de investigación en cohortes con diversos rangos de edad, se refiere que comprende un 10% de los niños con LLA-B con riesgo estándar (edad <10 años o cuenta de leucocitos <5x10<sup>4</sup> células/μL al diagnóstico) y 15% en niños con alto riesgo (edad ≥10 años o cuenta leucocitaria ≥5x10<sup>4</sup> células/μL). Esta frecuencia aumenta de acuerdo con la edad; se presenta en un 21% de los pacientes adolescentes (16-20 años) en el 27% de adultos jóvenes (21-39 años) y en 20% de los pacientes adultos (40-79 años) (Figura 3) (71-74).



**Figura 3. Incidencia de leucemia linfoblástica aguda del subtipo Ph-positivo y Ph-like, de acuerdo a la edad.** Proporción de pacientes generados dentro de cohorte alemana reportado por Den Boer *et. al.* y una cohorte estadounidense estudiados por Roberts *et. al.* A) Niños jóvenes entre 1 a 9 años, B) Niños mayores de entre 10 a 15 años, C) Adolescentes de entre 16 a 20 años, D) Adultos jóvenes de 21 a 39 años, E) Adultos de 40 a 55 años y F) Adultos mayores de 56 a 84 años (Modificado de Herold, *et. al.*, 2014).

### 1.3.3 Alteraciones genéticas del subtipo Ph-like

A diferencia del subtipo Ph positivo y otros subtipos de LLA clasificados e identificados mediante translocaciones cromosómicas o fusiones génicas específicas, la LLA de tipo Ph-like resulta ser sumamente heterogénea, al momento de ser definida por medio de diversas alteraciones genéticas presentes, sin embargo presentan en común la activación de cinasas por la presencia de alteraciones en genes de receptores de citocinas, la complejidad de este subtipo ha llevado a diferentes grupos de investigación al estudio detallado de este subtipo para lograr una identificación más específica y poder proponer terapias blanco, algunos de los parámetros para su clasificación son descritos a continuación (75).

### 1.4.4 Genes sobre expresados

Como anteriormente se ha mencionado las firmas de expresión génica juegan un papel sumamente importante dentro de la caracterización del subtipo Ph-like, estas presentan la sobre expresión de diferentes genes, que comparten los subtipos Ph positivo y Ph-like, algunos de ellos son descritos a continuación:

- **CRLF2.** El factor 2 similar al receptor de citocinas es una proteína codificada por el gen *CRLF2*. Esta proteína forma un complejo funcional con el receptor de IL-7 para dar lugar al receptor de linfopoyetina estromal tímica (TSLP), capaz de estimular la proliferación celular a través de la activación de las rutas STAT3, JAK-STAT5 y JAK2 y está implicado en el desarrollo del sistema hematopoyético.
- **SEMA6A.** Semaforina-6A es una proteína que está codificada por el gen *SEMA6A*. La expresión del gen *SEMA6A* en las células melanocíticas puede estar regulada por el factor de transcripción de leucina *MITF*, el cual está implicado en la regulación de la vía de linaje específico de muchos tipos celulares, entre los que están incluidos los melanocitos, los osteoclastos y los

mastocitos. *SEMA6A* puede estar involucrado en el cableado de las cascadas de señalización que se requieren específicamente para la supervivencia y la función fisiológica de sus precursores celulares normales (77).

- ***BMPR1B***. Las proteínas morfogénicas óseas (BMP) controlan múltiples procesos celulares en embriones y tejidos adultos. *BMPR1B* es un gen localizado en el cromosoma 4q22.3 que codifica un miembro de la familia del receptor transmembranal de la proteína morfogénica ósea (BMP) de serina / treonina cinasa. Los ligandos de este receptor son las BMP, que son miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ . Las BMP están involucradas en la embriogénesis. Estas proteínas traducen sus señales a través de la formación de complejos de heterodímeros de dos tipos diferentes de receptores, los de tipo I de aproximadamente 50-55 kD y receptores tipo II de aproximadamente 70-80 kD. Los receptores de tipo II se unen a los ligandos en ausencia de receptores de tipo I, pero requieren sus respectivos receptores de tipo I para la señalización, mientras que los receptores de tipo I requieren sus respectivos receptores de tipo II para la unión del ligando (78).
- ***TSPAN7***. El gen *TM4SF2* en Xp11.4 codifica a tetraspanina 7 (*TSPAN7*), miembro de la superfamilia de proteínas de membrana tetraspaninas, conservadas evolutivamente y se asocian dinámicamente con numerosas proteínas asociadas en micro dominios enriquecidos con tetraspanina (TEM) de la membrana plasmática. Las tetraspaninas mediante la transducción de señales juega un papel importante en eventos de desarrollo, activación, crecimiento y motilidad celular. Las mutaciones en tetraspaninas que conducen a la pérdida del fenotipo y de función son relativamente raras, probablemente porque muchas tetraspaninas se superponen funcionalmente. No obstante, tetraspaninas específicas desempeñan papeles críticos en los ovocitos durante la fertilización, durante la formación de sinapsis neuromuscular, activación de linfocitos T y B, degeneración de la retina y función cerebral (79).

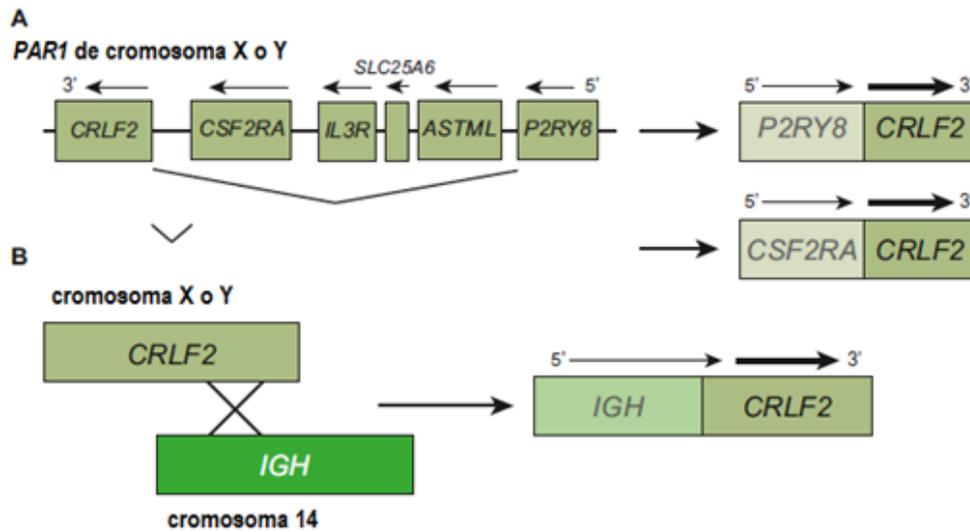
- **IGJ.** La cadena J es un componente proteico de los anticuerpos IgM e IgA codificado por el gen *IGJ* situado en el cromosoma 4q13.3. La cadena J es una proteína que es sintetizada en linfocitos B y cumple con dos funciones principales, vincular a monómeros de inmunoglobulina (pentámera de IgM y dímera de IgA) y unir a estas inmunoglobulinas al componente secretor. Análisis de transferencia indican que en el genoma humano contiene dos secuencias relacionadas con la cadena J, un gen funcional y otra secuencia que hibrida con algunas sondas de la cadena J (80).
- **PON2.** La paraoxonasa / ariesterasa 2 en suero es una enzima codificada por el gen *PON2* localizado en el cromosoma 7q21.3. Este gen es miembro de la familia de las paraoxonasas, que incluye tres miembros conocidos ubicados adyacentes entre sí en el brazo largo del cromosoma 7. La proteína codificada se expresa en tejidos humanos, unidos a la membrana, y puede actuar como un antioxidante celular, protegiendo las células del estrés oxidativo. La actividad hidrolítica contra lactonas de acilhomoserina, importantes mediadores de detección bacteriana, sugiere que la proteína codificada también puede desempeñar un papel en las respuestas de defensa a bacterias patógenas. Las mutaciones en este gen se pueden asociar con enfermedad vascular y una serie de fenotipos relacionados con la diabetes. Alternativamente, se han descrito variantes de transcritos que codifican diferentes isoformas (81).

#### 1.4.5 Alteraciones en el gen *CRLF2*

Una de las alteraciones con valor pronóstico asociada a la LLA del subtipo Ph-like es la que involucra al gen *CRLF2*, el cual se ha reportado con sobre expresión en cerca del 50% de los casos Ph-like, derivada de alteraciones en el gen *CRLF2*, estas alteraciones se han descrito como de mal pronóstico. Durante la hematopoyesis, las citocinas y sus receptores juegan un papel importante en la supervivencia, proliferación y diferenciación

celular. Estos receptores carecen de una actividad catalítica por lo cual dependen de la actividad de tirosina cinasa de la familia Janus de tirosina cinasa. *CRLF2* es un gen que codifica a un miembro de la familia de receptores de citocinas tipo 1, esta proteína codificada es un receptor para la linfopoyetina estromal tímica (TSLP) que junto con el receptor alfa de IL-7 (IL7RA), activan las vías de señalización STAT3, JAK-STAT5 y JAK2, las cuales controlan procesos como la proliferación celular y el desarrollo del sistema hematopoyético. Alteraciones en *CRLF2* son localizadas en la región pseudoautosómica 1 (PAR1) en el cromosoma Xp22 o Yp11, donde se encuentra una superficie celular con alto nivel de expresión del gen (71, 73, 82).

Dentro de los mecanismos que alteran la expresión de *CRLF2*, se encuentra la delección intersticial entre PAR1 de *CRLF2* dentro de los cromosomas sexuales con el primer exón no codificante de *P2Y8* (receptor acoplado a proteínas G) codificado por el gen *P2RY8*, el cual produce el transcrito *P2RY8-CRLF2*, quedando la expresión del gen *CRLF2* a cargo del promotor de *P2RY8*. Otra de las alteraciones que se puede presentar es la translocación recíproca criptica con el locus de la cadena pesada de inmunoglobulina (*IGH*) ubicado en el cromosoma 14q32 (Figura 4) (82,83), lo que provoca una alta sobre expresión del gen *CRLF2*. La fusión *P2RY8-CRLF2* es encontrada en conjunto con mutaciones en genes de la familia JAK en cerca del 5% de los pacientes, esta frecuencia es muy similar en los casos con y sin fenotipo Ph-like, sin embargo, se ha reportado que aumenta de 30 a 50% en niños con síndrome de Down con *CRLF2* alterado (84).



**Figura 4. Arreglos del gen *CRLF2*.** En (A) se muestra la delección intersticial de la región pseudoautosómica (PAR1) situado en el cromosoma X o Y que resulta en la fusión de *CRLF2* con la región no codificante de *P2RY8* que conducen a la transcripción (flechas delgadas) y a la traducción de la proteína (flecha gruesa). En (B) se representa la fusión *IGH-CRLF2* t(X;14) o t(Y;14). Estos arreglos resultan en sobre expresión de *CRLF2* e incremento de la proteína *CRLF2* (Modificado de Russell, et. al., 2009).

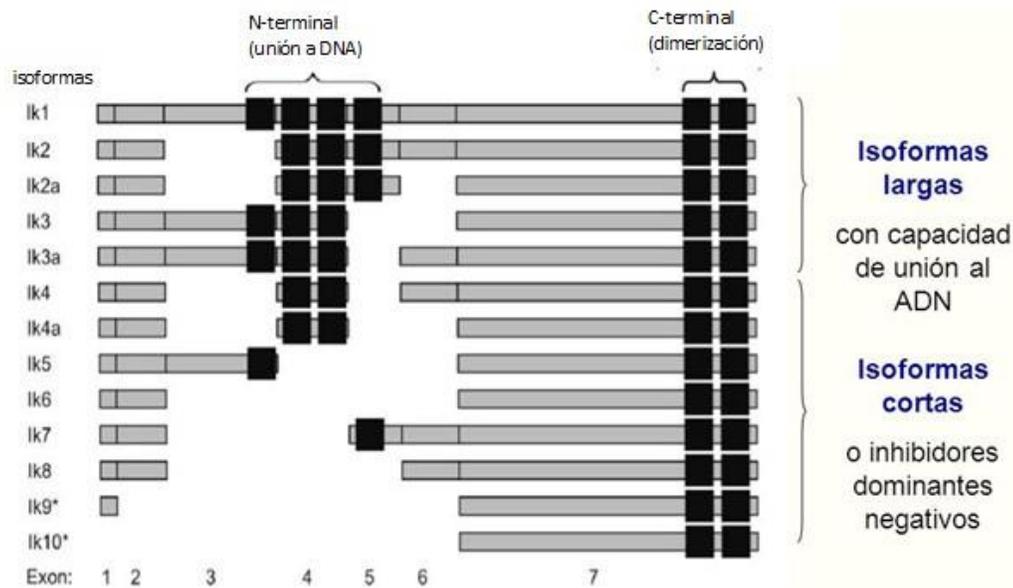
Por otro lado, diversos estudios que han abordado la frecuencia de estas alteraciones encontraron que la fusión *P2RY8-CRLF2* es más común en niños, mientras *IGH-CRLF2* se presenta con una mayor frecuencia en adolescentes y adultos (85, 86). Richard y colaboradores en 2010, realizaron un estudio en una cohorte conformada por 207 niños y adolescentes con riesgo clínico alto, donde se identificó por medio de técnicas genéticas y moleculares a las alteraciones más comunes en *CRLF2*, donde se encontró que 29 pacientes (14%) tenían una elevada expresión de *CRLF2* dentro de estos pacientes se observó que la mayoría presentaban mutaciones en genes de la familia JAK y que la alteración que se presentaba con mayor frecuencia era la translocación *IGH-CRLF2* (62%) comparada con *P2RY8-CRLF2* (34%), otro de los resultados que llamo la atención de este estudio fue que más del 62% de los pacientes con sobre expresión de *CRLF2* pertenecían a la etnia hispano/latina, esta asociación se explica por estudios de genoma completo donde han identificado mutaciones en el gen que codifica a la proteína de unión GATA de la tercera línea germinal (*GATA3*), donde se descubrió un alelo de riesgo *rs3824662* el cual está asociado con lesiones en LLA Ph-

like (incluidas la reorganización del gen *CRLF2* y mutaciones en genes de la familia JAK), el cual se encuentra dentro de la genética ancestral de la etnia hispano/latina así como en población nativo/americana (87, 88), estos resultados sugieren la cooperación de diversas alteraciones para el desarrollo de leucemogénesis, además de la importancia del conocimiento de vías de señalización activas para posibles blancos terapéutico (89).

#### **1.4.6 Alteraciones en el gen *IKZF1***

Estudios recientes basados en el análisis de anomalías en el número de copias del DNA, han ayudado a identificar alteraciones recurrentes en la LLA como son las mutaciones en más del 40% de los pacientes con LLA pre-B, estas alteraciones se presentan en genes que codifican a reguladores transcripcionales del desarrollo de las células B, entre los que se incluyen *PAX5*, *EBF1* e *IKZF1* (59, 90).

IKAROS es una proteína de la familia de dedos de zinc 1 codificada por el gen *IKZF1* localizado en 7p12.2, el cual es importante para la diferenciación de reguladores linfoides, la fase transcripcional del gen se caracteriza por la presencia de múltiples cortes-empalmes alternativos de intrones con dominios C-terminal (por dimerización dentro de la proteína IKAROS) y dominios N-terminal (por bandeado de DNA) que dan como resultado 11 isoformas que se modifican dentro de los exones 3 al 6, las isoformas capaces de unirse al DNA son las que expresan 3 o más dedos de zinc y son consideradas como isoformas funcionales, mientras que las isoformas no funcionales, no son capaces de unirse al DNA ya que solo expresan menos de 2 dedos de zinc, Ik6 e Ik8 son consideradas isoformas dominantes negativas, por la incapacidad de unirse al DNA y de actuar como factores de transcripción (Figura 5) (91, 92).



**Figura 5. Representación esquemática de las isoformas del gen *IKZF1*.** Los dedos de zinc están representados por rectángulos transversales de color negro. Isoformas funcionales capaces de unirse al DNA (Ik1 a Ik3); isoformas no funcionales (Ik4-Ik6). Ik6 e Ik8 isoformas dominantes negativas (Modificado de Meleshko, et. al., 2008).

Se cree que *IKZF1* es un modulador de expresión de genes de linaje celular específico, por medio de mecanismos que envuelven a la remodelación de la cromatina que dan como resultado el efectivo desarrollo linfocítico. La pérdida de la función del gen en modelos animales por medio de un alelo heterocigoto dominante-negativo o la delección homocigota en leucemia linfoblástica, conlleva al desarrollo de defectos severos en células B, T y NK. Estudios basados en las alteraciones asociadas con el pronóstico en la LLA han referido al gen *IKZF1* como un marcador de mal pronóstico en pacientes pediátricos con alto riesgo a recaída, encontrando hasta en un 30% alguna alteración en el gen, lo que incrementa hasta tres veces la falla al tratamiento debido a que está asociado con resistencia a la quimioterapia, independientemente de la presencia de alguna alteración genética y de otros factores de mal pronóstico conocidos. Además, estudios con micro-arreglos de expresión, han determinado que los pacientes con mutaciones en *IKZF1*, sin la presencia de la fusión *BCR-ABL1*, presentan perfiles de expresión similares (90, 93,94, 96).

Tanto deleciones como la presencia de isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1* se han asociado fuertemente con la fase blásticas de LMC, así como en las LLA de tipo Ph-positivo y Ph-like, donde en este último se ha reportado una alta frecuencia de alrededor del 70%. Algunos de los estudios sugieren que la inhibición de IKAROS predispone al desarrollo de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras (LLA pre-B), debido probablemente al agotamiento de la función de IKAROS, lo cual arresta a las células B en el estadio pre-B, lo que provoca una mejora en la proliferación celular dependiente de cinasas, así como en la auto-renovación (95-97).

#### **1.4.7 Vías de señalización alteradas en el subtipo Ph-like**

En la actualidad se han reportado cerca de 60 arreglos dentro de 15 genes receptores de citosinas o de cinasas en el subtipo Ph-like. Estos arreglos pueden dividirse en subgrupos basados en la cinasa activa o en la vía de señalización implicada, que incluyen a la vía JAK-STAT, donde algunas de las alteraciones incluyen a las secuencias de mutaciones en miembros de la familia JAK (*JAK1*, *JAK3*), mutaciones que envuelven a la homodimerización de IL7R o deleciones focales en el gen *SH2B3*, el cual codifica a un regulador negativo de la señalización de *JAK2* (*LNK*), además se han reportado casos que presentan mutaciones o deleciones que involucran a genes que activan a la vía JAK-STAT (*CRLF2*, *JAK2*, *EPOR*), en conjunto estas alteraciones se presentan en pacientes Ph-like niños con 14%, en adolescentes con 5% y en adultos con 7% (71, 97,102)

Aproximadamente, 10% de los pacientes que albergan el subtipo Ph-like cuentan con fusiones genéticas que envuelven a genes de la clase *ABL*. Las cinasas que cuentan con re arreglos en este subconjunto de alteraciones (*ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRA*, *PDGFRB*) son nombradas como “clase *ABL*”. Se han identificado múltiples parejas de fusión con cada gen de la clase *ABL*, donde en cada caso la fusión involucra a la cinasa con la pareja río abajo, preservando intacto el dominio cinasa (99,100).

Se conoce que aproximadamente el 4% de los casos Ph-like cuentan con mutaciones en genes como *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PTPN11* y *CBL1* que activan la señalización de la

vía de RAS, sin embargo, estas mutaciones también pueden ser observadas en pacientes con hiperdiploidía, hipodiploidía y con re arreglos en el gen *MLL*, dentro de dichas alteraciones se encuentran re arreglos en *CRLF2* con mutaciones en *JAK2* y re arreglos en *CRLF2* con el tipo silvestre de *JAK2*; re arreglos en la clase ABL (*ABL1*, *ABL2*, *CDF1R*, *PDGFRA* y *PDGFRB*); otras mutaciones en la señalización de JAK-STAT (*IL7R*, *SH2B3*, *JAK 1/3*, *TYK2*, *IL2RB* Y *TSLP*) y mutaciones en RAS (*KRAS*, *NRAS*, *NFI*, *PTPN11*, *BRAF* y *CBL*) (Cuadro 4) (101-103).

**Cuadro 4. Frecuencia de alteraciones genéticas en pacientes con leucemia linfoblástica aguda del subtipo Ph-like por grupos de edad en niños y adolescentes.**

Alteraciones en el subtipo Ph-like	Niños de 0-16 años con riesgo alto (%) frecuencia	Adolescentes de 16-21 años (%) frecuencia
Mutaciones en <i>CRLF2</i> y <i>JAK</i>	24	35
Alteraciones en <i>CRLF2</i> con el tipo silvestre de <i>JAK</i>	17	29
Alteraciones en genes de la clase ABL	17	10
Alteraciones en genes involucrados en la vía RAS	5	7
Otras alteraciones de la vía JAK-STAT	14	5

Modificado de Roberts, et. al., 2017.

#### 1.4.8 Identificación y opciones de tratamiento para el subtipo Ph-like

Avances en el estudio del genoma han contribuido en entender mejor las bases genéticas y las alteraciones recurrentes en LLA Ph-like. Estos avances ayudan a los investigadores a proponer el uso de diferentes inhibidores de vías de señalización blanco de tirosina cinasa. De acuerdo a lo antes mencionado se han sugerido diferentes métodos para la clasificación del subtipo Ph-like, los cuales se basan en la identificación de alteraciones en genes que se presentan con una mayor frecuencia dentro del subtipo por medio de técnicas genéticas y moleculares, además de la implementación de protocolos de tratamiento y la respuesta que tienen los pacientes. Algunos ejemplos

de algoritmos propuestos para la identificación del subtipo Ph-like se han descrito por Herold y colaboradores en 2017, el cual clasifica a este subtipo por medio de mutaciones en JAK o por la presencia de la translocación *IGH-CRLF2*; la clasificación usada por COG, utiliza un micro-arreglo de baja densidad con la expresión de 8 genes, además de las alteraciones que involucran al gen *CRLF2* (*P2RY8-CRLF2/ IGH-CRLF2*), y mutaciones en *JAK1*, *JAK2* e *IL7R* (83, 104, 105).

La mayoría de los casos con lesiones activadoras de tirosina cinasa responden mal a la quimioterapia en la inducción, indicando bajas tasas de remisión completa (cuando la enfermedad no es detectada por ensayos clínicos) y altos niveles de blastos en pacientes con una remisión completa también conocido como enfermedad mínima residual (EMR). Las tasas de SLE a cinco años en estudios pediátricos con pacientes Ph-like han reportado entre el 50 y 89% para fusiones de la clase ABL y en cerca del 67% de SLE para alteraciones que involucran a *JAK2/EPOR/CRLF2* (71, 106).

La activación de señalización de tirosina cinasa por lesiones en las clases JAK/ABL resultan en la fosforilación río debajo de moléculas diana de la vía JAK-STAT. Actualmente los TKIs que se encuentran en estudio incluyen a imatinib y dasatinib para fusiones de la clase ABL y ruxolitinib para alteraciones en *JAK*, *EPOR* y *CRLF2*. Tanto imatinib como dasatinib inhiben específicamente las cinasas *ABL1*, *ABL2*, *PDGFRB* y *CSF1R*; el inhibidor más amplio de tirosina cinasa. La sensibilidad a los TKIs se ha estudiado en modelos *in vitro*, *ex vivo* y en ratones. Tanto la citometría de flujo como el análisis de transferencia Western mostraron que la fosforilación de JAK-STAT5 fue inhibida específicamente por ruxolitinib en casos donde se presentaban alteraciones en *JAK*, *EPOR* y *CRLF2*, y por imatinib y dasatinib en el caso de fusiones en la clase ABL. La inhibición de la señalización después de la exposición al TKI fue acompañada por la inhibición de la proliferación en células de ratón *in vitro*, la reducción de la viabilidad celular en cultivos celulares de pacientes *ex vivo* y la cantidad de células leucémicas reducidas en xenoinjertos derivados de pacientes en modelos de ratón (107-109). Todos estos datos sugieren que el estudio de la activación de las vías de señalización podría ser utilizado como un posible parámetro de clasificación para el subtipo Ph-like, el cual

se puede estudiar por medio de los blancos activados mediante fosforilación involucrados en la vía, por medio de técnicas bioquímicas como la citometría de flujo o por técnicas moleculares como Western blot.

## 1.5 Planteamiento del problema

La identificación de características de riesgo tanto clínicas como genéticas en la LLA pediátrica ha permitido la estratificación de los pacientes, y así poder determinar tratamientos de acuerdo con el riesgo, lo cual ha permitido que se alcance una tasa de cura de más del 80% de los pacientes en países desarrollados. Recientemente se describió un nuevo subgrupo dentro de la LLA pre-B nombrado como similar a *BCR-ABL1* o Ph-like, el cual se ha reconocido como de alto riesgo, este subtipo de leucemia puede identificarse por la presencia de un perfil de expresión génica similar al de la leucemia positiva para el cromosoma Philadelphia y por activación de vías de señalización de cinasas principalmente de la vía de ABL, RAS y JAK-STAT, derivada de diversas alteraciones en receptores de cinasa, dentro de estas alteraciones se encuentran los arreglos génicos de *CRLF2* tales como la delección intracromosómica que genera el arreglo *P2RY8-CRLF2* y la translocación *IGH-CRLF2*, ambos arreglos provocan la sobre expresión del gen *CRLF2*, otra de las alteraciones frecuentes en el subtipo Ph-like es la presencia de isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1*. La identificación de los pacientes pertenecientes al subtipo Ph-like no sólo es importante para la estratificación de riesgo, sino por que aunado a esto existe la posibilidad de una terapia blanco-específica gracias al desarrollo de inhibidores de tirosina cinasa.

En el laboratorio de Genética y Cáncer del Instituto Nacional de Pediatría se han estudiado muestras de pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA-B, con el fin de identificar características genéticas del subtipo Ph-like y de esta manera hacer una clasificación sugerente de pertenencia a este nuevo subtipo de alto riesgo.

En éste trabajo se generó una base de datos que recabó la información, de aspectos clínicos (edad y cuenta de leucocitos) para hacer una clasificación de riesgo estándar o de riesgo alto, así como de los parámetros genéticos (perfil de expresión génica, alteraciones del gen *CRLF2*, isoformas dominantes negativas de *IKZF1*) y parámetros bioquímicos (activación de vías de señalización de ABL, RAS y JAK-JAK-STAT5), de

pacientes pediátricos atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría (INP), el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y el Hospital Infantil Teletón de Oncología (HITO), y determinar la posible pertenencia al subtipo Ph-like a partir de la presencia de alteraciones genéticas y bioquímicas representativas de este subtipo.

## **1.6 Justificación**

El cáncer es la primera causa de muerte en edad pediátrica, siendo la LLA el cáncer que afecta con mayor frecuencia. En nuestro país se desconoce la frecuencia de pacientes con LLA de células precursoras B pertenecientes al subtipo Ph-like, sin embargo, este subtipo se encuentra con una frecuencia alta en etnia hispano-latina. La identificación de pacientes pertenecientes a este subtipo es muy importante para un adecuado manejo clínico, además de la posibilidad de tener una terapia blanco-específica con inhibidores de tirosina cinasa. Por lo que la pregunta de investigación es:

¿Cuál es la frecuencia de pacientes pediátricos mexicanos con diagnóstico de LLA-B sin translocaciones recurrentes con diferente clasificación de riesgo, que puedan pertenecer al subtipo Ph-like por la presencia de alteraciones genéticas y bioquímicas características del subtipo?

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 General**

Clasificar pacientes pediátricos con LLA pre-B en grupos de riesgo y determinar su posible pertenencia al subtipo de LLA Ph-like mediante el análisis de parámetros bioquímicos y genéticos.

### **1.7.2 Particulares**

Analizar los niveles de transcrito de genes alterados en la LLA subtipo Ph-like y determinar una firma de expresión génica sugerente del subtipo.

Determinar la frecuencia de pacientes con LLA de riesgo estándar y riesgo alto positivos a la firma de expresión génica sugerente del subtipo Ph-like.

Determinar la frecuencia de alteraciones del gen *CRLF2* en pacientes con LLA de riesgo estándar y riesgo alto.

Determinar la frecuencia de isoformas dominantes negativas del gen *IKZF* en pacientes con LLA de riesgo estándar y riesgo alto.

Determinar la frecuencia de la activación de las vías de señalización ABL1, RAS y JAK-JAK-STAT5 en pacientes con LLA de riesgo estándar y riesgo alto.

## **1.8 Hipótesis**

Los pacientes pediátricos mexicanos diagnosticados con LLA-B sin alteraciones genéticas recurrentes (“otros B”) y clasificados clínicamente con riesgo estándar o riesgo alto, podrían presentar alguna de las alteraciones genéticas y bioquímicas características del subtipo Ph-like, sin embargo, se espera encontrar una mayor frecuencia de estas alteraciones dentro del grupo clasificado con riesgo alto.

## 2. Material y Método

### 2.1 Población de estudio

Se revisaron los datos clínicos de 241 pacientes pediátricos (0-18 años) atendidos en el periodo comprendido de septiembre de 2015 a junio de 2018, que aceptaron participar en el estudio por medio de una carta de consentimiento/asentimiento informado. De los cuales 68 fueron atendidos en el Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG), 19 atendidos en el Hospital Infantil Teletón de Oncología (HITO), y 136 en el Instituto Nacional de Pediatría (INP).

Características de inclusión de los pacientes

- Diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células precursoras B, confirmado por Inmunofenotipo
- Edad al diagnóstico con rango de 0 a 18 años
- Expediente con datos clínicos completos
- Negativos a fusiones génicas recurrentes como *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y arreglos del gen *MLL*
- Con análisis de alteraciones genéticas del subtipo Ph-like completo o con material biológico disponible para realizar las pruebas genéticas faltantes (perfil de expresión génica con los genes *CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMPR1B*, *TSPNA7* y *GUSβ* (control endógeno), alteraciones en *CRLF2*: sobre expresión, *P2RY8-CRLF2* con o sin *IGH-CRLF2*, isoformas dominantes negativas de *IKZF1*: Iκ6 e Iκ8, activación de vías de señalización: JAK-JAK-STAT5, ABL con o sin RAS).

De acuerdo con los criterios de inclusión del total de los pacientes, 42 se excluyeron de este trabajo por tener un diagnóstico diferente a LLA pre-B, 28 por presentar translocaciones recurrentes (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* o arreglos del gen

MLL), 45 por la ausencia de algún dato clínico dentro del expediente (edad, cuenta leucocitaria) y 71 por carecer de alguno de los resultados de las alteraciones genéticas o moleculares consideradas para este estudio. De todos los pacientes, en esta tesis se trabajó con 55 que cumplieron con los criterios de inclusión. Como son diagnóstico de LLA pre-B, negativos a translocaciones recurrentes, datos clínicos completos en el expediente y con resultados completos de las alteraciones genéticas estudiadas.

## **2.2 Reclutamiento de datos clínicos y de laboratorio**

Este es un estudio ambispectivo en donde los resultados de las determinaciones genéticas (alteraciones del gen *CRLF2*, isoformas dominantes negativas de *IKZF1*) y las bioquímicas (activación de vías de señalización de *ABL1*, *RAS* y *JAK-JAK-STAT5*), fueron realizadas previamente dentro del laboratorio de genética. El perfil de expresión génica está analizado de manera parcial, y en este trabajo se analizaron las muestras pendientes con material biológico disponible para realizar el perfil de expresión génica. A continuación, se describe la metodología utilizada para este análisis.

## **2.3 Procesamiento de muestras**

Se contó con un banco de muestras de médulas óseas previamente recolectadas, procesadas y preservadas en nitrógeno líquido de los pacientes para la obtención de material biológico (RNA y células viables) para los diferentes estudios.

De las muestras faltantes para los datos del perfil de expresión génica, se realizó la extracción de RNA, la síntesis de cDNA y la determinación de los niveles de expresión génica de cada uno de los genes como se describe a continuación.

### **2.3.1 Extracción de RNA**

- La extracción de RNA se llevó a cabo mediante el kit RNeasy Mini (QIAGEN) como lo indica el fabricante, para la elución final en 40 µL de agua libre de RNAsas.

- Posterior a la extracción, se cuantificó la concentración del RNA utilizando un equipo EPOCH, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 260 nm dando como valor la concentración en ng/μl para valorar la pureza del material genético donde se tomó en cuenta la relación 260/280 nm, la cual es óptima en un rango (R) entre 1.8 y 2.
- Por otro lado, para conocer la integridad del RNA se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando para la tinción gel red (Thermo Fisher) corriendo a 90 V por 40 minutos.

### **2.3.2 Síntesis de cDNA**

Para la obtención de la cadena complementaria de DNA se llevó a cabo en tubos Eppendorf de 0.2 mL por medio de 2 reacciones consecutivas, en la primera para la desnaturalización con 1 μg de RNA (si la muestra no alcanzó el 1 μg de RNA, se trabajó con los μg en un volumen máximo de 19.5 μL), 0.5 μL de random primers (100 mM) (Invitrogene) y agua libre de RNAsas para un volumen final de 20 μL. La reacción se colocó en un termociclador Mastercycler Eppendorf a una temperatura de 72 °C por 3 minutos.

Para la segunda reacción que consiste en la retrotranscripción se utilizó para cada tubo 1 μL de MMLV-RT (transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina Moloney), 6 μL de buffer 5X MMLV-RT, 2 μL de DTT (ditiotreitól) y 1 μL de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfatos) (Invitrogene).

Una vez concluido el tiempo de incubación de la primera reacción se pasaron inmediatamente a hielo y se añadió la reacción dos. Se continuo, la síntesis en el termociclador a 37 °C por una hora para finalizar a 94 °C por 6 minutos.

### **2.3.3 Verificación de síntesis de cDNA por PCR de *GAPDH***

Para verificar que las muestras concluyeron la síntesis exitosamente, se realizó una PCR punto final amplificando un fragmento del gen constitutivo *GAPDH*, donde se agregó para cada muestra 2 μL de cDNA, 0.2 μL de Taq-polimerasa (invitrogen), 2.5 μL

de buffer 10X, 1.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  (500 nM), 0.5  $\mu$ L dNTPs, 0.5  $\mu$ L de primers forward (10 mM), 0.5  $\mu$ L de primers reverse (10 mM) del fragmento del gen y agua libre de RNAsas para un volumen final de 25  $\mu$ L.

La reacción se llevó a cabo en termociclador Mastercycler eppendorf con las siguientes condiciones de reacción. Desnaturalización inicial a 94 °C por 5 minutos , seguido de 28 ciclos conformados por desnaturalización a 94 °C por 30 segundos, alineación a 62 °C por 30 segundos y extensión a 72 °C por 1 minuto.

El producto de amplificación se observó en un gel de agarosa al 2% con TBE (tris/borato/EDTA) y gel red (Thermo Fisher), utilizando un marcador de longitud de 100 pares de bases (pb), las condiciones de corrida fueron de 90 V por 35 minutos, el producto amplificado fue de 317 pares de bases.

#### **2.4 Determinación de los niveles de expresión génica por qRT-PCR**

La evaluación de los niveles de expresión génica de *CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMPR1B*, *TSPNA7* y *GUS $\beta$*  (control endógeno) se realizó mediante una cuantificación relativa de transcripción inversa de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), en el equipo Llightcycler 2.0 de Roche, usando como calibrador una muestra de medula ósea normal para cinco genes, ya que *BMPR1* solo esta expresado en células leucémicas, la muestra calibradora para este gen fue una medula ósea leucémica positiva para su expresión. La sonda de DNA tipo Taqman, así como los oligonucleótidos sentido y anti-sentido fueron diseñados en el programa Universal ProbeLibrary de Roche y se pueden observar en el Cuadro 5, así como las condiciones de reacción.

**Cuadro 5. Secuencias de oligonucleótidos para los genes *CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMPR1B*, *TSPAN7* y *GUSB***

Gen	Secuencia oligonucleótidos sentido	de	Secuencia oligonucleótidos anti-sentido	de	No. de secuencia
<b><i>CRLF2</i></b>	agcgactggtcagaggtga		aattggacagcttgggttg		NM_022148.2
<b><i>SEMA6A</i></b>	tggacaccagttcctgatga		tcattggagggtgcatacttc		NM_020796
<b><i>PON 2</i></b>	tccacactgccacctgatta		agccagaccattgggaagtat		NM_000305
<b><i>IGJ</i></b>	tgtggagagaaacatccgaatta		atggtgaggtgggatcagag		NM_144646.3
<b><i>BMPR1B</i></b>	tttcatgccttgatgataaagg		gcttgttaacttttctctctc		NM_001203.2
<b><i>TSPAN7</i></b>	catctactcctctgtcttctgga		agtaagttgccccagactcc		NM_004615.3
<b><i>GUSB</i></b>	cgccctgcctatctgtattc		tccccacagggagtgtgtag		NM_000181.3

Las condiciones de reacción se describen a continuación.

Pre-incubación 95 °C por 10 minutos 1 ciclo.

Amplificación 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 30 segundos y 72 °C por 0.5 segundos, 45 ciclos.

Reposo 40 °C por 30 segundos, 1 ciclo.

### 2.4.1 Cuantificación génica

Una vez concluida la qRT-PCR de cada gen, se tomaron los valores de Ct arrojados por el programa Lightcycler Software 4.05, integrado en el equipo, los datos se normalizaron mediante el método  $\Delta Ct$  el cual compara las medias del gen problema con el gen endógeno. Para la obtención de la expresión génica relativa se tomó en cuenta el valor definido por la diferencia de medias entre los valores de los genes problemas y las muestras calibradoras dado por la ecuación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . El punto de corte para clasificar la sobre expresión fue el valor de la mediana, se consideró con sobre expresión aquellos genes que presentaron un valor de expresión génica relativa igual o mayor a esta.

El estudio de las alteraciones del gen *CRLF2* (*IGH-CRLF2* y *P2RY8-CRLF2*), isoformas dominantes negativas de *IKZF1* y activación de las vías de señalización de JAK-JAK-STAT5 y ABL1 fue realizado previamente como se describe a continuación.

### **2.5 Alteraciones en el gen *CRLF2***

La determinación de la delección *P2RY8-CRLF2* se realizó por RT-PCR punto final flanqueando los puntos de ruptura de las regiones involucradas, la secuencia de oligonucleótidos que flanquea a *P2RY8* es 5'-ggacagatggaactggaagg-3' y la que hibrida en *CRLF2* es 5'-gtccattcctgatggagaa-3', el producto de la reacción se visualizó mediante un gel de agarosa al 2%, donde el fragmento amplificado equivale a 511 pares de bases (pb) (110,111).

La detección de la translocación *IGH-CRLF2* se llevó a cabo mediante hibridación por fluorescencia *in situ* (FISH) en interfase, utilizando una sonda de doble color para el gen *IGH*, dichas sondas se hibridaron para mapear el punto de ruptura t(X;14) o t(Y;14). Además se diseñaron dos sondas de separación alternativa para identificar la ruptura de *CRLF2* en la translocación por medio de la fluorescencia emitida (rojo, verde y amarillo para la señal de fusión) (71).

### **2.6 Isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1***

La identificación de las isoformas del gen *IKZF1* (ik-6 e ik-8) se realizó mediante una PCR punto final anidada. El producto de PCR de la reacción ika-1 se utilizó como templado para la segunda reacción de PCR ika-2, los oligonucleótidos utilizados se describen en el Cuadro 6.

**Cuadro 6. Secuencia de oligonucleótidos para el estudio de isoformas dominantes negativas de *IKZF1*.**

Sentido de oligonucleótidos para cada reacción F (forward) R (reverse)	Secuencia de oligonucleótidos
F1 ( <i>ika-1</i> )	atggatgctgacgagggtcaagac
R1 ( <i>ika-1</i> )	ttagctcatgtggaagcgggtgctc
F2 ( <i>ika-2</i> )	cccctgtaagcgatactccagatg
R2 ( <i>ika-2</i> )	gatggcttggtccatcacgtggga

Las isoformas del gen *IKZF1* fueron detectadas con base en el peso molecular en pb, utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2%. La isoforma *ik-6* positiva para la amplificación generó una banda de 202 pb mientras que para *ik-8* generó una banda de 337 pb (91).

## 2.7 Vías de señalización

En los blastos leucémicos se analizó la activación de las vías de señalización características de los pacientes del subgrupo Ph-like: ABL, RAS y JAK-JAK-STAT5 mediante Phosphoflow (BD biosciences, USA). Las alteraciones de cada una de las vías se evaluaron mediante anticuerpos monoclonales que reconocen blancos directos y fosforilados (o activados), la alteración en la vía de JAK-JAK-STAT5 por su blanco directo JAK-STAT5, la vía de ABL por su blanco Crkl y la vía de Ras por su blanco Erk. Las células fueron analizadas en el citómetro FACSVerse (BD biosciences, USA) y con el software Flowjo 10.0.

## 2.8 Análisis de resultados

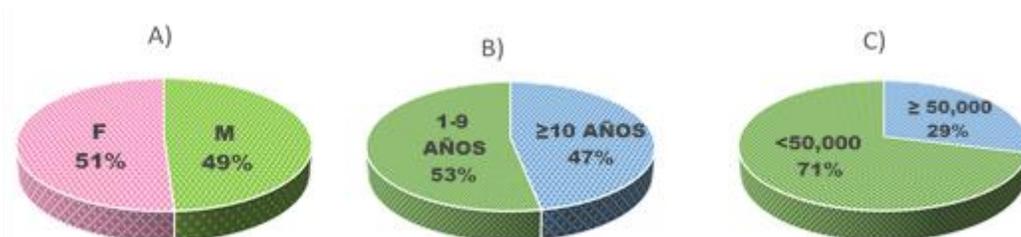
Se construyó una base de datos con los pacientes que contaran con la información completa para este trabajo, depurando las bases de datos existentes y tomando los datos de los parámetros clínicos y del laboratorio y se agrupó a los pacientes considerando la edad y cuenta de leucocitos circulantes en grupos de riesgo estándar (edad 1-9 años y cuenta leucocitaria  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ ) y grupo de riesgo alto (edad  $\geq 10$  años con o sin cuenta de leucocitos  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ ).

Se determinaron las frecuencias de cada uno de los parámetros genéticos y bioquímicos de laboratorio en los grupos de riesgo, se realizó una prueba estadística de *Chi-cuadrada* para conocer si existían diferencias significativas entre grupos y se asignó a los pacientes que probablemente puedan pertenecer al subtipo Ph-like mediante la presencia de diferentes combinaciones de alteraciones.

### 3. Resultados

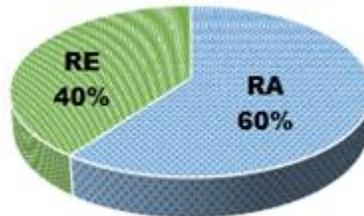
#### 3.1. Población de estudio, características clínicas y clasificación de riesgo de los pacientes con LLA pre-B

Del total de 55 pacientes incluidos en este trabajo, 28 (51%) fueron mujeres y 27 (49%) hombres (Figura 6 A) y presentaron un intervalo de edad entre 2 y 16 años con una media de 7.29 y desviación estándar de 4.8. Ningún presentó edad menor a un año. El conocimiento de las características clínicas de los pacientes al momento de ser diagnosticados con LLA-B permitió hacer una estratificación de riesgo clínico según los parámetros establecidos por el NCI, descrita a continuación. De acuerdo con la edad, los pacientes se agruparon en el rango de edad de 1 a 9 años (riesgo estándar) 29 pacientes (53%), mientras que 27 (47%) en edad de riesgo ( $\geq 10$  años) (Figura 6 B). Además, los pacientes se agruparon de acuerdo con la cuenta leucocitaria en sangre periférica quedando 39 (71%) pacientes con cuentas de leucocitos  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  (riesgo estándar) y 16 (29%) en cuenta  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ , es decir, con riesgo alto (Figura 6 C).



**Figura 6. Características clínicas de la cohorte de 55 pacientes.** A) Frecuencia de género (F, femenino M, Masculino) B) Frecuencia de edad al diagnóstico (1-9 años edad de riesgo estándar;  $\geq 10$  años edad de riesgo alto) C) Frecuencia de cuenta leucocitaria al diagnóstico ( $<5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  de riesgo estándar;  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$  de riesgo alto).

Por otro lado, considerando ambas características clínicas se estratificaron a los pacientes en grupos de riesgo. El grupo de riesgo estándar (edad de uno a nueve años más cuenta de leucocitos  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ ) conformado por 22 pacientes (40%) y en el grupo de riesgo alto (edad mayor o igual a diez años con o sin cuenta de leucos  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ ) con 33 (60%) (Figura 7).

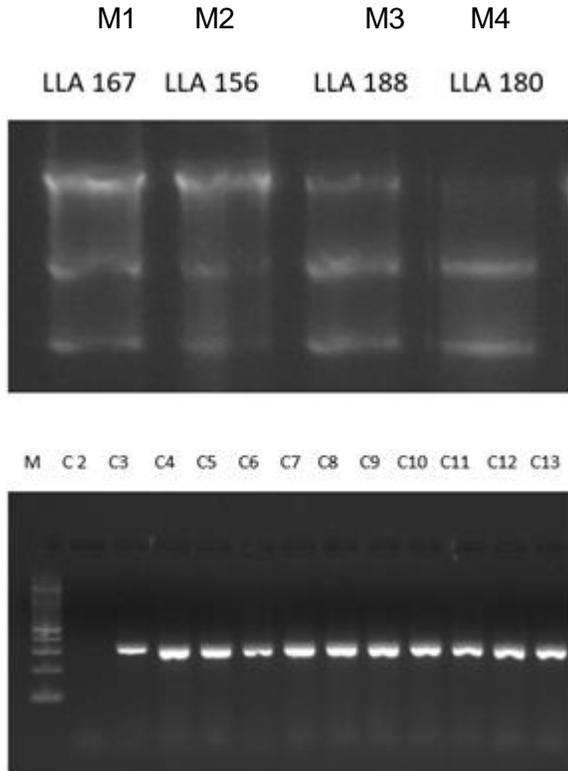


**Figura 7. Distribución de los pacientes por características clínicas.** RE, riesgo estándar; RA, riesgo alto.

### **3.2. Frecuencia del perfil de expresión génica característico del subtipo Ph-like**

Se realizó el estudio de un perfil de expresión génica conformada por los genes *CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMPR1B* y *TSPNA7*, los cuales se han referido con sobre expresión en pacientes con LLA-B pertenecientes al subtipo Ph-like (64-66), de los 55 pacientes incluidos en nuestra cohorte, 44 ya contaban con el estudio del perfil de expresión y en 11 se realizó el trabajo experimental para el procesamiento de las muestras y la terminación del perfil de expresión.

De las 11 muestras que no contaban con el análisis de la firma de expresión génica, se extrajo el RNA total, los cuales presentaron concentración, pureza, e integridad adecuados para realizar el análisis de expresión génica (Figura 8A), En todas las muestras procesadas se sintetizó el cDNA exitosamente, el cual se verificó por medio de la amplificación de un fragmento del gen constitutivo gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) mediante RT-PCR punto final, el producto amplificado es de una longitud de 317 pb (Figura 8B).



**Figura 8. Verificación del material genético para el perfil de expresión génica.** En A) se muestra el patrón de corrimiento electroforético característico del RNA íntegro de muestras representativas. En B) se observa el producto de amplificación de *GAPDH*, en los carriles se presenta lo siguiente: M, marcador de 100 pb; C2, control negativo de reacción y en C3-C13, cDNA de muestras de pacientes con LLA pre-B.

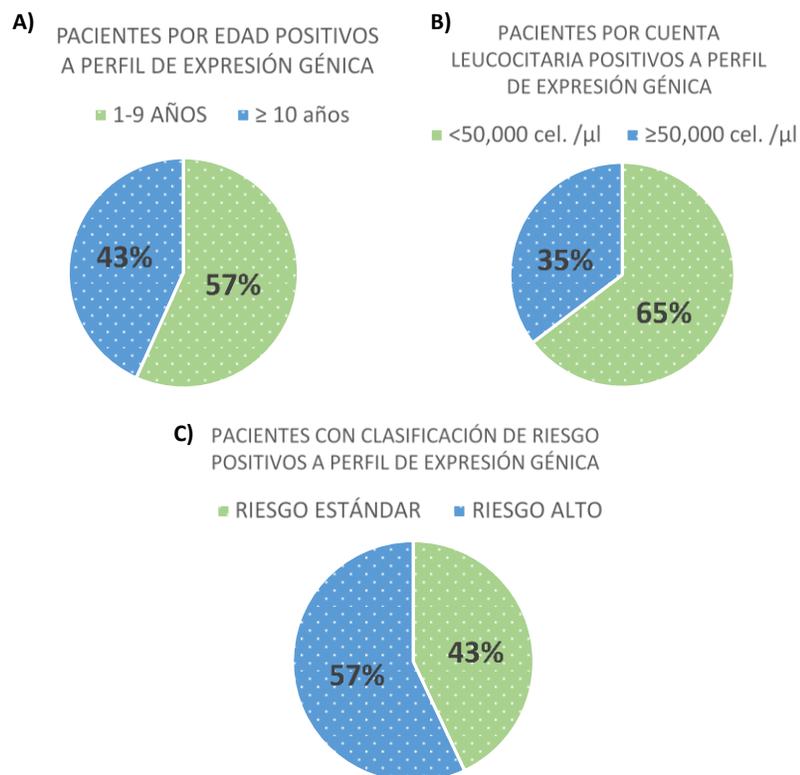
Los valores de expresión génica relativa se determinaron por la ecuación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , el estado de expresión de los genes (sobre expresado y no sobre expresado) se muestran en la Figura 9. Para definir el estado de sobre expresión de los 6 genes evaluados (*CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMPR1B*, *TSPNA7*), se utilizó a la mediana como valor de corte. Se consideraron con un perfil de expresión positivo para subtipo Ph-like aquellas muestras con sobre expresión en al menos tres de los seis genes ( $\geq 50\%$ ) analizados.

ID	<i>CRLF2</i>	<i>TSPAN7</i>	<i>SEMA6A</i>	<i>PON2</i>	<i>IGJ</i>	<i>BMPR1B</i>
LLA 1 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 2 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 3 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 4 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 5 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 6 (HI)	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 7 H	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 8 INP	Red	Green	Red	Red	Red	Red
LLA 9 INP	Red	Green	Red	Red	Red	Red
LLA 10 INP	Red	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 11 INP	Red	Red	Red	Red	Green	Red
LLA 12 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Green
LLA 13 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Green
LLA 14 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Green
LLA 15 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 16 INP	Red	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 17 INP	Red	Green	Red	Red	Red	Red
LLA 18 INP	Red	Red	Red	Red	Green	Green
LLA 19 INP	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 20 INP	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 21 INP	Red	Red	Green	Red	Red	Red
LLA 22 INP	Green	Green	Red	Red	Red	Red
LLA 23 INP	Red	Red	Red	Red	Green	Red
LLA 24 INP	Red	Red	Red	Red	Green	Green
LLA 25 INP	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 26 INP	Red	Red	Red	Green	Red	Green
LLA 27 H	Red	Green	Red	Red	Green	Red
LLA 28 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 29 INP	Green	Green	Red	Red	Red	Red
LLA 30 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 31 INP	Red	Red	Green	Red	Red	Red
LLA 32 (HI)	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 33 (HI)	Red	Green	Red	Red	Red	Red
LLA 34 (HI)	Red	Red	Green	Red	Red	Red
LLA 35 INP	Red	Green	Red	Green	Red	Red
LLA 36 H	Red	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 37 H	Red	Red	Green	Red	Red	Red
LLA 38 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 39 INP	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 40 INP	Red	Red	Red	Red	Green	Red
LLA 41 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 42 (HI)	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 43 (HI)	Red	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 44 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 45 INP	Green	Green	Red	Green	Red	Red
LLA 46 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 47 (HI)	Red	Red	Red	Red	Green	Red
LLA 48 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 49 INP	Green	Red	Red	Green	Red	Red
LLA 50 H	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 51 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 52 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 53 INP	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 54 HI	Green	Red	Red	Red	Red	Red
LLA 55 H	Green	Red	Red	Red	Red	Red

**Figura 9. Perfil de expresión génica representado en mapa de calor.** Expresión génica de los seis genes analizados en los pacientes con LLA-B del grupo “otros B”. Los genes con sobre expresión se representan en color rojo, en verde están representados los genes no sobre expresados. En 37 pacientes se encontró un perfil de expresión génica positivo (PEG+), mientras que en 18 pacientes se observó un perfil de expresión génica negativo (PEG-).

De acuerdo con lo anterior se encontró que 37 (67%) pacientes son candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like por presentar un perfil de expresión génica positivo (PEG+), la frecuencia por edad de riesgo fue de 57% (21 pacientes) en riesgo estándar, mientras que 43% (16 pacientes) se clasificaron en riesgo alto (Figura 10A). En lo que respecta a la cuenta leucocitaria, 24 pacientes (65%) se agruparon en riesgo estándar y 13 (35%) en riesgo alto (Figura 10B).

La frecuencia de los pacientes con PEG+ clasificados en grupos de riesgo clínico, por edad y cuenta de leucocitos, se encontró de la siguiente manera; de los pacientes clasificados con riesgo estándar 16 (43%) presentaron un PEG+ y 21 (57%) se encontraron en el grupo de riesgo alto (Figura 10C). al respecto, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos con características clínicas y en grupo por clasificación de riesgo clínico (prueba *Chi-cuadrada*  $p= 0.56, 0.27$  y  $0.68$  respectivamente).



**Figura 10. Frecuencia de pacientes positivos al perfil de expresión génica.** A) Pacientes clasificados por edad (1-9 años edad de riesgo estándar;  $\geq 10$  años edad de riesgo alto). B) Pacientes clasificados por cuenta leucocitaria ( $< 5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L de riesgo estándar;  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L riesgo alto). C) Pacientes clasificados por riesgo clínico estándar y alto.

### 3.3. Frecuencia de alteraciones en el gen *CRLF2*

Dentro de las diferentes alteraciones del gen *CRLF2* asociadas con el subtipo Ph-like se encuentran la sobre expresión del gen, la presencia de la delección *P2RY8-CRLF2* y la presencia o ausencia de la translocación *IGH-CRLF2*. La frecuencia de alteraciones en el gen *CRLF2* de manera general se presentó en 32 (58%) pacientes, mientras que dentro de los grupos estudiados, 19 (59%) se clasificaron con una edad de riesgo estándar y 13 (41%) contaron con una edad de riesgo alto, la alteración que se presentó con una mayor frecuencia en los dos grupos fue la delección *P2RY8-CRLF2* (Cuadro 7). En cuanto a la clasificación por cuenta leucocitaria, 22 (69%) presentaron una cuenta de leucocitos de riesgo estándar, además de presentar una mayor prevalencia de la delección *P2RY8-CRLF2*, mientras que 10 (31%) mostraron una cuenta de riesgo alto (Cuadro 8).

**Cuadro 7. Frecuencia de alteraciones de *CRLF2* en pacientes “otros B” clasificados por edad.**

Característica	Pacientes con edad de 1-9 años n=29 (%)	Pacientes con edad ≥10 años n=26 (%)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i>	3 (10)	3 (11)
<i>P2RY8-CRLF2</i>	7 (24)	6 (23)
<i>IGH-CRLF2</i>	4 (14)	1 (4)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i> más <i>IGH-CRLF2</i>	2 (7)	2 (8)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i> más <i>P2RY8-CRLF2</i>	3 (10)	1 (4)
Negativos a cualquier alteración en <i>CRLF2</i>	10 (35)	13(50)

De acuerdo con la frecuencia de pacientes con alguna alteración en *CRLF2* clasificados en grupos de riesgo clínico, se encontró que 13 (41%) se clasificaron con riesgo

estándar, mientras que 19 (59%) se encontraron en el grupo de riesgo alto (Cuadro 9). Al momento de realizar el análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre los grupos clasificados por características clínicas y en el grupo por clasificación de riesgo clínico (*Chi-cuadrada*  $p= 0.73, 0.24$  y  $1$  respectivamente).

**Cuadro 8. Frecuencia de alteraciones de *CRLF2* en pacientes “otros B” clasificados por cuenta leucocitaria.**

Característica	Cuenta leucocitaria $<5 \times 10^4$ células/ $\mu$ L n=39 (%)	Cuenta leucocitaria $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu$ L n=16 (%)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i>	2 (5)	4 (26)
<i>P2RY8-CRLF2</i>	11 (28)	2 (13)
<i>IGH-CRLF2</i>	2 (5)	2 (13)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i> más <i>IGH-CRLF2</i>	2 (5)	2 (13)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i> más <i>P2RY8-CRLF2</i>	5 (13)	0
Negativos a cualquier alteración en <i>CRLF2</i>	17 (44)	6 (38)

**Cuadro 9. Frecuencia de alteraciones de *CRLF2* en pacientes “otros B” clasificados por riesgo clínico estándar y alto.**

Característica	Riesgo estándar 1-9 años y cuenta leucocitaria $<5 \times 10^4$ células/ $\mu$ L n=22(%)	Riesgo alto $\geq 10$ años con o sin cuenta leucocitaria $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu$ L n=33(%)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i>	1 (5)	6 (18)
<i>P2RY8-CRLF2</i>	6 (27)	7 (21)
<i>IGH-CRLF2</i>	1 (5)	3 (9)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i> más <i>IGH-CRLF2</i>	2 (10)	2 (6)
Sobre expresión de <i>CRLF2</i> más <i>P2RY8-CRLF2</i>	3 (13)	1 (3)
Negativos a cualquier alteración en <i>CRLF2</i>	9 (40)	14 (43)

### 3.4 Frecuencia de isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1*

Otra alteración genética que se ha referido con frecuencia en pacientes pertenecientes al subtipo Ph-like es la presencia de isoformas dominantes negativas (IDN) del gen *IKZF1*, conocidas como Ik6 e Ik8. Dentro del presente trabajo se encontró en los pacientes estudiados al menos una de estas isoformas con una frecuencia de 85% (47 pacientes), al realizar la clasificación por grupos, se encontró que 25 (53%) de los pacientes positivos a esta alteración presentaron una edad de riesgo estándar, siendo la isoforma IK6 considerada como un marcador de mal pronóstico, la más frecuente dentro de este grupo, mientras que 22 (47%) tenían una edad de riesgo alto, y en los cuales se presentó una mayor prevalencia de las dos isoformas (Cuadro 10), en tanto al riesgo por cuenta leucocitaria, 35 (74%) tuvieron una cuenta de leucos de riesgo estándar además de presentar las dos IDN con una mayor frecuencia y 12 (26%) presentaron una cuenta de riesgo alto (Cuadro 11).

Por otro lado, en cuanto a la clasificación de riesgo clínico se encontró que dentro de los pacientes clasificados con riesgo estándar, 18 (38%) contaron con la presencia de al menos una de las IDN, mientras que en el grupo de riesgo alto, 29 (62%) fueron positivos a esta alteración, la presencia de las dos isoformas se presentó con una mayor frecuencia en este grupo (Cuadro 12). El análisis estadístico no mostró diferencia significativa al comparar los grupos de edad y cuenta leucocitarias de riesgo estándar vs riesgo alto, así como, entre los grupos de clasificación de riesgo clínico con esta alteración genética (*Chi-cuadrada*  $p= 1, 0.88$  y  $0.81$ , respectivamente).

**Cuadro 10. Frecuencia de isoformas dominantes negativas de *IKZF1* en pacientes “otros B” clasificados por edad.**

<b>Isoforma dominante negativa</b>	<b>Pacientes con edad 1-9 años n=29 (%)</b>	<b>Pacientes con edad ≥10 años n=26 (%)</b>
<b>IK6</b>	<b>12 (41)</b>	<b>6 (24)</b>
<b>IK8</b>	<b>2 (7)</b>	<b>4 (15)</b>
<b>IK6 más IK8</b>	<b>11 (38)</b>	<b>12 (46)</b>
<b>Negativos a la presencia de IDN</b>	<b>4 (14)</b>	<b>4 (15)</b>

**Cuadro 11. Frecuencia de isoformas dominantes negativas de *IKZF1* en pacientes “otros B” clasificados por cuenta de leucocitos**

<b>Isoforma dominante negativa</b>	<b>Pacientes con cuenta leucocitaria &lt;5x10<sup>4</sup> células/μL n=39 (%)</b>	<b>Pacientes con cuenta leucocitaria ≥5x10<sup>4</sup> células/μL n=16 (%)</b>
<b>IK6</b>	<b>13 (33)</b>	<b>4 (25)</b>
<b>IK8</b>	<b>6 (15)</b>	<b>1 (6)</b>
<b>IK6 más IK8</b>	<b>16 (41)</b>	<b>7 (44)</b>
<b>Negativos a la presencia de IDN</b>	<b>4 (11)</b>	<b>4 (25)</b>

**Cuadro 12. Frecuencia de isoformas dominantes negativas de *IKZF1* en pacientes “otros B” clasificados por riesgo clínico estándar y alto**

Isoforma dominante negativa	Riesgo estándar 1-9 años más cuenta leucocitaria <5x10 <sup>4</sup> células/μL n=22 (%)	Riesgo alto ≥10 años con o sin cuenta leucocitaria ≥5x10 <sup>4</sup> células/μL n=33 (%)
<b>IK6</b>	<b>8 (36)</b>	<b>10 (30)</b>
<b>IK8</b>	<b>2 (9)</b>	<b>4 (12)</b>
<b>IK6 más IK8</b>	<b>8 (36)</b>	<b>15 (46)</b>
<b>Negativos a la presencia de IDN</b>	<b>4 (19)</b>	<b>4 (12)</b>

### **3.5 Frecuencia de activación de vías de señalización**

El subtipo Ph-like resulta de diversas alteraciones en genes de receptores de cinasas que activan diferentes vías de señalización, la vía que se encuentra mayormente alterada es la de JAK-JAK-STAT5, seguida de la vía ABL y en menor frecuencia la vía de RAS, en este trabajo se analizaron estas vías en aquellos pacientes donde se logró disponer de material biológico para el estudio, dada esta situación, se obtuvo el resultado de 20 de los 55 pacientes, considerando lo anterior, del total de los pacientes analizados (20) se identificó que 13 (65%) resultaron positivos para la activación de al menos una de estas vías de señalización. Agrupando estos resultados con respecto a la clasificación por características clínicas se encontró lo siguiente, dentro de la clasificación por edad, en el grupo de riesgo estándar 7 (54%) pacientes presentaron activación de la vía ABL, no se encontró a ningún paciente con las vías de señalización JAK-STAT5 y RAS activas de manera individual, sin embargo 1 (8%) paciente presentó activación en las vías JAK-STAT5 y ABL. Por otro lado, dentro del grupo clasificado con edad de riesgo alto 2 (15%) pacientes presentaron activación de la vía ABL, 1 (8%) paciente tuvo activación de la vía JAK-STAT5 y 2 (15%) mostraron activación para dos vías (ABL y RAS) (Figura 11).

Dentro de la clasificación por cuenta leucocitaria, las frecuencias de la activación de vías de señalización quedaron de la siguiente manera; 6 pacientes (46%) tuvieron la vía ABL activa y cuenta leucocitaria de riesgo estándar (no se encontraron pacientes con activación de las vías JAK-STAT5 y RAS de manera individual) y dentro de este grupo de clasificación 1 paciente (8%) presentó activas las vías JAK-STAT5 y ABL y 1 (8%) las vías ABL y RAS. En cuanto al grupo con una cuenta leucocitaria de riesgo alto, 3 (22%) pacientes tuvieron activa la vía ABL, 1 paciente (8%) presentó activa la vía JAK-STAT5 y 1 (8%) mostró activas a las vías ABL y RAS (Figura 12).

La frecuencia de pacientes con la presencia de una o más vías de señalización activas, clasificados por riesgo clínico, se presentó en 6 (46%) pacientes los cuales presentaron activa la vía ABL y se clasificaron con riesgo estándar, no se detectó a ningún paciente con las vías de señalización JAK-STAT5 y ABL activas de manera individual, sin embargo dentro del mismo grupo 1 (8%) paciente presentó activas las vías JAK-STAT5 y ABL, mientras que 3 (22%) se clasificaron con riesgo alto y presentó activa la vía ABL, 1 (8%) paciente tuvo activa a la vía JAK-STAT5 y 2 (15%) contaron con las vías ABL y RAS activas (figura 13).

La activación de las vías de señalización confirma de manera directa la pertenencia al subtipo Ph-like, por lo que se analizó que alteraciones genéticas analizadas en este trabajo se presentaron de manera positiva en conjunto con la activación de vías de señalización, lo que se encontró fue que las características que se presentan con mayor frecuencia en los pacientes francamente positivos al subtipo Ph-like son la presencia de alguna IDN de *IKZF1* en 12 (92%) pacientes, seguido de la presencia de un PEG+ el cual se presentó en 9 (69%) seguido de alguna alteración en *CRLF2* presente en 5 (38%) pacientes (Figura 14). Por otro lado al realizar diferentes combinaciones de dichas alteraciones se encontró que el PEG+ además de la presencia de alguna isoforma dominante negativa (IDN) del gen *IKZF1* se presentó en 5 (38%) pacientes, seguido por 3 (23%) que contaron con PEG+ más alguna alteración en *CRLF2* y la presencia de alguna IDN de *IKZF1*, 2 (15%) tuvieron alguna alteración en *CRLF2* más IDN de *IKZF1*, otros 2 (15%) contaron con la presencia de alguna IDN de *IKZF1* y 1

(8%) paciente tuvo un PEG+ además de alguna alteración en *CRLF2* (Cuadro 13). No se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los grupos clasificados por características clínicas y en grupo por clasificación de riesgo clínico comparado con la activación de vías de señalización (*Chi-cuadrada*  $p=1$ ).

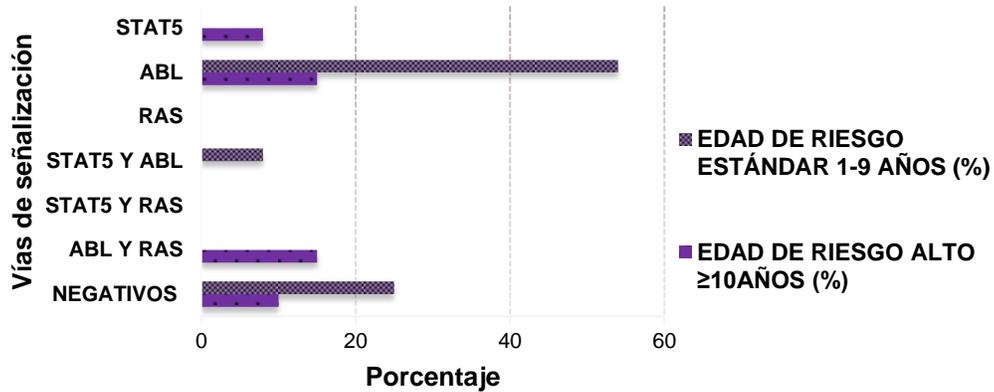


Figura 11. Frecuencia de activación de vías de señalización en pacientes clasificados por edad de riesgo estándar y alto.

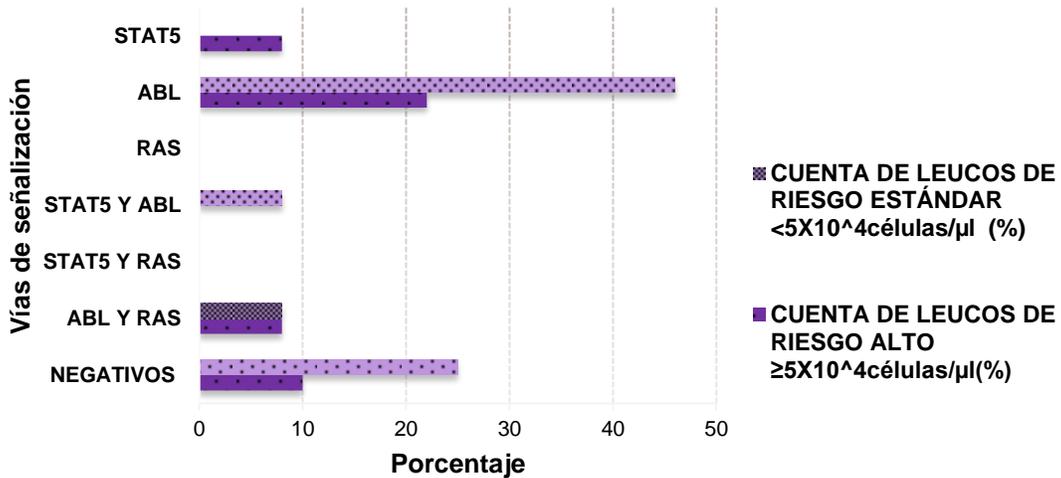


Figura 12. Frecuencia de activación de vías de señalización en pacientes clasificados por cuenta leucocitaria.

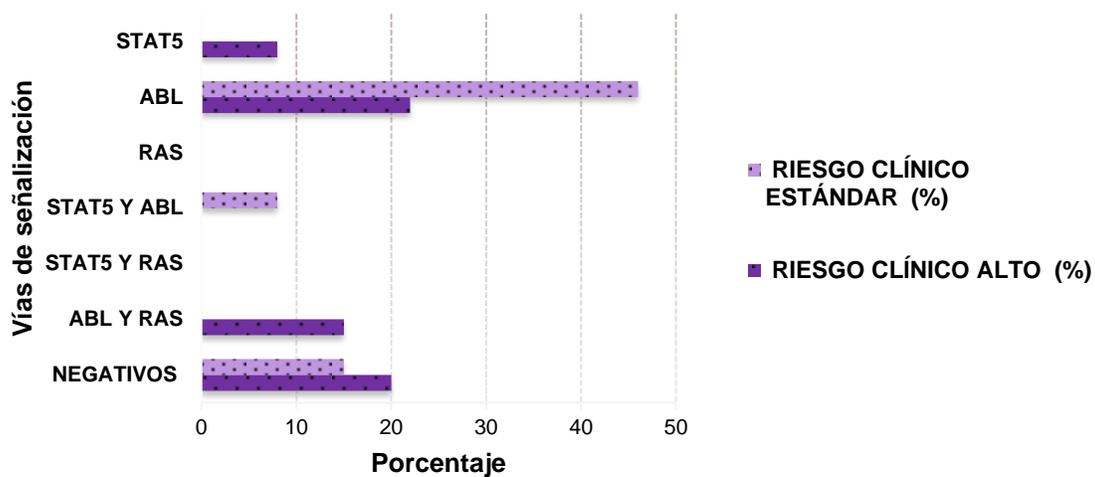


Figura 13. Frecuencia de activación de vías de señalización en pacientes clasificados por riesgo clínico estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ ) y alto ( $\geq 10$  años con o sin cuenta leucocitaria  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu\text{L}$ ).

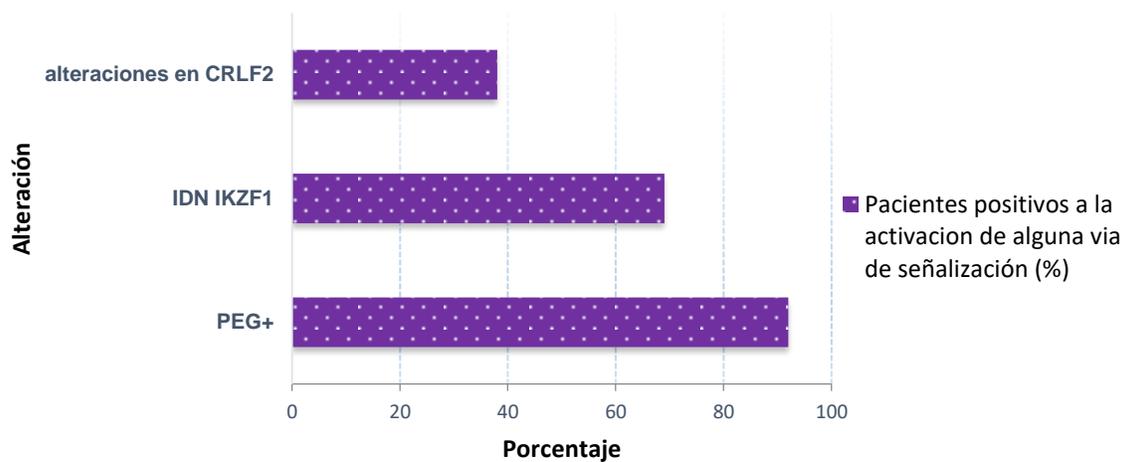


Figura 14. Frecuencia de alteraciones genéticas características del subtipo Ph-like de manera individual en pacientes "otros B" positivos para la activación de alguna de las vías de señalización ABL, JAK-STAT5 y RAS. IDN, isoforma dominante negativa; PEG, perfil de expresión génica.

**Cuadro 13. Alteraciones genéticas características del subtipo Ph-like en pacientes “otros B” positivos para la activación de alguna de las vías de señalización ABL, JAK-STAT5 y RAS.**

Paciente	IDN <i>IKZF1</i>	<i>CRLF2</i> más PEG+	IDN <i>IKZF1</i> más PEG+	<i>CRLF2</i> más IDN <i>IKZF1</i>	<i>CRLF2</i> más IDN <i>IKZF1</i> más PEG+
LLA 005		+			
LLA 020			+		
LLA 030			+		
LLA 047	+				
LLA 053			+		
LLA 058			+		
LLA 069			+		
LLA 072					+
LLA 073					+
LLA 114					+
LLA 156				+	
LLA 167	+				
LLA 188				+	

### 3.6 Frecuencia de alteraciones características del subtipo Philadelphia-like

Una vez realizado el análisis individual de las alteraciones referentes del subtipo Ph-like, se procedió a examinar los datos mediante diversas combinaciones entre los diferentes grupos de clasificación. La distribución por grupos de edad de riesgo alto y riesgo estándar con las diferentes combinaciones de las alteraciones estudiadas se muestran en el Cuadro 14.

**Cuadro 14. Frecuencia de alteraciones del subtipo Ph-like de pacientes “otros B” clasificados por edad de riesgo estándar y alto.**

Alteración genética	Riesgo estándar (1-9 años) n= 29		Riesgo alto (≥ 10 años) n=26	
	Resultado	Frecuencia	Resultado	Frecuencia
<i>CRLF2</i> alterado	P	62	P	54
	N	38	N	46
IDN	P	86	P	85
	N	14	N	15
PEG	P	72	P	62
	N	28	N	38
Vías STAT5 / ABL/ RAS	P	62	P	71
	N	38	N	29
<i>CRLF2</i> alterado, IDN	P	52	P	42
	N	48	N	58
<i>CRLF2</i> , PEG	P	45	P	35
	N	55	N	65
IDN, PEG	P	62	P	50
	N	38	N	50
IDN, PEG, <i>CRLF2</i> alterado	P	38	P	27
	N	62	N	73

Positivo para la alteración = P

Negativo para la alteración = N

*CRLF2* alterado = Sobreexpresión, *P2RY8-CRLF2* y/o *IGH-CRLF2*

IDN = isoformas dominantes negativas de *IKZF1*

PEG = perfil de expresión génica con ≥50% de genes con sobre-expresión

\*Frecuencias de vías de señalización obtenidas con base a los 20 pacientes que contaron con este dato

Los resultados de los pacientes clasificados por cuenta leucocitaria se presentan en el Cuadro 15, donde de manera individual se encontró mayor frecuencia de alteraciones en el grupo con cuenta leucocitaria de riesgo alto y al realizar las diferentes combinaciones se encontró de igual forma mayor frecuencia de alteraciones dentro de este grupo. El análisis estadístico, de estos datos no mostró significancias entre los grupos clasificados por cuenta leucocitaria y las diferentes combinaciones de alteraciones (*Chi-cuadrada*,  $p= 1, 0.5, 0.7, 0.8$ , respectivamente).

**Cuadro 15. Frecuencia de alteraciones del subtipo Ph-like de pacientes “otros B” clasificados por cuenta leucocitaria con riesgo estándar y alto.**

Alteración genética	Riesgo estándar ( $<5 \times 10^4$ células/ $\mu$ L) n= 39		Riesgo alto ( $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu$ L) n=16	
	Resultado	Frecuencia	Resultado	Frecuencia
<i>CRLF2</i> alterado	P	56	P	62
	N	44	N	38
IDN	P	87	P	81
	N	13	N	19
PEG	P	62	P	81
	N	38	N	19
Vías STAT5 / ABL/ RAS	P	67	P	67
	N	33	N	33
<i>CRLF2</i> alterado, IDN	P	46	P	50
	N	54	N	50
<i>CRLF2</i> , PEG	P	36	P	50
	N	64	N	50
IDN, PEG	P	54	P	63
	N	46	N	37
IDN, PEG, <i>CRLF2</i> alterado	P	31	P	37
	N	69	N	63

Positivo para la alteración = P

Negativo para la alteración = N

*CRLF2* alterado = Sobreexpresión, *P2RY8-CRLF2* y/o *IGH-CRLF2*

IDN = isoformas dominantes negativas de *IKZF1*

PEG = perfil de expresión génica con  $\geq 50\%$  de genes con sobre-expresión

\*Frecuencias de vías de señalización obtenidas con base a los 20 pacientes que contaron con este dato

Una vez realizado el análisis de las alteraciones sugerentes del subtipo Ph-like en los grupos clasificados por características clínicas, se determinó la frecuencia de las diferentes combinaciones de alteraciones en los dos grupos de riesgo clínico, de los datos obtenidos se observó de manera general una mayor frecuencia de alteraciones individuales del subtipo Ph-like en pacientes con riesgo estándar comparado con los clasificados con riesgo alto (Figura 15), las diferentes combinaciones de alteraciones se muestran en el Cuadro 16, encontrando una mayor frecuencia de las 3 alteraciones positivas (33%) en el grupo de riesgo alto y la presencia de alguna alteración en *CRLF2* con un PEG+ (42%), mientras que dentro del grupo de riesgo estándar se encontró a la presencia de alguna IDN de *IKZF1* con un PEG+ en el 59% (Figura 16) . No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las diferentes combinaciones y los grupos de riesgo clínico (*Chi-cuadrada*  $p= 1$ )

**Cuadro 16. Frecuencia de alteraciones del subtipo Ph-like en pacientes “otros B” con riesgo clínico estándar y alto.**

Alteración genética	Riesgo estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria $<5 \times 10^4$ células/ $\mu\text{L}$ ) n= 22		Riesgo alto ( $\geq 10$ años con o sin cuenta leucocitaria $\geq 5 \times 10^4$ células/ $\mu\text{L}$ ) n=33	
	Resultado	Frecuencia	Resultado	Frecuencia
<i>CRLF2</i> alterado	P	59	P	58
	N	41	N	42
IDN	P	82	P	88
	N	18	N	12
PEG	P	73	P	64
	N	27	N	36
Vías STAT5 / ABL/ RAS	P	64	P	67
	N	36	N	33
<i>CRLF2</i> alterado, IDN	P	45	P	45
	N	55	N	55
<i>CRLF2</i> , PEG	P	41	P	42
	N	59	N	58
IDN, PEG	P	59	P	55
	N	41	N	45
IDN, PEG, <i>CRLF2</i> alterado	P	32	P	33
	N	68	N	67

Positivo para la alteración = P

Negativo para la alteración = N

*CRLF2* alterado = Sobreexpresión, *P2RY8-CRLF2* y/o *IGH-CRLF2*

IDN = isoformas dominantes negativas de *IKZF1*

PEG = perfil de expresión génica con  $\geq 50\%$  de genes con sobre-expresión

\*Frecuencias de vías de señalización obtenidas con base a los 20 pacientes que contaron con este dato

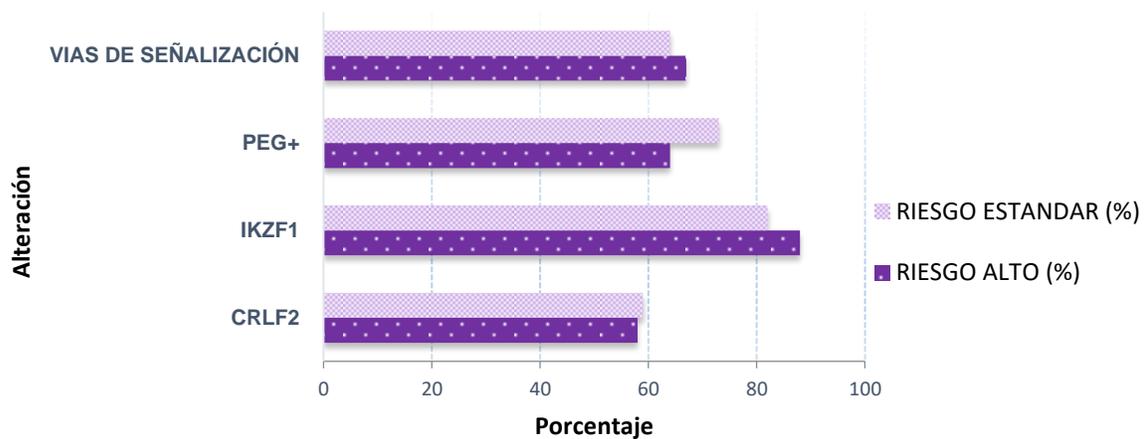


Figura 15. Frecuencia de alteraciones individuales en pacientes “otros B” pediátricos con riesgo clínico estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L) y alto ( $\geq 10$  años con o sin cuenta leucocitaria  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L). PEG+ (perfil de expresión génica positivo). \*Frecuencias de vías de señalización obtenidas con base a los 20 pacientes que contaron con este dato.

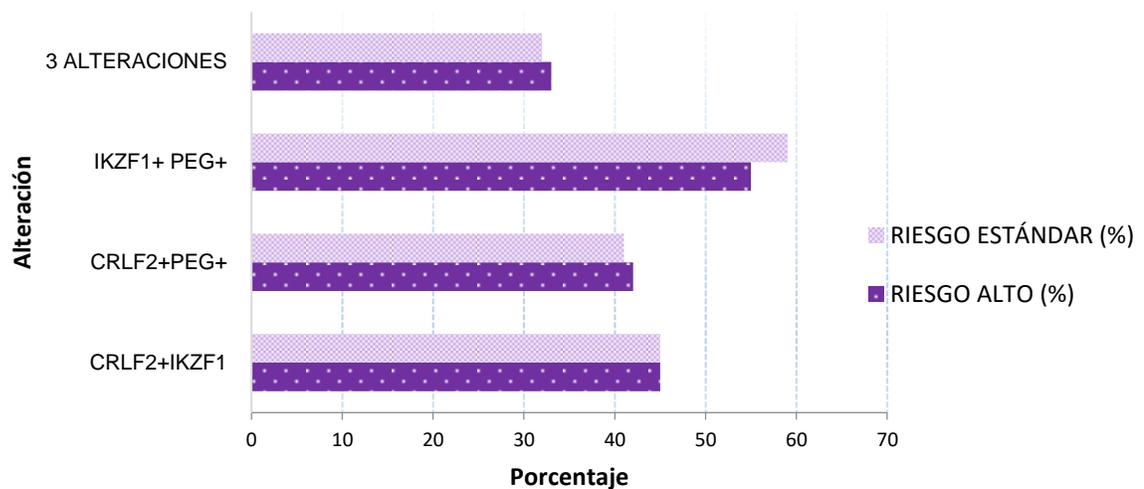


Figura 16. Frecuencia de combinaciones de alteraciones en pacientes “otros B” con riesgo clínico estándar (1-9 años y cuenta leucocitaria  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L) y alto ( $\geq 10$  años con o sin cuenta leucocitaria  $\geq 5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L). PEG+, perfil de expresión génica positivo.

#### 4. Discusión

La LLA es la principal causa de mortalidad por cáncer infantil a nivel mundial y se encuentra entre las principales causas de muerte por enfermedad en población pediátrica mexicana. Actualmente, en países desarrollados se alcanzan tasas de supervivencia de hasta un 80% en los pacientes con este padecimiento gracias a sistemas de clasificación de riesgo basados en las características clínicas, genéticas y moleculares, las cuales ayudan a ofrecer mejores esquemas de tratamiento (112,113). Sin embargo, el reciente conocimiento ha dado pauta al establecimiento de nuevos subtipos de LLA pre-B como es el subtipo Ph-like, el cual carece de una alteración genética centinela que permita su identificación directa, por lo cual dicho subtipo se ha referido como un grupo heterogéneo debido que presenta diferentes alteraciones que hacen que la identificación de los pacientes pertenecientes a este subtipo sea difícil.

En relación al cáncer, nuestro país ocupa el segundo lugar de mortalidad en niños y adolescentes (11,17). Estudios recientes muestran aumento de casos de leucemia y, a pesar de esto, aún ninguna institución de servicios de salud ha establecido algún método de diagnóstico para la identificación del subtipo Ph-like (114). Sumado a lo anterior, se ha encontrado al subtipo en población hispano-latina (89), por lo que existe una alta probabilidad de que este subtipo esté representado en población mexicana.

Recientemente, diversos grupos de investigación han detectado pacientes con subtipo Ph-like mediante técnicas genéticas y moleculares (72, 66,115). En el presente trabajo se analizaron distintos biomarcadores referidos para el subtipo Ph-like con el fin de conocer las frecuencias de estos en una muestra de la población mexicana y así identificar con base a las alteraciones presentes, aquellos pacientes que pudieran pertenecer al subtipo Ph-like.

#### **4.1 Candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like por perfil de expresión génica positivo**

El perfil de expresión génica propuesto en este trabajo para la identificación de pacientes pertenecientes al subtipo Ph-like se conformó por seis genes (*CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMPR1B* y *TSPNA7*), los cuales han formado parte de diferentes firmas de expresión para la clasificación del subtipo (63,64), aunado a esto, genes como *PON2*, *SEMA6A*, *BMPR1* e *IGJ*, han sido referidos por Ross y colaboradores para la clasificación del subtipo Ph positivo, confirmando así su utilidad para la identificación de casos a Ph-Like (116).

En este trabajo, en la población analizada se encontró que el 67% de los pacientes presentan un perfil de expresión génica sugerente del subtipo Ph-like (50% o más de los genes sobre expresados). La identificación de este subtipo surgió a partir de estudios de expresión génica por medio de micro-arreglos de expresión, a partir de estos primeros estudios se han propuesto diferentes perfiles de expresión génica para la determinación del subtipo Ph-like, el primer perfil de expresión predictor del subtipo está conformado por 15 genes (67); recientemente se han dado nuevas propuestas con 9, 8 y 10 genes (66, 117,118). Debido a la diversidad genética entre poblaciones (65), resulta importante la identificación de un perfil óptimo para poder clasificar a pacientes en nuestra población, sin embargo el perfil de expresión génica propuesto en el presente trabajo cuenta con el estudio de seis genes referidos dentro de diferentes perfiles de expresión, y podría tener la limitante de no identificar pacientes pertenecientes al subtipo (falsos negativos), para subsanar esta limitante, se analizaron otras alteraciones genéticas características descritas para este subtipo y con estos datos hacer una correlación y determinar con mayor precisión los pacientes pertenecientes al subtipo, por otro lado, se propone ampliar los genes del perfil de expresión incluyendo genes como son *MUC4* y *CA6*, los cuales han sido utilizados en diferentes firmas de expresión para la clasificación del subtipo Ph-like (64, 116,119).

Los pacientes pertenecientes al subtipo Ph-like en su mayoría cuentan con características clínicas de riesgo alto lo cual les ha conferido un pronóstico desfavorable (63, 64, 97). De manera interesante y contrario a lo esperado, en la población de este trabajo se encontró mayor frecuencia de pacientes con un PEG+ con características clínicas de riesgo estándar, al ser analizadas de manera independiente la edad y la cuenta leucocitaria, encontramos que 21 de los 37 pacientes que con un PEG+, presentaron edad de entre 1 a 9 años, mientras que 24 con cuenta leucocitaria  $<5 \times 10^4$  células/ $\mu$ L, sin embargo, al considerar la clasificación de riesgo clínico se observó una mayor frecuencia de pacientes con riesgo alto positivos al perfil (57%), lo cual se asemeja a lo referido en la literatura (63,64). El perfil de expresión génica propuesto en este trabajo para la clasificación subtipo Ph-like permitió identificar pacientes con estas características en ambos grupos de riesgo clínico.

#### **4.2 Candidatos Ph-like por alteraciones en *CRLF2***

En contraste con los subtipos genéticos recurrentes de la LLA, los cuales pueden ser clasificados por la presencia de algún re arreglo cromosómico particular, el subtipo Ph-like se ha referido con un panorama genómico complejo con diversas alteraciones genéticas y moleculares que desregulan a varias clases de receptores de citocinas, dentro de estas alteraciones se han referido aquellas que afectan al gen *CRLF2* con frecuencia aproximada de 50%. Las alteraciones que se presentan con mayor frecuencia se encuentran la delección que forma la fusión génica *P2RY8-CRLF2* y la translocación *IGH-CRLF2* (75, 86). En este trabajo se encontró que el 58% de los pacientes tienen alguna alteración del gen *CRLF2*, específicamente el 7% presentó la delección *P2RY8-CRLF2* más la sobre expresión del gen *CRLF2* y el 7% tuvieron la translocación *IGH-CRLF2* más la sobre expresión de *CRLF2*, coincidiendo con lo referido para las alteraciones del subtipo Ph-like (72,102) ya que estas alteraciones genéticas dan como resultado la sobre expresión de *CRLF2*, sin embargo dentro de nuestra población se presentaron casos con el arreglo *P2RY8-CRLF2* que no estuvieron acompañadas de la sobre expresión del gen; lo anterior puede ser explicado por la presencia de la alteración en clonas leucémicas minoritarias (110). Por otro lado, se encontraron pacientes con sobre expresión del

transcrito del gen *CRLF2*, pero sin la presencia de los arreglos *P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2*, esto se puede deber probablemente a la presencia de otras mutaciones o alteraciones que afectan directamente al gen.

En un estudio realizado por Herold en 2017, se refiere a la translocación *IGH-CRLF2* como una alteración que por sí sola determina la pertenencia al subtipo Ph-like, dicha translocación se presentó en el 11% de nuestra población, por lo que estos pacientes se lograron clasificar directamente con el subtipo Ph-like (120). Por otro lado, la delección *P2RY8-CRLF2* se presentó en más del 50% de los pacientes que contaron con alguna alteración en *CRLF2*, esta alteración se ha reportado con una alta frecuencia en niños, además de que se ha referido por Richard, 2010 en pacientes Ph-like, sin embargo, la presencia de esta alteración no determina de manera directa la pertenencia al subtipo, por lo que estos pacientes son fuertes candidatos a pertenecer al subtipo (86,89).

#### **4.3 Isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1* en pacientes candidatos Ph-like**

Las alteraciones en el gen *CRLF2* son un marcador indicativo de LLA del subtipo Ph-like, es importante considerar que los pacientes que albergan alguna alteración en dicho gen, suelen estar acompañados de alteraciones en el gen *IKZF1*, las cuales están asociadas con mal pronóstico en pacientes Ph-like (72,63,64), cabe resaltar que en un estudio realizado por Van der Veer en 2013, encontró a la firma génica del subtipo Ph-like y a las delecciones del gen *IKZF1*, como marcadores independientes de mal pronóstico (114). Dentro del presente estudio se encontró que el 85% de los pacientes pediátricos mexicanos estudiados contaron con al menos una de las isoformas dominantes negativas del gen *IKZF1*, lo cual es mayor comparado con lo referido en la literatura para pacientes Ph-like (40%) (90,100, 121). Por otro lado, dentro de los pacientes positivos a la presencia de IDN de *IKZF1*, encontramos que la mayor parte corresponden a una clasificación de riesgo clínico alto, sin embargo, también se presentaron pacientes positivos para esta alteración

dentro del grupo de riesgo estándar, lo anterior sugiere la tendencia a un pronóstico adverso en los pacientes con LLA pre-B positivos a esta alteración, independiente de las características clínicas, como lo refieren algunos autores (90, 122,123).

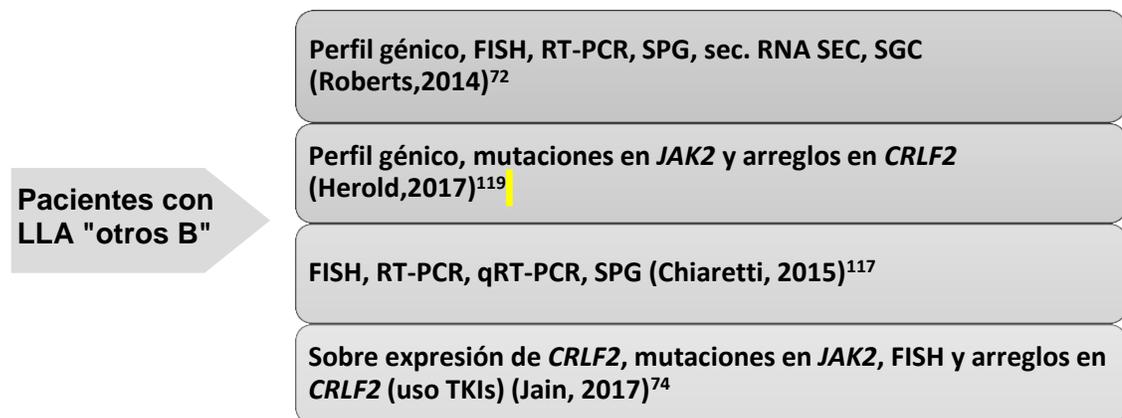
#### **4.4 Vías de señalización en pacientes candidatos Ph-like**

La principal alteración de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda del subtipo Ph-like es la alteración en cinasas que causa una activación de las vías de señalización, por esta razón se ha tenido principal interés en la búsqueda de estrategias terapéuticas específicas de estas vías de señalización alteradas, siendo utilizadas como blancos terapéuticos mediante el uso de inhibidores de tirosina cinasa como son imatinib, dasatinib y ruxolitinib. Dentro de las alteraciones en cinasas que se presentan con una mayor frecuencia en el subtipo Ph-like se encuentran los re arreglos en genes de la case ABL, secuencia de mutaciones o deleciones involucradas en la activación de las vías JAK-STAT, así como mutaciones en genes involucrados en la vía de señalización RAS (72,74,98). La determinación del estado de activación de estas vías de señalización resulta importante por la posibilidad de aplicar terapias dirigidas, por lo que ha sido estudiada ampliamente con el fin de encontrar una alternativa de tratamiento, sin embargo, dentro del presente estudio proponemos el estudio de la activación de vías de señalización como una nueva alternativa directa para la clasificación de paciente Ph-like. La determinación de las vías de señalización se realizó de manera parcial en la población por no contar con suficiente material biológico para este ensayo, nuestro resultados mostraron que el 24% de los pacientes estudiados fueron positivos a la activación de alguna de las vías mencionadas, con lo que podemos decir que pertenecen al subtipo Ph-like, la vía de ABL se presentó con una mayor frecuencia dentro de nuestra población, seguido por la activación de la vía JAK-STAT5, de manera interesante encontramos a un paciente con activación de dos vías de señalización (ABL y JAK-STAT5), mientras que otro paciente presento activas las vías ABL y RAS. Las causas que provocan esta alteración en vías de

señalización son muy heterogéneas, pues se involucran diversos genes que intervienen con la activación de la señalización, en nuestro estudio encontramos que cerca del 50% de los pacientes positivos a la activación de señalización, presentó alguna alteración en el receptor de citocinas *CRLF2*. Una limitante de nuestro estudio es que no se pudo realizar en toda la población, el estudio de activación de la señalización, y no se pudo determinar de manera directa la pertenencia al subtipo Ph-like de todos los pacientes, sin embargo, se consideraron los diferentes parámetros genéticos estudiados para poder clasificar a los pacientes y su pertenencia al subtipo Ph-like.

#### 4.5 Propuesta de algoritmo para la clasificación de pacientes con LLA del subtipo Ph-like.

El subtipo Ph-like se ha descrito como un grupo con alteraciones sumamente heterogéneas, lo cual ha llevado a diversos grupos de investigación a proponer además del uso de un perfil de expresión génica, técnicas genéticas y moleculares para su clasificación, lo cual ha generado diversos algoritmos (72,74, 119), basados en la búsqueda de las alteraciones referidas para el subtipo (Figura 17).



**Figura 17. Estrategias propuestas para la identificación del subtipo Ph-like.** Las metodologías empleadas son enfocadas en diferentes procesos y componentes celulares. Las dos primeras alternativas se basan en la evaluación directa del DNA (FISH, hibridación fluorescente *in situ*; SGC, secuenciación de genoma completo; SPG, secuenciación de próxima generación). En la tercera por la evaluación de la expresión génica (RT-PCR, transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa; secuenciación de RNA; SEC, secuenciación de exoma completo) y en la

Con base en las alteraciones referidas para el subtipo Ph-like, proponemos el siguiente algoritmo para su clasificación (Figura 18). Las muestras con diagnóstico de LLA pre-B y negativas al estudio de translocaciones comunes por medio de inmunofenotipo se les realizan como primera alternativa de clasificación el estudio del perfil de expresión génica propuesto (*CRLF2*, *SEMA6A*, *PON2*, *IGJ*, *BMP1B*, *TSPN17*) por medio de la técnica de RT-PCR, si el resultado es un PEG positivo ( $\geq 50\%$  de genes con sobre expresión) se considera como candidato a pertenecer al subtipo, si dentro de los genes con sobre expresión se encuentra al gen *CRLF2* y si se cuenta con suficiente material genético se procede a realizar el estudio de la presencia de alguna IDN de *IKZF1*, por medio de una PCR anidada si el resultado es positivo, se clasifica como perteneciente al subtipo Ph-like.

Otra alternativa para la clasificación del subtipo Ph-like dentro del algoritmo propuesto, es la búsqueda de sobre expresión del transcrito de *CRLF2*, si el resultado es positivo y si se cuenta con muestra necesaria se realiza la búsqueda de la delección *P2RY8-CRLF2* mediante RT-PCR punto final, si la muestra presenta dicha alteración se considera como fuerte candidato a pertenecer al subtipo Ph-like y si se cuenta con material genético disponible se busca alguna IDN de *IKZF1* para su confirmación, si el resultado de la búsqueda del re arreglo *P2RY8-CRLF2* es negativo, pero presenta sobre expresión de *CRLF2* se procede a realizar el estudio de un PEG.

La siguiente alternativa que se propone para la búsqueda de pacientes pertenecientes al subtipo Ph-like, se basa en la presencia inicial de sobre expresión de *CRLF2*, la cual si resulta positiva se procede a estudiar a la translocación *IGH-CRLF2*, por medio de la técnica de FISH, si el resultado es positivo, confirma a los pacientes Ph-like, por el contrario y si se cuenta con material biológico disponible se procede a la búsqueda de la delección *P2RY8-CRLF2*.

Dentro del presente trabajo, se propone al estudio de la activación de vías de señalización JAK-STAT5, ABL o RAS como un parámetro clasificatorio del subtipo Ph-like, por medio de la técnica de citometría de flujo, la presencia de la activación de alguna vía confirma a los pacientes Ph-like, por el contrario, si el resultado es negativo y si se cuenta con material biológico disponible se procede a la búsqueda de alteraciones por medio de las alternativas restantes. Es importante mencionar, que el objetivo de proponer diferentes alternativas de clasificación, se basa en el material genético disponible, ya que para cada técnica empleada se requiere de un número de células específico, y no siempre se logra contar con ella para todos los estudios. Aunado a lo anterior no todas las alteraciones del subtipo Ph-like serán detectadas por este algoritmo (línea punteada). La evaluación completa puede requerir ensayos alternativos para la detección de mutaciones en JAK1/2 e IL7R mediante PCR o reordenamientos en ABL por PCR multiplex o por secuenciación de ARN (Figura 18).

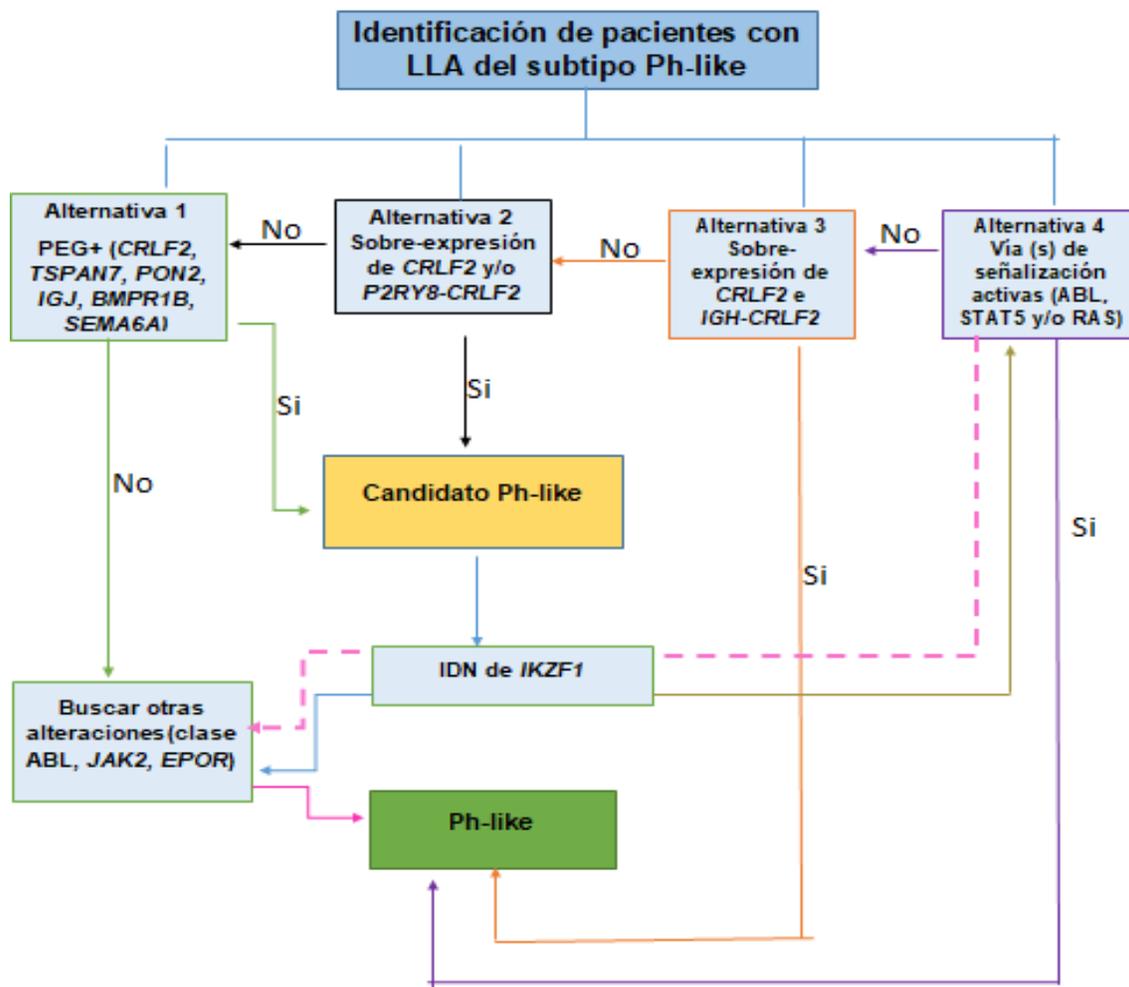


Figura 18. Propuesta de algoritmo para la clasificación de pacientes con leucemia linfoblástica aguda del subtipo Ph-like.

De acuerdo a las alternativas de clasificación del algoritmo propuesto, se encontró que el 35% de nuestra población pertenecen al subtipo Ph-like por la presencia de la translocación *IGH-CRLF2* con o sin la activación de alguna de las vías de señalización JAK-JAK-STAT5, ABL1 y RAS. Esta confirmación del subtipo se obtuvo de manera directa, por medio de las alternativas tres y cuatro, las cuales se basan en la presencia de la sobre expresión de *CRLF2* además de la translocación *IGH-CRLF2* (11%), y el 24% de los pacientes se identificó como Ph-like por la presencia

de alguna vía de señalización activa, es relevante mencionar que la presencia de un PEG positivo, así como alguna IDN de *IKZF1* se presentaron con mayor frecuencia dentro de los pacientes de este grupo. En cuanto al riesgo clínico de los pacientes Ph-like el 53% se estratificó con riesgo alto y el 47% con riesgo estándar.

Siguiendo con el algoritmo, el 22% del total de nuestra población tienen características Ph-like por lo que son considerados fuertes candidatos a pertenecer al subtipo. De estos pacientes y de acuerdo a la primera alternativa (PEG positivo, más alguna alteración en *CRLF2*, además de la presencia de alguna IDN de *IKZF1*) el 20% de los pacientes son fuertes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like. A través de la segunda alternativa de clasificación, el 2% resultó positivo para la sobre expresión de *CRLF2* acompañado de la delección *P2RY8-CRLF2* además de presentar alguna IDN de *IKZF*. De estos pacientes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like, el 42% se clasificó con riesgo alto y el 58% con riesgo estándar. De acuerdo a la primera alternativa (PEG positivo, más alguna alteración en *CRLF2*, además de la presencia de alguna IDN de *IKZF1*) el 20% de los pacientes son fuertes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like, los cuales pueden ser constatados mediante el estudio de las alternativas que confirman al subtipo, por medio de la segunda alternativa, un paciente (2%) resulto positivo para la sobre expresión de *CRLF2* acompañado de la delección *P2RY8-CRLF2* además de presentar alguna IDN de *IKZF*, donde la confirmación de pertenencia al subtipo de este paciente puede estar dada por la búsqueda de la activación de la vía de señalización JAK-STAT5.

Por otro lado, se ha referido que el subtipo Philadelphia-like tiene un pronóstico pobre de acuerdo con estudios de sobrevida libre de eventos, dentro de los eventos adversos que dan este mal pronóstico se consideran las recaídas (63, 64, 99, 119, 124), de manera interesante, dentro de los pacientes clasificados como Ph-like se encontró que seis pacientes presentaron recaída, agrupándose con mayor

frecuencia dentro del grupo de riesgo alto comparado con los pacientes de riesgo estándar.

Con base en nuestros resultados se puede decir que nuestro estudio demuestra que la presencia de alteraciones características del subtipo Ph-like se encuentran en ambos grupos de riesgo clínico estudiados, lo cual refleja que el riesgo clínico no es determinante para presentar con una mayor frecuencia las alteraciones genéticas y bioquímicas características del subtipo Ph-like.

## 5. Conclusiones

- Se logró la clasificación de pacientes con LLA pre-B en grupos de riesgo clínico y su pertenencia al subtipo Ph-like por presentar características genéticas y bioquímicas referentes para el subtipo.
- El perfil de expresión génica, las alteraciones del gen *CRLF2*, las isoformas dominantes negativas de *IKZF1* y la activación de vías de señalización, se encuentran sin diferencias significativas en los grupos de riesgo clínico estándar y alto.

## 6. Perspectivas

- Proponer el estudio de la activación de vías de señalización así como la detección de la translocación *IGH-CRLF2* como parámetros confirmativos del subtipo Philadelphia-like, para integrarlos a los estudios realizados para un diagnóstico inicial de LLA, y así mejorar la clasificación y la estratificación de riesgo de los pacientes.
- Incrementar en la sensibilidad de la firma de expresión propuesta integrando al panel, genes relevantes para el subtipo Ph-like como son *MUC4* y *CA6* (64, 66,116).
- Realizar análisis complementarios como la búsqueda de alteraciones genéticas en ABL, JAK2 y EPOR, que ayuden a confirmar la pertenencia al subtipo Ph-like de los pacientes que fueron clasificados como fuertes candidatos Ph-like.
- Realizar estudios clínicos para establecer la posibilidad de incorporar a la terapia farmacológica a los inhibidores de tirosina cinasa específicos en los pacientes Ph-like, de acuerdo a la vía de señalización alterada.

## 7. Bibliografía

1. Garza Salazar, J. G., & Juárez Sánchez, P. (2013). El cáncer, (p.17). Publicaciones de Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México.
2. Muñoz, A. (1997). *Cáncer: genes y nuevas terapias*, Vol. 2 (p.7). Editorial Hélice, España.
3. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), (pp. 394-424).
4. McGuire, S. (2016). World cancer report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO Press, 2015 (pp.418-419).
5. Instituto Nacional de Estadística. Geografía e Informática. (2018). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Disponible en: [http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018\\_Nal.pdf](http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_Nal.pdf)
6. Pérez-Cuevas, R., Doubova, S. V., Zapata-Tarres, M., Flores-Hernández, S., Frazier, L., Rodríguez-Galindo, C., & Muñoz-Hernández, O. (2013). Scaling up cancer care for children without medical insurance in developing countries: the case of Mexico. *Pediatric blood & cancer*, 60(2), (pp.196-203).
7. Young Jr, J. L., Ries, L. G., Silverberg, E., Horm, J. W., & Miller, R. W. (1986). Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer*, 58(S2 S2), (pp. 598-602).
8. Pui CH (2009). Acute lymphoblastic leukemia. introduction. *Seminars in Hematology*, 46(1), (pp23-26). PubMed PMID: 19100362; PubMed Central PMCID: PMC2638983.
9. Harrison, C. J. (2011). Acute lymphoblastic leukemia. *Clinics in laboratory medicine*, 31(4), (pp. 631-647).
10. Redaelli, A., Laskin, B. L., Stephens, J. M., Botteman, M. F., & Pashos, C. L. (2005). A systematic literature review of the clinical and epidemiological burden of acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *European journal of cancer care*, 13(3), (pp. 53-62).
11. Rivera-Luna, R., Correa-González, C., Altamirano-Alvarez, E., Sánchez-Zubieta, F., Cárdenas-Cardós, R., Escamilla-Asian, G., & Aguilar-Romo, M. (2013). Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International journal of cancer*, 132(7), (pp. 1646-1650).
12. Chiaretti, S., Zini, G., & Bassan, R. (2014). Diagnosis and subclassification of acute lymphoblastic leukemia. *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*, 6(1).
13. Jiménez-Morales, S., Hidalgo-Miranda, A., & Ramírez-Bello, J. (2017). Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 74(1), (pp.13-26).

14. Bennett, J. M., Catovsky, D., Daniel, M. T., Flandrin, G., Galton, D. A., Gralnick, H. R., & Sultan, C. (1976). Proposals for the classification of the acute leukaemias French-American-British (FAB) co-operative group. *British journal of hematology*, 33(4), (pp. 451-458).
15. Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., & Jaffe, E. S. (2011). The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 117 (19), (pp. 5019-5032).
16. First, M. I. C. (1986). Cooperative Study Group: Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias. *Cancer Genet Cytogenetics*, 23(189), (pp. 189-197).
17. Dorantes-Acosta, E., Zapata-Tarrés, M., Miranda-Lora, A., Medina-Sansón, A., Reyes-López, A., del Castillo, H. P., & Garduño-Espinosa, J. (2012). Comparación de las características clínicas al diagnóstico de niños con leucemia linfoblástica aguda afiliados al Seguro Popular, con respecto al desenlace. *Boletín médico del Hospital Infantil de México*, 69(3), (pp. 190-196).
18. Mrozek, K., Harper, D. P., & Aplan, P. D. (2009). Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics*, 23(5), (pp.991-1010).
19. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Harbott J, Ludwig WD, Henze G, et al (2000). Long term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M et al. *Leukemia*. Dec; 14(12), (pp. 2205-2222).
20. Panzer-Grümayer ER, Fascina K, Panzer S, Hettinger K, Schmitt K, Stöckler-Ipsiroglu S, et al. (2002). Nondisjunction of chromosomes leading to hyperdiploid childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia is an early event during leukemogenesis. *Blood*. 100(1), (pp. 347-349).
21. Williams DL, Tsiatis A, Brodeur GM, Look AT, Melvin SL, Bowman WP, Kalwinsky DK, Rivera G, Dahl GV (1982). Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 60 (4), (pp. 864-871).
22. Secker-Walker LM, Swansbury GJ, Hardisty RM, Sallan SE, Carson OM, Sakurai M, Lawler SD (1982). Cytogenetics of acute lymphoblastic leukemia in children as a factor in the prediction of long-term survival. *British Journal of Haematology* 52 (3), (pp. 389-399).
23. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. 2004b. Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. Disponible en <http://cgap.nci.nih.gov/>
24. Paulsson, K., Mörse, H., Fioretos, T., Behrendtz, M., Strömbeck, B., & Johansson, B. (2005). Evidence for a single-step mechanism in the origin of hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 44(2), (pp.113-122).
25. Harrison, C. J., Moorman, A. V., Broadfield, Z. J., Cheung, K. L., Harris, R. L., Reza Jalali, G., & Eden, T. O. (2004). Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *British journal of hematology*, 125(5), (pp. 552-559).

26. Nachman, J. B., Heerema, N. A., Sather, H., Camitta, B., Forestier, E., Harrison, C. J., & Silverman, L. B. (2007). Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *110*(4), (pp. 1112-1115).
27. Heerema, N. A., Nachman, J. B., Sather, H. N., Sensel, M. G., Lee, M. K., Hutchinson, R., ... & Uckun, F. (1999). Hypodiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the children's cancer group. *Blood*, *94*(12), (pp. 4036-4045).
28. Gibbons, B., MacCallum, P., Watts, E., Rohatiner, A. Z., Webb, D., Katz, F. E., & Campbell, R. H. (1991). Near haploid acute lymphoblastic leukemia: seven new cases and a review of the literature. *Leukemia*, *5*(9), (pp. 738-743).
29. Chessells, J. M., Swansbury, G. J., Reeves, B., Bailey, C. C., Richards, S. M., & Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. (1997). Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukaemia: results of MRC UKALL X. *British journal of hematology*, *99*(1), (pp. 93-100).
30. Martín, M. R., Fernández, F. M., & Barreiro, E. M. (2001). Cytogenetic abnormalities in acute lymphoblastic leukemia. *Anales españoles de pediatría*, *55*(1), (pp. 45-52).
31. Raynaud, S., Cave, H., Baens, M., Bastard, C., Cacheux, V., Grosgeorge, J., & Grandchamp, B. (1996). The 12; 21 translocation involving *TEL* and deletion of the other *TEL* allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *87*(7), (pp. 2891-2899).
32. Sun, C., Chang, L., & Zhu, X. (2017). Pathogenesis of *ETV6/RUNX1*-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget*, *8*(21), (p. 35445).
33. Golub, T. R., Barker, G. F., Bohlander, S. K., Hiebert, S. W., Ward, D. C., Bray-Ward, P., & Gilliland, D. G. (1995). Fusion of the *TEL* gene on 12p13 to the *AML1* gene on t(21;q22) in acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *92*(11), (pp. 4917-4921).
34. Bhojwani, D., Pei, D., Sandlund, J. T., Jeha, S., Ribeiro, R. C., Rubnitz, J. E., & Coustan-Smith, E. (2012). *ETV6-RUNX1*-positive childhood acute lymphoblastic leukemia: improved outcome with contemporary therapy. *Leukemia*, *26*(2), (p. 265).
35. Carroll, A. J., Crist, W. M., Parmley, R. T., Roper, M., Cooper, M. D., & Finley, W. H. (1984). Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1; 19. *Blood*, *63*(3), (pp. 721-724).
36. Burmeister, T., Gökbuget, N., Schwartz, S., Fischer, L., Hubert, D., Sindram, A., & Thiel, E. (2010). Clinical features and prognostic implications of *TCF3-PBX1* and *ETV6-RUNX1* in adult acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, *95*(2), (pp. 241-246).

37. Crist WM, Carroll AJ, Shuster JJ, Behm FG, Whitehead M, Vietti TJ, et al (1990). Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19) (q23; p13): A Pediatric Oncology Group study. *Blood*; 76 (1), (pp.117-122).
38. Pui, C. H., Raimondi, S. C., Hancock, M. L., Rivera, G. K., Ribeiro, R. C., Mahmoud, H. H., ... & Behm, F. G. (1994). Immunologic, cytogenetic, and clinical characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(1;19)(q23; p13) or its derivative. *Journal of Clinical Oncology*, 12(12), (pp. 2601-2606).
39. Hunger, S. P., Fall, M. Z., Camitta, B. M., Carroll, A. J., Link, M. P., Lauer, S. J., ... & Cleary, M. L. (1998). *E2A-PBX1* chimeric transcript status at end of consolidation is not predictive of treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemias with at (1; 19) (q23; p13): A Pediatric Oncology Group study. *Blood*, 91(3), (pp. 1021-1028).
40. Borkhardt, A., Cazzaniga, G., Viehmann, S., Valsecchi, M. G., Ludwig, W. D., Burci, L., & Basso, G. (1997). Incidence and clinical relevance of *TEL/AML1* fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood*, 90(2), (pp. 571-577).
41. Hermans, A., Heisterkamp, N., von Lindern, M., van Baal, S., Meijer, D., van der Plas, D., & Grosveld, G. (1987). Unique fusion of *BCR* and *c-ABL* genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, 51(1), (pp. 33-40).
42. Fentie, A. M., Woldu, M. A., & Worku, B. A. (2017). Current Management Approaches of Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer Sci Ther*, 9, (pp. 595-607).
43. Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., & Grosveld, G. (1985). Structural organization of the *BCR* gene and its role in the Ph' translocation. *Nature*, 315(6022), (p. 758).
44. Kurzrock, R., Gutterman, J. U., & Talpaz, M. (1988). The molecular genetics of Philadelphia chromosome–positive leukemias. *New England Journal of Medicine*, 319(15), (pp.990-998).
45. Bhojwani, D., Yang, J. J., & Pui, C. H. (2015). Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics*, 62(1), (pp. 47-60).
46. Aricò, M., Valsecchi, M. G., Camitta, B., Schrappe, M., Chessells, J., Baruchel, A., & Pui, C. H. (2000). Outcome of treatment in children with Philadelphia chromosome–positive acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 342(14), (pp. 998-1006).
47. Shah, N. P., Tran, C., Lee, F. Y., Chen, P., Norris, D., & Sawyers, C. L. (2004). Overriding imatinib resistance with a novel ABL kinase inhibitor. *Science*, 305(5682), (pp. 399-401).
48. Ravandi, F., O'Brien, S., Thomas, D., Faderl, S., Jones, D., Garris, R., & Borthakur, G. (2010). First report of phase 2 study of dasatinib with hyper-CVAD for the frontline treatment of patients with Philadelphia chromosome–positive (Ph+) acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 116(12), (pp. 2070-2077).

49. Woo, J. S., Alberti, M. O., & Tirado, C. A. (2014). Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Experimental hematology & oncology*, 3(1), (p.16).
50. Chessells, J. M., Harrison, C. J., Kempster, H., Webb, D. K. H., Wheatley, K., Hann, I. M., ... & Gibson, B. E. (2002). Clinical features, cytogenetics and outcome in acute lymphoblastic and myeloid leukaemia of infancy: report from the MRC Childhood Leukaemia working party. *Leukemia*, 16(5), (p.776).
51. Armstrong, S. A., Staunton, J. E., Silverman, L. B., Pieters, R., den Boer, M. L., Minden, M. D., ... & Korsmeyer, S. J. (2001). *MLL* translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nature genetics*, 30(1), (p. 41).
52. Pieters, R., Den Boer, M. L., Durian, M., Janka, G., Schmiegelow, K., Kaspers, G. J. L., & Veerman, A. J. P. (1998). Relation between age, immunophenotype and in vitro drug resistance in 395 children with acute lymphoblastic leukemia—implications for treatment of infants. *Leukemia*, 12(9), (p. 1344).
53. Hammond, D., Sather, H., Nesbit, M., Miller, D., Coccia, P., Bleyer, A., & Siegel, S. (1986). Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Medical and pediatric oncology*, 14(3), (pp. 124-134).
54. Pui, C. H., Campana, D., & Evans, W. E. (2001). Childhood acute lymphoblastic leukaemia—current status and future perspectives. *The Lancet Oncology*, 2(10), (pp. 597-607).
55. Smith, M., Arthur, D., Camitta, B., Carroll, A. J., Crist, W., Gaynor, P., & Murphy, S. (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 14(1), (pp.18-24).
56. Carroll, W. L., Bhojwani, D., Min, D. J., Raetz, E., Relling, M., Davies, S., & Reed, J. C. (2003). Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *ASH Education Program Book*, 2003(1), (pp.102-131).
57. Wetzler, M., Dodge, R. K., Mrózek, K., Stewart, C. C., Carroll, A. J., Tantravahi, R., & Bloomfield, C. D. (2004). Additional cytogenetic abnormalities in adults with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia: a study of the Cancer and Leukaemia Group B. *British journal of haematology*, 124(3), (pp.275-288).
58. Heerema, N. A., Harbott, J., Galimberti, S., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Janka-Schaub, G., & Auclerc, M. F. (2004). Secondary cytogenetic aberrations in childhood Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia are nonrandom and may be associated with outcome. *Leukemia*, 18(4), (p.693).
59. Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., & Relling, M. V. (2008). *BCR-ABL1* lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 453(7191), (p.110).

60. Georgopoulos, K., Bigby, M., Wang, J. H., Molnar, A., Wu, P., Winandy, S., & Sharpe, A. (1994). The *Ikaros* gene is required for the development of all lymphoid lineages. *Cell*, *79*(1), (pp.143-156).
61. Lacobucci, I., Storlazzi, C. T., Cilloni, D., Lonetti, A., Ottaviani, E., Soverini, S., & Impera, L. (2009). Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the *IKZF1* gene in a large cohort of *BCR-ABL1*-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood*, *114*(10), (pp.2159-2167).
62. Pui, C. H., Sandlund, J. T., Pei, D., Campana, D., Rivera, G. K., Ribeiro, R. C., & Cheng, C. (2004). Improved outcome for children with acute lymphoblastic leukemia: results of Total Therapy Study XIII B at St Jude Children's Research Hospital. *Blood*, *104*(9), (pp.2690-2696).
63. Den Boer, M. L., van Slegtenhorst, M., De Menezes, R. X., Cheok, M. H., Buijs-Gladdines, J. G., Peters, S. T., ... & Horstmann, M. A. (2009). A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology*, *10*(2), (pp.125-134).
64. Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Wang, X., Dobbin, K. K., Davidson, G. S., Bedrick, E. J., & Wilson, C. S. (2010). Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*, *116*(23), (pp.4874-4884).
65. Boer, J. M., Marchante, J. R., Evans, W. E., Horstmann, M. A., Escherich, G., Pieters, R., & Den Boer, M. L. (2015). *BCR-ABL1*-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. *Haematologica*, *100*(9), (p.354).
66. Reshmi, S. C., Harvey, R. C., Roberts, K. G., Stonerock, E., Smith, A., Jenkins, H., Chen, I., Valentine, M., Liu, Y., Li, Y., Shao, Y., Easton, J., Payne-Turner, D., Gu, Z., Tran, T. H., Nguyen, J. V., Devidas, M., Dai, Y., Heerema, N. A., Carroll, A. J., Raetz, E. A., Borowitz, M. J., Wood, B. L., Angiolillo, A. L., Burke, M. J., Salzer, W. L., Zweidler-McKay, P. A., Rabin, K. R., Carroll, W. L., Zhang, J., Loh, M. L., Mullighan, C. G., Willman, C. L., Gastier-Foster, J. M., & Hunger, S. P. (2017). Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood*, *129*(25), (pp. 3352-3361).
67. Kang, H., Roberts, K. G., Chen, I. M. L., Atlas, S. R., Bedrick, E. J., Gastier-Foster, J. M., ... & Raetz, E. A. (2013). Development and validation of a highly sensitive and specific gene expression classifier to prospectively screen and identify B-precursor acute lymphoblastic leukemia (ALL) patients with a Philadelphia chromosome-like ("Ph-like" or "*BCR-ABL1*-like") signature for therapeutic targeting and clinical intervention (p. 826).
68. Hoffmann, K., Firth, M. J., Beesley, A. H., Freitas, J. R., Ford, J., Senanayake, S., & Kees, U. R. (2008). Prediction of relapse in pediatric pre-B acute lymphoblastic leukaemia using a three-gene risk index. *British journal of haematology*, *140*(6), (pp.656-664).

69. Kang, H., Chen, I. M., Wilson, C. S., Bedrick, E. J., Harvey, R. C., Atlas, S. R., & Ar, K. (2010). Gene expression classifiers for relapse-free survival and minimal residual disease improve risk classification and outcome prediction in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *115*(7), (pp.1394-1405).
70. Arber, D. A., Orazi, A., Hasserjian, R., Thiele, J., Borowitz, M. J., Le Beau, M. M., & Vardiman, J. W. (2016). The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, *127*(20), (pp.2391-2405).
71. Herold, T., Baldus, C. D., & Gökbuget, N. (2014). Ph-like acute lymphoblastic leukemia in older adults. *New England Journal of Medicine*, *371*(23), (pp.2235-2235).
72. Roberts, K. G., Li, Y., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., Yang, Y. L., Pei, D., ... & Ma, J. (2014). Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *371*(11), (pp.1005-1015).
73. Tasian, S. K., Hurtz, C., Wertheim, G. B., Bailey, N. G., Lim, M. S., Harvey, R. C., ... & Reshmi, S. C. (2017). High incidence of Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in older adults with B-ALL. *Leukemia*, *31*(4), (p.981).
74. Jain, N., Roberts, K. G., Jabbour, E., Patel, K., Eterovic, A. K., Chen, K., & Konoplev, S. (2017). Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*, *129*(5), (pp.572-581).
75. Wells, J., Jain, N., & Konopleva, M. (2017). Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia: progress in a new cancer subtype. *Clinical Advances in Hematology & Oncology*, *15*(7), (pp.554-561).
76. Zhang, W., Wang, J., Wang, Q., Chen, G., Zhang, J., Chen, T., & Cao, X. (2001). Identification of a novel type I cytokine receptor *CRLF2* preferentially expressed by human dendritic cells and activated monocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *281*(4), (pp.878-883).
77. Garraway, L. A., & Sellers, W. R. (2006). Lineage dependency and lineage-survival oncogenes in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, *6*(8), (p.593).
78. Murphy, M., Brown, G., Wallin, C., Tatusova, T., Pruitt, K., Murphy, T., & Maglott, D. (2018). Gene help: integrated access to genes of genomes in the reference sequence collection. In *Gene Help [Internet]*. National Center for Biotechnology Information (US).
79. Boucheix, C., Duc, G. H. T., Jasmin, C., & Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins and malignancy. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *3*(4), (pp.1-17).
80. Max, E. E., McBride, O. W., Morton, C. C., & Robinson, M. A. (1986). Human J chain gene: chromosomal localization and associated restriction fragment length polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(15), (pp.5592-5596).

81. Mochizuki, H., Scherer, S. W., Xi, T., Nickle, D. C., Majer, M., Huizenga, J. J., & Prochazka, M. (1998). Human *PON2* gene at 7q21. 3: cloning, multiple mRNA forms, and missense polymorphisms in the coding sequence. *Gene*, *213*(1), (pp.149-157).
82. Russell, L. J., Capasso, M., Vater, I., Akasaka, T., Bernard, O. A., Calasanz, M. J., & Guttery, D. S. (2009). Deregulated expression of cytokine receptor gene, *CRLF2*, is involved in lymphoid transformation in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *114*(13), (pp.2688-2698).
83. Tasian, S. K., Loh, M. L., & Hunger, S. P. (2017). Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *130*(19), (pp.2064-2072).
84. Mullighan, C. G., Collins-Underwood, J. R., Phillips, L. A., Loudin, M. G., Liu, W., Zhang, J., ... & Mikhail, F. M. (2009). Rearrangement of *CRLF2* in B-progenitor–and Down syndrome–associated acute lymphoblastic leukemia. *Nature genetics*, *41*(11), (p.1243).
85. Yoda, A., Yoda, Y., Chiaretti, S., Bar-Natan, M., Mani, K., Rodig, S. J., & Sattler, M. (2010). Functional screening identifies *CRLF2* in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(1), (pp.252-257).
86. Tasian, S., & Loh, M. L. (2011). Understanding the biology of *CRLF2*-overexpressing acute lymphoblastic leukemia. *Critical Reviews™ in Oncogenesis*, *16*(pp.1-2).
87. Perez-Andreu, V., Roberts, K. G., Xu, H., Smith, C., Zhang, H., Yang, W., & Carroll, W. L. (2015). A genome-wide association study of susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in adolescents and young adults. *Blood*, *125*(4), (pp.680-686).
88. Perez-Andreu, V., Roberts, K. G., Harvey, R. C., Yang, W., Cheng, C., Pei, D., & Chen, I. M. (2013). Inherited *GATA3* variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nature genetics*, *45*(12), (p.1494).
89. Harvey, R. C., Mullighan, C. G., Chen, I. M., Wharton, W., Mikhail, F. M., Carroll, A. J., & Carroll, W. L. (2010). Rearrangement of *CRLF2* is associated with mutation of JAK kinases, alteration of *IKZF1*, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *115*(26), (pp.5312-5321).
90. Mullighan, C. G., Su, X., Zhang, J., Radtke, I., Phillips, L. A., Miller, C. B., ... & Harvey, R. C. (2009). Deletion of *IKZF1* and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *New England Journal of Medicine*, *360*(5), (pp.470-480).
91. Meleshko, A. N., Movchan, L. V., Belevtsev, M. V., & Savitskaja, T. V. (2008). Relative expression of different Ikaros isoforms in childhood acute leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *41*(3), (pp.278-283).
92. Tefferi A. (2010). Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: *JAK2*, *MPL*, *TET2*, *ASXL1*, *CBL*, *IDH* and *IKZF1*. *Leukemia*, *24*(6), (p.1128).

93. Mulligan, C. G., Goorha, S., Radtke, I., Miller, C. B., Coustan-Smith, E., Dalton, J. D., ... & Su, X. (2007). Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, *446*(7137), (p.758).
94. Kuipe, R. P., Waanders, E., Van Der Velden, V. H. J., Van Reijmersdal, S. V., Venkatachalam, R., Scheijen, B., ... & Van Kessel, A. G. (2010). *IKZF1* deletions predict relapse in uniformly treated pediatric precursor B-ALL. *Leukemia*, *24*(7), (p.1258).
95. John L. B., & Ward, A. C. (2011). The *Ikaros* gene family: transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Molecular immunology*, *48*(9-10), (pp.1272-1278).
96. Mulighan, C., & Downing, J. (2008). *Ikaros* and acute leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, *49*(5), (pp.847-849).
97. Cob, B. S., & Smale, S. T. (2005). Ikaros-family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. In *Molecular Analysis of B lymphocyte Development and Activation* (pp. 29-47) Springer, Berlin, Heidelberg.
98. Tran, T. H., & Loh, M. L. (2016). Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *ASH Education Program Book*, *2016*(1), (pp.561-566).
99. Roberts, K. G., GU, Z., Payne-Turner, D., McCastlain, K., Harvey, R. C., Chen, I. M., & Shi, L. (2017). High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, *35*(4), (pp.394-401).
100. Roberts, K. G., Morin, R. D., Zhang, J., Hirst, M., Zhao, Y., Su, X., & Chen, X. (2012). Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer cell*, *22*(2), (pp.153-166).
101. Wiemls, J. L., Kang, M., Chang, J. S., Zheng, L., Kouyoumji, C., Zhang, L., & Wiencke, J. K. (2010). Backtracking RAS mutations in high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *45*(3), (pp.186-191).
102. Roberts, K. G. (2017). The biology of Philadelphia chromosome-like ALL. *Best Practice & Research Clinical Hematology*, *30*(3), (pp.212-221).
103. Pui, C. H., Roberts, K. G., Yang, J. J., & Mullighan, C. G. (2017). Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia*, *17*(8), (pp.464-470).
104. Kotb, A., El Fakih, R., Hanbali, A., Hawsawi, Y., Alfraih, F., Hashmi, S., & Aljurf, M. (2018). Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia: diagnostic dilemma and management perspectives. *Experimental hematology*.

105. Herold, T., & Gökbuget, N. (2017). Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia in adults. *Current oncology reports*, 19(5), (p.31).
106. Boer, J. M., & den Boer, M. L. (2017). BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia: from bench to bedside. *European Journal of Cancer*, 82, (pp.203-218).
107. Inokuchi, K., Wakita, S., Hirakawa, T., Tamai, H., Yokose, N., Yamaguchi, H., & Dan, K. (2011). RCSD1-ABL1-positive B lymphoblastic leukemia is sensitive to dexamethasone and tyrosine kinase inhibitors and rapidly evolves clonally by chromosomal translocations. *International journal of hematology*, 94(3), (p.255).
108. Roberts, K. G., Yang, Y. L., Payne-Turner, D., Harvey, R. C., Chen, I. M., Reshmi, S. C. & Mullighan, C. G. (2014). Functional analysis of kinase-activating fusions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia (pp.786-786).
109. Maude, S. L., Tasian, S. K., Vincent, T., Hall, J. W., Sheen, C., Roberts, K. G., & Mullighan, C. G. (2012). Targeting JAK1/2 and mTOR in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 120(17), (pp.3510-3518).
110. Palmi, C., Vendramini, E., Silvestri, D., Longinotti, G., Frison, D., Cario, G., ... & Villa, T. (2012). Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 26(10), (p.2245).
111. Hernández, A. *Identificación de pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda pertenecientes al subtipo similar a BCR-ABL positivo (Ph-like)*. (Tesis de licenciatura). UNAM, México.
112. Trigg, M. E., Sather, H. N., Reaman, G. H., Tubergen, D. G., Steinherz, P. G., Gaynon, P. S., ... & Hammond, G. D. (2008). Ten-year survival of children with acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Oncology Group. *Leukemia & lymphoma*, 49(6), (pp.1142-1154).
113. Pieters, R., Groot-Kruseman, H. D., Velden, V., Fiocco, M., Berg, H., Bont, E. D., ... & Haas, V. D. (2016). Successful therapy reduction and intensification for childhood acute lymphoblastic leukemia based on minimal residual disease monitoring: study ALL10 from the Dutch Childhood Oncology Group. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 34, (p.11)
114. Rivera-Luna, R., Shalkow-Klincovstein, J., Velasco-Hidalgo, L., Cárdenas-Cardós, R., Zapata-Tarrés, M., Olaya-Vargas, A., ... & Pantoja-Guillen, F. (2014). Descriptive epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *BMC cancer*, 14(1), (p. 790).

115. van der Veer, A., Waanders, E., Pieters, R., Willemse, M. E., Van Reijmersdal, S. V., Russell, L. J., ... & Van Leeuwen, F. (2013). Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*, 122(15), (pp.2622-2629)
116. Ross, M. E., Zhou, X., Song, G., Shurtleff, S. A., Girtman, K., Williams, W. K., ... & Patel, A. (2003). Classification of pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Blood*, 102(8), (pp.2951-2959).
117. Heatley, S. L., Sadras, T., Kok, C. H., Nievergall, E., Quek, K., Dang, P., ... & Law, T. (2017). High prevalence of relapse in children with Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia despite risk-adapted treatment. *haematologica*, 102(12), (pp490-493).
118. Chiaretti, S., Grammatico, S., Piciocchi, A., Messina, M., Fedullo, A. L., Gianfelici, V., ... & Vignetti, M. (2015). Rapid Identification of BCR/ABL1-like Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) Cases By Quantitative Real Time-PCR (Q-RT-PCR). Generation and Validation of a Predictive Statistical Model (p1410).
119. Reshmi, S. C., Harvey, R. C., Roberts, K. G., Stonerock, E., Smith, A., Jenkins, H., ... & Shao, Y. (2017). Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood*, 129(25), (pp.3352-3361).
120. Herold, T., Schneider, S., Metzeler, K. H., Neumann, M., Hartmann, L., Roberts, K. G., ... & Huk, N. (2017). Adults with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica*, 102(1), (pp130-138).
121. Mullighan, C. G., Miller, C. B., Radtke, I., Phillips, L. A., Dalton, J., Ma, J., ... & Relling, M. V. (2008). BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*, 453(7191), (p.110).
122. Dörge, P., Meissner, B., Zimmermann, M., Möricke, A., Schrauder, A., Bouquin, J. P., ... & Ludwig, W. D. (2013). IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*, 98(3), (pp.428-432)
123. Clappier, E., Grardel, N., Bakkus, M., Rapon, J., De Moerloose, B., Kastner, P., ... & Lutz, P. (2015). *IKZF1* deletion is an independent prognostic marker in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia, and distinguishes patients benefiting from pulses during maintenance

therapy: results of the EORTC Children's Leukemia Group study 58951. *Leukemia*, 29(11), (p.2154)

124. Roberts, K. G., Pei, D., Campana, D., Payne-Turner, D., Li, Y., Cheng, C., ... & Zhang, J. (2014). Outcomes of children with BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukemia treated with risk-directed therapy based on the levels of minimal residual disease. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27), (p.3012).