



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS DE DNA ASOCIADAS A LA RECAÍDA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES LINFOIDES B**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. ROSALES RODRÍGUEZ BEATRIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., AGOSTO, 2021.**



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.





# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS DE DNA  
ASOCIADAS A LA RECAÍDA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS CON  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES LINFOIDES B**

# **TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**M. EN C. ROSALES RODRÍGUEZ BEATRIZ**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**DR. JUAN MANUEL MEJÍA ARANGURÉ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2021.**



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/661/2021

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **17 de mayo de 2021** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **ROSALES RODRÍGUEZ BEATRIZ** con número de cuenta **404087540** con la tesis titulada **“IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS DE DNA ASOCIADAS A LA RECAÍDA DE PACIENTES PEDIÁTRICOS MEXICANOS CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE PRECURSORES LINFOIDES B”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. HAYDEÉ ROSAS VARGAS**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. EDELMIRO SANTIAGO OSORIO  
Vocal: DRA. SILVIA JIMÉNEZ MORALES  
Vocal: DR. GUILLERMO AQUINO JARQUIN  
Vocal: DR. RAMÓN MAURICIO CORAL VÁZQUEZ  
Secretario: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

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

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 27 de julio de 2021

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**

**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

## **Agradecimientos**

Dedico un profundo agradecimiento al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme un espacio de formación académica.

Agradezco los apoyos económicos ofrecidos por el Consejo Nacional de Tecnología (CONACYT) y el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), instituciones que otorgaron la beca doctoral 429110 y 2017-56, respectivamente. Agradecimiento adicional al Fondo de Investigación en Salud por participar en el financiamiento de este protocolo de investigación, con el número de registro institucional R-2015-785-121, a través del convenio FIS/IMSS/PROT/1364.

A los integrantes de mi Comité Tutoral: Dr. Juan M. Mejía y Dra. Sara Frías, por sus valiosas contribuciones durante el desarrollo de esta tesis.

Expreso mi total gratitud a mi tutora Dra. Haydeé Rosas Vargas, por la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por todo el tiempo dedicado a orientar mi desarrollo académico.

## **Agradecimientos a título personal**

A los investigadores que conformaron mi jurado, Dr. Edelmiro Santiago Osorio, Dra. Silvia Jiménez Morales, Dr. Guillermo Aquino Jarquin y Dr. Ramón Mauricio Coral Vázquez, por sus acertados comentarios aportados a la presentación de esta tesis.

Especial agradecimiento al Dr. Juan Carlos Núñez, por contribuir con su guía constante durante cada etapa del proyecto.

Finalmente, a mi familia por todo su apoyo incondicional: Manuel Salgado, por ayudarme a encontrar motivación y a mis padres, gracias a cada uno por su inmenso amor.

## Índice

### Lista de figuras y tablas

Resumen .....	1
Abstract .....	3
1. Antecedentes .....	5
1.1. Tipos de leucemia .....	5
1.2. Leucemia linfoblástica aguda .....	6
1.3. Leucemia linfoblástica de linaje B (LLA-B) .....	6
1.3.1. Origen prenatal de la LLA-B .....	7
1.4. Recaída en LLA-B .....	9
1.5. Estratificación del riesgo en LLA-B .....	11
1.5.1. Sistemas pronósticos establecidos en LLA-B.....	12
1.5.2. Indicadores de pronóstico emergentes en LLA-B .....	13
1.5.2.1. Alteraciones en el número de copias de ADN (CNAs) .....	13
1.6. CNAs y asociaciones clínico-biológicas en LLA-B .....	14
1.7. CNAs que potencialmente predicen el desenlace clínico en LLA-B .....	15
1.7.1. Sistema de clasificación de riesgo de recaída en LLA-B basado en perfiles de CNAs .....	16
1.8. Métodos de análisis frecuentemente utilizados para detectar CNAs con importancia pronóstica en LLA-B .....	18
1.9. LLA-B en México .....	20
2. Justificación .....	23
3. Hipótesis .....	24
4. Objetivos .....	25
5. Metodología.....	26
5.1. Selección de los pacientes incluidos en el estudio.....	26
5.2. Área de estudio .....	27
5.3. Tipos de muestras.....	27
5.4. Extracción de ADN genómico (ADNg).....	27
5.5. Recopilación de datos de cambios en el número de copias.....	28
5.5.1. Detección de CNAs por arreglos genómicos .....	28
5.5.2. MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligados múltiples) .....	30
5.6. Análisis genómico de cambios en el número de copias .....	30

5.6.1. Cálculo del genoma alterado por CNAs .....	30
5.6.2. Identificación de regiones genómicas con CNAs recurrentes .....	31
5.6.3. Análisis funcional de los genes afectados por CNAs focales significativamente recurrentes .....	31
5.7. Clasificación de riesgo basada en cambios en el número de copias .....	32
5.8. Análisis estadístico .....	32
6. Resultados .....	34
6.1. Características de los pacientes con recaída muy temprana (RMT) de LLA-B incluidos en el estudio .....	34
6.2. Identificación de CNAs asociadas con RMT en pacientes negativos a alteraciones citogenéticas con relevancia pronóstica establecida en LLA-B.....	35
6.2.1. Características de los pacientes analizados por arreglos genómicos .....	35
6.2.2. Caracterización de perfiles de CNAs con arreglos genómicos de alta resolución .....	37
6.2.3. Identificación de CNAs recurrentes y su potencial implicación biológica ....	40
6.2.3.1. CNAs recurrentes en el grupo de pacientes sin RMT .....	40
6.2.3.2. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con CNAs focales identificados en el grupo de pacientes sin RMT .....	42
6.2.3.3. CNAs recurrentes en pacientes con RMT .....	44
6.2.3.4. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes afectados por CNAs focales en pacientes con RMT .....	48
6.2.4. Asociación de las CNAs recurrentes con factores clínicos pronósticos en pacientes con y sin recaída muy temprana de LLA-B .....	48
6.2.5. Asociación de las CNAs recurrentes con el desenlace clínico .....	48
6.2.5.1. Análisis de riesgos proporcionales de Cox .....	50
6.3. Identificación mediante MLPA de CNAs en genes asociados con el pronóstico de LLA-B .....	51
6.3.1. Validación de CNAs con relevancia pronóstica por MLPA .....	51
6.3.2. Características de los pacientes con LLA-B analizados exclusivamente con MLPA .....	54
6.4. Asociación de perfiles de riesgo basados en CNAs con la RMT en LLA-B ...	55
6.4.1. Características de los pacientes estudiados .....	55
6.4.2. Frecuencia de deleciones en genes examinados con MLPA en pacientes con y sin RMT .....	57
6.4.3. Clasificación de riesgo basada en CNAs.....	58

6.4.4. Análisis de supervivencia por grupos de riesgo identificados con el clasificador basado en CNAs .....	58
6.4.5. Análisis de regresión de Cox.....	61
7. Discusión.....	62
8. Conclusiones.....	69
9. Referencias Bibliográficas .....	70
10. Anexos .....	81
Artículo requisito para la obtención del grado .....	81
Cartas de consentimiento informado.....	90

## **Lista de figuras y tablas**

**Figura 1.** Principales tipos de leucemia, clasificados en función de la progresión clínica y el linaje hematopoyético implicado

**Figura 2.** Clasificación de los subtipos citogenéticos y moleculares que conforman a la LLA-B

**Figura 3.** Cronología del desarrollo de LLA-B

**Figura 4.** Indicadores pronósticos utilizados actualmente en la clasificación de riesgo de recaída en LLA-B

**Figura 5.** Genes frecuentemente afectados por pérdidas en el número de copias en LLA-B

**Figura 6.** Sistema de clasificación de riesgo basada en el número de copias

**Figura 7.** Proceso de detección de alteraciones en el número de copias por arreglos genómicos

**Figura 8.** Perfiles de CNAs en pacientes mexicanos con LLA-B analizados con arreglos genómicos de alta resolución

**Figura 9.** Cambios en el número de copias en el genoma de pacientes con y sin recaída muy temprana de la enfermedad

**Figura 10.** Histograma que muestra la frecuencia de las ganancias de cromosomas completos en pacientes hiperdiploides con RMT y sin RMT de LLA-B.

**Figura 11.** CNAs recurrentes en pacientes sin RMT

**Figura 12.** Análisis de enriquecimiento funcional de genes contenidos en las regiones recurrentemente duplicadas en pacientes sin RMT

**Figura 13.** Análisis de enriquecimiento ClueGO de los 13 genes que presentaron deleciones recurrentes en el grupo sin RMT

**Figura 14.** CNAs recurrentes en pacientes con RMT

**Figura 15.** Pérdidas en el número de copias en la región 9p21.3 identificadas con arreglos genómicos

**Figura 16.** Análisis de supervivencia de los pacientes con cambios recurrentes en el número de copias

**Figura 17.** Concordancia en la determinación de deleciones con valor pronóstico en LLA-B en los pacientes con datos de CNAs obtenidos con arreglos genómicos y MLPA

**Figura 18.** Validación de CNAs en el *locus* 9p21.3 que aloja a los genes *CDKN2A/B*.

**Figura 19.** Resultado inconsistente entre MLPA y arreglos genómicos

**Figura 20.** Perfiles de delección en genes evaluados mediante MLPA en pacientes al diagnóstico de LLA-B

**Tabla 1.** Comparación de los pacientes incluidos y no incluidos con recaída muy temprana

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis de cambios en el número de copias con arreglos de hibridación genómica

**Tabla 3.** Regiones cromosómicas con CNAs recurrentes identificadas en el grupo recaída muy temprana de LLA-B

**Tabla 4.** Regiones con CNAs recurrentes identificados en el análisis conducido en los pacientes con recaída muy temprana de LLA-B

**Tabla 5.** Modelo de regresión de Cox para el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con LLA-B

**Tabla 6.** Características clínicas y biológicas de los pacientes analizados exclusivamente por MLPA

**Tabla 7.** Características de los pacientes clasificados por su perfil de delecciones

**Tabla 8.** Frecuencia de delecciones en genes relevantes en LLA-B en los subgrupos de pacientes estudiados

**Tabla 9.** Reclasificación de los pacientes en tres grupos de riesgo definidos por CNAs

**Tabla 10.** Análisis de regresión de Cox entre los grupos de riesgo definidos con perfiles de CNAs y la supervivencia libre de enfermedad

## Resumen

México es uno de los países con mayores tasas de recurrencia de leucemia linfoblástica aguda de tipo B (LLA-B), el tipo de cáncer más común en edad pediátrica. Los pacientes que recaen dentro de los 18 meses posteriores al diagnóstico inicial (recaídas muy tempranas, RMT) registran mayor mortalidad. Por lo tanto, es imprescindible clasificar mejor el riesgo de recurrencia de LLA-B. En este contexto, la presente tesis doctoral analizó la asociación de alteraciones en el número de copias de ADN (CNAs) y la RMT en LLA-B infantil. Se realizó un estudio ambispectivo con un diseño de casos y controles (grupos de pacientes con y sin RMT, respectivamente) anidados en una cohorte. Los pacientes se parearon por género, edad y periodo de seguimiento.

Esta investigación abordó: 1) el análisis de CNAs recurrentes a nivel de todo el genoma con arreglos de alta densidad y 2) la identificación de CNAs por ensayos de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA) en genes frecuentemente alterados en LLA-B y cuya relevancia clínica ha sido reconocida en la literatura.

El primer análisis, realizado únicamente en pacientes (14 con RMT y 21 sin RMT) sin clasificación por riesgo citogenético establecida al diagnóstico, identificó tres regiones focales que se alteran a frecuencias significativas en muestras diagnósticas de pacientes con RMT: ganancia en 7p11.2 (*LINC01445*) y pérdidas en 9p21.3 (*CDKN2A*, *CDKN2A-AS1*) y 7q34 (*LOC730441*, *PRSS1*, *PRSS2*, *PRSS3P2*, *MTRNR2L6*). En análisis univariados (curvas de supervivencia Kaplan-Meier), los cambios en 7q34 y 7p11.2 se relacionaron significativamente ( $P < 0.01$ ) con una mayor probabilidad de RMT. Sin embargo, al ajustar por la edad y cuenta leucocitaria [riesgo NCI (National Cancer Institute)] y el esquema de quimioterapia en un análisis de riesgos proporcionales de Cox, únicamente la duplicación de 7p11.2 constituyó un indicador pronóstico independiente asociado en marcada tendencia ( $P = 0.06$ ) con RMT.

Complementario al análisis con microarreglos de ADN, aplicamos una propuesta de clasificación de riesgo basada en CNAs (estado de delección en *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región pseudoautosómica PAR1) para demostrar su asociación con RMT en niños mexicanos con LLA-B. Esta fase del estudio incluyó en total a 63 pacientes: combinamos un grupo de 33 examinados con SNP a con otros 30 pacientes analizados exclusivamente con MLPA. Este último grupo consistió en 11 casos con RMT y los 19 restantes que no registraron recaída durante el periodo de seguimiento de la cohorte (mediana: 69 meses; rango: 49-96 meses) se seleccionaron como grupo de referencia. Con los perfiles de delección identificados por MLPA, los pacientes se clasificaron en los tres grupos de riesgo descritos por el clasificador UK (United Kingdom) ALL-CNA: bajo

(52.4% de los casos), intermedio (33.3%) y alto (14.3%). Las CNAs de riesgo intermedio y alto se asociaron con una mayor probabilidad de desarrollar RMT (Hazard risk: HR= 4.94, Intervalos de Confianza del 95%: IC95%= 1.87-13.07 y HR= 7.42, IC95%= 2.37-23.26, respectivamente) en comparación con alteraciones de bajo riesgo. Los grupos de riesgo basados en perfiles de CNAs continuaron siendo significativos después de ajustar por la clasificación NCI y el protocolo de quimioterapia en un modelo multivariado. La aplicación del UKALL-CNA reclasificó el riesgo de 8 de 13 pacientes con RMT (61.5%): mientras que al diagnóstico presentaron características clínicas de riesgo estándar NCI su perfil de CNAs determinó un riesgo de recaída intermedio/alto. Esta información pronóstica podría haber ayudado a que este grupo de pacientes recibiera una quimioterapia más intensiva, lo que posiblemente hubiera prevenido la recurrencia de LLA-B.

Nuestros resultados apoyan la potencial utilidad clínica de considerar CNAs para refinar las estrategias de estratificación de riesgo de recaída que en la actualidad se aplican en los niños mexicanos con LLA-B. No obstante, antes de trasladar a la clínica nuestros hallazgos es necesario que éstos sean validados en cohortes independientes que incluyan un mayor número de pacientes.

## Abstract

Mexico has one of the highest relapse rates of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), the most common type of cancer in the pediatric age. Patients who relapse within 18 months of initial diagnosis (very early relapses, VER) have higher mortality. Therefore, more adequate risk classification and outcome prediction in B-ALL are needed. In this context, the purpose of this doctoral thesis was to investigate the association of DNA copy number alterations (CNAs) and VER in children with B-ALL residing in Mexico City. An ambispective study was performed with a case-control design (groups of patients with and without VER, respectively) nested in a cohort. The main matching variables included gender, age, and follow-up period.

From the present doctoral thesis, two principal analyses arose: 1) analysis of whole-genome CNAs using a high-density single-nucleotide polymorphism (SNP) array (SNPa), and 2) identification of CNAs by multiple ligand dependent probe amplification assays (MLPA) in genes recurrently altered in B-ALL and whose prognostic impact has been documented in the literature.

Our first analysis aimed to gain insight in the association between CNAs and the VER risk in 35 patients that lacked the existing established cytogenetic risk classification at diagnosis. This study group included 14 cases with VER and 21 without VER. We identified three regions of focal CNAs that are altered at significant frequencies across diagnostic samples from patients with relapsed disease: gain at 7p11.2 (*LINC01445*) and losses at 9p21.3 (*CDKN2A*, *CDKN2A-AS1*) and 7q34 (*LOC730441*, *PRSS1*, *PRSS2*, *PRSS3P2*, *MTRNR2L6*). CNA events involving 7q34 and 7p11.2 were significantly related ( $P < 0.01$ ) in univariate analysis (Kaplan-Meier survival curves) with a higher probability of VER. However, after adjustment for the National Cancer Institute (NCI) risk category (age and white blood cell count at diagnosis) and chemotherapy schedule, only the focal gain on 7p11.2 showed a strong trend ( $P = 0.06$ ) as an independent prognostic indicator of VER.

Complementary to the SNPa analysis, we applied a proposed CNA-based risk classification (deletion status in *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* and the pseudoautosomal region PAR1 genes) to demonstrate their association with VER in Mexican children with B-ALL. MLPA assays were performed on 63 patients: we combined a set of 33 cases previously studied in the SNPa analysis with 30 additional patients, which were studied using only MLPA. Eleven of these 30 samples were obtained at the time of diagnosis from patients who had VER and 19 were obtained from patients who had no recurrence of the disease during the follow-up period (median: 69 months; range: 49-96 months). The relapse-free cases were selected to be the reference group.

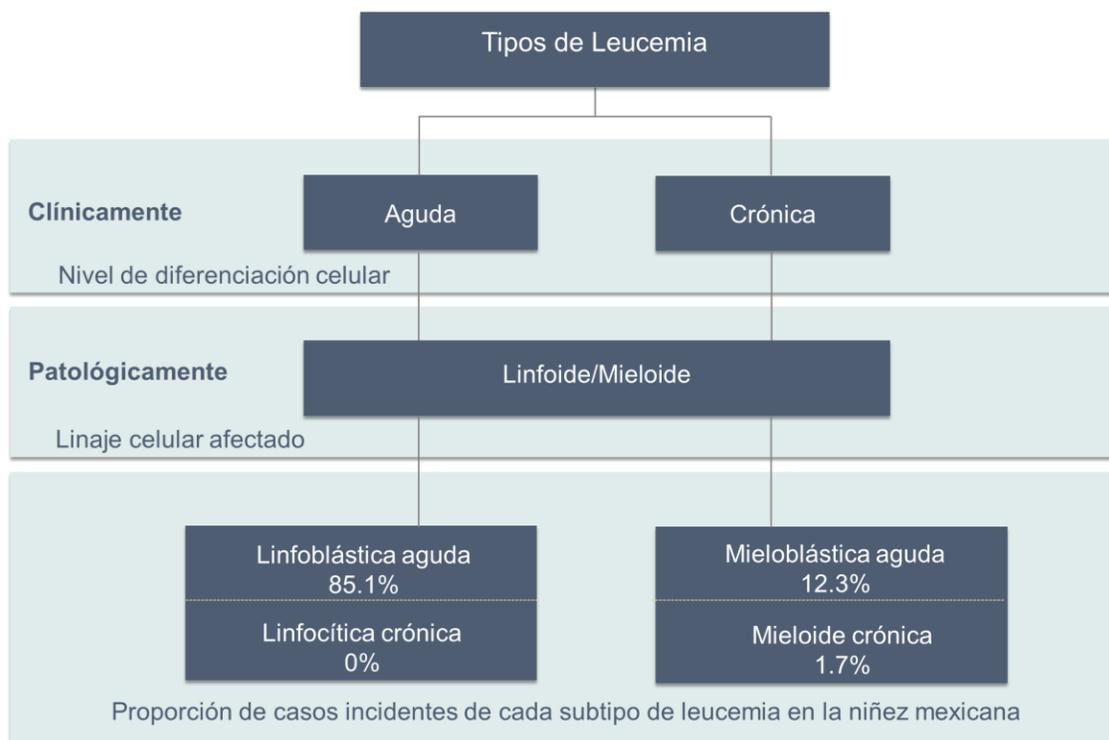
Using MLPA results, patients were stratified into the three risk groups that have been defined by the UKALL-CNA classifier: good (52.4%), intermediate (33.3%), and poor (14.3%). Groups with intermediate and poor-risk CNAs were associated with a higher risk of VER (Hazard risk: HR=4.94, 95% Confidence Intervals: CI95%=1.87-13.07 and HR=7.42, CI95%=2.37-23.26, respectively) compared to good-risk CNAs. The risks remained statistically significant after adjusting for NCI risk classification and the chemotherapy protocol in a multivariate model. The application of the UKALL-CNA reclassified the risk of 8 out of 13 patients with VER (61.5%): while at diagnosis they presented clinical features of standard NCI risk, their CNA profile indicated an intermediate/high risk of relapse. Given that treatment regimens should be tailored to the individual risk category, this subset of patients could have been eligible for intensive chemotherapy to prevent the recurrence of B-ALL.

Based on the present doctoral thesis analyses, our results support the potential clinical usefulness of CNAs to refine the risk stratification currently applied in Mexican children with B-ALL. However, to translate copy number data into the clinic, we must validate our initial results in larger independent cohorts.

# 1. Antecedentes

## 1.1. Tipos de leucemia

Anualmente a nivel global, el cáncer afecta a 300 000 niños con edades entre 0 y 14 años [1]; uno de cada tres casos padece leucemia [2]. Esta enfermedad de origen hematopoyético comprende varias entidades que conforman subtipos biológica y clínicamente heterogéneos. En general, el curso clínico divide a los procesos leucémicos en agudos o crónicos y según la estirpe celular de origen, la enfermedad es linfoide o mieloide. La forma aguda tiene una rápida progresión, las células que proliferan de manera incontrolada son principalmente inmaduras e indiferenciadas, lo cual afecta su normal funcionamiento. El tiempo promedio de evolución de la sintomatología es 30-40 días [3]. En cambio, la forma crónica progresa con menor rapidez, las células leucémicas exhiben un mayor nivel de maduración y conservan parcialmente sus funciones normales [2,4]. Dichas características clínicas y patológicas agrupan a la leucemia en cuatro entidades principales: linfoblástica aguda (LLA), linfocítica crónica (LLC), mieloide aguda (LMA) y mieloide crónica (LMC) (Figura 1).



**Figura 1.** Principales tipos de leucemia, clasificados en función de la progresión clínica y el linaje hematopoyético implicado. Se indica la proporción de casos con leucemia identificados en pacientes con edades <15 años residentes en la CDMX y tratados en hospitales públicos [5].

## **1.2. Leucemia linfoblástica aguda**

El tipo de leucemia que predomina en la infancia y adolescencia es la linfoblástica aguda, la cual conforma el 85% de los casos (Figura 1). Desde una perspectiva epidemiológica, es interesante que esta entidad tenga características que varían entre etnias. Su incidencia es mayor en niños de origen hispano/latino y, en ellos, también el desenlace clínico es más desalentador (la mortalidad se incrementa 39% en comparación con niños no hispanos) [2,6–8]. La etiología de dicha disparidad podría atribuirse a múltiples factores relacionados con una combinación de riesgos ambientales, aspectos socioeconómicos, biológicos y farmacogenómicos [8,9].

La LLA implica la expansión clonal de progenitores o precursores linfoides inmaduros (linfoblastos) de la serie de células B o T en la médula ósea (MO) y su infiltración en sangre periférica u otros tejidos extramedulares (ej. sistema nervioso central, bazo, hígado, timo, ganglios linfáticos, testículos) [10,11]. La presentación clínica de la enfermedad incluye signos y síntomas de cuatro síndromes asociados: infiltrativo, hemorrágico, anémico y febril.

El diagnóstico definitivo requiere un aspirado medular, en el cual se realizan estudios de morfología, citoquímica, fenotipo, cariotipo y biología molecular [3]. La identificación de 20% o más de blastos linfoides en MO y/o en sangre periférica confirma la presencia de LLA. En la mayoría de los casos (70%-85%) la enfermedad deriva del linaje B [5,12].

## **1.3. Leucemia linfoblástica de linaje B (LLA-B)**

Las células B provienen de precursores linfoides situados en la MO, donde maduran a través de una serie de etapas de desarrollo caracterizadas por la expresión de marcadores de superficie celular, factores de transcripción específicos y por el reordenamiento de los genes de inmunoglobulina [13]. Por lo tanto, la información inmunofenotípica es importante para determinar el nivel de diferenciación celular, particularmente de las células leucémicas. Los antígenos relacionados al linaje B incluyen a la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) en el núcleo celular, CD79a (citoplásmico), CD19 y CD22. La expresión de CD10, CD20 y la inmunoglobulina M es útil para discriminar entre los cuatro subtipos que subclasifican fenotípicamente a la LLA-B: pro-B-ALL, B común, pre-B-ALL y transicional-pre-B-ALL [14].

A nivel genético, la Organización Mundial de la Salud (OMS) divide a la LLA-B en 7 subtipos [15] que exhiben alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas recurrentes (Figura 2). Estos cambios citogenéticos predominan en los pacientes menores de 10 años, con la mayor incidencia en el rango de 1 a 4 años [16]. Los

infantes (<1 año) presentan con mayor frecuencia reordenamientos de *KMT2A* [17]. El subtipo menos representado en LLA-B es el gen de fusión *IL3-IGH*, identificado en el 1% de los casos [16].

---

Clasificación de la LLA-B de acuerdo con la OMS, 2016	
•	LLA-B No especificada
•	LLA-B con anomalías genéticas recurrentes
	t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>
	t(v;11q23.3);rearrangios en <i>KMT2A</i>
	t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6-RUNX1</i>
	Hiperdiploidía
	Hipodiploidía
	t(5;14)(q31.1;q32.3); <i>IL3-IGH</i>
	t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3-PBX1</i>
•	Entidades provisionales
	<i>BCR-ABL1</i> -like
	Amplificación intracromosómica del cromosoma 21

---

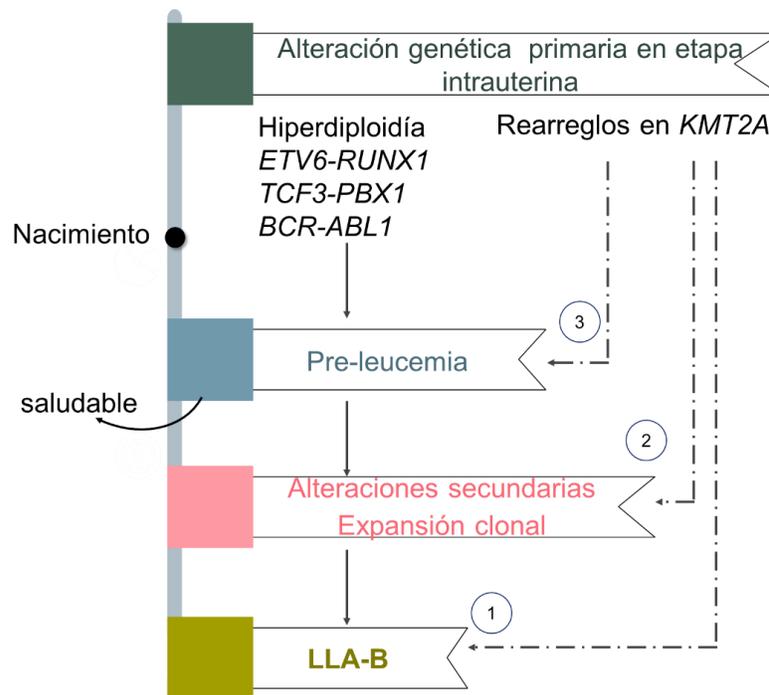
**Figura 2.** Clasificación de los subtipos citogenéticos y moleculares que conforman a la LLA-B. De acuerdo con la clasificación propuesta por la OMS en 2016, esta enfermedad se caracteriza por la presencia de cambios somáticos recurrentes que incluyen a translocaciones cromosómicas y aneuploidías establecidas como subtipos citogenéticos, o bien carece de una alteración genética clasificatoria.

Adicional a las alteraciones citogenéticas que constituyen entidades extensamente establecidas en LLA-B, destacan otros subgrupos (*BCR-ABL1*-like y la amplificación intracromosómica del cromosoma 21 [iAMP21]) que la OMS ha incorporado como entidades de carácter provisional por su potencial relevancia terapéutica. La primera de ellas, *BCR-ABL1*-like, presente en el 10% de los casos, exhibe perfiles de expresión génica que se asemejan a los descritos en *BCR-ABL1* positivos pero sin la presencia de la translocación cromosómica [18,19]. La entidad citogenética iAMP21, definida por la presencia de 3 o más copias del gen *RUNX1*, ocurre en el 2% de los pacientes con LLA-B [20].

### 1.3.1. Origen prenatal de la LLA-B

En lo que respecta a su origen, la mayoría de las leucemias pediátricas son causadas por cambios somáticos que aparentemente ocurren en dos fases (Figura 3). Distintas líneas de evidencia indican que inician prenatalmente por genes de

fusión producto de translocaciones cromosómicas o el aumento en el número de cromosomas [21–23].



**Figura 3.** Cronología del desarrollo de LLA-B. Alteraciones genéticas primarias que se producen en el útero conducen a un estado de pre-leucemia. Después del nacimiento, el desarrollo de LLA-B requiere de alteraciones secundarias que promueven la expansión clonal de las células leucémicas. En el caso de los reordenamientos de *KMT2A* se proponen tres escenarios posibles, en los que la alteración: 1) es suficiente para el desarrollo de LLA-B, 2) desencadena directamente la adquisición de cambios secundarios y 3) promueve un estado pre-leucémico que requiere alteraciones secundarias independientes. Imagen modificada de Hein et al. (2020) [21].

A nivel molecular, los reordenamientos cromosómicos iniciales característicos en LLA-B, por ejemplo *TCF3-PBX1*, parecen ser inducidos por procesos mutagénicos enzimáticos (la actividad endonucleasa del complejo RAG causa cortes de doble cadena en el ADN durante la recombinación V(D)J), normalmente utilizados por el sistema inmunológico para diversificar el repertorio de anticuerpos, dirigidos de manera errónea a oncogenes y *enhancers* genómicos [24,25]. Los eventos somáticos primarios afectan genes que codifican a reguladores de la hematopoyesis, supresores de tumores, oncogenes o tirosinas cinasas [26,27]. Estos cambios establecen un estado pre-leucémico (las células tienen propiedades de supervivencia y autorrenovación alteradas) pero no son suficientes para desarrollar la enfermedad [22,28,29]. Por tanto, el proceso de

leucemiagénesis continúa con alteraciones genéticas secundarias que son adquiridas durante un período posnatal variable. Estos cambios complementarios promueven que las clonas pre-leucémicas generadas en el útero durante la hematopoyesis progresen a un estado leucémico completo (Figura 3). La duración del período entre el nacimiento y el diagnóstico de leucemia puede ser de unos días o prolongarse hasta 14 años [30].

#### **1.4. Recaída en LLA-B**

El abordaje terapéutico de los pacientes con LLA-B consiste en la asignación de un tratamiento en función de marcadores pronósticos que al diagnóstico de la enfermedad determinan la estratificación del riesgo de recaída y la intensidad del tratamiento (Figura 4). En pacientes con indicadores pronósticos asociados a una menor probabilidad de supervivencia el abordaje terapéutico es más intensivo y por el contrario, es reducido en niños con factores relacionados con desenlaces clínicos favorables para evitar o limitar la toxicidad [31,32].

En general, la estructura del régimen de tratamiento consta de tres fases, cuya duración total es de dos a tres años: 1) inducción, 2) consolidación o intensificación y 3) mantenimiento. La primera etapa incluye la administración simultánea de al menos tres agentes principales: vincristina, l-asparaginasa y glucocorticoides sintéticos (prednisona, prednisolona o dexametasona) [32]. El objetivo de este tratamiento, con una duración aproximada de cuatro a seis semanas, es inducir la remisión. Para los pacientes clasificados en el grupo de alto riesgo, el esquema incorpora la administración de antraciclinas (daunorrubicina o doxorubicina) [33]. La fase de consolidación también es intensiva, su duración es generalmente de ocho semanas y combina metotrexato, vincristina, análogos de purina, glucocorticoides y l-asparaginasa. La terapia final, el mantenimiento, puede extenderse de dos hasta tres años posterior a la fase de consolidación. Consiste en la administración oral de metotrexato y mercaptopurina con o sin el uso de pulsos de esteroides y vincristina. El número de ciclos y el tiempo en que los fármacos utilizados en las terapias de consolidación y mantenimiento son administrados difiere entre los protocolos de tratamiento propuestos por distintos grupos de estudio pediátricos internacionales [32].

La implementación de esquemas terapéuticos adaptados al riesgo de recaída ha contribuido a una notable mejoría en el resultado clínico de la enfermedad. Este avance es más notable en países desarrollados, en los cuales la tasa de supervivencia a cinco años en LLA-B aumentó del 11% en 1962-1966 a 91% en 2011-2018 [17,34,35]. En el contexto mundial, la disminución en el riesgo de recaída no es uniforme dado que se registra una incidencia de recurrencia de LLA-B entre el 9% y el 35% [36–40]. Estas cifras son obtenidas a cinco años de

evaluación o reportadas en estudios con períodos de 20 años de seguimiento. Las clasificaciones que se utilizan en la actualidad no son suficientes para predecir con precisión el riesgo de recaída ya que ambos grupos de pacientes con características clínicas/citogenéticas de bajo o alto riesgo pueden experimentar la recurrencia de la enfermedad. Este hecho resalta la necesidad de implementar en la práctica clínica factores pronósticos que permitan elegir con mayor certeza el tratamiento adaptado al riesgo de recaída de cada paciente.



**Figura 4.** Indicadores pronósticos utilizados actualmente en la clasificación de riesgo de recaída en LLA-B. Previo al tratamiento, existen factores clínicos y citogenéticos ya ampliamente reconocidos que se asocian a mayor o menor riesgo de recaer.

El desenlace para los niños que recaen es desfavorable, con tasas de supervivencia global a cinco años que no superan el 40% [37,38,40], por lo tanto, la recurrencia de LLA-B constituye una de las principales causas de muerte por cáncer en la infancia [41]. Entre los aspectos que explican el pronóstico negativo, se ha descrito la resistencia celular a los fármacos [42]. A diferencia del diagnóstico inicial, los blastos de la recaída presentan una menor capacidad de respuesta a glucocorticoides, l-asparaginasa, antraciclinas y tiopurinas [43]. Esta resistencia farmacológica puede adquirirse *de novo* o inducirse por la quimioterapia mediante la selección de una subclona leucémica con resistencia intrínseca a los medicamentos ya presente al tiempo del diagnóstico [44].

La supervivencia de los pacientes con recurrencia de LLA-B está determinada por factores pronósticos que incluyen la duración de la remisión y el sitio anatómico en el que reaparecen las células leucémicas. La mayoría de las recaídas ocurren en la MO, aislada (75%) o combinada con la participación de sitios extramedulares (SNC o testículos; 12%). La recaída medular aislada implica la presencia de  $\geq 25\%$  de células leucémicas en pacientes que completaron exitosamente la terapia de inducción a la remisión. La forma combinada presenta  $\geq 5\%$  de linfoblastos en MO en asociación con la afectación de uno o más compartimentos extramedulares [45]. Respecto al tiempo de aparición, la recaída puede dividirse en tres clases, las cuales tienen definición variable dependiendo de los consorcios internacionales de investigación. De acuerdo con el grupo alemán Berlín-Frankfurt-Münster, la recaída muy temprana tiene lugar durante los primeros 18 meses de tratamiento. Las recaídas tempranas suceden entre los 18 y 30 meses, mientras que los eventos de recurrencia tardíos aparecen posterior a los 30 meses de la presentación de la enfermedad [46]. Un grupo de especial interés son los pacientes que recaen muy tempranamente (RMT) dado que tienen resultados clínicos particularmente negativos con el 21% de supervivencia a cinco años [38].

La comparación de muestras pareadas, estudiadas al momento del diagnóstico y la recaída en LLA-B, ha permitido reconstruir su estructura clonal y trayectoria evolutiva. Para diferenciar entre variantes de línea germinal y alteraciones somáticas es ideal incluir aspirados medulares obtenidos en la remisión. Con ese abordaje se ha establecido que la mayoría (96%) de los casos con recaída exhiben relación con el clon leucémico observado al diagnóstico. Se pueden adquirir alteraciones genéticas adicionales (34%) o, más comúnmente (52%), es identificado un clon ancestral (pre-leucémico) que contiene algunas, pero no todas las alteraciones detectadas en la presentación de la enfermedad [47]. Consistente con esos estudios iniciales, un análisis reciente confirmó que las clonas responsables de la recaída de LLA-B están presentes al diagnóstico de la enfermedad y en su mayoría constituyen una subpoblación menor [48].

### **1.5. Estratificación del riesgo en LLA-B**

En los regímenes terapéuticos actuales, la clasificación del riesgo de recaída está basada en parámetros clínicos y alteraciones citogenéticas identificados al diagnóstico y/o la respuesta temprana al tratamiento. Ésta última estrategia usa indicadores como la enfermedad mínima residual al final de la fase de inducción y la respuesta a prednisona a los 8 días de tratamiento [49,50]. La evaluación de las células leucémicas residuales en MO es considerada un indicador pronóstico muy fiable porque no sólo refleja la sensibilidad intrínseca a la quimioterapia, sino también la farmacodinámica y la farmacogenómica del paciente, la adherencia al tratamiento y su eficiencia [51].

### 1.5.1. Sistemas pronósticos establecidos en LLA-B

La edad y el conteo leucocitario son parámetros utilizados desde hace más de 30 años en la práctica médica para estratificar a los pacientes con LLA-B en distintos grupos pronósticos al diagnóstico inicial. El consenso internacional, propuesto por el NCI, establece que los niños con edades entre 1 y 10 años y un recuento de leucocitos <50 000 tienen un riesgo estándar de recaída. Los pacientes menores a 1 año (infantes) y aquellos mayores a 10 años y/o una cuenta de leucocitos  $\geq 50$  000 son de alto riesgo [52] (Figura 4). Aparte de dichos parámetros, los subtipos definidos en LLA-B por aneuploidías y transcritos de fusión (Figura 2), con implicaciones tanto pronósticas como terapéuticas, son relevantes en la práctica clínica actual [11,53]. En función de estas características citogenéticas, se establecen tres categorías de riesgo: bajo, intermedio y alto (Figura 4). Aproximadamente el 75% de los casos con LLA-B exhibe anomalías cromosómicas numéricas y estructurales que los agrupan en las categorías de riesgo citogenético bajo y alto (Figura 4) [53–56].

La hiperdiploidía (>46 cromosomas), dividida en 1) baja (47-50 cromosomas) y 2) alta (51–65 cromosomas), es el mayor subgrupo citogenético de LLA-B. La segunda categoría dentro de esta entidad biológica, representa alrededor del 25% de los casos [57], con mayor frecuencia en el grupo de niños de entre 1 y 9 años [58]. En general, exhibe un patrón no aleatorio de ganancias que incluye a los cromosomas 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18, 21 y X [59]. La hiperdiploidía baja ocurre en el 13-17% de los pacientes, los cromosomas extra que predominan son 21 y X [60].

Junto con la alta hiperdiploidía, el gen de fusión *ETV6-RUNX1* generado por la alteración estructural t(12;21)(p13;q22), es otro de los subtipos más frecuentes en LLA-B, identificado en el 30%-34% de los pacientes [16,57]. Ambas alteraciones confieren un pronóstico favorable con tasas de supervivencia global a 5 años del 96% [53].

En cambio, los resultados clínicos son desfavorables para los casos con *BCR-ABL1*, reordenamientos del gen *KMT2A*, la baja hipodiploidía (30-39 cromosomas), y el subtipo provisional iAMP21 [53,61]. Por esta razón, en la mayoría de los protocolos, conforman criterios para recibir la intensificación del tratamiento [50].

Aunque la mayoría de los pacientes tienen alteraciones cromosómicas de importancia clínica, existe un subgrupo en LLA-B que carece de alteraciones citogenéticas clasificatorias (24%) [57]. A estos casos, denominados *B-other*, se les asigna un riesgo de recaída intermedio (Figura 4).

La identificación precisa de los subtipos genéticamente distintos que conforman a la LLA-B es relevante sobre todo cuando existen intervenciones terapéuticas dirigidas a blancos específicos. Por ejemplo, la introducción de inhibidores de

tirosina cinasas en el tratamiento de pacientes *BCR-ABL1* ha contribuido notablemente a incrementar su supervivencia libre de eventos [62].

### 1.5.2. Indicadores de pronóstico emergentes en LLA-B

Las características clínicas y alteraciones genéticas primarias mencionadas anteriormente contribuyen en el desenlace clínico. Sin embargo, resultan insuficientes para identificar con precisión a los pacientes que desarrollarán eventos de recaída. Lo anterior ha promovido la búsqueda de alteraciones genéticas adicionales (secundarias) que permitan refinar la estratificación pronóstica en LLA-B. Entre las mutaciones que complementan el proceso de transformación de las células pre-leucémicas destacan los cambios somáticos que alteran el número de copias de ADN como potenciales indicadores de riesgo de recaída al diagnóstico de la enfermedad.

#### 1.5.2.1. Alteraciones en el número de copias de ADN (CNAs)

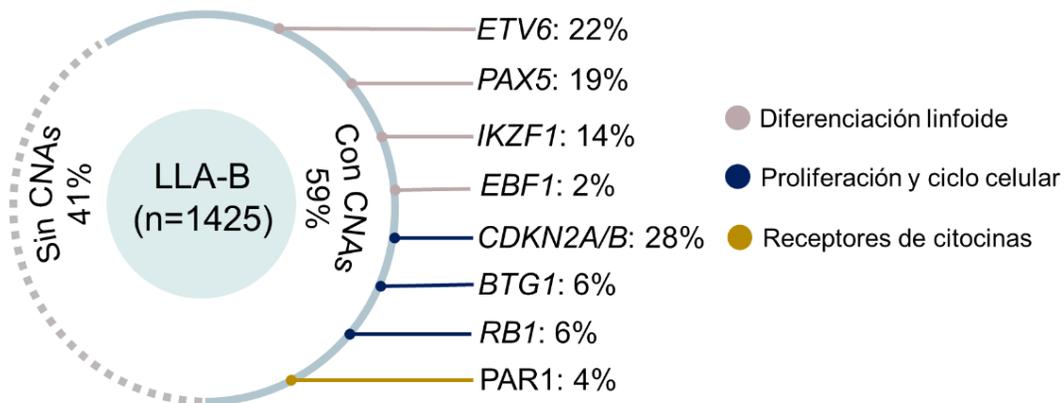
Las CNAs son cambios somáticos que comprenden deleciones o duplicaciones/amplificaciones de fragmentos de material genómico. Se clasifican por su tamaño en extensas (mayores al 50% de un brazo cromosómico o cromosomas completos) o focales (mayores al 50% de un brazo cromosómico; longitud media de 1.8 Mb) [63,64]. Funcionalmente, pueden conducir a la sobreexpresión de oncogenes y subexpresión/inactivación de supresores de tumores. No obstante, los cambios en el número de copias respecto al genoma de referencia no siempre corresponden con alteraciones en los niveles de expresión; en estas condiciones se han descrito mecanismos de adaptación transcripcional a CNAs [65].

En LLA-B, el número promedio de CNAs es de 4 a 12 por genoma [18,47,66–70], con predominancia de las pérdidas sobre las ganancias genómicas [67,68,71,72]. Entre el variado espectro de CNAs que conforman a la LLA-B se tienen identificadas deleciones que son comunes, en su mayoría focales (<1 Mb) [66,68,73], e involucran genes esenciales en el desarrollo linfoide, regulación del ciclo celular/apoptosis, la coactivación transcripcional y la señalización celular mediada por citocinas: *ETV6*, *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *BTG1*, *RB1* y *PAR1*. En la Figura 5 se indica la frecuencia de dichas alteraciones reportada en una amplia cohorte, representativa de los principales subtipos citogenéticos que constituyen a la LLA-B, estudiada por Schwab et al (2013) [57]. Este y otro análisis posterior (2019) [74], conducido en un menor número de casos (n=515), coinciden en que las alteraciones que predominan en los pacientes (60%-80%) afectan genes que regulan el desarrollo de los progenitores linfoides B e incluyen a los

factores de transcripción *PAX5* (19%-28%), *IKZF1* (14%-20%), *ETV6* (22%-30%) y *EBF1* (2%-6%). Entre ellos destaca *IKZF1*, cuya afectación total o parcial por eventos de delección da lugar a la expresión de isoformas con funciones dominante-negativas, haploinsuficiencia o a la pérdida completa de su expresión. La inactivación de *IKZF1* altera múltiples vías implicadas en la regulación del estado metabólico, la señalización de los receptores de células pre-B, la adhesión y proliferación celular [75].

*RB1*, *CDKN2A*, *CDKN2B* y *BTG1* son esenciales para la regulación del ciclo celular y la proliferación. En LLA-B, se presentan principalmente (28%-33%) [57,74], CNAs en *CDKN2A* y *CDKN2B*, genes que codifican a las proteínas supresoras tumorales p16/p14 y p15. Por el contrario, menos del 10% de los pacientes posee cambios en el número de copias de *RB1* y *BTG1* [57,74].

La delección intersticial (316 kb) que ocurre en la región pseudoautosómica 1 (PAR1) de los cromosomas X o Y yuxtapone el primer exón de *P2RY8* a la región codificante de *CRLF2*. Esta alteración estructural genera el transcrito de fusión *P2RY8-CRLF2*, el cual induce la sobreexpresión del receptor de citocinas *CRLF2* [76]. Su frecuencia corresponde al 4% [57,74].



**Figura 5.** Genes frecuentemente afectados por pérdidas en el número de copias en LLA-B. Se indica la proporción de casos con (línea continua) y sin CNAs (línea punteada) que afectan a los genes que son frecuentemente alterados en esta enfermedad. La figura está basada en el análisis realizado por Schwab et al. (2013) [57]. Su función biológica está codificada por colores. Las alteraciones no son mutuamente excluyentes.

## 1.6. CNAs y asociaciones clínico-biológicas en LLA-B

Al diagnóstico, la prevalencia de las CNAs comúnmente alteradas en LLA-B varía del 47% al 71% [57,61,69,74,77–80]. Las variaciones en estas estimaciones pueden estar relacionadas con diferencias en las poblaciones analizadas. Al

respecto, se han descrito asociaciones significativas entre las CNAs y características clínico-biológicas que constituyen factores pronósticos en LLA-B: 1) la edad y el conteo leucocitario considerados en el riesgo NCI y 2) las alteraciones primarias en los blastos que definen las entidades citogenéticas que conforman a la enfermedad [57,61,68,74,78,79,81–83]. Por ejemplo, la pérdida de *ETV6* es más frecuente en niños con riesgo de recaída estándar NCI. En contraste, otros genes como *IKZF1*, *EBF1*, *CDKN2A/B* y/o *PAX5* son principalmente alterados por eventos de delección en la categoría NCI de alto riesgo [57,84]. La mayoría de los subgrupos citogenéticos que constituyen a la LLA-B presentan cambios en el número de copias de los genes *ETV6*, *PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *BTG1*, *RB1* y *PAR1* [57,74], no obstante, estas alteraciones pueden encontrarse sobrerrepresentadas en entidades específicas. El ejemplo más ilustrativo de estas asociaciones es la delección de *IKZF1*, cuya prevalencia predomina en *BCR-ABL1* y *BCR-ABL1*-like (64%-70%), subtipos asociados a un alto riesgo de recaída [57,74,85–88]. En contraste, este gen es menos afectado por delecciones (3%-18%) en pacientes positivos a *ETV6-RUNX1*, un subgrupo citogenético relacionado generalmente con desenlaces clínicos favorables [57,74,89].

### 1.7. CNAs que potencialmente predicen el desenlace clínico en LLA-B

Las diferencias en el desenlace clínico observadas entre los casos que pertenecen al mismo subtipo citogenético son parcialmente atribuidas al impacto que ejercen las CNAs en el pronóstico. Un ejemplo de ello ocurre en *ETV6-RUNX1*, entidad que a pesar de ser reconocida como un indicador pronóstico positivo registra tasas de recaída del 13% [53]. En este grupo, la pérdida de *CDKN1B*, localizado en la región cromosómica 12p13, constituye una alteración secundaria asociada significativamente con una menor duración de la remisión [90].

El análisis de muestras pareadas, obtenidas en el diagnóstico inicial y en la recurrencia de la enfermedad, identificó que en la recaída existe un aumento en la prevalencia de las CNAs [47,66]. Los cambios que emergen confieren resistencia a los fármacos utilizados en el tratamiento de LLA-B e incluyen principalmente la pérdida en el número de copias de los genes *MSH6* (respuesta a mercaptopurina y prednisona), *NR3C1* y *BTG1* (respuesta a glucocorticoides) [66,73].

Entre las CNAs que son detectadas con frecuencia al diagnóstico de LLA-B (Figura 5), las delecciones de *CDKN2A/B* o *IKZF1* [18,78,83,85,91–98] constituyen marcadores de pronóstico negativo, al menos esta asociación parece ser consistente para *IKZF1*. Por el contrario, el consenso es menor para el impacto que conlleva la delección de los genes *CDKN2A/B* [74,99]. Con excepción de *RB1* o la pérdida de genes en *PAR1*, asociadas a desenlaces clínicos desfavorables, no se han encontrado correlaciones significativas para *EBF1*, *PAX5*, *BTG1* y *ETV6*

en términos de incidencia acumulativa de recaída, supervivencia o niveles detectables de enfermedad mínima residual al finalizar la fase de inducción [74,79,96,100].

Aparte del análisis del impacto pronóstico de cambios en el número de copias de genes individuales es importante identificar alteraciones que ocurren simultáneamente y su influencia en el pronóstico. Al respecto, el efecto de una CNA puede modificarse por la presencia/ausencia de alteraciones adicionales en el número de copias. Por ejemplo, la delección combinada de *BTG1* e *IKZF1* confiere una menor supervivencia libre de enfermedad a cinco años y una mayor incidencia acumulativa de recaída respecto a pacientes con deleciones únicamente en *IKZF1* [101]. En cambio, el pronóstico desfavorable asociado a la pérdida de copias en este gen parece ser contrarrestado por la presencia de deleciones concomitantes del gen *ERG1* [50].

Esos hallazgos inspiraron el desarrollo de clasificadores de riesgo de recaída en LLA-B basados en la detección de combinaciones de cambios en el número de copias en genes que son alterados con frecuencia en LLA-B (Figura 5). Aunque se ha reconocido su potencial utilidad pronóstica, los clasificadores propuestos no se utilizan en la actualidad en la práctica médica para estratificar a los pacientes y en función de esto, adaptar con mayor precisión la intensidad del tratamiento.

#### 1.7.1. Sistema de clasificación de riesgo de recaída en LLA-B basado en perfiles de CNAs

El sistema de clasificación pronóstica propuesto por Moorman et al. [61], puede citarse como el mejor ejemplo de la utilidad clínica de identificar, previo al tratamiento quimioterapéutico, cambios en el número de copias de ADN. De acuerdo con estos investigadores, la combinación de deleciones en los genes *IKZF1*, *ETV6*, *PAX5*, *EBF1*, *CDKN2A/B*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1 define tres grupos de riesgo de recaída de LLA-B: bajo (CNA-BR), intermedio (CNA-RI) y alto (CNA-AR) (Figura 6). Con esta estrategia, el perfil de CNAs en la mayoría (61%) de los pacientes corresponde a la categoría de bajo riesgo. En contraste, el 10% presentó alteraciones que corresponden al grupo de alto riesgo de recaída. El porcentaje restante se incluyó en la categoría de riesgo intermedio. Los resultados clínicos resultaron significativamente diferentes entre los tres grupos de riesgo, con tasas de supervivencia libre de eventos a 10 años del 80% (CNA-BR), 67% (CNA-RI), y 49% (CNA-AR) [61].

Esta clasificación basada en CNAs puede integrarse con la información proporcionada por los tres grupos de riesgo citogenético definidos en LLA-B (bajo riesgo: CITO-BR, riesgo intermedio: CITO-RI y alto riesgo: CITO-AR). La combinación de las alteraciones primarias (aneuploidía y rearrreglos

cromosómicos) y secundarias (CNAs) agrupa a los pacientes finalmente en categorías de riesgo genético de recaída: bajo (GEN-BR) o alto riesgo (GEN-AR) (Figura 6). Estos dos últimos grupos tienen una probabilidad de supervivencia global a cinco años de 83% y 97%, respectivamente [61].

El impacto pronóstico de las alteraciones citogenéticas que confieren un alto y bajo riesgo no modifica el desenlace definido por el estado en el número de copias. En contraste, los pacientes con riesgo de recaída intermedio, determinado por alteraciones citogenéticas, pueden ser reclasificados en categorías de mayor o menor riesgo de recaída al considerar su perfil de CNAs.

Sobre la base de sus conclusiones preliminares obtenidas en 2014, en 2019 se realizó un estudio complementario [102], con la información de más de 3,000 pacientes con LLA-B incluidos en 16 ensayos clínicos derivados de 12 grupos de estudio internacionales, para validar el clasificador de riesgo de recaída basado en CNAs, UK (United Kingdom) ALL-CNA. Esta herramienta pronóstica permitió confirmar diferencias significativas en la tasa de supervivencia libre de eventos a cinco años entre los tres grupos de riesgo propuestos en el estudio original (riesgo bajo: 88%, intermedio: 76% y alto: 68%). Con el estudio de validación también se demostró que el clasificador de riesgo UKALL-CNA proporciona información pronóstica relevante dentro de protocolos adaptados o no a la evaluación de enfermedad mínima residual. En investigaciones independientes se ha evaluado la solidez y viabilidad del UKALL-CNA, identificando asociaciones significativas con el riesgo de recaída NCI y la respuesta al tratamiento, incluido el fracaso de la inducción a la remisión [103] y el nivel de enfermedad mínima residual al término de la quimioterapia de inducción [78,104]. La estratificación en clases de riesgo basadas en CNA, independientemente de la información pronóstica establecida por la entidad citogenética subyacente, identificó a un subconjunto de pacientes con resultados clínicos adversos. La supervivencia libre de eventos a los 24 meses aumentó en los casos que presentaron perfiles de CNA de bajo riesgo en comparación con su contraparte de alto riesgo (83% vs. 52.6%) [103].

Aunque los resultados descritos demuestran la importancia del UKALL-CNA, su incorporación en los protocolos de tratamiento ajustados al riesgo de recaída continúa sin implementarse.

En México, la recurrencia de la enfermedad es alta y se requieren herramientas pronósticas que ayuden a mejorar la predicción pronóstica en niños con LLA-B. (descripción detallada en la sección 1.9.). Considerando este escenario, es conveniente disponer de información sobre perfiles de CNAs y su aplicación en la estratificación del riesgo en LLA-B. Con ello, potencialmente se contribuiría a orientar decisiones clínicas oportunas en beneficio del paciente, y como resultado, reducir la incidencia de recaída en nuestro país.

		Alta hiperdiploidia	ETV6-RUNX1	TCF3-PBX1	B-other	BCR-ABL1	MLL-r	iAMP21	Baja hiperdiploidia
		CITO-BR		CITO-RI		CITO-AR			
Ausencia de deleciones( $\Delta$ )	CNA-BR	GEN-BR	GEN-BR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR
$\Delta ETV6$ , $\Delta PAX5$ , o $\Delta BTG1$									
$\Delta ETV6 + \Delta BTG1$ , $\Delta CDKN2A/B$ o $\Delta PAX5$									
Otros perfiles de CNAs	CNA-RI	GEN-BR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR
$\Delta IKZF1$ , $\Delta PAR1$ , o $\Delta RB1$	CNA-AR	GEN-BR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR	GEN-AR
$\Delta IKZF1/\Delta PAX5/\Delta CDKN2A/B$									

**Figura 6.** Sistema de clasificación de riesgo basada en el número de copias. Alteraciones citogenéticas y en el estatus de deleción de genes frecuentemente alterados en LLA-B. El sistema de clasificación propuesto por Moorman et al. (2014) [53] agrupa a los pacientes en grupos de riesgo definidos al diagnóstico por características citogenéticas (bajo riesgo: CITO-BR, riesgo intermedio: CITO-RI y alto riesgo: CITO-AR) o por CNAs (bajo riesgo: CNA-BR, riesgo intermedio: CNA-RI y alto riesgo: CNA-AR). La integración de ambas clasificaciones pronósticas finalmente divide a los pacientes en dos categorías de riesgo genético: 1) bajo (GEN-BR) o alto riesgo (GEN-AR). Imagen publicada en Rosales-Rodríguez et al. (2021) [105], modificada de Hamadeh et al. (2019) [102].

### 1.8. Métodos de análisis frecuentemente utilizados para detectar CNAs con importancia pronóstica en LLA-B

Dadas las implicaciones diagnósticas/pronósticas de las CNAs (aneuploidías y alteraciones focales) su identificación es esencial en LLA-B. En lo que concierne a las alteraciones que involucran cromosomas completos, éstas son detectadas convencionalmente mediante técnicas de cariotipo con bandeado G o por la determinación del índice de ADN con citometría de flujo [60].

Las limitaciones relacionadas a esas técnicas (ej. la disponibilidad de blastos con alto índice mitótico o la dificultad de obtener metafases representativas) [106], no

representan desventajas para las tecnologías basadas en microarreglos que incorporan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPa) o métodos de hibridación genómica comparativa (CGH). Su incorporación en el abordaje clínico facilitaría la distinción oportuna de los cambios de ploidía en LLA-B y mejoraría potencialmente el proceso de clasificación de riesgo actual [56,107,108].

La técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) mediante el uso de sondas dirigidas a *RUNX1* permite detectar a la *iAMP21* [20,109], una entidad citogenética provisional con impacto pronóstico en LLA-B [56,82,108]. Cuando los resultados obtenidos por FISH son ambiguos, es útil realizar un diagnóstico alternativo con microarreglos, inclusive este abordaje demostró que *RUNX1* puede no ser el objetivo principal de la amplificación [108,110].

Las alteraciones genéticas submicroscópicas clínicamente relevantes en LLA-B que no son detectables por técnicas citogenéticas clásicas (con una resolución aproximada de 5-10 Mb) son estudiadas con microarreglos. Estas plataformas gradualmente han alcanzado una resolución promedio de ~3-10 kb [56] y más allá de sustituir los análisis citogenéticos convencionales, su integración podría complementarlos [107,111,112]. Ejemplo de ello es que la combinación de cariotipo, FISH y los microarreglos, incrementan en un 19% la tasa de detección de alteraciones de relevancia clínica en LLA-B como lo son *iAMP21*, la delección de *IKZF1* o hipodiploidía [107].

Entre las plataformas comúnmente utilizadas para fines citogenéticos se distinguen Affymetrix CytoScan HD, Agilent 4x180K-CGH, e Illumina CytoSNP-850. Esas tres tecnologías difieren en el número y en el tamaño de las alteraciones identificadas, así como en el porcentaje de anomalías no validadas. En particular, CytoScan HD registra el mayor número de hallazgos validados [113].

La evaluación de las CNAs reconocidas como marcadores de utilidad clínica potencial en LLA-B (Figura 5 y 6) se basa tradicionalmente en la amplificación de sondas dependiente de ligados múltiples (MLPA). Es un método semicuantitativo para el análisis del número de copias de hasta 50 secuencias genómicas diferentes en una reacción de PCR. Cada sonda MLPA consta de dos secuencias de oligonucleótidos (25 a 50 pb) que deben hibridar adyacentes al ADN diana para lograr una ligación exitosa. Solo las sondas ligadas pueden amplificarse mediante PCR. A diferencia de una reacción multiplex estándar, en MLPA solo se utilizan un par de primers, lo que da como resultado un sistema más robusto. En la reacción de PCR se producen fragmentos de amplificación que varían entre 100 y 500 nucleótidos de longitud, los cuales son separados y cuantificados por electroforesis capilar. La comparación del patrón de un pico obtenido en una muestra de interés con el de una muestra de referencia indica cuales secuencias muestran números de copia alterados. De esta manera, el número relativo de fragmentos presentes después de la reacción de PCR depende de la cantidad

relativa de la secuencia diana presente en una muestra de ADN [114]. En particular, el diseño comercial MLPA P335 (MRC Holland, Amsterdam, The Netherlands) incluye sondas que detectan deleciones de los genes *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *EBF1*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1*, y *PAR1* (*CSF2RA/IL3RA/CRLF2*). Este método tiene la capacidad de registrar con precisión cambios en el número de copias que están presentes en más del 20-30% de los blastos leucémicos [57,115].

A pesar de que la implementación del uso de plataformas de microarreglos en el entorno clínico podría mejorar la estratificación del riesgo y la elección terapéutica de los pacientes con LLA-B, actualmente no existe un consenso internacional respecto a su aplicación rutinaria. Las desventajas al usar estas herramientas incluyen el rendimiento relativamente bajo, la incapacidad de detectar aberraciones cromosómicas equilibradas, la dificultad de estimar con precisión la heterogeneidad clonal, los altos costos y la necesidad de un análisis de datos cuidadoso y experto; por estas limitaciones es habitual conducir estudios con microarreglos en cohortes específicas y/o de seguimiento [56,116].

### **1.9. LLA-B en México**

En México, la leucemia es un problema de salud importante, su incidencia se ubica entre las más altas reportadas a nivel global [1]. De acuerdo con estimaciones realizadas por el Grupo Mexicano Interinstitucional para la Identificación de las Causas de la Leucemia en Niños (GMIICLN), la incidencia de la LLA-B en la ciudad de México (CDMX), es de 35.8 casos por cada millón de habitantes menores de 15 años [5]. A la par de su alta incidencia, el pronóstico para la población pediátrica mexicana es inferior. En otros países, la implementación de regímenes terapéuticos basados en la estratificación del riesgo de recaída ha contribuido a que en la actualidad se registren tasas de supervivencia global a cinco años que superan el 90% [17,34,35]. No obstante, esos escenarios internacionales no son replicados en México, donde la tasa de supervivencia es del 60%-70% [117–120].

Los resultados clínicos desfavorables que persisten en niños mexicanos están influenciados por la alta incidencia que existe en la recurrencia de la enfermedad. En México, la tasa de recaída es 26%-40% y en el grupo de pacientes que recae la supervivencia es muy reducida; el riesgo de mortalidad es 4 veces mayor respecto a los que no registran eventos de recaída [37,119,120]. El pronóstico posterior a la recurrencia de LLA-B es especialmente adverso para los pacientes mexicanos, con tasas de supervivencia a cinco años del 11% [37,39,120].

Es importante remarcar que adicional a los contrastes que existen en la supervivencia de leucemia, en nuestro país aumenta la proporción de pacientes que registran recaída muy temprana. Por ejemplo, a diferencia de lo reportado en países nórdicos, el porcentaje de recaídas muy tempranas es hasta cinco veces mayor en México (9%-20% vs. 4%). Este aspecto adquiere relevancia dado que la duración de la remisión tiene un valor predictivo negativo para la supervivencia de los pacientes que recaen. El riesgo de mortalidad es cuatro veces mayor para los niños mexicanos que experimentan recurrencia medular de LLA-B con un periodo de remisión inferior a 18 meses [33].

La mayor incidencia de recaída entre niños mexicanos puede atribuirse a diferencias clínico-biológicas, ejemplo de ello es que, en nuestro país, la proporción de casos pediátricos (0-18 años) clasificados como de alto riesgo conforme a los criterios del NCI corresponde al 50-80%. En contraste, en Estados Unidos, la prevalencia de este tipo de pacientes es 25% [3,37,120,121].

La asignación del riesgo de recaída en México es insuficiente en varios aspectos. Uno de ellos, se relaciona con el uso de características clínicas como edad y conteo leucocitario. A pesar de que históricamente constituyen indicadores pronósticos independientes, estas variables no estiman con absoluta precisión el riesgo de recaída y conducen a decisiones terapéuticas inadecuadas. En los pacientes mexicanos es bastante notoria la limitación de la edad y cuenta leucocitaria al diagnóstico como factores pronósticos puesto que la mayoría de los eventos de recaída en nuestro país ocurren en niños que son clasificados en el grupo de riesgo NCI estándar [5]. Por lo tanto, es fundamental considerar en la estratificación de los pacientes factores pronósticos adicionales que permitan guiar mejor el tratamiento.

La frecuencia de los subtipos citogenéticos con significado pronóstico definido en LLA-B, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *KMT2A-AF1*, también limita la predicción del riesgo de recaída en los pacientes mexicanos; en ellos, la frecuencia de estas cuatro alteraciones cromosómicas es menor al 20% [122]. En comparación, otras regiones del mundo reportan porcentajes superiores a 35% [27,31,53,123]. El peor pronóstico que tienen los pacientes mexicanos con LLA-B se ha relacionado precisamente con las diferencias existentes en la frecuencia de los cuatro subtipos de riesgo citogenético. El contraste más marcado se observa en *ETV6-RUNX1*. En México, la frecuencia de este indicador pronóstico positivo es 7.4% [122], mientras que en pacientes eslovacos o ingleses es 29% y 25%, respectivamente [53,69].

Frente a la ausencia de alteraciones con valor predictivo del riesgo de recaída en la mayoría (80%) de los niños mexicanos con LLA-B, se requiere más investigación para determinar otras alteraciones genéticas que afectan el pronóstico, y con ello aumentar la precisión de la estratificación clínica y la

orientación terapéutica. Esta problemática ha sido abordada en años recientes por el GMIICLN. Sus resultados sugieren, por ejemplo, la incorporación del transcrito de fusión *EP300-ZNF384* en el diagnóstico de rutina para lograr una mejor estratificación del riesgo [124] o se propone la inclusión del RNA largo no codificante *LINC00152* como potencial biomarcador de recaída temprana [125]. En la continua búsqueda de indicadores de pronóstico diferentes a los establecidos en la práctica clínica, el GMIICLN retoma el valor pronóstico de las CNAs reportado en la literatura. Por lo tanto, el presente trabajo conforma una línea de investigación del GMIICLN enfocada en identificar CNAs a nivel de todo el genoma y su asociación con la recaída muy temprana en LLA-B, un abordaje no realizado previamente en nuestro país. Por otra parte, en los apartados previos se ha descrito que la aplicación de CNAs como factores pronósticos permitiría refinar la estratificación de riesgo de recaída que en la actualidad se conduce en los pacientes con LLA-B infantil. En este contexto y con el fin de complementar los escasos reportes disponibles en México, limitados a evaluar alteraciones en el número de copias de *IKZF1* en un reducido número de pacientes [126], en el presente trabajo se busca identificar perfiles de CNAs y estudiar su asociación con la recaída de LLA-B que ocurre muy tempranamente.

## 2. Justificación

En México, la recaída muy temprana de LLA-B ocurre con mayor frecuencia que en otros países. Frente a su alta incidencia y el mayor riesgo de mortalidad que representa para los niños mexicanos la recurrencia de la enfermedad, son necesarias mejores estrategias para predecir el pronóstico. Eficientizar la identificación de los pacientes que tienen mayor riesgo de recaer muy tempranamente podría aumentar la supervivencia global de LLA-B en nuestro país.

Por consiguiente, este proyecto forma parte de una línea de investigación que desarrolla el GMIICLI con la intención de ampliar el conocimiento existente sobre la implicación de las CNAs en la recaída muy temprana en niños mexicanos. En estudios internacionales, la evaluación del genoma con tecnologías de alta resolución ha definido regiones cromosómicas ganadas o perdidas que tienen una estrecha asociación con el desenlace de la enfermedad. Considerando que existe un alto porcentaje de pacientes mexicanos en los cuales la información citogenética establecida al diagnóstico no es suficiente para predecir el curso clínico, resulta preciso realizar investigaciones genómicas que definan deleciones y duplicaciones de ADN con valor pronóstico en nuestra población.

Por otra parte, dado que el efecto pronóstico de un cambio en el número de copias puede ser modificado por la presencia de alteraciones concomitantes, se ha resaltado la importancia de analizar su coocurrencia. Ese tipo de abordaje condujo al reconocimiento de la importancia clínica de 9 CNAs que afectan a genes involucrados en el proceso de desarrollo de las células B, las cuales han sido integradas en el sistema de clasificación de riesgo UKALL-CNA. A la fecha, la potencial utilidad clínica de esta estrategia no se ha estudiado en pacientes mexicanos, como ha ocurrido en otras poblaciones. Por tal razón, parece oportuno determinar si la estratificación de riesgo basada en CNAs permite detectar desde el momento del diagnóstico a aquellos casos con LLA-B que tienen mayores probabilidades de recaer muy tempranamente. Siendo identificados, estos pacientes podrían someterse a tratamientos más intensivos. El beneficio de definir mejor el pronóstico conforme a perfiles de CNAs es la posibilidad de ayudar a orientar mejor a los médicos en la toma de decisiones clínicas para eventualmente reducir la alta tasa de recaída de LLA-B que persiste en nuestro país.

### 3. Hipótesis

- Las alteraciones en el número de copias de ADN, reportadas o no previamente en la literatura, se asocian con el riesgo de recaída muy temprana en pacientes con LLA-B que al diagnóstico no presentan alteraciones citogenéticas establecidas como indicadores pronósticos.
- La detección de deleciones en los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1, incluidas en el clasificador UKALL-CNA, permite identificar pacientes con mayor riesgo de recaída muy temprana en LLA-B.

## **4. Objetivos**

### **4.2. Objetivo general**

Evaluar en pacientes pediátricos con LLA-B la asociación entre CNAs recurrentes y el riesgo de recaer muy tempranamente.

### **4.3. Objetivos particulares**

- Analizar al diagnóstico el genoma de pacientes con LLA-B para identificar CNAs asociadas con el riesgo de recaída muy temprana mediante la utilización de arreglos de alta densidad.
- Comparar los perfiles de CNAs obtenidos en pacientes con recaída muy temprana, en el momento del diagnóstico y posteriormente en la recurrencia de la enfermedad.
- Identificar CNAs recurrentes y su potencial implicación biológica y clínica con LLA-B
- Evaluar con MLPA genes recurrentemente alterados por deleciones en LLA-B e identificar perfiles de alteraciones descritos en el clasificador UKALL-CNA para estudiar su asociación con el riesgo de RMT.

## 5. Metodología

### 5.1. Selección de los pacientes incluidos en el estudio

Se condujo un estudio de casos y controles anidados en una cohorte de pacientes con diagnóstico de LLA-B captados entre 2010 y 2018, con edades comprendidas entre 1 y 18 años, que alcanzaron la remisión completa (<5% de blastos en MO) después de concluir la fase de inducción del tratamiento. En la cohorte se excluyó a pacientes con síndrome de Down u otras condiciones genéticas asociadas con LLA y/o que residieran fuera de la CDMX.

La información relativa al género, la edad, el conteo leucocitario en sangre periférica, el inmunofenotipo (linaje B o T), la clasificación de riesgo, la detección de 4 rearrreglos genéticos (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *KMT2A-AFF1*), el porcentaje de blastos en MO al diagnóstico o al final de la fase de inducción y el esquema de quimioterapia aplicado por la institución hospitalaria fue recabado de la base de datos que prospectivamente integra el GMIICLN desde el 2010.

El riesgo de recaída previo al inicio del tratamiento fue clasificado de acuerdo con los criterios internacionales propuestos por el NCI. Aquellos pacientes categorizados como de riesgo estándar presentaron una edad entre 1 a 10 años y una cuenta leucocitaria <50,000/ul. Los pacientes mayores a 10 años, o una cuenta de leucocitos en sangre periférica >50,000/ul fueron considerados como de alto riesgo. La presencia de los transcritos de fusión *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *KMT2A-AFF1* fue evaluada por ensayos de RT-PCR descritos previamente [122].

En la base de datos fueron identificados como casos todos los pacientes que en la cohorte inicial desarrollaron recaída durante los primeros 18 meses después de lograr la remisión completa (recaída muy temprana; RMT). La recurrencia de la enfermedad fue confirmada por el hallazgo del  $\geq 5\%$  de linfoblastos en el aspirado medular. Se incluyó únicamente a pacientes con RMT aislada en MO o combinada con otros sitios, con muestra de aspirado medular disponible y suficiente para la evaluación experimental y con datos de seguimiento completos (por ejemplo, que no abandonaron el tratamiento). Para efectos de comparación, se seleccionaron de forma aleatoria 1-2 pacientes que no hubieran recaído muy tempranamente en la cohorte, pareados para cada caso por frecuencia de género, edad ( $\pm 18$  meses) y el tiempo de seguimiento.

## **5.2. Área de estudio**

Los pacientes analizados fueron remitidos para recibir tratamiento en centros hospitalarios públicos que proporcionan atención al 95% de los niños con leucemia en la CDMX [127]. El sector público está representado por distintas entidades gubernamentales que incluyen al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) y la Secretaría de Salud (SSA) a nivel federal y en la CDMX (SEDESA).

Los hospitales participantes fueron:

- Hospital General de México (SSA)
- Hospital Infantil de México "Federico Gómez" (SSA)
- Hospital Juárez de México (SSA)
- Hospital Pediátrico de Moctezuma (SEDESA)
- Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" (IMSS)
- Hospital General "Gaudencio González Garza" en el Centro Médico Nacional "La Raza" (IMSS)
- Hospital Regional "Carlos McGregor Sánchez Navarro" (IMSS)
- Centro Médico Nacional "20 de noviembre" (ISSSTE)

## **5.3. Tipos de muestras**

El presente protocolo de investigación fue aprobado en 2015 por el Comité Nacional de Investigación Científica y Ética con el número R-2015-785-121. Las muestras de MO se obtuvieron al diagnóstico/recaída de la enfermedad después de un consentimiento informado por escrito firmado por los padres y un asentimiento informado en niños mayores de 8 años (Anexos). Las muestras de MO fueron sometidas a centrifugación en gradientes de densidad utilizando Ficoll para recuperar la fracción de células mononucleares. El botón celular se almacenó en el Biobanco del GMIICLN con Suero Fetal Bovino y dimetil sulfóxido (DMSO) a -80°C hasta la subsecuente extracción de ADN.

En todos los pacientes se analizaron muestras de MO recolectadas en el diagnóstico inicial. Para el grupo de casos con RMT se examinaron además muestras colectadas en la etapa de seguimiento en la que se detectó la recurrencia de la enfermedad.

## **5.4. Extracción de ADN genómico (ADNg)**

El ADNg se extrajo a partir del botón celular criopreservado de acuerdo con el protocolo de extracción alto en sales descrito por Suguna et al. (2014) [128] o con

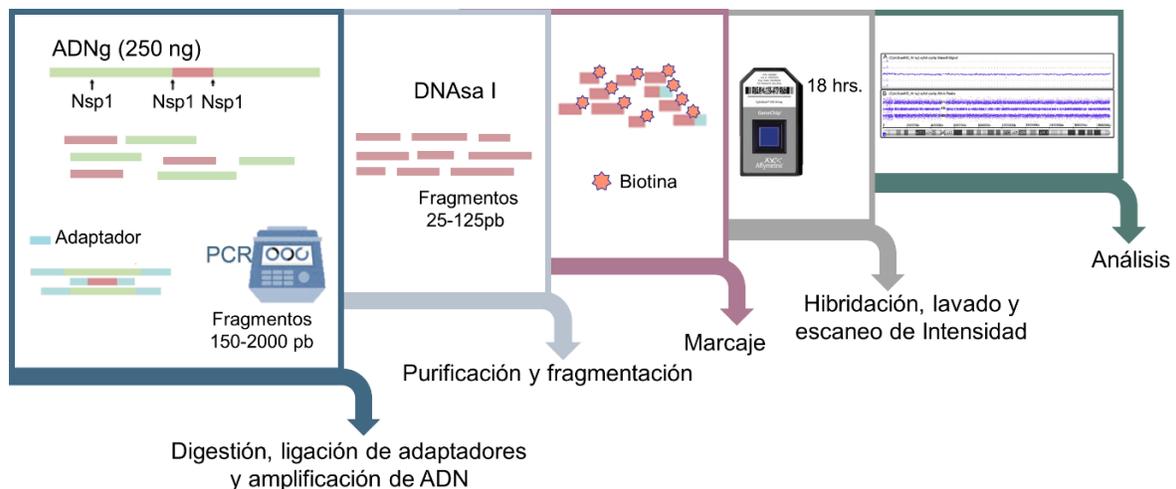
el kit comercial QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

La cuantificación y determinación de pureza para establecer el grado de contaminación proteica y de solventes orgánicos (relación de absorbancia 260/A280 y 260/230 con valores entre 1.7-2.0 y 1.6-2.4, respectivamente) se realizó por espectrofotometría con un equipo Nanodrop® 1000. La integridad se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Finalmente, se almacenaron alícuotas a -20°C para su posterior procesamiento.

## 5.5. Recopilación de datos de cambios en el número de copias

### 5.5.1. Detección de CNAs por arreglos genómicos

En total, se hibridaron 250 ng de ADNg en los arreglos genómicos de alta resolución Cytoscan HD (Thermo Fisher Scientific) conforme al protocolo especificado por el fabricante (Thermo Fisher Scientific). El arreglo incluye en su diseño 2,696,550 sondas (743,304 SNPs y 1,953,246 sondas no polimórficas) con una distancia promedio de 880 pb en regiones intragénicas y 1737 pb en regiones intergénicas. En la Figura 7 se sintetiza el flujo de trabajo para este procedimiento.



**Figura 7.** Proceso de detección de alteraciones en el número de copias por arreglos genómicos. El ADNg es digerido por NspI y amplificado por PCR con adaptadores unidos covalentemente a los fragmentos de restricción. A continuación, los productos de la PCR se purifican con perlas magnéticas, se fragmentan utilizando DNasa I, se marcan con biotina y se hibridan en el arreglo durante 18 h. Tras la incubación, las muestras se lavan y se tiñen con estreptavidina/biotina en una estación de fluidos. Finalmente, los arreglos son escaneados para generar los datos de intensidad que posteriormente se utilizarán en el análisis de estado en el número de copias.

Los datos obtenidos se analizaron con el programa Chromosome Analysis Suite (ChAS; versión 3.1) (Thermo Fisher Scientific) para determinar los estados en número de copias. La relación de intensidad de cada sonda contenida en el arreglo proporciona valores que representan el número de copias relativo (relación  $\log_2$ ) que está normalizado respecto al genoma de referencia. La normalización se realizó *in silico* con un archivo incorporado en ChAS, el cual incluye datos de 380 muestras, 284 de HapMap y 96 de BioServe Biotechnologies. Los valores próximos a cero asumen un estatus diploide mientras que las regiones genómicas con ganancia o pérdida de ADN son identificadas por valores positivos o negativos, respectivamente.

El control de calidad de los datos generados se llevó a cabo usando el parámetro Median of the Absolute values of all Pairwise Differences ( $\text{MAPD} \leq 0.25$ ) que refleja la variabilidad de los cambios en intensidad entre las sondas adyacentes incluidas en el arreglo.

El número mínimo de sondas/longitud en kb aplicado para determinar las CNAs estudiadas en el análisis correspondió a: 1) 50 sondas/100 kb para duplicaciones/amplificaciones y 2) 25 sondas/25 kb para deleciones. Los cromosomas sexuales fueron excluidos del análisis. Esta excepción se debe a que los enfoques analíticos usados en el presente trabajo no fueron específicamente diseñados para considerar la complejidad de los cromosomas sexuales [64,129] como la naturaleza haploide del cromosoma Y o la desigualdad en el número de cromosomas X que existe entre sexos.

Las regiones que co-localizaron  $>80\%$  con alteraciones germinales o polimórficas en el número de copias reconocidas en individuos sanos de acuerdo con la Base de Datos de Variantes Genómicas de Toronto (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>) fueron descartadas del análisis.

El visualizador Integrative Genomics Viewer (IGV)-Web app (<https://igv.org/app>) fue usado para presentar los números de copias relativos (relaciones  $\log_2$ ) por autosoma. La posición de los marcadores se basó en la construcción del genoma GRCh 37/hg19 (Feb 2009).

En términos de la longitud del genoma que involucran, las CNAs se analizaron en dos grupos: 1) CNAs extensas, son definidas a nivel de cromosoma completo y a nivel de brazo cromosómico ( $\geq 50\%$ ) y 2) CNAs focales, comprenden  $<50\%$  de un brazo cromosómico.

### 5.5.2. MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligados múltiples)

Para estos ensayos se utilizó un total de 50 ng de ADNg. La cuantificación del material genético fue fluorimétrica con el Qubit 4.0 Fluorometer (Invitrogen, Life Technologies) utilizando el kit Qubit dsDNA Broad Range (Invitrogen, Life Technologies).

Se utilizaron dos kits comerciales, P335 (SALSA MLPA P335-C1 ALL-IKZF1) y P419 (SALSA MLPA Probemix P419 CDKN2A/2B-CDK4) (MRC-Holland), de acuerdo con el protocolo especificado por el proveedor. El primero de ellos contiene 42 sondas, que generan productos de amplificación para *EBF1* (5q33.3), *IKZF1* (7p12.2), *CDKN2A* (9p21.3), *CDKN2B* (9p21.3), *PAX5* (9p13.2), *ETV6* (12p13.2), *BTG1* (12q21.33), *RB1* (13q14.2) y la región pseudoautosómica PAR1 (Xp22.33; *CSF2RA/IL3RA/CRLF2*). La deleción que ocurre en esta última región produce el transcrito de fusión *P2RY8-CRLF2*. El kit MLPA P335 tiene una cobertura limitada de sondas para los genes *CDKN2A/B* (una y dos sondas, respectivamente) por lo que se utilizó el juego de sondas P419 para corroborar el estado de número de copias en estos dos genes. Este segundo kit contiene un total de 14 sondas para el gen *CDKN2A* y 9 sondas para el gen *CDKN2B*. La pérdida de marcadores individuales sólo se consideró positiva si se confirmaba con el kit P419.

Los productos de amplificación marcados con el fluoróforo FAM se separaron mediante electroforesis capilar para obtener el perfil de fragmentos (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). Éstos se analizaron con el software Coffalyser.net (MRC Holland) para estimar el número de copias relativo. Los datos obtenidos en el análisis de los fragmentos se normalizaron con ADN de MO procedente de 10 pacientes pediátricos no leucémicos. Para la interpretación de los resultados, se consideró que los valores entre 0.7 y 1.3 indican un estado en el número de copias normal. Los valores inferiores o superiores a ese rango corresponden a deleciones o duplicaciones monoalélicas, respectivamente. Un valor inferior a 0.25 fue considerado como deleción bialélica mientras que las duplicaciones bialélicas presentaron valores entre 1.7-2.1.

## 5.6. Análisis genómico de cambios en el número de copias

### 5.6.1. Cálculo del genoma alterado por CNAs

Para calcular el genoma que es afectado por CNAs se utilizó la aplicación Web CNApp, diseñada para facilitar el análisis de estos cambios [129]. Se estimaron puntajes, en función de la longitud y amplitud (cambios monoalélicos o bialélicos) de los cambios observados, que proporcionan para cada muestra tres cuantificaciones diferentes de los niveles de CNAs: extensas, focales y globales.

Las alteraciones extensas involucran  $\geq 50\%$  de un brazo cromosómico y las focales tienen una longitud  $< 50\%$  de un brazo cromosómico. Los puntajes globales proporcionan una evaluación general de la fracción del genoma que es afectado por CNAs tanto extensas como focales.

#### 5.6.2. Identificación de regiones genómicas con CNAs recurrentes

Se utilizó GISTIC2.0 (Genomic Identification of Significant Targets in Cancer), un algoritmo ampliamente usado para identificar regiones del genoma que se duplican o pierden con frecuencia significativa en un conjunto de muestras [64].

En principio, GISTIC asigna un puntaje G, el cual considera la magnitud de los cambios genómicos (intensidad  $\log_2$ ), así como su frecuencia de ocurrencia. La comparación entre las puntuaciones G calculadas para cada región con pérdidas/ganancias observadas en las muestras y los valores dados por alteraciones que son generadas aleatoriamente en un modelo de distribución nula permite identificar cambios significativos. Este valor P se debe ajustar por contrastes múltiples con el procedimiento Benjamini-Hochberg que controla la tasa de descubrimientos falsos (FDR) y proporciona un valor q. Las regiones mínimas comunes de pérdida y ganancia con valores q inferiores a 0.25 se consideraron significativas. Este umbral minimiza la tasa de falsos negativos y previene la pérdida de hallazgos biológicos potencialmente relevantes [130].

Se emplearon los valores predeterminados de relación  $\log_2 \pm 0.1$  (equivalente a 2.14/1.87 copias) como umbrales para identificar respectivamente ganancias y pérdidas. Los cambios focales y a nivel de brazo cromosómico fueron examinados separadamente.

#### 5.6.3. Análisis funcional de los genes afectados por CNAs focales significativamente recurrentes

Se realizó un análisis de las anotaciones funcionales de los genes ubicados en las regiones que fueron reconocidas como significativamente alteradas por CNAs recurrentes. Dicho abordaje se centró en eventos focales, ya que éstos pueden contener genes biológicamente relevantes. Por el contrario, el gran tamaño de los CNAs a nivel de un brazo cromosómico hace difícil determinar cuáles son los genes específicamente implicados en procesos oncogénicos [63].

Se utilizó el software Cytoscape (V3.8.0) y el plugin ClueGO (V2.5.7) [131] para realizar análisis de enriquecimiento funcional, el cual se basó en datos (descargados en mayo 2020) de anotaciones o términos funcionales disponibles públicamente en bases de datos como ontología genética (GO, procesos

biológicos), KEGG (the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) [132], WikiPathways [133] y Reactome [134].

Dicho análisis calcula los términos sobrerrepresentados (valor P ajustado  $<0.05$ , prueba hipergeométrica seguida de una corrección de contrastes múltiples con el método de Benjamini-Hochberg) que se visualizan como redes de procesos y/o vías significativas que se agrupan según su función biológica.

### **5.7. Clasificación de riesgo basada en cambios en el número de copias**

Previamente, Moorman et al. (2014) [61] diseñaron y validaron [102] el clasificador de riesgo UKALL-CNA basado en el número de copias de los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1 (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA* y *P2RY8*).

La información del estatus de delección para dichos genes obtenida con MLPA fue utilizada para clasificar a los pacientes en tres grupos de riesgo: bajo, intermedio y alto. Los pacientes de alto riesgo presentan al menos una delección en *IKZF1*, *RB1* o PAR1 o la pérdida combinada de *IKZF1/PAX5/CDKN2A/B*. La ausencia de delecciones en las regiones/genes interrogados o la presencia de pérdidas alélicas en *ETV6*, *PAX5* o *BTG1* colocan a los pacientes en la categoría de bajo riesgo. Los pacientes con combinaciones de alteraciones distintas a las mencionadas se clasificaron como de riesgo intermedio (Figura 6).

### **5.8. Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos se realizaron con el software SPSS 21.0 (IBM). En el análisis univariado de factores asociados a riesgo de RMT se utilizó la prueba de  $X^2$  o la prueba exacta de Fisher, según procediera, para evaluar variables categóricas.

Para identificar las asociaciones de la coocurrencia de las delecciones en los genes analizados, se calcularon los odds ratios (OR) y los intervalos de confianza del 95% (IC95%). Los valores P se determinaron con la prueba exacta de Fisher.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) fue el principal desenlace clínico a evaluar; para los fines de este estudio, se calculó desde la fecha de la confirmación del diagnóstico hasta la fecha en que, posterior a la remisión completa, se produce la recaída (grupo con RMT) o hasta la última visita del paciente (grupo sin recaída).

La supervivencia global (SG) se definió como el tiempo entre la remisión completa y la fecha de muerte del paciente o la última muestra de seguimiento registrada.

La probabilidad de SLE o SG fue calculada utilizando el método de Kaplan-Meier. Para efectuar comparaciones entre las curvas de supervivencia de los distintos grupos de pacientes se utilizó la prueba de rango logarítmico para detectar diferencias significativas.

Para establecer la asociación entre variables independientes y la SLE se condujo un análisis multivariado mediante el modelo de riesgos proporcionales de Cox. El modelo se ajustó por las variables que en el análisis univariado mostraban una relación estadísticamente significativa o que en estudios previos hubiesen sido reconocidas como predictoras de recaída en LLA-B. Las variables con correlaciones superiores a 0.30 fueron descartadas de los modelos finales. Los estimadores que genera el modelo de Cox se denominan tasas de riesgo (hazard ratio [HR]).

Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando se observaron valores de  $P < 0.05$ .

## 6. Resultados

### 6.1. Características de los pacientes con recaída muy temprana (RMT) de LLA-B incluidos en el estudio

En la cohorte de pacientes con diagnóstico de LLA-B establecido entre 2010 y 2018 se identificaron un total de 172 pacientes con RMT, a quienes se les siguió durante mínimo 18 meses posterior a la remisión completa. De ellos, únicamente fueron analizables 25 casos que cumplieron con todos los criterios de inclusión descritos en la sección Metodología.

No se observaron diferencias significativas entre el número total de casos que conformaron el grupo de estudio y aquellos casos con RMT no analizados en cuanto al género, edad, conteo leucocitario y categoría de riesgo NCI (Tabla 1). Lo anterior sugiere que los 25 casos que fueron evaluados en la presente tesis son representativos de la cohorte de pacientes que recae muy tempranamente en la CDMX. Estos pacientes se estudiaron en dos etapas de análisis, el primero (n=14) conducido para explorar cambios en el número de copias en todo el genoma y el segundo (n=11) fue enfocado en la detección de deleciones que representan potenciales biomarcadores para la estratificación del riesgo de recaída en LLA-B.

**Tabla 1.** Comparación de los pacientes incluidos y no incluidos con recaída muy temprana

Características clínicas al diagnóstico	No incluidos, n=147	Incluidos, n=25	P
Género, n (%)			
Hombre	91 (61.9)	12 (48)	0.19
Mujer	56 (38.1)	13 (52)	
Edad, n (%)			
1-9.9 años	85 (57.8)	16 (64)	0.56
≥10 años	62 (42.2)	9 (36)	
Conteo leucocitario, n (%)			
<50,000/ul	89 (60.5)	19 (76)	0.14
≥ 50,000/ul	58 (39.5)	6 (24)	
Riesgo NCI, n (%)			
Estándar	56 (38.1)	13(52)	0.19
Alto	91 (61.9)	12 (48)	

Valor de P calculados con  $X^2$ /prueba exacta de Fisher, cuando corresponda. NCI= National Cancer Institute

## **6.2. Identificación de CNAs asociadas con RMT en pacientes negativos a alteraciones citogenéticas con relevancia pronóstica establecida en LLA-B.**

Un alto porcentaje de los pacientes con LLA-B que son captados por el GMIICLN son negativos a las translocaciones cromosómicas que definen a los subtipos *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1* y *KMT2A-AFF1* [122], entidades con impacto pronóstico clínicamente establecido. Debido a que este tipo de pacientes no cuentan con información genética que al diagnóstico permita su clasificación de riesgo de recaída, es fundamental identificar en su genoma otras alteraciones que pudieran tener un impacto en el desenlace clínico.

Bajo dicha premisa, uno de los objetivos planteados en el presente estudio incluyó la identificación de pérdidas o ganancias de material genético, asociadas con la RMT. Para abordar tal objetivo, la primera fase de nuestro estudio consistió en el análisis de CNAs con un arreglo genómico. Este primer abordaje se enfocó solamente a los pacientes con RMT que reunían los criterios de elegibilidad siguientes: 1) la ausencia de alteraciones citogenéticas (los 4 genes de fusión que han sido mencionados) que predicen el pronóstico en LLA-B y 2) disponibilidad de muestras pareadas en el biobanco, obtenidas al diagnóstico y en la recaída. Debe aclararse que al inicio del seguimiento (año 2010) de la cohorte, el GMIICLN recolectaba únicamente el aspirado medular al momento del diagnóstico. A partir del 2016, comenzó a obtenerse el material biológico de la recurrencia de la enfermedad. Por tanto, las muestras estudiadas en la primera fase de nuestro análisis pertenecieron a pacientes que recayeron muy tempranamente entre 2016 y 2018.

Como grupo de comparación, conforme al registro de la cohorte conducido por el GMIICLN, se seleccionaron pacientes sin RMT (n=21), pareados con los casos con RMT por frecuencia de edad ( $\pm$  18 meses), género, periodo de seguimiento y ausencia de los genes de fusión.

Por lo tanto, el análisis con arreglos genómicos incluyó a un total de 35 pacientes: 14 de los 25 con RMT identificados en la cohorte (descrito en la sección anterior de resultados) y 21 que no recayeron muy tempranamente. La mediana de tiempo de seguimiento fue 41 meses (rango: 2-59).

### **6.2.1. Características de los pacientes analizados por arreglos genómicos**

La información clínica de los pacientes con y sin RMT (n=35) investigados en el primer análisis con arreglos genómicos de alta resolución se describe en la Tabla 2. La edad promedio al diagnóstico de LLA-B fue de 6 años (rango 1-17) con el 28.6% de los pacientes mayores de 10 años.

En el grupo con RMT (n=14) la media de edad al diagnóstico fue 6.5 (rango:1.5-16.9), con un tiempo medio de recaída de 11.2 meses (rango: 2-17). La media de conteo de blastos fue 90% (rango: 45-100%) en el diagnóstico y 98% (rango: 90-100%) en la recaída. La media de edad a la que se estableció el diagnóstico de los pacientes sin RMT (n=21) fue 5.6 años (rango: 2.1-9.9). La mediana del tiempo de seguimiento para este grupo de comparación fue de 50 meses (rango: 24-59).

Se encontraron diferencias significativas entre los grupos con y sin RMT en términos de edad (P=0.02), la categoría de riesgo NCI (P=0.002), el esquema de quimioterapia (P=0.02) así como en la proporción de fallecimientos (P=0.03) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Características clínicas de los pacientes incluidos en el análisis de cambios en el número de copias con arreglos de hibridación genómica

	<b>Pacientes con RMT n=14</b>	<b>Pacientes sin RMT n=21</b>	<b>P</b>
Género, n (%)			
Hombre	8(57.1)	13(61.9)	1.0
Mujer	6(42.9)	8(38.1)	
Edad, n (%)			
1-9.9 años	10(71.4)	21(100)	0.02
≥10 años	4(28.6)	---	
Conteo leucocitario, n (%)			
<50,000/ul	11(78.6)	21(100)	0.06
≥ 50,000/ul	3(21.4)	---	
Riesgo NCI, n (%)			
Estándar	8(57.1)	21(100)	0.002
Alto	6(42.9)	---	
Esquema de quimioterapia, n (%)			
St. Jude Total XV	3(21.4)	16(76.2)	0.02
BFM-95	2(14.3)	---	
DFCI	4(28.6)	1(4.8)	
St. Jude Total XIIB	5(35.7)	4(19)	
Defunción, n (%)			
No	9(64.3)	20(95.2)	0.03
Sí	5(35.7)	1(4.8)	

Valor de P calculados con  $X^2$ /prueba exacta de Fisher, cuando corresponda. RMT= recaída muy temprana; NCI= National Cancer Institute; BFM-95= Berlin-Frankfurt-Münster-95; DFCI= Dana Farber Cancer Institute 00-01.

### 6.2.2. Caracterización de perfiles de CNAs con arreglos genómicos de alta resolución

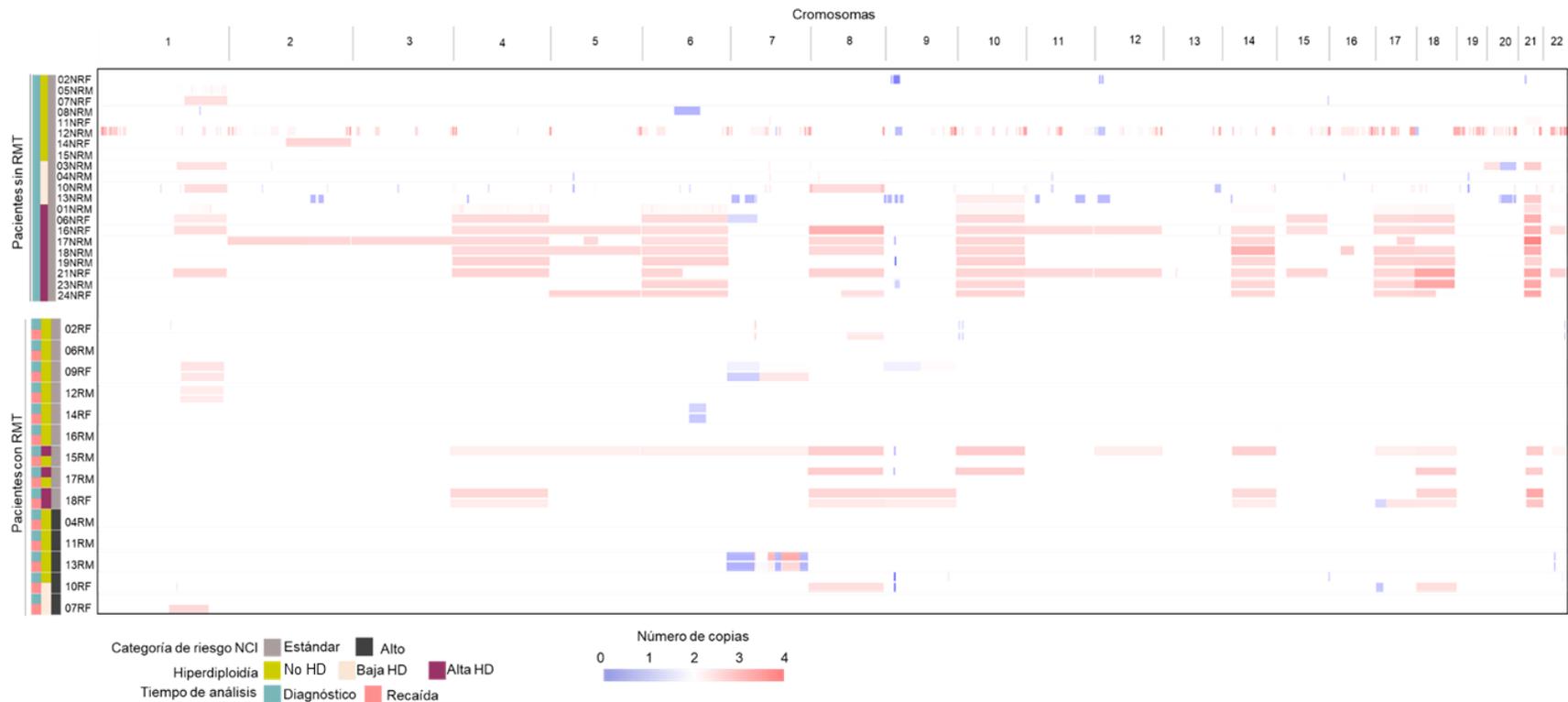
Los perfiles de ganancias y pérdidas en el número de copias identificados en cada uno de los 35 pacientes examinados con arreglos genómicos se presentan en la Figura 8. Al momento del diagnóstico se detectaron un total de 1136 CNAs, incluyendo 854 duplicaciones y 282 deleciones (ver criterios para definir ganancias o pérdidas en la sección de Metodología 5.5.1). De ellas, 87 deleciones y 62 duplicaciones fueron registradas en la serie con RMT. Resalta la presencia de múltiples alteraciones (718 CNAs, 619 ganancias y 99 pérdidas) en dos pacientes sin RMT (10NRM y 12NRM). Esa cantidad de eventos sugiere la existencia de una alta inestabilidad genómica.

Se encontraron duplicaciones y deleciones que comúnmente son reportadas en LLA-B, incluyendo aneuploidías, así como duplicaciones y pérdidas intersticiales en 1q, 9p, 7q y 12p (Figura 9A, B). Se determinó que ocurren diferencias ( $P=0.01$ ) en la distribución de alteraciones extensas ( $\geq 50\%$  de un brazo cromosómico) entre los grupos de pacientes con y sin RMT (Figura 9C).

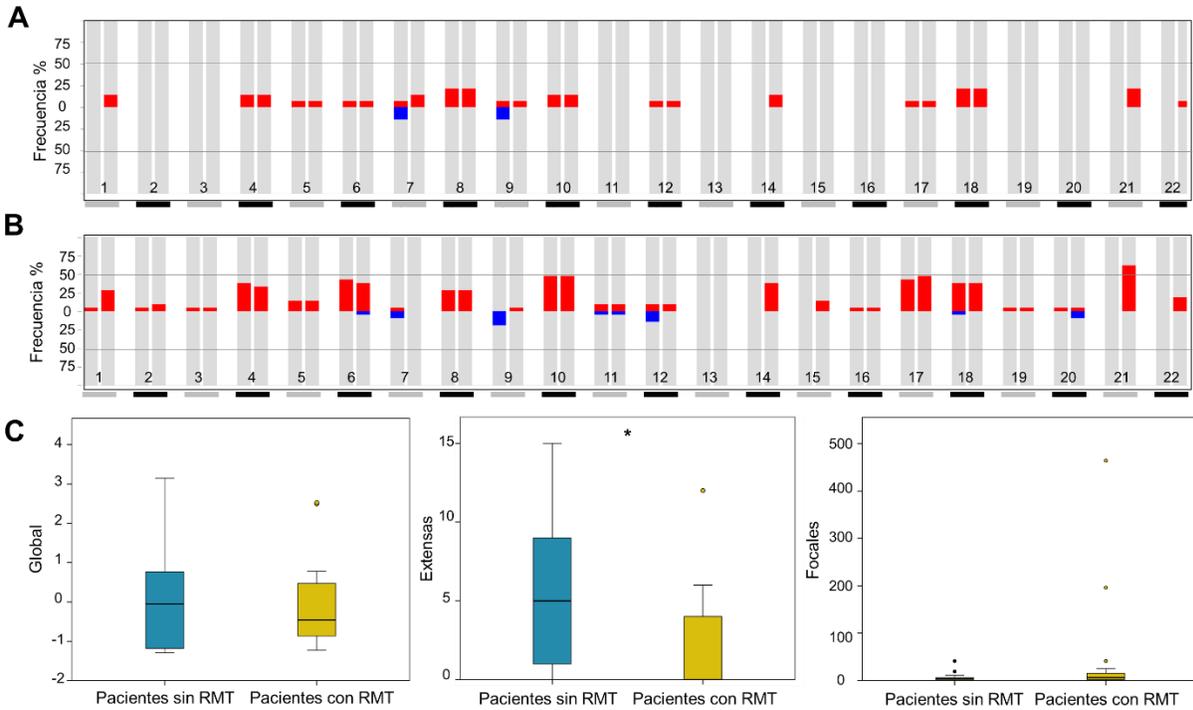
En cuanto a los eventos que afectan la ploidía, no se distinguieron perfiles con monosomías. En cambio, el 48.6% (17/35) de los pacientes analizados presentó hiperdiploidía; la mayoría de ellos, el 70.6% (12/17), con  $>50$  cromosomas (hiperdiploidía alta). La duplicación intersticial en 1q, alteración estructural identificada con frecuencia en cariotipos con hiperdiploidía alta, se presentó en el 25% (3/12).

La frecuencia de la ganancia de cromosomas completos en pacientes hiperdiploides con o sin RMT, se muestra en la Figura 10. En esta entidad citogenética ampliamente descrita en LLA-B, los cromosomas 4, 6, 8, 10, 14, 17, 18 y 21 representaron entre el 47-82% de las ganancias observadas. No se detectaron copias extra de los cromosomas 1, 13, 16, 19 y 20. Las ganancias en esos cromosomas son escasamente reportadas en hiperdiploidía; su prevalencia se estimó entre el 6% y 10% en un estudio que incluyó alrededor de 500 pacientes [135].

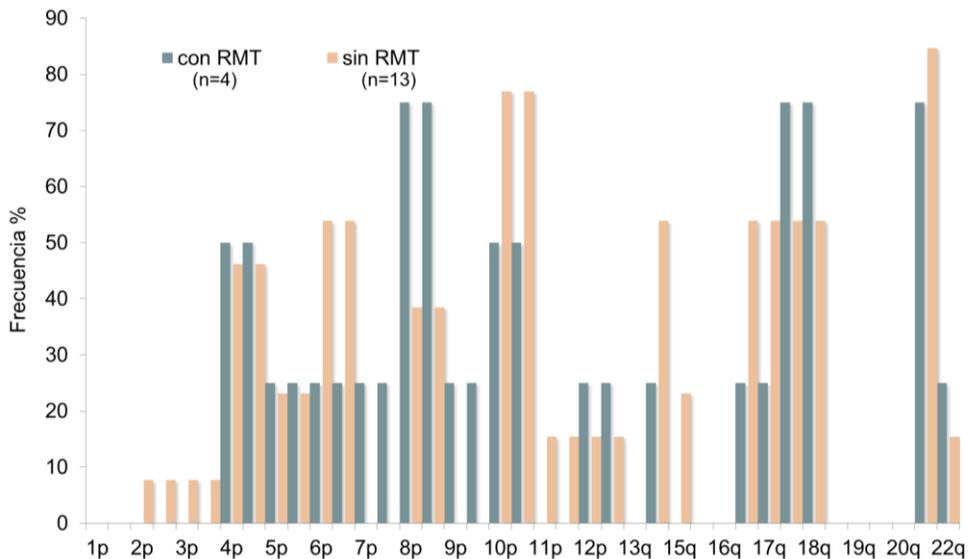
En el tiempo de la presentación clínica, el 28.6% (4/14) de los niños con RMT exhibieron cromosomas extra. La hiperdiploidía alta, asociada a un pronóstico favorable en LLA-B, fue caracterizada en el 21.4% (3/14) del grupo con RMT. No se encontraron perfiles que indicaran la presencia de otros cambios estructurales que comprenden alteraciones genéticas primarias con relevancia pronóstica tales como la *iAMP21*, entidad que ha sido asociada con un desenlace clínico negativo en LLA-B [136].



**Figura 8.** Perfiles de CNAs en pacientes mexicanos con LLA-B analizados con arreglos genómicos de alta resolución. En rojo y azul se representa ganancias y pérdidas de material genético, respectivamente. Los pacientes están organizados (eje y) en función de la clasificación de riesgo NCI asignada al diagnóstico y el estatus de hiperdiploidía (HD) identificado con la plataforma de hibridación genómica utilizada. En los pacientes con RMT, el genoma es representado al diagnóstico inicial y en el tiempo en que ocurrió la recaída. La información sobre el género se incluye en la identificación del paciente (F= femenino; M= masculino). NCI= National Cancer Institute; RMT= recaída muy temprana.



**Figura 9.** Cambios en el número de copias en el genoma de pacientes con y sin recaída muy temprana de la enfermedad. (A) Se indica la frecuencia de las alteraciones (en rojo ganancias y en azul pérdidas) detectadas en los casos que recayeron y (B) en el grupo de comparación. (C) Diagrama de caja que muestra la distribución de la carga global de CNAs focales y extensas estimada en los dos grupos de estudio. Para este cálculo se utilizó la aplicación CNApp disponible en [tools.idibaps.org/CNApp](https://tools.idibaps.org/CNApp). Se realizó la prueba de Mann-Whitney U-test para identificar diferencias significativas. Valor  $P \leq 0.05$  (\*).



**Figura 10.** Histograma que muestra la frecuencia de las ganancias de cromosomas completos en pacientes hiperdiploides con RMT y sin RMT de LLA-B.

### 6.2.3. Identificación de CNAs recurrentes y su potencial implicación biológica

Después de obtener los perfiles genómicos de CNAs en los 35 pacientes analizados con arreglos genómicos, se buscó distinguir entre los cambios que potencialmente tienen funciones biológicas importantes para el inicio y progresión de la enfermedad y los que constituyen eventos aleatorios que no confieren ventajas selectivas a las células leucémicas (ver en Metodología sección 5.6.2.). Con este análisis se identificaron regiones cromosómicas significativamente alteradas asociadas con el riesgo de RMT en LLA-B.

A continuación, se describen por separado los resultados obtenidos en el grupo de comparación conformado por pacientes sin RMT (n=21) o en el grupo de casos con RMT (n=14), estudiados al diagnóstico inicial y en el momento de la recurrencia de la enfermedad.

#### 6.2.3.1. CNAs recurrentes en el grupo de pacientes sin RMT

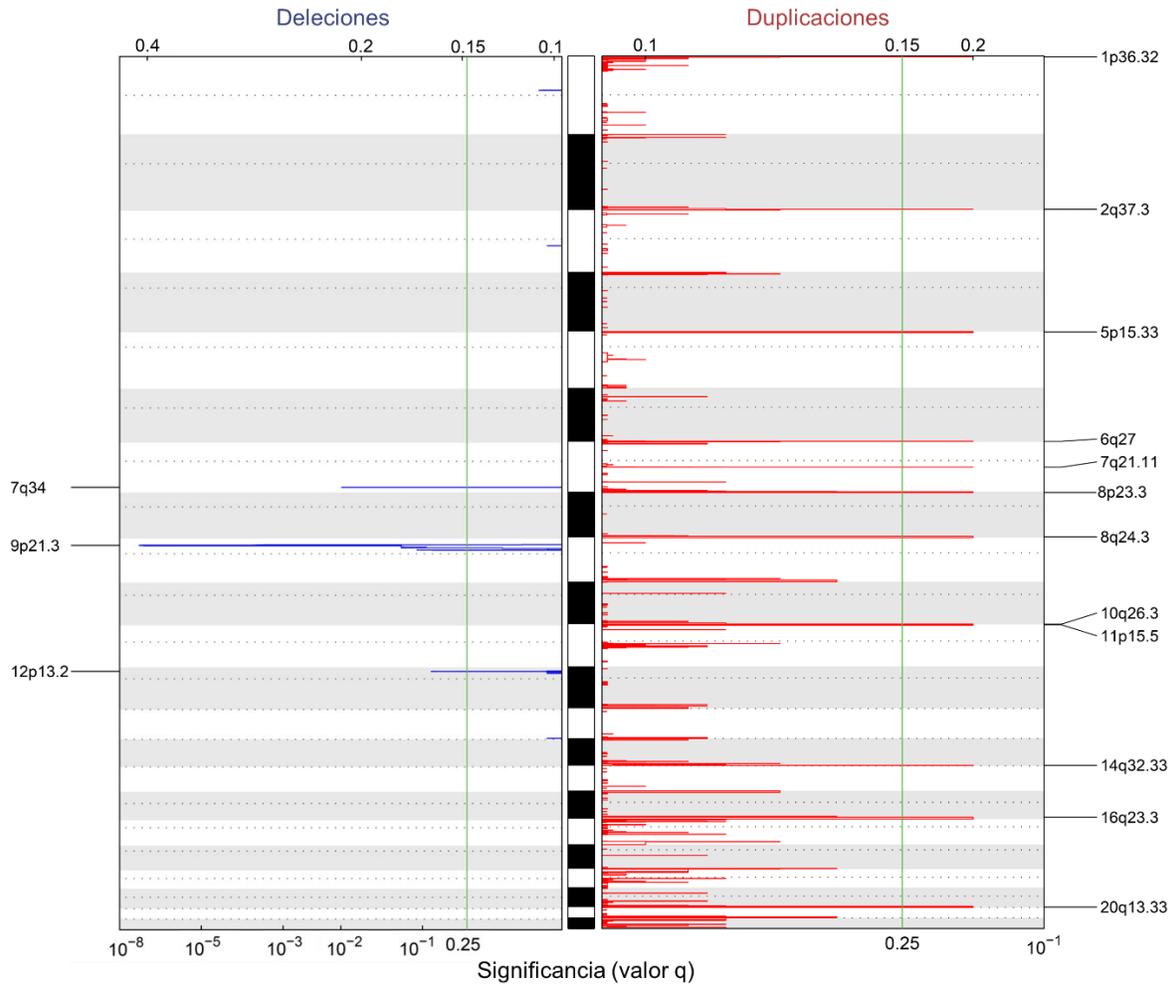
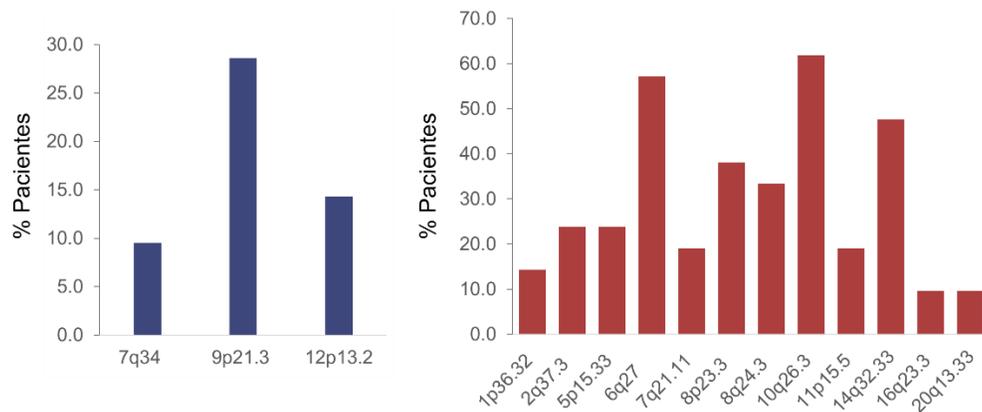
En el grupo de comparación sin RMT (n=21), se encontraron alteraciones recurrentes tanto extensas, afectando un brazo cromosómico ( $\geq 50\%$ ) o cromosomas completos, como focales ( $< 50\%$  de un brazo cromosómico). Respecto a la primera categoría, los desequilibrios cromosómicos significativos ( $q < 0.25$ ) incluyeron la duplicación en 1q (29%), 4p (33%), 4q (33%), 6p (43%), 6q (38%), 8p (24%), 8q (29%), 10p (48%), 10q (48%), 14q (38%), 17p (38%), 17q (43%), 18p (43%), 18q (38%), y 21q (57%). Por otra parte, se distinguieron en total 15 regiones mínimas comunes de ganancias y pérdidas focales significativas (Figura 11A). En conjunto, estas alteraciones genómicas afectaron a un total de 845 genes, incluyendo miRNAs y RNAs no codificantes; 832 y 13 genes exhibieron ganancias y pérdidas en el número de copias, respectivamente. Su tamaño, y ubicación genómica se indican en la Tabla 3. Las alteraciones focales más frecuentes se localizan en 10q26.3 y 9p21.3, citobandas afectadas por eventos de duplicación en el 61.9% (n=13) y por deleciones en el 28.6% (n=6), respectivamente (Figura 11B).

Las 12 regiones con ganancias focales contuvieron una mediana de 85 genes (rango 1-117). *SMOC2* y *SEMA3C* fueron los únicos genes incluidos en la región mínima de alteración en 6q27 y 7q21.11, respectivamente. Ocho regiones (1p36.32, 2q37.3, 8q24.3, 10q26.3, 11p15.5, 14q32.33, 16q23.3 y 20q13.33) contuvieron más de 50 genes. En las dos regiones restantes, 5p15.33 y 8p23.3, las alteraciones involucraron a 36 y 14 genes.

En cuanto a los eventos de pérdida en el número de copias, se identificaron tres regiones recurrentes que en total afectan a 13 genes (Tabla 3). Dos de esos cambios ocurrieron en 9p21.3 y 12p13.2, regiones que comprenden a los supresores tumorales funcionalmente validados *CDKN2A/B* y *ETV6*.

**A**

Pacientes sin RMT (n=21)

**B**

**Figura 11.** CNAs recurrentes en pacientes sin RMT. (A) Gráfico de los puntajes G (evalúan la amplitud y frecuencia de las alteraciones) calculados con GISTIC2.0 para identificar regiones recurrentemente perdidas (azul) o ganadas (rojo) en el genoma. El umbral de significancia (valor q) se estableció en 0.25. (B) Gráfico de barras que indica la frecuencia de muestras que al diagnóstico presentaron las regiones identificadas como recurrentes (en rojo duplicaciones y en azul deleciones).

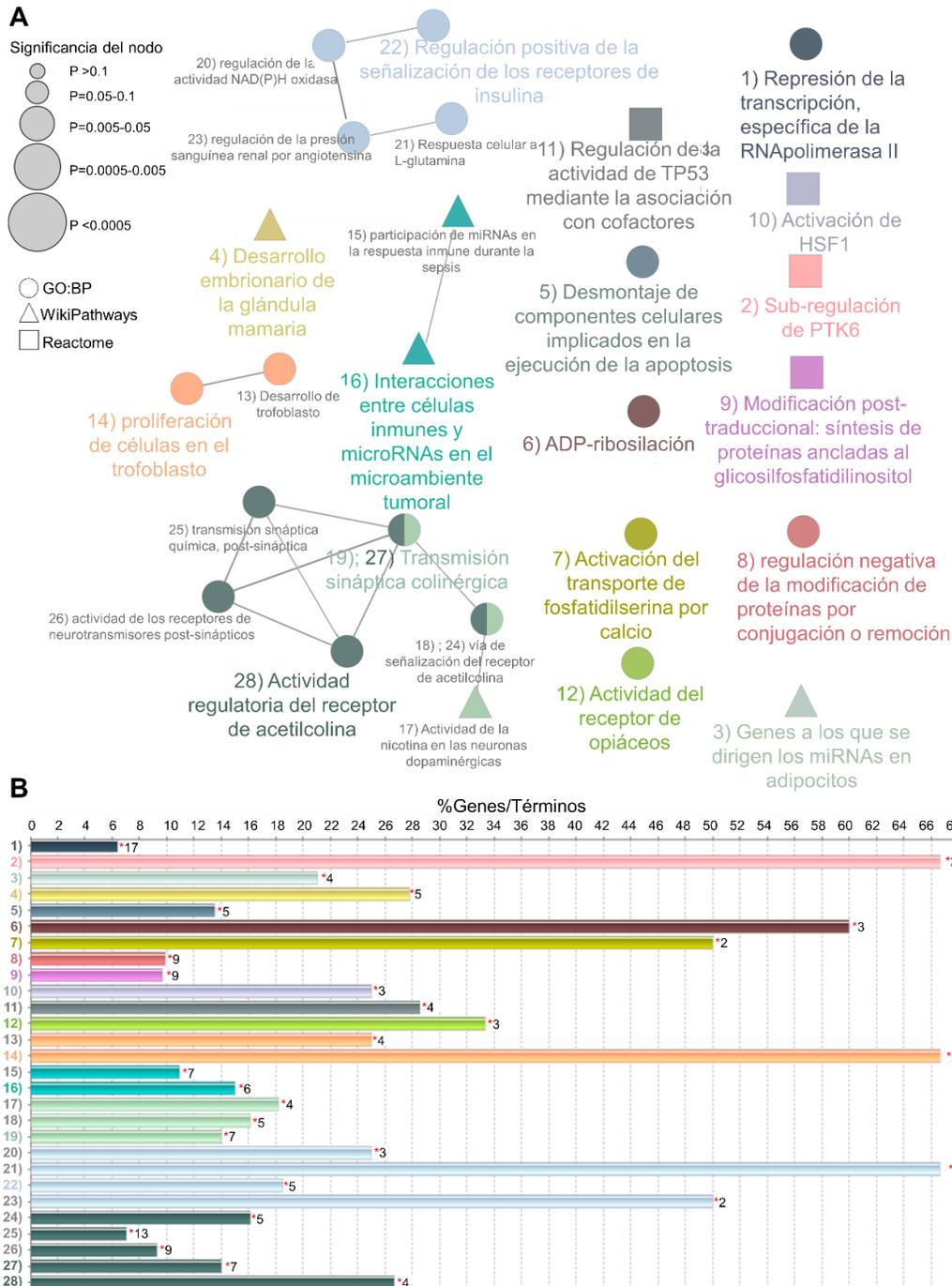
**Tabla 3.** Regiones cromosómicas con CNAs recurrentes identificadas en el grupo sin recaída muy temprana de LLA-B

Evento focal	Citobanda	Posición genómica	Tamaño (Mb)	No. de genes	Ejemplo de genes afectados
<b>Duplicaciones</b>					
Región 1	1p36.32	chr1:1-5064586	5.1	113	<i>TNFRSF14</i>
Región 2	2q37.3	chr2:238312462-243199373	4.9	74	<i>SEPT2</i>
Región 3	5p15.33	chr5:1-2955035	3.0	36	<i>TERT</i>
Región 4	6q27	chr6:169224982-169334174	0.1	1	<i>SMOC2</i>
Región 5	7q21.11	chr7:80540570-80789535	0.2	1	<i>SEMA3C</i>
Región 6	8p23.3	chr8:1-2257795	2.3	14	<i>MYOM2</i>
Región 7	8q24.3	chr8:142013420-146364022	4.4	114	<i>FBXO25</i>
Región 8	10q26.3	chr10:131252936-135534747	4.3	52	<i>PPP2R2D</i>
Región 9	11p15.5	chr11:1-3716187	3.7	117	<i>SIRT3</i>
Región 10	14q32.33	chr14:101457776-106352825	4.9	113	<i>AKT1</i>
Región 11	16q23.3	chr16:83796191-90354753	6.6	101	<i>CDH15</i>
Región 12	20q13.33	chr20:59554913-63025520	3.5	96	<i>UCKL1</i>
<b>Deleciones</b>					
Región 1	7q34	chr7:141967790-142560047	0.6	7	<i>PRSS1/2</i>
Región 2	9p21.3	chr9:21555579-23697520	2.1	5	<i>CDKN2A/B</i>
Región 3	12p13.2	chr12:11711226-12231275	0.5	1	<i>ETV6</i>

#### 6.2.3.2. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes con CNAs focales identificados en el grupo de pacientes sin RMT

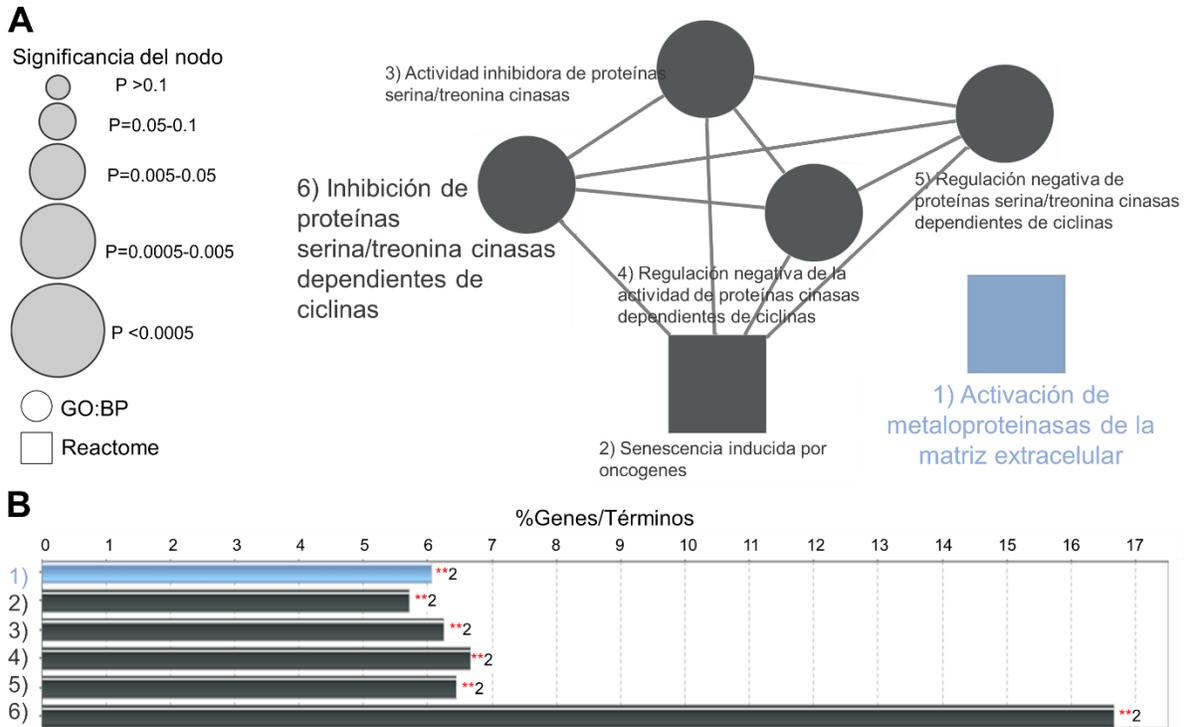
Después de identificar regiones cromosómicas recurrentes en pacientes sin RMT (Tabla 3) se realizaron análisis de enriquecimiento funcional con ClueGO (Metodología). Con este tipo de abordaje es posible interpretar la relevancia biológica de los genes que se encontraron significativamente alterados por pérdidas y ganancias en el número de copias.

En el listado de 845 genes, correspondiente a las 12 regiones con eventos focales de duplicación, fueron significativamente enriquecidos 28 procesos/vías biológicas (Figura 12A) implicados en la respuesta inmune (Interacciones entre células inmunes y microRNAs en el microambiente tumoral), la proliferación celular (Regulación de la actividad de TP53 mediante la asociación con cofactores), apoptosis (Desmontaje de componentes celulares en la fase de ejecución de la apoptosis) o la modificación de proteínas (ADP-ribosilación, Modificación post-traducciona: síntesis de proteínas ancladas a glicosilfosfatidilinositol).



**Figura 12.** Análisis de enriquecimiento funcional de genes contenidos en las regiones recurrentemente duplicadas en pacientes sin RMT. (A) Los términos sobre-representados (Procesos biológicos (BP) en Gene Ontology (GO), Reactome y WikiPathways) son visualizados como nodos cuyo tamaño representa el nivel de significancia (\*valor P Benjamini-Hochberg < 0.05) (n=21). (B) Las barras indican el número de genes asociados con los términos, junto a cada una de las barras aparece el porcentaje que representa con respecto al número total de genes que ha sido asociados específicamente con cada proceso biológico.

Por otro lado, el análisis funcional de los 13 genes alterados por deleciones focales recurrentes identificó 6 procesos biológicos/vías asociados significativamente, incluyendo la regulación del ciclo celular (regulación negativa de la actividad de proteínas serina/treonina cinasa dependiente de ciclinas) y la remodelación de la matriz extracelular (activación de metaloproteinasas) (Figura 13A). Los genes alterados por pérdidas en el número de copias representaron respectivamente alrededor del 6% y 17% del total de genes que han sido relacionados con estos procesos (Figura 13B).



**Figura 13.** Análisis de enriquecimiento ClueGO de los 13 genes que presentaron deleciones recurrentes en el grupo sin RMT. (A) Redes funcionalmente agrupadas de acuerdo con la categoría de procesos biológicos (BP), en Gene Ontology (GO) y Reactome. Los términos son presentados como nodos (forma redonda o cuadrada) cuyo tamaño representa el nivel de significancia (\*\*valor P Benjamini-Hochberg < 0.001) (n=21). (B) Las barras indican el número de genes asociados con los términos, junto a cada una de las barras aparece el porcentaje que representa con respecto al número total de genes que ha sido asociados específicamente con cada término.

### 6.2.3.3. CNAs recurrentes en pacientes con RMT

En el grupo de casos con RMT (n=14) se estudiaron los aspirados medulares obtenidos tanto al diagnóstico inicial como en la respectiva recaída de la enfermedad. Debido a su baja frecuencia, el análisis conducido en las alteraciones a nivel de brazo cromosómico

no contó con el suficiente poder estadístico. Por lo tanto, únicamente se reportan los resultados que corresponden a la detección de eventos focales.

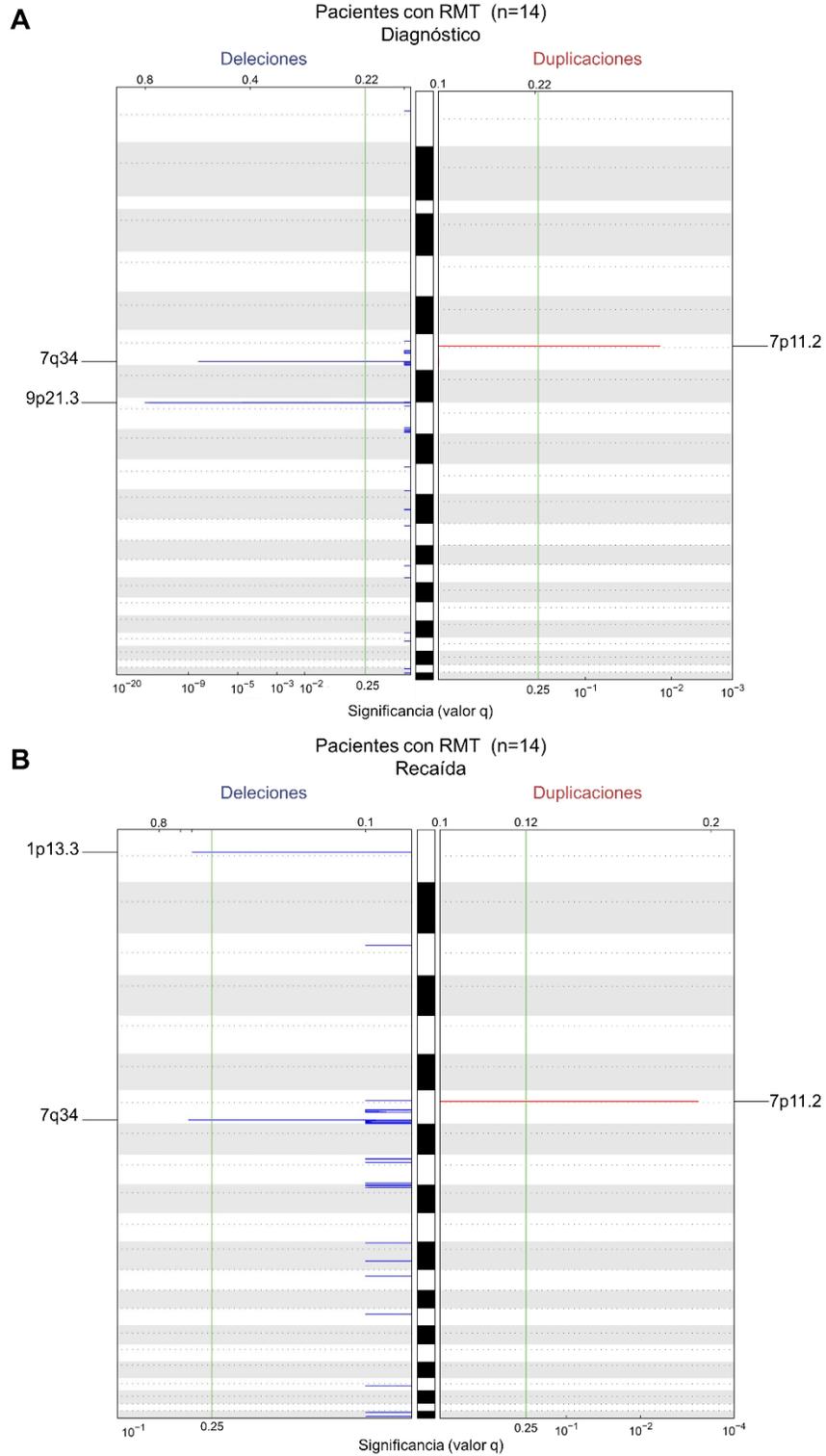
En el diagnóstico de esta serie de pacientes que eventualmente recayó, se distinguieron tres regiones con CNAs recurrentes (Figura 14A). La ubicación y el tamaño de las pérdidas/ganancias de material genético y el número de genes asociados, se enlistan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Regiones con CNAs recurrentes identificados en el análisis conducido en los pacientes con recaída muy temprana de LLA-B

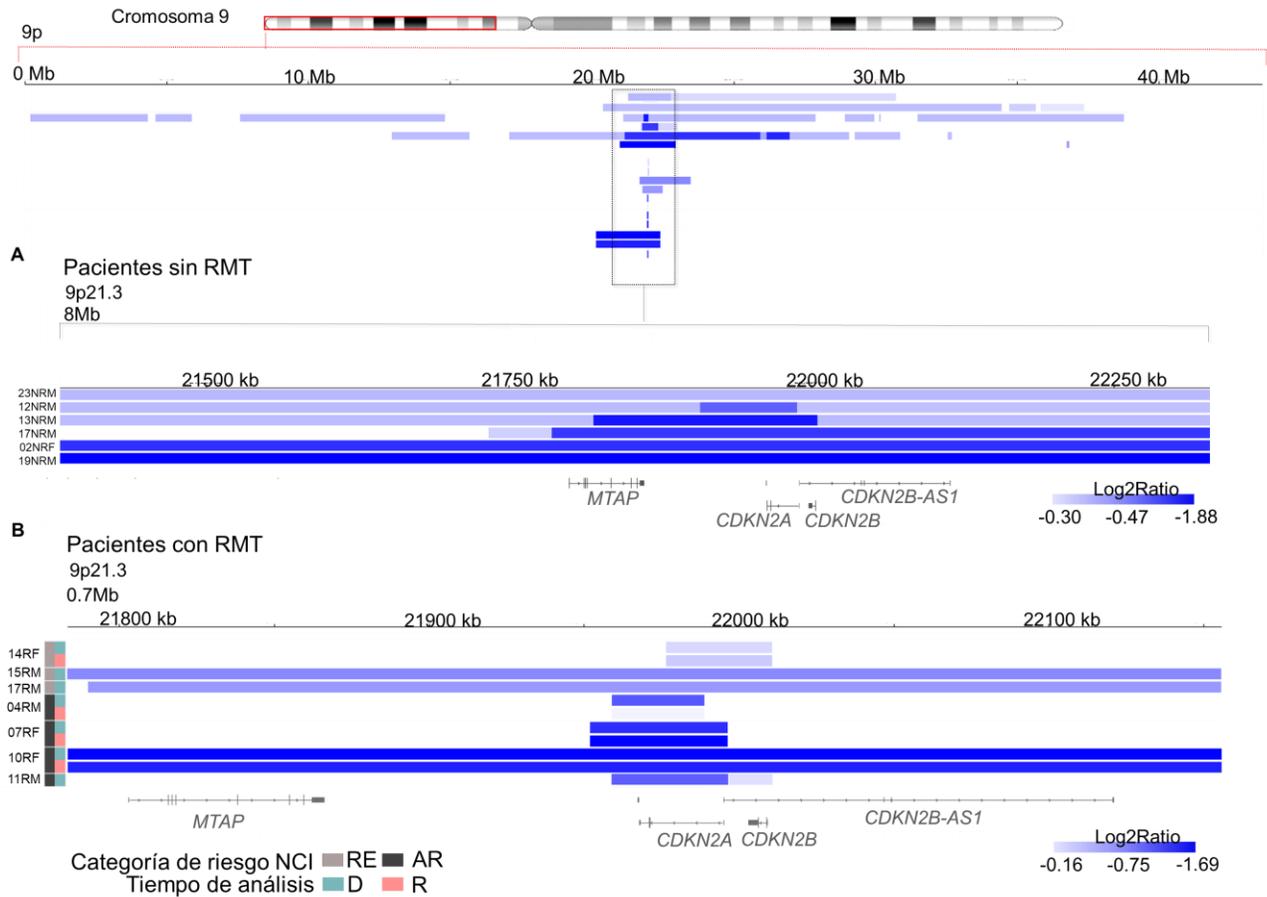
Evento focal	Citobanda	Posición genómica	Tamaño (Mb)	No. de genes	Ejemplo de genes afectados
<b>Diagnóstico</b>					
Duplicaciones					
Región 1	7p11.2	chr7:54296198-54551972	0.3	1	<i>LINC01445</i>
Deleciones					
Región 1	7q34	chr7:141967302-142553624	0.6	5	<i>PRSS1/2</i>
Región 2	9p21.3	chr9:21959040-21982738	0.02	2	<i>CDKN2A</i>
<b>Recaída</b>					
Duplicaciones					
Región 1	7p11.2	chr7:54296198-54550850	0.3	1	<i>LINC01445</i>
Deleciones					
Región 1	1p13.3	chr1:108506279-108994149	0.5	2	<i>SLC25A24</i>
Región 2	7q34	chr7:141967659-142553624	0.6	5	<i>PRSS1/2</i>

Al visualizar las coordenadas genómicas que corresponden a la región mínima común de duplicación hallada en 7p11.2, se precisó que *LINC01445* es el único gen ubicado dentro de dicho *locus*.

Conviene resaltar que las citobandas 7q34 y 9p21.3, las cuales exhibieron deleciones en el 35.7% y 50% de los casos con RMT, también fueron consideradas como significativas en pacientes que no recayeron tempranamente (Figura 11A). Sin embargo, cabe destacar que los eventos focales de deleción fueron de menor tamaño y, por lo tanto, afectaron a un menor número de genes en el grupo con RMT (Tablas 3 y 4). En ellos, por ejemplo, la región mínima común de deleción en el *locus* 9p21.3 incluyó a *CDKN2A-DT* y *CDKN2A*, mientras que en pacientes sin RMT la deleción afectó además a *CDKN2B*, *CDKN2B-AS1*, *MTAP*, *DMRTA1* y *LINC01239*. En la Figura 15 se ilustra la diferencia en el tamaño de las pérdidas genómicas que ocurrieron en 9p21.3. En los pacientes con y sin RMT, dichas CNAs presentaron una mediana de longitud de 0.05 Mb (rango:0.03-2.3 Mb) y 8 Mb (rango:1.28-13.9 Mb), respectivamente.



**Figura 14.** CNAs recurrentes en pacientes con RMT. Se indican las regiones cromosómicas con pérdidas (azul) o ganancias (rojo) significativas (valor  $q < 0.25$ ) determinadas (A) al diagnóstico y (B) en la subsecuente recaída de la enfermedad.



**Figura 15.** Pérdidas en el número de copias en la región 9p21.3 identificadas con arreglos genómicos. Se presenta un panorama general de las alteraciones. Se incluye la representación esquemática detallada para (A) los pacientes incluidos en el grupo de referencia o en (B) pacientes con recaída muy temprana, remarcando la diferencia en la extensión de la deleción para los dos grupos de estudio analizados. La intensidad del color refleja la amplitud del cambio de acuerdo con la relación Log2. No se incluyeron las alteraciones en mosaico. RE=riesgo estándar; AR=alto riesgo; D=diagnóstico; R=recaída.

En el análisis que corresponde a la RMT de la enfermedad, se identificaron tres regiones con CNAs significativas (Figura 14B). Dichos cambios ocurrieron en 7q34, 7p11.2 y 1p13.3. Las dos primeras alteraciones también fueron observadas en el diagnóstico inicial, en tanto que la deleción de los genes *SLC25A24* y *NBPF4* en 1p13.3 (Tabla 4, Figura 14B), se identificó como un cambio que ocurre exclusivamente en el momento de la recaída. Al visualizar las coordenadas genómicas en IGV se evidenció que la región de deleción común también incluye al gen *VAV3-AS1*.

La CNA focal identificada en 9p21.3 fue significativa únicamente en el diagnóstico de LLA-B. En contraste, 7q34 y 7p11.2 son regiones que se alteran a frecuencias

significativas por CNAs focales en la presentación de LLA-B como en la recaída de la enfermedad.

#### 6.2.3.4. Análisis de enriquecimiento funcional de los genes afectados por CNAs focales en pacientes con RMT

Las deleciones y duplicaciones recurrentes (Tabla 4), definidas al diagnóstico y a la recaída de la enfermedad, contenían un reducido número de genes por lo que el análisis de enriquecimiento en ClueGO no generó redes de procesos biológicos funcionalmente relacionados. Únicamente *PRSS1* y *PRSS2*, genes con pérdidas significativas en el número de copias en la región 7q34, se asociaron (valor P Benjamini-Hochberg 1.5E-5/ 2.9E-5) con la vía de activación de metaloproteinasas (ej. proMMP1/7), las cuales participan en la renovación de los componentes de la matriz extracelular (Reactome).

#### 6.2.4. Asociación de las CNAs recurrentes con factores clínicos pronósticos en pacientes con y sin recaída muy temprana de LLA-B

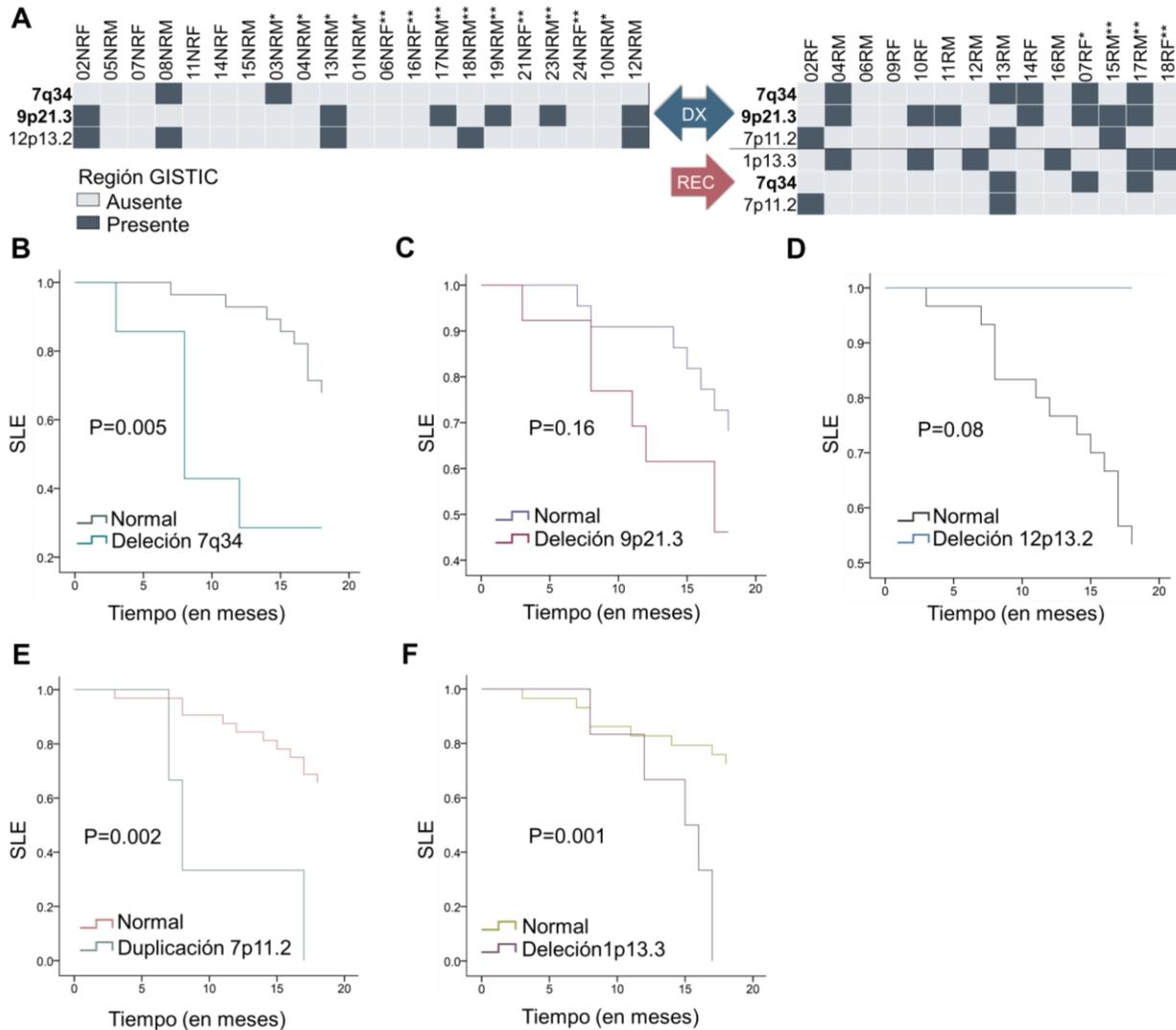
Después de haber identificado CNAs focales que potencialmente podrían representar cambios biológicamente relevantes en el diagnóstico y/o la RMT de LLA-B, se estudió su correlación con características clínico-biológicas como la edad, conteo leucocitario y la clasificación de riesgo NCI.

El análisis se enfocó en las duplicaciones y deleciones recurrentes que ocurren en 9p21.3, 7q34, 12p13.2, 1p13.3 y 7p11.2. Con excepción de 7q34 y 1p13.3, no se encontraron asociaciones con las características clínicas evaluadas. Los pacientes que al momento de la RMT mostraron deleciones en 1p13.3 (46%; 6/14) fueron con mayor frecuencia clasificados en la categoría de alto riesgo NCI al diagnóstico inicial (P= 0.049). Por otra parte, los niños con CNAs en 7q34, en tendencia, sufrieron con mayor frecuencia RMT de la enfermedad (2% vs. 35.7%; P=0.09), y se estratificaron principalmente en el grupo de alto riesgo NCI (P= 0.08).

#### 6.2.5. Asociación de las CNAs recurrentes con el desenlace clínico

La Figura 16B-F ilustra la asociación de los cambios recurrentes identificados en los pacientes con la supervivencia libre de enfermedad (SLE). Tres de las cinco CNAs se relacionaron con un impacto pronóstico negativo. Centrándose en los pacientes que exhibieron duplicaciones en 7p11.2 y deleciones en 1p13.3, éstos recayeron muy tempranamente durante el seguimiento. En contraste, en pacientes que no registraron alteraciones en el número de copias de 7p11.2 o 1p13.3, la SLE fue del 66% y 72%, respectivamente (P=0.002; P=0.001). Asimismo, se observó una SLE menor (28%) en pacientes con deleciones en 7q34, en comparación con la SLE del grupo de pacientes

con estados normales en dicha región (68%,  $P=0.005$ ). No obstante, la SLE no difirió entre los pacientes positivos o negativos a la delección de los genes *CDKN2A/B* en 9p21.3 (46% vs. 68%,  $P=0.16$ ).



**Figura 16.** Análisis de supervivencia de los pacientes con cambios recurrentes en el número de copias. (A) Presencia/ausencia de ganancias y/o pérdidas que ocurren a frecuencias significativas (región GISTIC) en el diagnóstico o recaída de LLA-B. Curvas de supervivencia libre de enfermedad (SLE) con respecto a la presencia de delecciones en (B) 7q34, (C) 9p21.3, (D) 12p13.2 o (F) 1p13.3, y (E) duplicaciones en 7p11.2. DX= diagnóstico; REC= recaída. \*Pacientes con hiperdiploidía baja (47-50 cromosomas). \*\*Pacientes con hiperdiploidía alta (>50 cromosomas).

### 6.2.5.1. Análisis de riesgos proporcionales de Cox

Se efectuaron análisis de supervivencia multivariantes (riesgos proporcionales de Cox) para determinar la asociación de las CNAs en los loci 7p11.2, 7q34 y 1p13.3 con la RMT. Al ajustar el modelo (aHR) por factores con reconocido impacto pronóstico en el desenlace clínico como la clasificación de riesgo NCI y el esquema de tratamiento administrado, no se identificaron asociaciones significativas (Tabla 5). No obstante, es importante resaltar que los pacientes con incrementos en el número de copias en *LINC01445*, gen ubicado en 7p11.2, tienen 5.9 veces el riesgo de recaer muy tempranamente (P= 0.06) en comparación con aquellos que no presentaron esta alteración al diagnóstico.

**Tabla 5.** Modelo de regresión de Cox para el análisis de la supervivencia libre de enfermedad en pacientes con LLA-B

Variable	Pacientes n	No ajustado HR (IC95%)	P	Ajustado aHR (IC95%) <sup>a</sup>	P
Delección 7q34					
No	28	Referencia		Referencia	
Sí	7	4.3 (1.4-13.2)	0.011	2.3 (0.6-8.8)	0.22
Delección 1p13.3					
No	29	Referencia		Referencia	
Sí	6	5.3 (1.7-15.9)	0.003	2.3 (0.6-9.9)	0.25
Duplicación 7p11.2					
No	32	Referencia		Referencia	
Sí	3	5.8 (1.6-21.4)	0.008	5.9 (0.9-38.2)	0.06

<sup>a</sup> El modelo fue ajustado por la clasificación de riesgo NCI y el esquema quimioterapéutico. RMT= recaída muy temprana; HR= Hazard ratios no ajustados; aHR =Hazard ratios ajustados por la clasificación de riesgo NCI y el esquema de tratamiento; CI= intervalo de confianza

### 6.3. Identificación mediante MLPA de CNAs en genes asociados con el pronóstico de LLA-B

Adicional al análisis genómico, en el presente trabajo se investigó la asociación entre la clasificación de riesgo previamente descrita en la literatura, UKALL-CNA y el riesgo de RMT en pacientes pediátricos con LLA-B. Dicho sistema de estratificación está basado en el estatus de delección de los genes *EBF1* (5q33.3), *IKZF1* (7p12.2), *CDKN2A* (9p21.3), *CDKN2B* (9p21.3), *PAX5* (9p13.2), *ETV6* (12p13.2), *BTG1* (12q21.33), *RB1* (13q14.2) y la región PAR1 (Xp22.33). El estado en el número de copias de esos genes fue determinado con dos kits comerciales de MLPA, P335 y P419 (Metodología). Estos ensayos permitieron en primer instancia validar el número de copias de genes relacionados con el pronóstico de LLA-B, determinados en los 35 pacientes incluidos en el estudio genómico.

#### 6.3.1. Validación de CNAs con relevancia pronóstica por MLPA

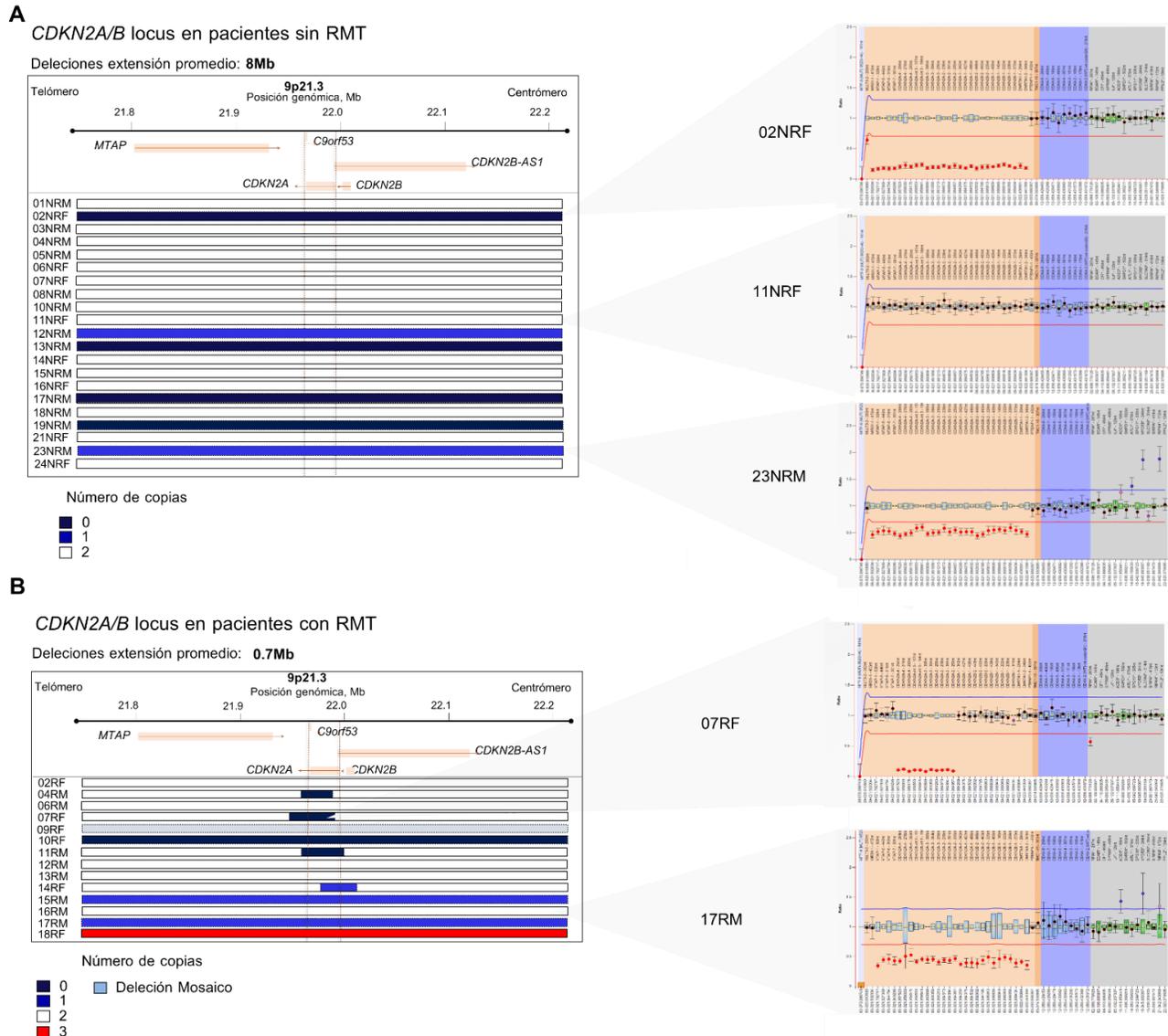
En la validación de los resultados generados con el arreglo genómico, se analizó por MLPA a un total de 49 muestras, 21 de ellas pertenecientes al diagnóstico de pacientes sin RMT y las 28 restantes obtenidas de los 14 casos que desarrollaron RMT de LLA-B. De estos últimos, se estudió tanto el diagnóstico (14 muestras) como la respectiva recurrencia de la enfermedad (14 muestras).

Con la aplicación de ambas metodologías, se consiguieron resultados concordantes para la detección de pérdidas de número de copias en los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y PAR1 (*CSF2RA*, *IL3RA*, y *P2RY8*) en 48/49 muestras (98%). La concordancia entre los hallazgos de CNAs generados con MLPA y el SNPa se indica en la Figura 17.

Delecciones en genes con relevancia pronóstica en LLA-B		MLPA		Total
		Negativos	Positivos	
SNPa	Negativos	23	1	24
	Positivos	0	25	25
Total		23	26	49

**Figura 17.** Concordancia en la determinación de delecciones con valor pronóstico en LLA-B en los pacientes con datos de CNAs obtenidos con arreglos genómicos y MLPA. Se evaluó el estado de delección en los genes *EBF1* (5q33.3), *IKZF1* (7p12.2), *CDKN2A/B* (9p21.3), *PAX5* (9p13.2), *ETV6* (12p13.2), *BTG1* (12q21.33), *RB1* (13q14.2) y PAR1 (Xp22.33).

En la Figura 18 se incluyen cinco gráficos representativos de ensayos de MLPA dirigidos al *locus* 9p21.3 (*CDKN2A/B*) con los cuales se validaron las CNAs previamente identificadas por SNPa. Los datos fueron discrepantes en un niño (03NRM; Figura 19), cuya delección de ~11.5 kb (afectando a los exones 1 y 2 de los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*, respectivamente) fue detectada únicamente por MLPA. Nuestros resultados ilustran la importancia y la utilidad de incluir en el abordaje terapéutico a esta técnica para evaluar CNAs con implicaciones pronósticas en LLA-B.

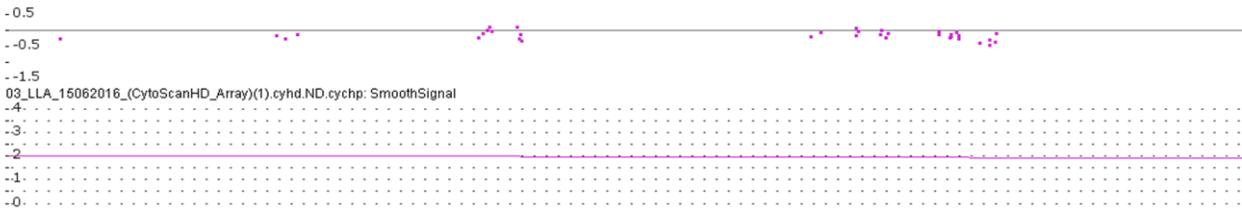


**Figura 18.** Validación de CNAs en el *locus* 9p21.3 que aloja a los genes *CDKN2A/B*. Ejemplos de hallazgos concordantes entre SNPa y MLPA en (A) el grupo de comparación y (B) pacientes con RMT.

9p21.3

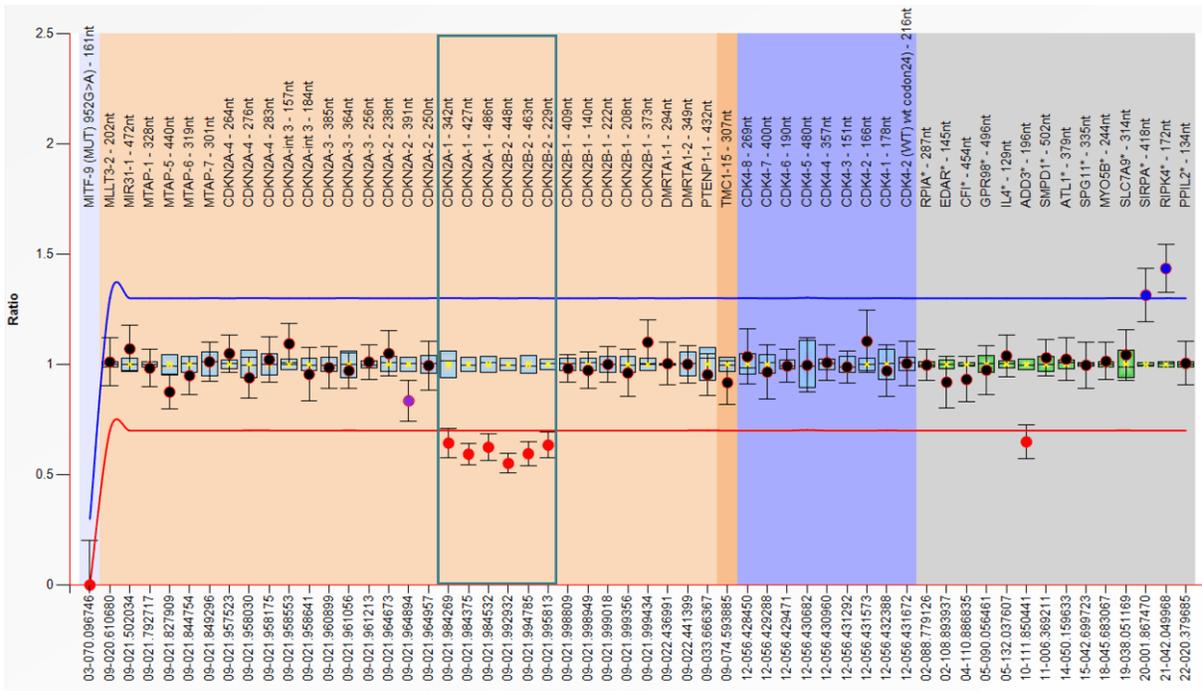
SNPa

03\_LLA\_15062016\_(CytoScanHD\_Array)(1).cyhd.nd.cychp: Weighted Log2 Ratio



MLPA 419

MLPA 335



**Figura 19.** Resultado inconsistente entre MLPA y arreglos genómicos. CytoScan HD no identificó la delección en *CDKN2A/B* que fue evidenciada con ensayos MLPA. La pérdida de la única sonda que el kit P335 incluye para identificar delecciones en el gen *CDKN2B* fue confirmada con la utilización del ensayo P419. Este segundo kit corroboró que la alteración en la región 9p21.3 implicó respectivamente a los exones 1 y 2 de los genes *CDKN2A* y *CDKN2B*, con un total de seis sondas perdidas (recuadro verde). Se presenta la ubicación genómica de las sondas incluidas en el arreglo y en los kits de MLPA utilizados, P335 y P419.

### 6.3.2. Características de los pacientes con LLA-B analizados exclusivamente con MLPA

De los 25 casos con RMT disponibles dentro de la cohorte, once no fueron elegibles para la caracterización genómica por falta de aspirado medular correspondiente a la recaída. En ellos, el análisis fue enfocado en el número de copias de los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1. Sus características clínico-biológicas son señaladas en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Características clínicas y biológicas de los pacientes analizados exclusivamente por MLPA

	Pacientes con RMT n=11	Pacientes sin RMT n=19	P
<b>Características clínicas</b>			
Género, n (%)			
Hombre	4(36.4)	7(36.8)	1.0
Mujer	7(63.6)	12(63.2)	
Edad, n (%)			
1-9.9 años	6(54.5)	14(73.7)	0.43
≥10 años	5(45.5)	5(26.3)	
Conteo leucocitario, n (%)			
<50,000/ul	8(72.7)	12(63.2)	0.70
≥ 50,000/ul	3(27.3)	7(36.8)	
Riesgo NCI, n (%)			
Estándar	5(45.5)	9(47.4)	1.0
Alto	6(54.5)	10(52.6)	
Esquema de quimioterapia, n (%)			
St. Jude Total XV	3(27.3)	10(52.6)	0.42
BFM-95	5(45.4)	6(31.6)	
DFCI	---	---	
St. Jude Total XIIIB	3(27.3)	3(15.8)	
Defunción, n (%)			
No	2(18.2)	17(89.5)	<0.001
Sí	9(81.8)	2(10.5)	
<b>Características genéticas</b>			
Transcrito de fusión, n (%)			
No detectado/No analizado	5/4(81.8)	1/12(68.4)	0.67
Detectado	2(18.2)	6(31.6)	

Valor de P calculados con  $\chi^2$ /prueba exacta de Fisher, cuando corresponda. RMT= recaída muy temprana; NCI= National Cancer Institute; BFM-95= Berlin–Frankfurt–Münster-95; DFCI= Dana Farber Cancer Institute 00–01.

En el grupo de comparación se incluyeron 19 pacientes sin RMT, pareados por frecuencia de edad ( $\pm 18$  meses), género y al menos el mismo tiempo de seguimiento de los pacientes con RMT. En total se estudiaron 30 pacientes exclusivamente por MLPA, los cuales presentaron al diagnóstico una edad promedio de 8.2 años (rango 1.1-17.6). Las once recaídas analizadas ocurrieron en promedio a los 9.5 meses (rango 3-18). En el grupo sin RMT, cada uno de los pacientes permaneció en la primera remisión completa durante un promedio de 70 meses (rango 49-120 meses).

#### **6.4. Asociación de perfiles de riesgo basados en CNAs con la RMT en LLA-B**

##### **6.4.1. Características de los pacientes estudiados**

La primera fase de análisis, realizada en pacientes sin fusiones génicas comunes en LLA-B, se complementó con un segundo estudio dirigido a CNAs específicas, cuyo impacto pronóstico ha sido sugerido en la literatura. El abordaje consistió en aplicar el clasificador de riesgo UKALL-CNA, basado en la pérdida de los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1, y evaluar su asociación con el riesgo de recaer muy tempranamente. A diferencia del estudio con arreglos genómicos, la ausencia de fusiones génicas no se empleó como criterio de selección para la segunda fase de análisis. Las características de los pacientes que conformaron el grupo de estudio son resumidas en la Tabla 7. En total fueron elegibles 63 pacientes: 38 pacientes sin RMT, pareados (1:1.5) por frecuencia de edad ( $\pm 18$  meses), género y tiempo de seguimiento (Metodología) a los 25 casos con RMT identificados en la cohorte (Tabla 1). En todos los pacientes ( $n=63$ ), la mediana de edad fue de 6.4 años; tres fueron positivos a *ETV6-RUNX1* (4.8%) y cinco a *TCF3-PBX1* (7.9%), alteraciones citogenéticas asociadas respectivamente con un valor pronóstico favorable e intermedio en LLA-B. En el grupo de pacientes que no registraron RMT, la mediana del tiempo de seguimiento fue 55 meses (rango 29-120).

Dentro del grupo con RMT, el 48% ( $n=12$ ) eran hombres, y la mediana de edad en el diagnóstico inicial fue de 7 años (rango 1.1-16.9). Las recaídas que se analizaron ocurrieron en un promedio de 10.5 meses (rango 2-18) y afectaron sólo a la MO, excepto en un paciente (16RM), en el que el evento se produjo de forma combinada en los testículos. La proporción de RMT fue similar entre los grupos de riesgo NCI estándar (52%) y alto (48%) (Tabla 7). Por otro lado, en la serie sin recaída, fue más frecuente (74%) encontrar la categoría estándar que la clasificación de alto riesgo (26%). El análisis de la presencia de genes de fusión con relevancia pronóstica en LLA-B fue positivo por RT-PCR en dos casos (18.2%); ambos con *TCF3-PBX1*. De acuerdo con lo esperado, se observaron diferencias entre los dos grupos de estudio en la distribución por edad ( $P=0.03$ ), en el esquema de quimioterapia administrado ( $P=0.03$ ) y el fallecimiento ( $P<0.001$ ). No hubo diferencias en cuanto a la distribución de transcritos de fusión (Tabla 7).

**Tabla 7.** Características de los pacientes clasificados por su perfil de deleciones

	<b>Pacientes sin RMT, n=38</b>	<b>Pacientes con RMT, n=25</b>	<b>P</b>
<b>Características clínicas</b>			
Sexo, n (%)			
Hombre	18 (47.4)	12 (48)	0.96
Mujer	20 (52.6)	13 (52)	
Edad, n (%)			
1-9.9 años	33 (86.8)	16 (64)	0.03
≥10 años	5 (13.2)	9 (36)	
Conteo leucocitario, n (%)			
<50,000/ul	31 (81.6)	19 (76)	0.59
≥ 50,000/ul	7 (18.4)	6 (24)	
Riesgo NCI, n (%)			
Estándar	28 (73.7)	13 (52)	0.08
Alto	10 (26.3)	12 (48)	
Esquema de quimioterapia, n (%)			
St. Jude Total XV	24(63.2)	6 (24)	0.03
BFM-95	1 (2.6)	4 (16)	
DFCI	6 (15.8)	7 (28)	
St. Jude Total XIIIB	7 (18.4)	8 (32)	
Defunción, n (%)			
No	35 (92.1)	11 (44)	<0.001
Sí	3 (7.9)	14 (56)	
<b>Características genéticas</b>			
Tipo de gen de fusión, n (%)			
No evaluado/No detectado	1/31 (84.2)	5/18 (92)	0.76
<i>ETV6-RUNX1</i>	3 (7.9)	0 (0)	
<i>TCF3-PBX1</i>	3 (7.9)	2 (8)	
Deleciones, n (%)			
No	20 (52.6)	5 (20)	0.01
Sí	18 (47.4)	20 (80)	

Valores de P obtenidos con  $\chi^2$ /prueba exacta de Fisher, cuando corresponda;  
DFCI= Dana Farber Cancer Institute 00–01; BFM-95= Berlin–Frankfurt–Münster-95

#### 6.4.2. Frecuencia de deleciones en genes examinados con MLPA en pacientes con y sin RMT

El estado en el número de copias de los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1 fue determinado con MLPA. El 60.3% (n=38) de los pacientes presentó las deleciones de interés, con una mediana de una deleción por caso (rango 0-5). Las pérdidas en el número de copias predominaron en el grupo con RMT (P=0.01) (Tabla 7). Las alteraciones más frecuentes fueron las deleciones de *CDKN2A* (33.3%; n=21) y *CDKN2B* (30.2%; n=19). Otro gen afectado con alta frecuencia fue *IKZF1* (27%; n=17). *ETV6*, *PAX5* y *BTG1* presentaron deleciones en el 11.1-15.9% de los pacientes mientras que los cambios menos frecuentes ocurrieron en *RB1*, *EBF1* y PAR1.

Las deleciones de *CDKN2A/B* e *IKZF1* fueron más frecuentes en pacientes con RMT (Tabla 8). Es importante señalar que también en estos casos se detectó una asociación estadísticamente significativa entre el estado de supresión del gen *IKZF1* y la clasificación de alto riesgo según los criterios del NCI (P=0.01) (Figura 1). En particular, la pérdida del gen *IKZF1* fue significativamente más común en pacientes mayores de 10 años (P=0.03).

**Tabla 8.** Frecuencia de deleciones de genes relevantes en LLA-B en los subgrupos de pacientes estudiados

Gen/región	Total		Pacientes sin RMT, n=38	Pacientes con RMT, n=25	P
	n	%	n (%)	n (%)	
<i>EBF1</i>	1	1.6	1 (2.6)	-----	NC
<i>IKZF1</i>	17	27	7 (18.4)	10 (40.0)	0.06
<i>CDKN2A</i>	20	31.7	7 (18.4)	13 (52.0)	0.005
<i>CDKN2B</i>	18	28.6	7 (18.4)	11 (44.0)	0.03
<i>PAX5</i>	10	15.9	6 (15.8)	4 (16.0)	1
<i>ETV6</i>	10	15.9	9 (23.7)	1 (4.0)	0.07
<i>BTG1</i>	7	11.1	4 (10.5)	3 (12.0)	1
<i>RB1</i>	3	4.8	1 (2.6)	2 (8.0)	0.56
PAR1	3	4.8	1 (2.6)	2 (8.0)	0.56

Valores de P obtenidos con  $\chi^2$ /prueba exacta de Fisher, cuando aplique; NC= no calculado debido a tamaño de muestra insuficiente

En cuanto a la coocurrencia de CNAs, el 90% de los pacientes con deleciones en *CDKN2A* también exhibió la pérdida concomitante de *CDKN2B*. Adicionalmente, se

observaron asociaciones significativas entre deleciones en los genes *CDKN2A/B* y la pérdida de *PAX5* (OR= 7.18; IC95%: 1.62-31.87; P= 0.008; OR= 5.13; IC95%:1.24-21.19; P=0.026, respectivamente). Otros cambios que coexistieron significativamente fueron las deleciones de *IKZF1* y el gen anti proliferativo *BTG1* (OR= 9.17; IC95%: 1.58-53.26; P=0.013).

#### 6.4.3. Clasificación de riesgo basada en CNAs

De acuerdo con el estatus en el número de copias de los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1 (Figura 6), obtenido con MLPA al diagnóstico de la enfermedad, el 53% (33/63) de los pacientes fue clasificado en la categoría de bajo riesgo UKALL-CNA. El 14% (9/63) se consideró como de alto riesgo. En el resto de los pacientes (33%; 21/63), el perfil de CNAs correspondió a un riesgo intermedio. En la Figura 20 se presenta el perfil de las deleciones y la respectiva clasificación de riesgo, asignada en cada uno de los pacientes conforme al sistema UKALL-CNA. Las categorías de riesgo intermedio y alto estuvieron sobrerrepresentadas entre aquellos pacientes con RMT (P=0.001).

A pesar de la importancia pronóstica de la edad y la cuenta leucocitaria al diagnóstico, incorporar información acerca del estatus en el número de copias de genes que son frecuentemente afectados por deleciones en LLA-B podría ser útil para mejorar la clasificación de riesgo que actualmente se realiza en nuestro país. Con la aplicación del sistema UKALL-CNA, el 61.5% (8/13) de pacientes con RMT que inicialmente se estratificaron como riesgo estándar NCI fue reclasificado en categorías de riesgo intermedio (n=5) o alto riesgo (n=3). Para el resto de los casos con RMT (n=12), con alto riesgo de acuerdo con el NCI, los perfiles de CNAs identificados en 9 de ellos permitieron reclasificarlos en categorías de riesgo bajo (n=1) e intermedio (n=8) (Tabla 9).

#### 6.4.4. Análisis de supervivencia por grupos de riesgo identificados con el clasificador basado en CNAs

Para conocer el impacto de los grupos de riesgo definidos conforme al clasificador UKALL-CNA, se evaluó la SLE y la SG a los 18 meses después de alcanzar un estatus de remisión completa. En cuanto a la SLE, se estimaron tasas del 82% para los pacientes de bajo riesgo, del 38% y del 33% para aquellos con grupos de riesgo intermedio y alto, respectivamente (prueba de rango logarítmico, P<0.0001). Asimismo, la SG mostró diferencias significativas entre las categorías de riesgo basadas en CNAs. Se documentó una mayor tasa de SG para los pacientes de riesgo bajo e intermedio (85% y 65%, respectivamente) en comparación con el 44% observado en el grupo de riesgo alto (prueba de rango logarítmico, P=0.005).



**Tabla 9.** Reclasificación de los pacientes en tres grupos de riesgo definidos por CNAs

<b>Pacientes sin RMT, n=38</b>			<b>Pacientes con RMT, n=25</b>		
<b>ID</b>	<b>NCI</b>	<b>UKALL-CNA</b>	<b>ID</b>	<b>NCI</b>	<b>UKALL-CNA</b>
29NRF	Alto	Intermedio	23RM	Alto	Alto
35NRM	Alto	Intermedio	28RF	Alto	Alto
30NRF	Alto	Intermedio	20RF	Alto	Alto
25NRF	Alto	Bajo	11RM	Alto	Intermedio
42NRF	Alto	Bajo	27RF	Alto	Intermedio
40NRF	Alto	Bajo	10RF	Alto	Intermedio
36NRM	Alto	Bajo	13RM	Alto	Intermedio
37NRM	Alto	Bajo	22RM	Alto	Intermedio
38NRM	Alto	Bajo	04RM	Alto	Intermedio
34NRM	Alto	Bajo	07RF	Alto	Intermedio
33NRF	Estándar	Alto	26RF	Alto	Intermedio
06NRF	Estándar	Alto	18RF	Alto	Bajo
13NRM	Estándar	Intermedio	02RF	Estándar	Alto
03NRM	Estándar	Intermedio	24RF	Estándar	Alto
27NRF	Estándar	Intermedio	29RF	Estándar	Alto
19NRM	Estándar	Intermedio	21RM	Estándar	Intermedio
23NRM	Estándar	Intermedio	14RF	Estándar	Intermedio
39NRF	Estándar	Intermedio	15RM	Estándar	Intermedio
02NRF	Estándar	Bajo	17RM	Estándar	Intermedio
43NRM	Estándar	Bajo	19RF	Estándar	Intermedio
08NRM	Estándar	Bajo	25RM	Estándar	Bajo
18NRM	Estándar	Bajo	16RM	Estándar	Bajo
41NRM	Estándar	Bajo	12RM	Estándar	Bajo
21NRF	Estándar	Bajo	09RF	Estándar	Bajo
31NRF	Estándar	Bajo	06RM	Estándar	Bajo
32NRF	Estándar	Bajo			
28NRF	Estándar	Bajo			
26NRF	Estándar	Bajo			
15NRM	Estándar	Bajo			
24NRF	Estándar	Bajo			
01NRM	Estándar	Bajo			
05NRM	Estándar	Bajo			
14NRF	Estándar	Bajo			
04NRM	Estándar	Bajo			
16NRF	Estándar	Bajo			
11NRF	Estándar	Bajo			
10NRM	Estándar	Bajo			
07NRF	Estándar	Bajo			

#### 6.4.5. Análisis de regresión de Cox

Se utilizó el modelo de riesgos proporcionales de Cox para analizar la asociación entre el clasificador UKALL-CNA y la SLE. En la Tabla 10 se presentan los resultados obtenidos. El análisis retrospectivo (post-hoc) de la potencia estadística considerando el número de pacientes con RMT que se clasificaron en los grupos de riesgo bajo (18.2%; 6/33) e intermedio/alto (63.3%; 19/30) resultó en una potencia del 97.1% con una probabilidad de error de 0.05. Inicialmente, en un modelo univariable, el clasificador UKALL-CNA fue asociado con el riesgo de RMT (riesgo intermedio: HR= 4.94, IC95%= 1.87–13.07; alto riesgo: HR= 7.42, IC95%= 2.37–23.26). Al realizar un análisis multivariable ajustado por la clasificación de riesgo NCI y el régimen quimioterapéutico se observó que las categorías de riesgo definidas por perfiles de CNAs mantienen su significancia pronóstica (Tabla 10). Cuando los pacientes con riesgo intermedio y alto se englobaron en un solo grupo, el riesgo de RMT fue 5 veces mayor respecto a la categoría de bajo riesgo UKALL-CNA (aHR=4.84, IC95%: 1.86-12.55) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Análisis de regresión de Cox entre los grupos de riesgo definidos con perfiles de CNAs y la supervivencia libre de enfermedad

Grupo de riesgo	Pacientes	RMT	No ajustado	P	Ajustado	P
	n	n	HR (IC95%)		aHR (IC95%) <sup>a</sup>	
<b>Tres categorías</b>						
Bajo	33	6	Referencia		Referencia	
Intermedio	21	13	4.94 (1.87-13.07)	<b>0.001</b>	3.51 (1.27-9.68)	<b>0.01</b>
Alto	9	6	7.42 (2.37-23.26)	<b>0.001</b>	14.46 (4.0-52.26)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Dos categorías</b>						
Bajo	33	6	Referencia		Referencia	
Intermedio/Alto	30	19	5.51 (2.19-13.90)	<b>&lt;0.001</b>	4.84 (1.86-12.55)	<b>0.001</b>

<sup>a</sup> El modelo fue ajustado por la clasificación de riesgo del NCI y el esquema quimioterapéutico. RMT= recaída muy temprana; HR= Hazard ratios no ajustados; aHR= Hazard ratios ajustados por la clasificación de riesgo NCI y el esquema de tratamiento; CI=intervalo de confianza

## 7. Discusión

En México, una importante proporción de pacientes con recaída de LLA-B presenta al diagnóstico características clínicas de riesgo estándar NCI, lo que demuestra que este indicador pronóstico es impreciso. En relación con este problema, es necesario reconocer que la recaída es alta en nuestro país. En concreto, la RMT, asociada con el peor pronóstico en LLA-B, ocurre con mayor frecuencia en pacientes mexicanos (8.9-19.9%) que en niños que residen en otros países (ej. población nórdica: ~3.8%), aun recibiendo esquemas de quimioterapia comparables [37,39,120]. Una razón que explicaría la alta incidencia de recaída en población mexicana es la variable distribución de anomalías citogenéticas que es observada entre pacientes con LLA-B de diferentes grupos étnicos [137]. El indicador de pronóstico positivo, *ETV6-RUNX1*, es menos común en las poblaciones hispanas, incluyendo la nuestra, en comparación con las poblaciones de ascendencia europea [137].

Atendiendo a la necesidad de identificar factores adicionales que permitan establecer con mayor eficiencia el pronóstico en LLA-B, este trabajo ha sido el primero en estudiar cambios en el número de copias y su asociación con RMT en niños mexicanos con leucemia. Un primer abordaje consistió en usar microarreglos genómicos de alta densidad para detectar ganancias y pérdidas de ADN en pacientes con y sin RMT. En esta investigación se hizo particular énfasis en niños que no presentan los genes de fusión (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, y *KMT2A-AFF1*) que en LLA-B constituyen factores de riesgo citogenético establecidos. Lo anterior permitió identificar CNAs focales que se producen recurrentemente en el genoma. Nuestros resultados indican que en aquellos que no registraron RMT predominan las ganancias de ADN. De doce citobandas que se encontraron significativamente alteradas por CNAs focales, cuatro (5p15.33, 6q27, 7q21.11 y 8p23.3) contenían cada una en su región mínima común de duplicación menos de 50 genes entre los que destacaron *TERT* (5p15.33), *SMOC2* (6q27), *SEMA3C* (7q21.11), y *MYOM2* (8p23.3) (Tabla 3). Por ejemplo, *SEMA3C* se ha relacionado con la promoción de migración e invasión en estudios *in vitro* e *in vivo* en cáncer de próstata [138]. En lo que respecta a *SMOC2*, éste se propone como gen candidato supresor de tumores en la progresión de cáncer colorrectal, cuya expresión es asociada con resultados clínicos positivos [139].

Con el análisis de enriquecimiento funcional se identificaron procesos biológicos/vías que están sobrerrepresentados estadísticamente en el conjunto de genes que son afectados por duplicaciones focales en los pacientes sin RMT. Los términos biológicos se relacionaron con la regulación de TP53, activación de HSF1, desmontaje de componentes celulares en la apoptosis, represión de la transcripción o miRNAs que participan en la regulación de componentes de la vía de señalización NF- $\kappa$ B y modulan la respuesta inflamatoria en procesos de sepsis.

Los pacientes que desarrollaron RMT presentaron al diagnóstico inicial únicamente tres citobandas con cambios focales recurrentes: duplicación de 7p11.2 y deleciones en 9p21.3 y 7q34. En las regiones mínimas comunes de alteración se ubicaron 8 genes, incluyendo a *CDKN2A*, el cual es frecuentemente inactivado en LLA-B por eventos de deleción [140]. Con excepción de los RNA-no codificantes *LINC01445* y *LOC730441*, los genes *PRSS1*, *PRSS2*, *CDKN2A-AS1*, *PRSS3P2* y *MTRNR2L6*, están implicados en neoplasias sólidas [141–144]. Los genes que codifican las proteasas catiónica y aniónica de la pro-enzima digestiva tripsinógeno, *PRSS1* y *PRSS2* (7q34), relacionados con cáncer pancreático, también están asociados con el riesgo de desarrollar pancreatitis como efecto adverso de la administración de asparaginasa, fármaco incorporado en los protocolos de tratamiento actualmente utilizados para el manejo de LLA [141].

A pesar de las importantes funciones que ejercen las proteínas p16/p14 y p15, codificadas respectivamente por *CDKN2A* y *CDKN2B* (9p21.3), en el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis, su impacto pronóstico en LLA-B es controversial. En contraste con los reportes internacionales que argumentan a favor de su impacto pronóstico [80,83,97], en este trabajo se descartaron como indicadores independientes de recaída muy temprana. Por lo tanto, nuestros resultados coinciden con otros grupos de investigación que no identifican asociaciones entre estos genes y el desenlace clínico [74,145]. La falta de consistencia en dichos estudios [76, 79, 91, 73, 134] se atribuye a la gran heterogeneidad que existe respecto a la población analizada, tamaño, criterios de selección y tratamiento. Otros aspectos por considerar son las diferencias en los procedimientos metodológicos usados en la evaluación de las alteraciones y en los tiempos de seguimiento [95].

Las CNAs identificadas en las regiones 7q34 (*LOC730441*, *PRSS1*, *PRSS2*, *PRSS3P2* y *MTRNR2L6*) y 7p11.2 (*LINC01445*) se encontraron en 7/14 pacientes con RMT. Se asociaron con una menor tasa de supervivencia libre de recaída ( $P<0.01$ ). Sin embargo, después de conducir un análisis multivariable, se determinó que únicamente la duplicación de 7p11.2 representa un indicador pronóstico independiente asociado en marcada tendencia ( $P=0.06$ ) con el desenlace clínico en términos de RMT.

La serie con RMT exhibió alteraciones focales recurrentes en 1p13.3; la región mínima común de deleción incluyó a un total de tres genes: *SLC25A24*, *NBPF4* y *VAV3-AS1*. Éste último es un RNA largo no codificante cuyo estatus de metilación se ha reconocido como un biomarcador asociado con la progresión de cáncer colorrectal [146]. Por otro lado, *SLC25A24* y *NBPF4* son genes que se encuentran significativamente duplicados en cáncer de pulmón [147]. Cabe destacar que *SLC25A24* codifica a un transportador que importa nucleótidos, metabolitos y cofactores dentro de la matriz mitocondrial en respuesta a  $Ca^{2+}$  intracelular. Interesantemente, la subexpresión de otros miembros de la familia de transportadores SCL25, a la cual pertenece dicho gen, ha sido implicada críticamente en mecanismos de adaptación que permiten que algunas células

tumorales adquieran resistencia a los fármacos (*SLC25A1*) o en una menor capacidad de respuesta al estrés oxidativo (*SLC25A10*) [148].

La segunda fase del análisis presentado por esta investigación consistió en evaluar la asociación entre perfiles de deleciones establecidos por el sistema de pronóstico UKALL-CNA y el riesgo de RMT en LLA-B. Por ello, se analizaron datos respecto al número de copias de los genes *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1* y la región PAR1 (*CSF2RA*, *IL3RA* y *CRLF2*). De un total de 63 pacientes (25 con RMT y 38 que no experimentaron la recurrencia de la enfermedad durante el periodo de seguimiento), el 60.3% exhibió al menos una deleción en dichos genes. Su prevalencia coincide con lo reportado en distintos estudios (55%-71%) [57,61,74,78,80,102,103]. De acuerdo con un análisis realizado en pacientes sin los cuatro transcritos de fusión pronósticamente relevantes en LLA-B, la frecuencia de estas deleciones es ligeramente inferior (46.6%) [79].

Los resultados del presente trabajo ponen en evidencia que la prevalencia de pérdidas en el número de copia de los genes *CDKN2A/B* en LLA-B es mayor (~32%) en comparación con lo descrito en pacientes italianos (11%) [79]. Este hallazgo podría explicar parcialmente el agresivo curso de la enfermedad que existe en los niños mexicanos con LLA-B. Adicionalmente, encontramos que la eliminación de *CDKN2A/B* es más frecuente en niños con RMT que en aquellos que se mantienen libres de la enfermedad (44-52% vs 18.4%, Tabla 8). Estos resultados coinciden con los reportados por Erbilgin et al. (2019) [80]; en un estudio realizado en población turca, los autores mencionan que las alteraciones en *CDKN2A/B* fueron detectadas más comúnmente en pacientes que presentaron recaída.

Se observaron dos patrones de coocurrencia en los genes que son comúnmente eliminados en LLA-B: 1) *CDKN2A/B* con *PAX5*, y 2) *IKZF1* con *BTG1*. Estos hallazgos fueron similares a las deleciones concomitantes previamente reportadas de *CDKN2A* y *PAX5*, y de *IKZF1* y *BTG1* en los subtipos LLA-B con alta hiperdiploidía y negativos a *ETV6-RUNX1* [149]. Cabe señalar que los pacientes estudiados en la presente investigación mostraron una baja frecuencia de este último reordenamiento cromosómico.

Previo a nuestro estudio, la implicación de las CNAs en el pronóstico de la LLA-B pediátrica ha sido escasamente investigada en México. Destaca el trabajo realizado por Ayón-Pérez et al. (2019) [126], enfocado en describir la frecuencia de deleciones en el gen *IKZF1* en un grupo de 38 pacientes, únicamente al diagnóstico de la enfermedad. La estimación de la prevalencia de cambios en el número de copias de *IKZF1* (20.6%) es consistente con lo que nosotros determinamos en pacientes que no desarrollaron RMT de LLA-B (18%). En contraste, los pacientes con RMT registraron una mayor prevalencia de pérdidas en el número de copias de *IKZF1*, la cual correspondió al 40%, sugiriendo su relevancia como factor de pronóstico adverso en nuestra población. De acuerdo con Vesely et al. (2017) [150], quienes estudiaron una cohorte de pacientes

positivos al gen de fusión *P2RY8-CRLF2* (generado por la delección que ocurre en la región PAR1), se observa que la pérdida de *IKZF1* es más frecuente en casos con recaída que en aquellos que no la experimentan (41% vs 10%). Distintos estudios reportan asociaciones significativas entre la delección de *IKZF1* y resultados clínicos desfavorables [67,78,93,95] o la persistencia de EMR durante las fases tempranas de la quimioterapia [104]. Aparte de dichas correlaciones clínicas, ensayos funcionales *in vivo* e *in vitro* han demostrado que la pérdida del número de copias de *IKZF1* tiene un efecto atenuador de la respuesta a prednisona y aumenta la resistencia a glucocorticoides [151]. En cambio, Palmi et al. [152] han cuestionado que el estado del número de copias de *IKZF1* sea utilizado como marcador de mal pronóstico en pacientes negativos a *BCR-ABL1*. Con esas observaciones resalta que el valor pronóstico de las delecciones de *IKZF1* en LLA-B depende de la compleja interacción que existe entre los determinantes genéticos de la enfermedad, los cuales influyen en la respuesta al tratamiento [100]. Por tal razón, más allá de evaluar cambios individuales en el número de copias, resultaría más informativo considerar la presencia de alteraciones concomitantes. En este sentido, la integración de los perfiles de ADN puede ser esencial para mejorar la evaluación del riesgo de recaída. En el presente estudio, se hizo uso de las tres categorías de riesgo descritas por el clasificador UKALL-CNA [61]. Particularmente, nuestros resultados evidenciaron que el 47% de los pacientes presentaron combinaciones de CNAs que los ubicaron en las categorías de riesgo alto e intermedio. Aunque la presente investigación examinó un tamaño de muestra relativamente pequeño, se observó que los perfiles de riesgo intermedio/alto se asociaron con una mayor probabilidad de desarrollar RMT en relación con las CNAs que han sido definidos como de bajo riesgo.

Entre las limitaciones de nuestro estudio debe mencionarse que todos los análisis se realizaron en el ADN genómico aislado de células mononucleares derivadas de la MO. Una estrategia alternativa es obtener el material genético a partir de la fracción específica de células leucémicas de linaje B, recuperadas con la aplicación de la técnica de separación celular activada por fluorescencia. En contraste con lo establecido en otras entidades hematopoyéticas como la leucemia mieloide aguda donde el concepto de célula troncal es ampliamente reconocido, las células que inician la leucemia en LLA-B aún no se han identificado fenotípicamente. Diferentes subpoblaciones, expresando diferentes marcadores de superficie, reconstruyeron la enfermedad tras ser trasplantadas en ratones inmunodeficientes, lo que sugiere que la capacidad de propagar la LLA-B parece estar definida a un nivel funcional [153]. En esta línea, el haber optado por analizar todos los componentes celulares presentes en la fracción mononuclear no descarta los hallazgos reportados en nuestra investigación puesto que reflejan los cambios que ocurren en el genoma de las poblaciones de blastos que conforman la heterogeneidad clonal en LLA-B. Ha sido demostrado que el contenido de células troncales/progenitores hematopoyéticos normales (CD34+Lin-) es reducido en la MO de pacientes con LLA-B, además su capacidad proliferativa y el potencial de diferenciación resultaron limitados en estudios funcionales *in vitro* [154]. La

producción de citocinas proinflamatorias por las células leucémicas contribuye al agotamiento de la hematopoyesis residual normal en la MO [155].

La heterogeneidad clonal en LLA-B se extiende a las células iniciadoras de la leucemia, cuyas propiedades biológicas evidenciadas *in vivo*, quiescencia y quimioresistencia, permiten plantear su implicación en el desarrollo de la recaída de la enfermedad [156]. Este proceso es modulado por: 1) implicación de la clona leucémica original, identificada en el diagnóstico, 2) por evolución clonal, o 3) por una población celular que surge de una clona pre-leucémica, que se desarrolla en paralelo con las células leucémicas detectadas en el momento del diagnóstico [92].

Existen otros clasificadores de riesgo en LLA-B que también se basan en información sobre el estatus de números de copias [92,157,158]. Por ejemplo, en el perfil IKFZ1<sup>plus</sup> (eliminaciones de *IKZF1* que ocurren simultáneamente con eliminaciones en *CDKN2A/B*, *PAX5*, o *PAR1* en ausencia de eliminación de *ERG*) [157,158], el impacto pronóstico depende fuertemente del nivel de enfermedad mínima residual (EMR), que ahora constituye uno de los predictores más sensibles y específicos de recaída después de la finalización de la terapia de inducción en niños con LLA. Precisamente por esta razón, los indicadores que permiten una estratificación temprana del riesgo (previa al tratamiento) son importantes. Además, teniendo en cuenta que la evaluación de la EMR no se realiza de forma rutinaria en los niños atendidos en los hospitales públicos de la Ciudad de México, el clasificador UKALL-CNA puede tener en el futuro una mayor aplicabilidad en nuestros entornos clínicos.

Se identificaron tres diferencias considerables entre el presente estudio y las investigaciones que han descrito la asociación de los perfiles de CNAs con los resultados clínicos en niños con leucemia: 1) la uniformidad del esquema de quimioterapia; 2) la detección de EMR como factor pronóstico y 3) el contraste que existe en la búsqueda de aberraciones genéticas recurrentes en el momento del diagnóstico, de modo que al contrario de lo que sucede en nuestro país, aproximadamente el 75% de los pacientes pueden ser asignados a una categoría particular de riesgo citogenético. Reconocemos estos aspectos como una limitación de nuestro estudio; sin embargo, es necesario enfatizar que las asociaciones que reportamos consideran el esquema quimioterapéutico como una variable de ajuste dentro del análisis multivariable. Por otra parte, en lo que respecta a la detección de EMR, así como al análisis de un panel completo de alteraciones genéticas recurrentes al diagnóstico de la enfermedad, aunque son variables importantes en la estratificación del riesgo, no se realizan de forma rutinaria en los hospitales públicos de la Ciudad de México debido sobre todo a la falta de recursos económicos. Por otra parte, cabe mencionar que la asociación entre los perfiles de CNAs y el desenlace clínico es consistente tanto en protocolos que se basan en la detección de EMR como en los que no consideran este parámetro [102].

Los resultados de la presente investigación destacan la importancia de evaluar el estatus del número de copias de genes que son alterados recurrentemente en LLA-B. En particular, se reafirma que el sistema UKALL-CNA representa una estrategia que permitiría potencialmente mejorar la identificación de los pacientes con mayor riesgo de recaer muy tempranamente desde el momento del diagnóstico. Al respecto, el 61.5% (8/13) de los pacientes con RMT que presentaban características clínicas de riesgo estándar según los criterios del NCI fueron reasignados a una categoría de riesgo intermedio/alto UKALL-CNA. Si se toma en cuenta que los regímenes de tratamiento se adaptan típicamente al riesgo, este subconjunto de pacientes (riesgo estándar NCI con perfil de CNAs de riesgo intermedio/alto) podría haber recibido una quimioterapia intensiva para prevenir la recurrencia de LLA-B.

Interesantemente, encontramos que un paciente de alto riesgo NCI con RMT fue reclasificado como de bajo riesgo basado en su estado de CNAs. Este caso se clasificó como alta hiperdiploidía, subtipo citogenético en LLA-B relacionado con resultados favorables, no obstante, se ha descrito que alrededor de un 15% de los pacientes con esta alteración eventualmente recaen. En ellos han sido identificadas altas tasas de mutaciones en la histona acetiltransferasa *CREBBP* y en el gen de la vía Ras *KRAS*, cambios que potencialmente contribuyen a la resistencia terapéutica y podrían, al menos en parte, explicar el desenlace clínico visto en este paciente [159].

Es importante reconocer que las asociaciones descritas en el presente trabajo podrían estar sujetas a un tipo de sesgo relacionado con la supervivencia de la enfermedad, haciendo que las observaciones presentadas puedan ser sub o sobreestimadas [160]. Este sesgo de supervivencia selectiva surgiría si se considera que la RMT incrementa el riesgo de mortalidad; bajo este escenario no es descartable que exista un subgrupo de pacientes que recaen y mueren antes de ser ingresado en el hospital y, por tanto, impide la obtención de su muestra biológica, introduciendo un sesgo de selección. No obstante, parece no ser el caso de nuestro estudio ya que los pacientes analizados son representativos de la población que registró RMT en la CDMX durante el periodo de inclusión (Tabla 1).

Respecto al cálculo de la probabilidad de la supervivencia, adicional al método Kaplan-Meier, se realizaron análisis de regresión de Cox para estimar valores de HR no ajustados y ajustados generados a partir de modelos de riesgos proporcionales univariados y multivariados, respectivamente. En particular, el haber ajustado el impacto de covariables o factores de confusión que afectan al pronóstico del paciente en el modelo multivariable (clasificación de riesgo NCI y esquema de tratamiento) nos permitió determinar que los perfiles de CNAs con riesgo intermedio y/o alto se asocian significativamente y de forma independiente con la RMT en LLA-B. Los análisis ajustados y no ajustados produjeron HR similares, lo que es indicativo de que no existieron desequilibrios importantes en los factores pronósticos conocidos [161], es decir, la distribución de las covariables clasificación clínica NCI y esquema de

tratamiento es similar entre los pacientes con CNAs de bajo riesgo y aquellos clasificados como intermedio/alto riesgo (Tabla 10).

Se debe enfatizar que los instrumentos de estratificación pronóstica siguen siendo costosos para un país en el que la búsqueda rutinaria de alteraciones genéticas en cada paciente con leucemia aguda es limitada por la tecnología y los costos [162]. Sin embargo, conociendo su utilidad, es posible considerar la posibilidad de que los laboratorios centralicen este tipo de pruebas para que sean más accesibles para todos los pacientes con LLA-B. En los países donde no se ha reducido la mortalidad por leucemia infantil, como es nuestro caso, es pertinente hacer todos los esfuerzos posibles para predecir qué niños requerirán regímenes de quimioterapia más intensos a fin de mejorar sus posibilidades de supervivencia y, por otra parte, identificar qué pacientes requerirán una quimioterapia menos intensiva y reducir los efectos adversos asociados con el tratamiento.

## 8. Conclusiones

Este estudio reafirma la implicación de las CNAs en el pronóstico de pacientes mexicanos con LLA-B infantil. A nuestro entendimiento, se proporcionan por primera vez evidencia sobre la importancia de considerar cambios en el número de copias al diagnóstico para predecir la recaída muy temprana, eventos muy frecuentes en nuestra población, asociados con altas tasas de mortalidad.

El estudio del genoma completo a alta resolución condujo a la identificación de la duplicación de la región 7p11.2 (*LINC01445*) como potencial marcador de riesgo de RMT en casos con LLA-B que no tienen una clasificación citogenética de riesgo al diagnóstico. No obstante, el valor pronóstico de este biomarcador requiere ser validado en cohortes independientes que incluyan un mayor número de pacientes.

El clasificador UKALL-CNA representa una estrategia que tiene la capacidad de identificar subgrupos de pacientes con diferentes probabilidades de supervivencia. Usando este enfoque, demostramos por primera vez, que los cambios en el número de copias están asociados con las recaídas que ocurren muy tempranamente durante el tratamiento de los niños mexicanos con LLA. Sobre la base de estos resultados, el clasificador UKALL-CNA podría ser implementado en la práctica clínica y potencialmente mejorar los actuales esquemas de estratificación de riesgo. No obstante, se requieren más estudios para dilucidar su valor predictivo con resultados a largo plazo y usando marcadores de respuesta al tratamiento como la detección de la EMR.

## 9. Referencias Bibliográficas

1. Steliarova-Foucher, E.; Colombet, M.; Ries, L.; et al. International incidence of childhood cancer, 2001-10: a population-based registry study. *Lancet. Oncol.* **2017**, 18, 719–731.
2. Zhao, Y.; Wang, Y.; Ma, S. Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. *Sci. Rep.* **2018**, 8, 548.
3. Dorantes-Acosta, E.; Zapata-Tarrés, M.; Miranda-Lora, A.; et al. Comparación de las características clínicas al diagnóstico de niños con leucemia linfoblástica aguda afiliados al seguro popular, con respecto al desenlace. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **2012**, 69, 190–196.
4. Colby-Graham, M.F.; Chordas, C. The childhood leukemias. *J. Pediatr. Nurs.* **2003**, 18, 87–95.
5. Pérez-Saldivar, M.L.; Fajardo-Gutiérrez, A.; Bernáldez-Ríos, R.; et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* **2011**, 11, 355.
6. Yamamoto, J.F.; Goodman, M.T. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002. *Cancer Causes Control* **2008**, 19, 379–390.
7. Kadan-Lottick, N.S.; Ness, K.K.; Bhatia, S.; et al. Survival Variability by Race and Ethnicity in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, 290, 2008–2014.
8. Quiroz, E.; Aldoss, I.; Pullarkat, V.; et al. The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population – biological and clinical implications. *Blood Rev.* **2019**, 33, 98–105.
9. Scheurer, M.E.; Lupo, P.J.; Schüz, J.; et al. An overview of disparities in childhood cancer: Report on the Inaugural Symposium on Childhood Cancer Health Disparities, Houston, Texas, 2016. *Pediatr. Hematol. Oncol.* **2018**, 35, 95–110.
10. Tijchon, E.; Havinga, J.; Scheijen, B. B-lineage transcription factors and cooperating gene lesions required for leukemia development. *Leukemia* **2012**, 27, 541–552.
11. Malouf, C.; Ottersbach, K. Molecular processes involved in B cell acute lymphoblastic leukaemia. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, 75, 417–446.
12. Bhojwani, D.; Yang, J.J.; Pui, C.-H. Biology of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. **2015**, 62, 47–60.
13. Campos-Sanchez, E.; Toboso-Navasa, A.; Romero-Camarero, I.; et al. Acute lymphoblastic leukemia and developmental biology: A crucial interrelationship. *Cell Cycle* **2011**, 10, 3473–3486.
14. Sędek, Ł.; Balsa, J.; Sonsala, A.; et al. The immunophenotypes of blast cells in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: How different are they from their normal counterparts? *Cytom. Part B Clin. Cytom.* **2014**, 86, 329–339.
15. Arber, D.A.; Orazi, A.; Hasserjian, R.; et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **2016**, 127, 2391–2405.
16. Sun, Y.; Long, S.; Liu, W. Observation of the molecular genetics among children with acute lymphoblastic leukemia. *Medicine (Baltimore)*. **2020**, 99, e20009.

17. Pui, C.-H.; Carroll, W.L.; Meshinchi, S.; et al. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J. Clin. Oncol.* **2011**, *29*, 551–65.
18. Mullighan, C.G.; Su, X.; Zhang, J.; et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 470–480.
19. Den Boer, M.L.; van Slegtenhorst, M.; De Menezes, R.X.; et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol.* **2009**, *10*, 125–134.
20. Harrison, C.J. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood* **2015**, *125*, 1383–6.
21. Hein, D.; Borkhardt, A.; Fischer, U. Insights into the prenatal origin of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev.* **2020**, *39*, 161–171.
22. Greaves, M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18*, 471–484.
23. Cazzola, A.; Cazzaniga, G.; Biondi, A.; et al. Prenatal Origin of Pediatric Leukemia: Lessons From Hematopoietic Development. *Front. Cell Dev. Biol.* **2021**, *8*, 12.
24. Whitehead, T.P.; Metayer, C.; Wiemels, J.L.; et al. Childhood Leukemia and Primary Prevention. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care* **2016**, *46*, 317–352.
25. Wiemels, J. Chromosomal translocations in childhood leukemia: Natural history, mechanisms, and epidemiology. In: Proceedings of the Journal of the National Cancer Institute - Monographs; Oxford Academic, **2008**; 2008, 87–90.
26. Mullighan, C.G. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012**, 2012, 389–396.
27. Mullighan, C.G. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Invest.* **2012**, *122*, 3407–15.
28. Greaves, M.F.; Wiemels, J. Origins of chromosome translocations in childhood leukaemia. *Nat Rev Cancer.* **2003**, *3*, 639–49.
29. Teachey, D.T.; Hunger, S.P. Predicting relapse risk in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2013**, *162*, 606–620.
30. Maia, A.T.; Koechling, J.; Corbett, R.; et al. Protracted Postnatal Natural Histories in Childhood Leukemia. *Genes Chromosom. Cancer* **2004**, *39*, 335–340.
31. Tasian, S.K.; Loh, M.L.; Hunger, S.P. Childhood acute lymphoblastic leukemia: Integrating genomics into therapy. *Cancer* **2015**, *121*, 3577–3590.
32. Santiago, R.; Vairy, S.; Sinnett, D.; et al. Novel therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin. Pharmacother.* **2017**, *18*, 1081–1099.
33. Silverman, L.B.; Declerck, L.; Gelber, R.D.; et al. Results of Dana-Farber Institute Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1981-1995). *Leukemia* **2000**, *14*, 2247–2256.
34. Pui, C.H.; Evans, W.E. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin. Hematol.* **2013**, *50*, 185–196.
35. Demidowicz, E.; Pogorzala, M.; Łęcka, M.; et al. Outcome of pediatric acute lymphoblastic leukemia: Sixty years of progress. *Anticancer Res.* **2019**, *39*, 5203–5207.
36. Hough, R.; Vora, A. Crisis management in the treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia: Putting right what can go wrong (emergency

- complications of disease and treatment). *Hematology* **2017**, 2017, 251–258.
37. Jaime-Pérez, J.C.; Pinzón-Uresti, M.A.; Jiménez-Castillo, R.A.; et al. Relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia and outcomes at a reference center in Latin America: organomegaly at diagnosis is a significant clinical predictor. *Hematology* **2018**, 23, 1–9.
  38. Nguyen, K.; Devidas, M.; Cheng, S.-C.; et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Leukemia* **2008**, 22, 2142–50.
  39. Oskarsson, T.; Söderhäll, S.; Arvidson, J.; et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica* **2016**, 101, 68–76.
  40. Abdelmabood, S.; Fouda, A.E.; Boujettif, F.; et al. Treatment outcomes of children with acute lymphoblastic leukemia in a middle-income developing country: high mortalities, early relapses, and poor survival. *J. Pediatr. (Rio. J.)*. **2020**, 96, 108–116.
  41. Hunger, S.P.; Mullighan, C.G. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N. Engl. J. Med.* **2015**, 373, 1541–1552.
  42. Pogorzala, M.; Kubicka, M.; Rafinska, B.; et al. Drug-resistance profile in multiple-relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Anticancer Res.* **2015**, 35, 5667–5670.
  43. Klumper, E.; Pieters, R.; Veerman, A.J.P.; et al. In vitro cellular drug resistance in children with relapsed/refractory acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **1995**, 86, 3861–3868.
  44. Kaspers, G.J.; Veerman, A.J. Clinical significance of cellular drug resistance in childhood leukemia. *Recent Results Cancer Res.* **2003**, 161, 196–220.
  45. Ceppi, F.; Cazzaniga, G.; Colombini, A.; et al. Risk factors for relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia: prediction and prevention. *Expert Rev. Hematol.* **2015**, 8, 57–70.
  46. Uderzo, C.; Conter, V.; Dini, G.; et al. Treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia after the first relapse: curative strategies. *Haematologica* **2001**, 86, 47–53.
  47. Mullighan, C.G.; Phillips, L.A.; Su, X.; et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* **2008**, 322, 1377–1380.
  48. Waanders, E.; Gu, Z.; Dobson, S.M.; et al. Mutational Landscape and Patterns of Clonal Evolution in Relapsed Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cancer Discov.* **2020**, 1, 96–111.
  49. Schultz, K.R.; Pullen, D.J.; Sather, H.N.; et al. Risk- and response-based classification of childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia: A combined analysis of prognostic markers from the Pediatric Oncology Group (POG) and Children's Cancer Group (CCG). *Blood* **2007**, 109, 926–935.
  50. Clappier, E.; Auclerc, M.F.; Rapon, J.; et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia* **2014**, 28, 70–77.
  51. Pui, C.H.; Mullighan, C.G.; Evans, W.E.; et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia: Where are we going and how do we get there? *Blood* **2012**, 120, 1165–

- 1174.
52. Smith, M.; Arthur, D.; Camitta, B.; et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **1996**, *14*, 18–24.
  53. Moorman, A. V.; Ensor, H.M.; Richards, S.M.; et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: Results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol.* **2010**, *11*, 429–438.
  54. Woo, J.S.; Alberti, M.O.; Tirado, C.A. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: A genetic update. *Exp. Hematol. Oncol.* **2014**, *3*, 16.
  55. Kato, M.; Manabe, A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr. Int.* **2018**, *60*, 4–12.
  56. Berry, N.K.; Scott, R.J.; Rowlings, P.; et al. Clinical use of SNP-microarrays for the detection of genome-wide changes in haematological malignancies. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2019**, *142*, 58–67.
  57. Schwab, C.J.; Chilton, L.; Morrison, H.; et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica* **2013**, *98*, 1081–1088.
  58. Harrison, C.J. Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **2009**, *144*, 147–156.
  59. Moorman, A.V.; Richards, S.M.; Martineau, M.; et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2003**, *102*, 2756–62.
  60. Groeneveld-Krentz, S.; Schroeder, M.P.; Reiter, M.; et al. Aneuploidy in children with relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: clinical importance of detecting a hypodiploid origin of relapse. *Br. J. Haematol.* **2019**, *185*, 266–283.
  61. Moorman, A.V.; Enshaei, A.; Schwab, C.; et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2014**, *124*, 1434–44.
  62. Rabin, K.R. Optimizing Targeted Therapy for Philadelphia Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 333–334.
  63. Beroukhi, R.; Mermel, C.H.; Porter, D.; et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* **2010**, *463*, 899–905.
  64. Mermel, C.H.; Schumacher, S.E.; Hill, B.; et al. GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. *Genome Biol.* **2011**, *12*, R41.
  65. Bhattacharya, A.; Bense, R.D.; Urzúa-Traslaviña, C.G.; et al. Transcriptional effects of copy number alterations in a large set of human cancers. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1–12.
  66. Yang, J.J.; Bhojwani, D.; Yang, W.; et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2008**, *112*, 4178–4183.
  67. Kuiper, R.P.; Schoenmakers, E.F.P.M.; van Reijmersdal, S.V.; et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* **2007**, *21*, 1258–1266.

68. Mullighan, C.G.; Goorha, S.; Radtke, I.; et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2007**, 446, 758–764.
69. Vaska, A.; Makohusova, M.; Plevova, K.; et al. Clinical impact of genomic analysis in children with B-acute lymphoblastic leukemia: A pilot study in Slovakia. *Neoplasma* **2019**, 66, 1009–1018.
70. Batista-Gomes, J.A.; Mello, F.A.R.; De Oliveira, E.H.C.; et al. Identifying novel genetic alterations in pediatric acute lymphoblastic leukemia based on copy number analysis. *Mol. Cytogenet.* **2020**, 13, 25.
71. Kawamata, N.; Ogawa, S.; Zimmermann, M.; et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood* **2008**, 111, 776–784.
72. Lejman, M.; Zawitkowska, J.; Styka, B.; et al. Microarray testing as an efficient tool to redefine hyperdiploid paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia patients. *Leuk. Res.* **2019**, 83, 106163.
73. Hogan, L.E.; Meyer, J.A.; Yang, J.; et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood* **2011**, 118, 5218–5226.
74. Steeghs, E.M.P.; Boer, J.M.; Hoogkamer, A.Q.; et al. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 4634.
75. Marke, R.; van Leeuwen, F.N.; Scheijen, B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2018**, 103, 565–574.
76. Mullighan, C.G.; Collins-Underwood, J.R.; Phillips, L.A.A.; et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor-and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat. Genet.* **2009**, 41, 1243–1246.
77. Olsson, L.; Lundin-Ström, K.B.; Castor, A.; et al. Improved cytogenetic characterization and risk stratification of pediatric acute lymphoblastic leukemia using single nucleotide polymorphism array analysis: A single center experience of 296 cases. *Genes, Chromosom. Cancer* **2018**, 57, 604–607.
78. Singh, M.; Bhatia, P.; Trehan, A.; et al. High frequency of intermediate and poor risk copy number abnormalities in pediatric cohort of B-ALL correlate with high MRD post induction. *Leuk. Res.* **2018**, 66, 79–84.
79. Messina, M.; Chiaretti, S.; Fedullo, A.L.; et al. Clinical significance of recurrent copy number aberrations in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia without recurrent fusion genes across age cohorts. *Br. J. Haematol.* **2017**, 178, 583–587.
80. Erbilgin, Y.; Firtina, S.; Mercan, S.; et al. Prognostic gene alterations and clonal changes in childhood B-ALL. *Leuk. Res.* **2019**, 83, 106159.
81. Forero-Castro, M.; Robledo, C.; Benito, R.; et al. Genome-Wide DNA Copy Number Analysis of Acute Lymphoblastic Leukemia Identifies New Genetic Markers Associated with Clinical Outcome. *PLoS One* **2016**, 11, e0148972.
82. Harrison, C.J.; Moorman, A.V.; Schwab, C.; et al. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): Cytogenetic characterization and outcome. *Leukemia* **2014**, 28, 1015–1021.
83. Kathiravan, M.; Singh, M.; Bhatia, P.; et al. Deletion of CDKN2A/B is associated with inferior relapse free survival in pediatric B cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2019**, 60, 433–441.

84. Conceição Barbosa, T.; Terra-Granado, E.; Quezado Magalhães, I.M.; et al. Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. *Cancer Genet.* **2015**, 208, 492–501.
85. Martinelli, G.; Iacobucci, I.; Storlazzi, C.T.; et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J. Clin. Oncol.* **2009**, 27, 5202–5207.
86. Van Der Veer, A.; Zaliova, M.; Mottadelli, F.; et al. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood* **2014**, 123, 1691–1698.
87. Mullighan, C.G.; Miller, C.B.; Radtke, I.; et al. BCR–ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* **2008**, 453, 110–114.
88. Roberts, K.G.; Li, Y.; Payne-Turner, D.; et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 371, 1005–1015.
89. Sun, C.; Chang, L.; Zhu, X. Pathogenesis of ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemia and mechanisms underlying its relapse. *Oncotarget* **2017**, 8, 35445–35459.
90. Bokemeyer, A.; Eckert, C.; Meyr, F.; et al. Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* **2014**, 99, 706–714.
91. Zhang, W.; Kuang, P.; Liu, T. Prognostic significance of CDKN2A/B deletions in acute lymphoblastic leukaemia: a meta-analysis. *Ann. Med.* **2019**, 51, 28–40.
92. Kiss, R.; Gángó, A.; Benard-Slagter, A.; et al. Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mod. Pathol.* **2020**, 33, 812–824.
93. Olsson, L.; Ivanov Öfverholm, I.; Norén-Nyström, U.; et al. The clinical impact of IKZF1 deletions in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia is independent of minimal residual disease stratification in Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology treatment protocols used between 1992 and 2013. *Br. J. Haematol.* **2015**, 170, 847–858.
94. Öfverholm, I.; Tran, A.N.; Heyman, M.; et al. Impact of IKZF1 deletions and PAX5 amplifications in pediatric B-cell precursor ALL treated according to NOPHO protocols. *Leukemia* **2013**, 27, 1936–1939.
95. Stanulla, M.; Cavé, H.; Moorman, A.V. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Still a poor prognostic marker? *Blood* **2020**, 135, 252–260.
96. Sutton, R.; Venn, N.C.; Law, T.; et al. A risk score including microdeletions improves relapse prediction for standard and medium risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukaemia in children. *Br. J. Haematol.* **2018**, 180, 550–562.
97. Braun, M.; Pastorczak, A.; Fendler, W.; et al. Biallelic loss of CDKN2A is associated with poor response to treatment in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2017**, 58, 1162–1171.
98. Roberts, K.G.; Morin, R.D.; Zhang, J.; et al. Cancer Cell Article Genetic Alterations Activating Kinase and Cytokine Receptor Signaling in High-Risk Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **2012**, 22, 153–166.

99. Mirebeau, D.; Acquaviva, C.; Suci, S.; et al. The prognostic significance of CDKN2A, CDKN2B and MTAP inactivation in B-lineage acute lymphoblastic leukemia of childhood. Results of the EORTC studies 58881 and 58951. *Haematologica* **2006**, 91, 881–885.
100. Palmi, C.; Vendramini, E.; Silvestri, D.; et al. Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2012**, 26, 2245–2253.
101. Scheijen, B.; Boer, J.M.; Marke, R.; et al. Tumor suppressors BTG1 and IKZF1 cooperate during mouse leukemia development and increase relapse risk in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia patients. *Haematologica* **2017**, 102, 541–551.
102. Hamadeh, L.; Enshaei, A.; Schwab, C.; et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv.* **2019**, 3, 148–157.
103. Gupta, S.K.; Bakhshi, S.; Kumar, L.; et al. Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma* **2017**, 58, 333–342.
104. Patkar, N.; Subramanian, P.; Tembhare, P.; et al. An integrated genomic profile that includes copy number alterations is highly predictive of minimal residual disease status in childhood precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **2017**, 60, 209–213.
105. Rosales-Rodríguez, B.; Núñez-Enríquez, J.C.; Mejía-Arangur, J.M.; et al. Prognostic Impact of Somatic Copy Number Alterations in Childhood B-Lineage Acute Lymphoblastic Leukemia. *Curr. Oncol. Rep.* **2021**, 23, 1–11.
106. Al-Anazi, W.K.; Dridi, W.; Al-Anazi, K.A.; et al. Cytogenetics, Molecular Genetics and Epigenetics and Their Impact on The Management of Acute Lymphoblastic Leukemia. *J. Mol. Genet. Med.* **2017**, 11, 1–15.
107. Wang, Y.; Miller, S.; Roulston, D.; et al. Genome-Wide Single-Nucleotide Polymorphism Array Analysis Improves Prognostication of Acute Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *J. Mol. Diagnostics* **2016**, 18, 595–603.
108. Schwab, C.; Sinclair, P.; Moorman, A.V.; et al. Improved Diagnosis of Intrachromosomal Amplification of Chromosome 21 (iAMP21) By Copy Number Profiling. *Blood* **2016**, 128, 1733–1733.
109. Reichard, K.K.; Kang, H.; Robinett, S. Pediatric B-lymphoblastic leukemia with RUNX1 amplification: clinicopathologic study of eight cases. *Mod. Pathol.* **2011**, 24, 1606–1611.
110. Tsuchiya, K.D.; Davis, B.; Gardner, R.A. Is intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) always intrachromosomal? *Cancer Genet.* **2017**, 218–219, 10–14.
111. Baughn, L.B.; Biegel, J.A.; South, S.T.; et al. Integration of cytogenomic data for furthering the characterization of pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: A multi-institution, multi-platform microarray study. *Cancer Genet.* **2015**, 208, 1–18.
112. Berry, N.K.; Scott, R.J.; Sutton, R.; et al. Enrichment of atypical hyperdiploidy and IKZF1 deletions detected by SNP-microarray in high-risk Australian AIEOP-BFM B-cell acute lymphoblastic leukaemia cohort. *Cancer Genet.* **2020**, 242, 8–14.
113. Haraksingh, R.R.; Abyzov, A.; Urban, A.E. Comprehensive performance

- comparison of high-resolution array platforms for genome-wide Copy Number Variation (CNV) analysis in humans. *BMC Genomics* **2017**, 18, 321.
114. Eijk-Van Os, P.G.C.; Schouten, J.P. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA ®) for the detection of copy number variation in genomic sequences. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 688, 97–126.
  115. Schwab, C.J.; Jones, L.R.; Morrison, H.; et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom. Cancer* **2009**, 49, 1104–1113.
  116. Konialis, C.; Savola, S.; Karapanou, S.; et al. Routine application of a novel MLPA-based first-line screening test uncovers clinically relevant copy number aberrations in haematological malignancies undetectable by conventional cytogenetics. *Hematology* **2014**, 19, 217–224.
  117. Allemani, C.; Matsuda, T.; Di Carlo, V.; et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000–14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries. *Lancet* **2018**, 391, 1023–1075.
  118. Jaime-Pérez, J.C.; Fernández, L.; Jiménez-Castillo, R.A.; et al. Age Acts as an Adverse Independent Variable for Survival in Acute Lymphoblastic Leukemia: Data From a Cohort in Northeast Mexico. *Clin. Lymphoma. Myeloma Leuk.* **2017**, 17, 590–594.
  119. Jaime-Pérez, J.C.; López-Razo, O.N.; García-Arellano, G.; et al. Results of Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Low-middle Income Country: 10 Year Experience in Northeast Mexico. *Arch. Med. Res.* **2016**, 47, 668–676.
  120. Jiménez-Hernández, E.; Jaimes-Reyes, E.Z.; Arellano-Galindo, J.; et al. Survival of Mexican children with acute lymphoblastic leukaemia under treatment with the protocol from the Dana-Farber cancer institute 00-01. *Biomed Res. Int.* **2015**, 2015, 576950.
  121. Verduzco-Rodriguez, L. Prevalence of high risk acute lymphoblastic leukemia (ALL) in Mexico, a possible explanation for outcome disparities. *J. Clin. Oncol.* **2018**, 36, e22501–e22501.
  122. Bekker-Méndez, V.C.; Miranda-Peralta, E.; Núñez-Enríquez, J.C.; et al. Prevalence of Gene Rearrangements in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: A Population Study - Report from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia. *Biomed Res. Int.* **2014**, 2014, 210560.
  123. Hakeem, A.; Shiekh, A.A.; Bhat, G.M.; et al. Prognostification of ALL by Cytogenetics. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **2015**, 31, 322–31.
  124. Mata-Rocha, M.; Rangel-López, A.; Jiménez-Hernández, E.; et al. Identification and characterization of novel fusion genes with potential clinical applications in mexican children with acute lymphoblastic leukemia. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 2394.
  125. Bárcenas-López, D.A.; Núñez-Enríquez, J.C.; Hidalgo-Miranda, A.; et al. Transcriptome analysis identifies LINC00152 as a biomarker of early relapse and mortality in acute lymphoblastic leukemia. *Genes.* **2020**, 11, 302.

126. Ayón-Pérez, M.F.; Pimentel-Gutiérrez, H.J.; Durán-Avelar, M.D.J.; et al. Ikbzf1 gene deletion in pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in Mexico. *Cytogenet. Genome Res.* **2019**, *158*, 10–16.
127. Jiménez-Hernández, E.; Fajardo-Gutiérrez, A.; Núñez-Enriquez, J.C.; et al. A greater birthweight increases the risk of acute leukemias in Mexican children—experience from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia (MIGICCL). *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1528–1536.
128. Suguna, S.; Nandal, D.H.; Kamble, S.; et al. Genomic DNA isolation from human whole blood samples by non enzymatic salting out method. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2014**, *6*, 198–199.
129. Franch-Expósito, S.; Bassaganyas, L.; Vila-Casadesús, M.; et al. CNApp: quantification of genomic copy number alterations in cancer and integrative analysis to unravel clinical implications. *eLife* **2020**, *9*, e50267.
130. Storey, J.D.; Tibshirani, R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 9440–9445.
131. Bindea, G.; Mlecnik, B.; Hackl, H.; et al. ClueGO: A Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1091–1093.
132. Kanehisa, M.; Furumichi, M.; Tanabe, M.; et al. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D353–D361.
133. Kelder, T.; Van Iersel, M.P.; Hanspers, K.; et al. WikiPathways: Building research communities on biological pathways. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, D1301–D1307.
134. Fabregat, A.; Jupe, S.; Matthews, L.; et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, D649–D655.
135. Dastugue, N.; Suciu, S.; Plat, G.; et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood* **2013**, *121*, 2415–2423.
136. Moorman, A.V.; Richards, S.M.; Robinson, H.M.; et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood* **2007**, *109*, 2327–2330.
137. Marcotte, E.L.; Spector, L.G.; Mendes-de-Almeida, D.P.; et al. The Prenatal Origin of Childhood Leukemia: Potential Applications for Epidemiology and Newborn Screening. *Front. Pediatr.* **2021**, *9*, 188.
138. Tam, K.J.; Hui, D.H.F.; Lee, W.W.; et al. Semaphorin 3 C drives epithelial-to-mesenchymal transition, invasiveness, and stem-like characteristics in prostate cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11501.
139. Jang, B.G.; Kim, H.S.; Bae, J.M.; et al. SMOC2, an intestinal stem cell marker, is an independent prognostic marker associated with better survival in colorectal cancers. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 14591.
140. Heidari, N.; Abroun, S.; Bertacchini, J.; et al. Significance of Inactivated Genes in Leukemia: Pathogenesis and Prognosis. *Cell J.* **2017**, *19*, 9–26.
141. Wolthers, B.O.; Frandsen, T.L.; Patel, C.J.; et al. Trypsin-encoding PRSS1-PRSS2 variations influence the risk of asparaginase-associated pancreatitis in children with acute lymphoblastic leukemia: A ponte di legno toxicity working group report. *Haematologica* **2019**, *104*, 556–563.

142. Wang, G.D.; Huang, J.T.; Liu, Y.; et al. Deletion of C9orf53 promotes the growth of head and neck squamous cell carcinoma and is associated with poor prognosis of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Lett.* **2019**, *17*, 1223–1228.
143. Pan, Q.D.E.; Wang, L.C.; Zhang, H.E.; et al. Identification of a 5-Gene Signature Predicting Progression and Prognosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. **2019**, *25*, 4401–4413.
144. You, X.; Yang, S.; Sui, J.; et al. Molecular characterization of papillary thyroid carcinoma: A potential three-lncRNA prognostic signature. *Cancer Manag. Res.* **2018**, *10*, 4297–4310.
145. Kim, M.; Yim, S.H.; Cho, N.S.; et al. Homozygous deletion of CDKN2A (p16, p14) and CDKN2B (p15) genes is a poor prognostic factor in adult but not in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a comparative deletion and hypermethylation study. *Cancer Genet. Cytogenet.* **2009**, *195*, 59–65.
146. Zhang, X.; Wan, S.; Yu, Y.; et al. Identifying potential DNA methylation markers in early-stage colorectal Cancer. *Genomics* **2020**, *112*, 3365–3373.
147. Al Zeyadi, M.; Dimova, I.; Ranchich, V.; et al. Whole genome microarray analysis in non-small cell lung cancer. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2015**, *29*, 111–118.
148. Rochette, L.; Meloux, A.; Zeller, M.; et al. Mitochondrial SLC25 carriers: Novel targets for cancer therapy. *Molecules* **2020**, *25*, 2417.
149. De Smith, A.J.; Kaur, M.; Gonseth, S.; et al. Correlates of prenatal and early-life tobacco smoke exposure and frequency of common gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 1674–1683.
150. Vesely, C.; Frech, C.; Eckert, C.; et al. Genomic and transcriptional landscape of P2RY8-CRLF2-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2017**, *31*, 1491–1501.
151. Marke, R.; Havinga, J.; Cloos, J.; et al. Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2016**, *30*, 1599–1603.
152. Palmi, C.; Valsecchi, M.G.; Longinotti, G.; et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica* **2013**, *98*, 1226–1231.
153. Trentin, L.; Queudeville, M.; Eckhoff, S.M.; et al. Leukemia reconstitution in vivo is driven by cells in early cell cycle and low metabolic state. *Haematologica* **2018**, *103*, 1008–1017.
154. Purizaca, J.; Contreras-Quiroz, A.; Dorantes-Acosta, E.; et al. Lymphoid progenitor cells from childhood acute lymphoblastic leukemia are functionally deficient and express high levels of the transcriptional repressor Gfi-1. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 349067.
155. Vilchis-Ordoñez, A.; Contreras-Quiroz, A.; Vadillo, E.; et al. Bone marrow cells in acute lymphoblastic leukemia create a proinflammatory microenvironment influencing normal hematopoietic differentiation fates. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 386165.
156. Ebinger, S.; Özdemir, E.Z.; Ziegenhain, C.; et al. Characterization of Rare, Dormant, and Therapy-Resistant Cells in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 849–862.

157. Dagdan, E.; Zaliova, M.; Zimmermann, M.; et al. Concurrent deletions of IKZF1 and PAX5, CDKN2A, CDKN2B or PAR1 (IKZF1plus) confer a very poor prognosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Klin. Pädiatrie* **2014**, 226, A10.
158. Stanulla, M.; Dagdan, E.; Zaliova, M.; et al. IKZF1 plus defines a new minimal residual disease-dependent very-poor prognostic profile in pediatric b-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* **2018**, 36, 1240–1249.
159. Malinowska-Ozdowy, K.; Frech, C.; Schönegger, A.; et al. KRAS and CREBBP mutations: A relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **2015**, 29, 1656–1667.
160. Mendonça, G.A.S. Selection of subjects in case-controls studies. *Sao Paulo Med. J.* **1995**, 113, 41–42.
161. Barraclough, H.; Simms, L.; Govindan, R. Biostatistics primer: What a clinician ought to know: Hazard ratios. *J. Thorac. Oncol.* **2011**, 6, 978–982.
162. Zapata-Tarres, M.; Sánchez-Huerta, J.L.; Angeles-Florian, T.; et al. Identificación de alteraciones moleculares en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda. *Revista de Hematología* **2017**, 18, 47–57.

## 10. Anexos

### Artículo requisito para la obtención del grado



ELSEVIER



Check for updates

Archives of Medical Research 52 (2021) 414–422

Archives  
of Medical  
Research

#### CLINICAL

### Copy Number Alterations are Associated with the Risk of Very Early Relapse in Pediatric B-lineage Acute Lymphoblastic Leukemia: A Nested Case-control MIGICCL Study

Beatriz Rosales-Rodríguez,<sup>a,b</sup> Juan Carlos Núñez-Enríquez,<sup>c</sup> Ana Claudia Velázquez-Wong,<sup>b</sup> Carolina González-Torres,<sup>d</sup> Javier Gaytán-Cervantes,<sup>d</sup> Elva Jiménez-Hernández,<sup>e,f</sup> Jorge Alfonso Martín-Trejo,<sup>g</sup> María de los Ángeles del Campo-Martínez,<sup>f</sup> Aurora Medina-Sanson,<sup>h</sup> Janet Flores-Lujano,<sup>c</sup> Luz Victoria Flores-Villegas,<sup>i</sup> José Gabriel Peñaloza-González,<sup>j</sup> José Refugio Torres-Nava,<sup>k</sup> Rosa Martha Espinosa-Elizondo,<sup>l</sup> Raquel Amador-Sánchez,<sup>m</sup> María Raquel Miranda-Madrazo,<sup>i</sup> Jessica Denise Santillán-Juárez,<sup>n</sup> María Luisa Pérez-Saldívar,<sup>c</sup> Alma Gurrola-Silva,<sup>o</sup> Darío Orozco-Ruiz,<sup>k</sup> Karina Anastacia Solís-Labastida,<sup>g</sup> Martha Margarita Velázquez-Aviña,<sup>j</sup> David Aldebarán Duarte-Rodríguez,<sup>c</sup> Minerva Mata-Rocha,<sup>b,e</sup> Omar Alejandro Sepúlveda-Robles,<sup>b,e</sup> Mónica Ortiz-Maganda,<sup>p</sup> Vilma Carolina Bekker-Méndez,<sup>p</sup> Silvia Jiménez-Morales,<sup>q</sup> Juan Manuel Mejía-Arangur,<sup>e</sup> and Haydeé Rosas-Vargas<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Doctorado, Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

<sup>b</sup>Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>c</sup>Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>d</sup>Laboratorio de Secuenciación, División de Desarrollo de la Investigación, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>e</sup>Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>f</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital General Gaudencio González Garza, Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>g</sup>Servicio de Hematología, Unidad de Investigación Médica en Epidemiología Clínica, Hospital de Pediatría, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>h</sup>Servicio de Hemato-Oncología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

<sup>i</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado, Ciudad de México, México

<sup>j</sup>Servicio de Onco-Pediatría, Hospital Juárez de México, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

<sup>k</sup>Servicio de Oncología, Hospital Pediátrico Moctezuma, Secretaría de Salud de la Ciudad de México, Ciudad de México, México

<sup>l</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital General de México, Secretaría de Salud, Ciudad de México, México

<sup>m</sup>Servicio de Hematología Pediátrica, Hospital General Regional No. 1 Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>n</sup>Servicio de Hemato-Oncología Pediátrica, Hospital Regional No. 1° de Octubre, Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado, Ciudad de México, México

<sup>o</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia, Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado, Ciudad de México, México

<sup>p</sup>Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología Dr. Daniel Méndez Hernández, Centro Médico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México

<sup>q</sup>Laboratorio de Genómica del Cáncer, Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México

Received for publication July 3, 2020; accepted December 14, 2020 (ARCMED\_2020\_1112).

Address reprint requests to: Haydeé Rosas-Vargas, Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Alcaldía

Cuauhtémoc, Ciudad de México 06720, Mexico; Phone: 52 (55) 5627 6941; E-mail: hayrov@gmail.com

**Background.** Refining risk stratification to avoid very early relapses (VER) in Mexican patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) could lead to better survival rates in our population.

**Aim of the study.** The purpose of this study was to investigate the association between the United Kingdom ALL (UKALL)-CNA classifier and VER risk in Mexican patients with childhood B-ALL.

**Methods.** A nested case-control study of 25 cases with VER and 38 frequency-matched controls without relapse was conducted within the MIGICCL study cohort. They were grouped into the categories of the UKALL-CNA risk classifier (good [reference], intermediate and poor), according to the results obtained by multiplex ligation dependent probe amplification. Overall and disease-free survival (DFS) were estimated using the Kaplan-Meier method. Univariate and multivariate Cox proportional hazards analyses were conducted.

**Results.** The *CDKN2A/B* genes were most frequently deleted in the group with relapse. According to UKALL-CNA classifier, 33 (52.4%) patients were classified as good, 21 (33.3%) intermediate and 9 (14.3%) poor-risk B-ALL. The intermediate and poor risk groups were associated with an increased risk of VER (HR = 4.94, 95% CI = 1.87–13.07 and HR = 7.42, 95% CI = 2.37–23.26, respectively) in comparison to the good-risk patients. After adjusting by NCI risk classification and chemotherapy scheme in a multivariate model, the risks remained significant.

**Conclusions.** Our data support the clinical utility of profiling CNAs to potentially refine current risk stratification strategies of patients with B-ALL. © 2021 IMSS. Published by Elsevier Inc.

**Key Words:** Acute lymphoblastic leukemia, Risk stratification, Copy number alterations, Deletions, Relapse.

## Introduction

Despite the global therapeutic progress in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), wide disparities remain across countries. It is a matter of concern that relapsing disease occurs in a substantial proportion of Mexican patients (26.2–35.4%) and constitutes the major reason for death (1,2). This highlights that the current risk stratification system used in public hospitals of Mexico City, which is mainly based on clinical criteria (National Cancer Institute [NCI] risk categories), immunophenotype, and the most common gene rearrangements (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, and *KMT2A-AFF1*), seems to be insufficient to accurately assess the risk of relapse. Notably, the implication of genetic factors influencing ethnic disparities in treatment outcome has been documented (3).

The need for a more accurate risk classification is especially apparent for patients with very early relapses (VER) during the first 18 months after initial remission achievement, as they have the highest mortality rates in comparison to patients who relapse later (4). Particularly, compared to other populations, VER is overrepresented in Mexican cases (1,2,5). Furthermore, in our country, about 80% of B-ALL patients lack of any of the risk-associated chromosomal rearrangements routinely tested (6), which represents an interesting setting to identify the prognostic relevance of additional genetic abnormalities which could improve current stratification schemes.

Advances in genomic technology research have, to a great extent, allowed the identification of somatic copy number alterations (CNAs) (7–11) as cooperating genetic events required for leukemia development (12,13). Notably, a prognostic stratification by CNAs has been proposed by Moorman AV, et al. (14). This stratification system (United Kingdom ALL, UKALL-CNA) has enabled the identification of different risk groups based on DNA copy number status of the *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, and *RBI* genes and the pseudoautosomal region 1 (PAR1). These genes, critical for B-lymphocyte differentiation and cell cycle control, are commonly deleted in childhood B-ALL (10,15–17). The primary aim of this study was to investigate the association between CNA-based risk classification and VER risk in pediatric patients with B-ALL. Our results support the clinical utility of profiling copy number changes to potentially refine current risk stratification strategies for Mexican children.

## Materials and Methods

### Patients and Samples

A case-control study “nested” within a cohort was carried out. The patients with B-ALL were diagnosed and treated during 2011–2016 in public hospitals members of the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of

the Causes of Childhood Leukemia (MIGICCL). These hospitals provide treatment to about 95% of pediatric patients with leukemia in Mexico City (18). All samples analyzed in the present report were selected from patients aged 1–18 years, who achieved complete remission (< 5% of blasts in bone marrow aspirate) after induction phase of treatment. Study participants were treated according to the protocol used in each participating hospital. The eligibility criteria included: residence in Mexico City during treatment to achieve a complete follow-up and availability of bone marrow samples collected at diagnosis confirmation of patients. During prospective follow-up, children who relapsed very early at bone marrow were identified (cases). A group of patients without disease recurrence was selected from the cohort as the controls. Two controls per case were searched within the cohort. The controls were frequency-matched by gender, age ( $\pm 18$  months), and at least the same time of follow-up of the cases. The exclusion criteria were leukemia associated with a genetic syndrome (e.g., Down Syndrome), inappropriate mononuclear cell content for suitable nucleic acid extraction, and patients with isolated extramedullary relapse. Low quality DNA samples were removed for subsequent analyses.

The research protocol was approved by the National Scientific and Ethical Research Committee with number R-2015-785-121. Bone marrow specimens were obtained after written informed consent signed by parents and informed assent in children older than 8 years of age.

#### Data Collection

Information regarding sex, age at diagnosis, white blood cells (WBC) count in peripheral blood at diagnosis confirmation, immunophenotype (B or T lineage), gene rearrangement characterization, percentage of blasts in bone marrow at the end of induction phase, and chemotherapeutic scheme was collected from patients' clinical charts by personnel with previous standardized training. The four most common gene rearrangements with a known impact on the prognosis of children with leukemia (*ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1*, *BCR-ABL1*, and *KMT2A-AFF1*) were examined by RT-PCR.

Risk classification was determined at the time of diagnosis according to the NCI criteria: standard risk (ages from 1–9.99 years; WBC count < 50,000/ $\mu$ L) or as high risk (age < 1 or  $\geq 10$  years or WBC  $\geq 50,000/\mu$ L). Very early relapse in bone marrow was defined when a patient presented  $\geq 5\%$  lymphoblasts in a medullary aspirate during the first 18 months after complete remission achievement.

#### DNA Extraction

Bone marrow samples, collected at diagnosis before treatment initiation, had been stored in the biobank of the MIGICCL. DNA of patients selected was purified from the cryopreserved mononuclear fractions using the commercially

available QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), according to the manufacturer's indications. Genomic DNA was quantified by spectrophotometry (Nanodrop 1000, USA). Integrity was assessed by 1% agarose gel electrophoresis.

#### Identification of B-ALL Genes Deleted in the Study Population

Recurrently deleted genes in B-ALL, *EBF1* (5q33.3), *IKZF1* (7p12.2), *CDKN2A* (9p21.3), *CDKN2B* (9p21.3), *PAX5* (9p13.2), *ETV6* (12p13.2), *BTG1* (12q21.33), *RBI* (13q14.2) and the pseudoautosomal region PAR1 (Xp22.33), were investigated using commercially available multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) kits, according to the manufacturer's instructions. Two sets of MLPA probes were used, one to interrogate selected exons of all the investigated genes/regions (P335; MRC-Holland), and a second one to corroborate *CDKN2A/B* (P419; MRC-Holland) copy number status. Since MLPA kit P335 has a limited probe coverage for *CDKN2A/B* genes (one and two probes, respectively). A loss of single markers was only considered as positive if confirmed by the second kit. The FAM-labeled amplification products were separated by capillary electrophoresis (ABI 3500 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) and the resulting peak intensities were analyzed with the [Coffalyser.net](http://Coffalyser.net) software (MRC Holland). DNA from bone marrow samples of ten non-leukemic pediatric patients was employed in data normalization for copy number determination. We included those deletions with loss  $\geq 2$  probes, except for three samples defined by loss of a single probe which were confirmed using additional MLPA analysis replications and SNP array data. As a matter of fact, in 33 patients, the deletions found in MLPA assays were compared with the copy number status previously observed by SNP array (CytoScan high-density [HD], Affymetrix, USA), as part of a MIGICCL pilot study conducted to explore the genomic alterations in Mexican children with B-ALL by a high resolution technique (19).

#### CNA-Risk Classification

Moorman AV, et al. (2014) designed (14) and validated (20) the UKALL-CNA risk classifier based on the copy number status of the following genes: *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RBI* and the PAR1 region (*CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA* and *P2RY8*). This methodology was employed in the present study. In brief, the deletion status derived from MLPA analyses was used to classify patients into three distinct categories according to the UKALL-CNA system. The first category refers to good-risk patients without deletions in the interrogated regions/genes, isolated allelic losses of *ETV6*, *PAX5*, *BTG1* or *ETV6* deletions with a single additional loss of *BTG1*, *PAX5*, *CDKN2A/B*. The second category, poor-risk, comprised patients harboring single deletion in *IKZF1*,

*RBI*, *PAR1* or the combined loss of *IKZF1/PAX5/CDKN2A/B*. The third category, intermediate risk, included patients with none of those and/or another alteration profile.

It is important to note that CNA profiles were not further integrated into the well-recognized cytogenetic risk categories because available resources did not allow us to analyze the ploidy status for all patients.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the SPSS 21.0 software (IBM, USA). Descriptive statistic was used. To assess differences in distributions of categorical variables,  $\chi^2$  or Fisher's exact tests were calculated, as appropriate. To identify associations for the co-occurrence of deletions in the genes analyzed we calculated odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (95% CI). *p*-values were computed using the Fisher Exact test. Disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) were the primary endpoints of the study. DFS was calculated from the time of remission achievement until the date of relapse (VER group) or until the last visit of patient (non-relapsed group). Likewise, OS was calculated from the time of remission achievement until the date of patient's death or until the last visit of patient. Survival probabilities of CNA risk groups were calculated using Kaplan-Meier analysis, and log-rank test was used to detect differences. A *p* < 0.05 value was considered as statistically significant.

Finally, a Cox proportional hazards regression analysis was conducted for assessing the impact of the CNA-risk classifier on VER risk adjusting for NCI status and chemotherapeutic schema which were associated with CNA-risk categories or with relapse risk in univariate analyses, respectively. The Cox model was tested for the proportionality of the hazard. Unadjusted (HR) and adjusted Hazard ratios (aHR) and 95% CI were calculated.

## Results

### Clinical and Genetic Features of the Studied Cohort

During the period of inclusion, out of 1467 pediatric patients with B-ALL enrolled in the MIGICCL study, 172 (11.7%) relapsed within 18 months of achieving first remission. However, among all these patients, only a minority (14.5%) met all the selection criteria for the present investigation (see [Material and Methods](#) section). Of importance, there were no significant differences between the study participants and VER patients not included in the analysis regarding gender, age, WBC count, and NCI risk classification ([Supplementary Table 1](#)). This indicates that our study group was representative of the entire population of patients who relapsed very early during the inclusion period. Consequently, the case group comprised 25 patients; relapses occurred at a median time of 10 months (range

**Table 1.** Summary of clinical and genetic features of the study population

Parameters at diagnosis	Patients without relapse, <i>n</i> = 38	VER patients, <i>n</i> = 25	<i>p</i>
Clinical characteristics			
Gender, <i>n</i> (%)			
Male	18 (47.4)	12 (48)	0.96
Female	20 (52.6)	13 (52)	
Age, <i>n</i> (%)			
1-9.9 years	33 (86.8)	16 (64)	<b>0.03</b>
≥10 years	5 (13.2)	9 (36)	
WBC count, <i>n</i> (%)			
< 50,000/uL	31 (81.6)	19 (76)	0.59
≥50,000/uL	7 (18.4)	6 (24)	
NCI, <i>n</i> (%)			
Standard	28 (73.7)	13 (52)	0.08
High	10 (26.3)	12 (48)	
Chemotherapy schema, <i>n</i> (%)			
St. Jude Total XV (reference)	24(63.2)	6 (24)	<b>0.03</b>
BFM-95	1 (2.6)	4 (16)	
DFCI	6 (15.8)	7 (28)	
St. Jude Total XIII B	7 (18.4)	8 (32)	
Death, <i>n</i> (%)			
No	35 (92.1)	11 (44)	<b>&lt;0.001</b>
Yes	3 (7.9)	14 (56)	
Genetic characteristics			
Type of gene rearrangement, <i>n</i> (%)			
Not assessed/non-detected	1/31 (84.2)	5/18 (92)	0.76
<i>ETV6-RUNX1</i>	3 (7.9)	0 (0)	
<i>TCF3-PBX1</i>	3 (7.9)	2 (8)	
Gene deletions, <i>n</i> (%)			
No	20 (52.6)	5 (20)	<b>0.01</b>
Yes	18 (47.4)	20 (80)	

*p* values from  $\chi^2$  tests/Fisher's exact test, when appropriate.

In bold the significant values.

NCI, National Cancer Institute risk classification; VER, very early relapse; WBC, white blood cell; DFCI, Dana Farber Cancer Institute 00-01; BFM-95, Berlin-Frankfurt-Munster-95.

2–18 months). Thirty-eight subjects without relapse (controls) were matched to cases (1.5:1) (see [Material and Methods](#) section). Median follow-up time in the control group was 55 months (range 29–120 months). Baseline characteristics of cases and controls are shown in [Table 1](#).

Bone marrow specimens from a total of 63 newly diagnosed B-ALL patients, aged 1.1–17.6 years (median age 6.4 years), were examined. The median follow-up time was 46 months (range 2–120 months). Eight patients had common B-ALL fusion genes, three (4.8%) were *ETV6-RUNX1* and five (7.9%) were *TCF3-PBX1* positive. Of the relapsed patients, twelve were male, and median age at initial diagnosis was 7 years (range 1.1–16.9 years). An isolated bone marrow relapse was registered in almost all cases, except in one patient (16RM), in whom the event occurred in a combined manner affecting bone marrow and

testicles. The proportion of VER was similar between NCI standard (52%) and high risk (48%) groups (Table 1). In the other hand, in the group of patients without relapse, NCI standard risk was more frequent (73.7%) than NCI high risk classification (26.3%). Although comparable WBC counts were seen between groups with or without relapse, significant differences in age distribution ( $p = 0.03$ ), chemotherapy schema ( $p = 0.03$ ) and death ( $p < 0.001$ ) were detected (Table 1).

#### Frequency of Deletions in B-cell Related Genes at Diagnosis

Of the total 63 patients, 39.7% ( $n = 25$ ) developed VER, while 60.3% ( $n = 38$ ) did not, representing this last, the control group for comparisons. Overall, altered numbers of DNA copies were found in 38 samples (60.3%; range 0–5 deletions), with a median of one abnormality per case. Notably, patients in the very early relapsed group showed a higher incidence of copy number losses than the control group ( $p = 0.01$ ) (Table 1).

The genes more frequently affected by copy number loss were *CDKN2A* and *CDKN2B*, identified in 20 (31.7%) and eighteen (28.6%) patients, respectively. *IKZF1* gene deletion was documented in 27% of samples ( $n = 17$ ). Deletions targeting *ETV6*, *PAX5* and *BTG1* were present at lower frequencies, accounting for 15.9, 15.9 and 11.1% of patients, respectively. *RBI*, *PAR1* and *EBF1* were rarely deleted (Table 2).

Deletion frequencies were mostly similar between subgroups with or without relapse, but significant differences for *CDKN2A/B* deletions were seen (Table 2). To note, in VER cases, a higher frequency of *IKZF1* copy number loss was detected although the difference was not statistically significant. It should be noted that a statistically significant association was detected between the state of suppression

of the *IKZF1* gene and high-risk classification according to NCI criteria ( $p = 0.01$ ) in patients with VER (Figure 1). Particularly, *IKZF1* gene deletions were significantly more common in patients over 10 years of age ( $p = 0.03$ ). Regarding genetic alterations co-occurrence, significant associations between *CDKN2A/B* with *PAX5* deletions were observed (OR = 7.18; 95% CI: 1.62–31.87;  $p = 0.008$ ; OR = 5.13; 95% CI: 1.24–21.19;  $p = 0.026$ , respectively). Furthermore, *IKZF1* deletions coincided significantly with allelic losses of the *BTG1* anti-proliferative gene (OR = 9.17; 95% CI: 1.58–53.26;  $p = 0.013$ ).

#### CNA-Based Risk Classification

Based on the copy number status derived from MLPA assays, 53% (33/63), 33% (21/63) and 14% (9/63) of the studied patients were assigned to the good, intermediate, and poor-risk groups, respectively (Table 3, Figure 1). Intermediate/poor-risk categories were overrepresented in the VER group ( $p = 0.001$ ). Despite the clinical importance of age and WBC count, in the group with VER, eight (61.5%) out of 13 patients initially assigned as standard risk by the NCI classification met criteria for intermediate-risk ( $p = 5$ ) and for poor-risk ( $p = 3$ ) established on the UKALL-CNA classifier (Figure 1).

#### Survival Analysis by CNA-Based Risk Groups

DFS and OS at 18 months after complete remission achievement were estimated. In the whole cohort, DFS was 82% for good-risk patients, 38% and 33% for those with intermediate and poor-risk groups, respectively (log-rank test,  $p < 0.0001$ ). Likewise, OS showed significant differences among CNA-based risk categories. A higher OS rate was documented for good and intermediate-risk patients (85% and 65%, respectively) compared with the 44% observed in the poor-risk group (log-rank test,  $p = 0.005$ ).

#### Cox Regression

Univariate Cox regression analysis showed that the UKALL-CNA classifier was associated with VER risk (Intermediate-risk: HR = 4.94; 95% CI: 1.87–13.07; Poor-risk: HR = 7.42; 95% CI: 2.37–23.26). Noteworthy, after adjusting by NCI risk classification and chemotherapeutic scheme in a multivariate model, the risk categories based on CNAs remained significant (Table 3). In addition, when the categories intermediate and poor were collapsed in one group, it was observed an increased risk of VER (aHR = 4.84; 95% CI: 1.86–12.55) compared with those patients classified in the good CNA-risk category (Table 3).

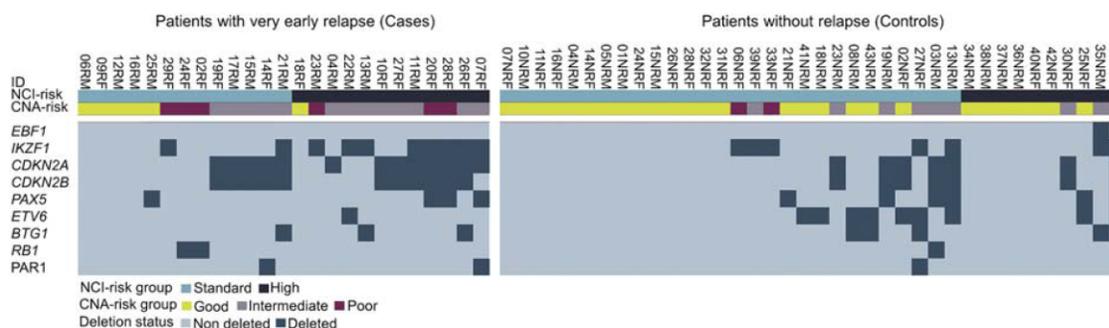
**Table 2.** Frequency of specific gene deletions according to subgroups of patients

Deleted gene/ region	Patients without relapse,		VER patients,		<i>p</i>
	Total	<i>n</i> = 38	<i>n</i> = 25		
	<i>n</i>	%	<i>n</i> (%)	<i>n</i> (%)	
<i>EBF1</i>	1	1.6	1 (2.6)	–	NC
<i>IKZF1</i>	17	27	7 (18.4)	10 (40.0)	0.06
<i>CDKN2A</i>	20	31.7	7 (18.4)	13 (52.0)	<b>0.005</b>
<i>CDKN2B</i>	18	28.6	7 (18.4)	11 (44.0)	<b>0.03</b>
<i>PAX5</i>	10	15.9	6 (15.8)	4 (16.0)	1
<i>ETV6</i>	10	15.9	9 (23.7)	1 (4.0)	0.07
<i>BTG1</i>	7	11.1	4 (10.5)	3 (12.0)	1
<i>RBI</i>	3	4.8	1 (2.6)	2 (8.0)	0.56
<i>PAR1</i>	3	4.8	1 (2.6)	2 (8.0)	0.56

*p* values from  $\chi^2$  tests/Fisher's exact test when appropriate.

In bold the significant values.

NC, not calculated due to insufficient sample size; VER, very early relapse.



**Figure 1.** Overview of gene deletion profiles assessed by multiplex ligation-dependent probe amplification in 63 B-ALL patients at initial diagnosis. Cases and controls (one per column) are grouped by NCI risk categories. CNA risk stratification was defined according to the copy number status (deleted vs not deleted). Genes were ordered according to their chromosomal locations. Information about gender is considered in the patient ID (F, female; M, male).

## Discussion

On improving B-ALL survival rates, concerns include the accuracy of relapse risk assessment. The high proportion of patients with VER having NCI standard risk clinical characteristics underscores that age and WBC counts are insufficient to accurately stratify patients into distinct prognostic groups. It is important to consider that relapse during the first 18 months after diagnosis occurs more frequently in Mexican patients (8.9–19.9%) than in children from other populations (~3.8%) receiving comparable chemotherapy schemes (1,2,5). Of interest, survival is particularly poor for patients relapsing very early (21), suggesting different biological mechanisms contributing to relapse (22). Prognostic risk factors for disease recurrence based on copy number status have been introduced but have so far not been evaluated for Mexican patients.

**Table 3.** Results of the Cox regression analyses between CNA-risk groups and disease-free survival

CNA-risk group	Patients VER Unadjusted			Adjusted		
	<i>n</i>	<i>n</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>	aHR (95% CI) <sup>a</sup>	<i>p</i>
Three categories						
Good	33	6	Reference		Reference	
Intermediate	21	13	4.94 (1.87-13.07)	<b>0.001</b>	<b>13.51</b> (1.27-9.68)	<b>0.01</b>
Poor	9	6	7.42 (2.37-23.26)	<b>0.001</b>	<b>14.46</b> (4.0-52.26)	<b>&lt;0.001</b>
Two categories						
Good	33	6	Reference		Reference	
Intermediate/Poor	30	19	5.51 (2.19-13.90)	<b>&lt;0.001</b>	<b>14.84</b> (1.86-12.55)	<b>0.001</b>

VER, very early relapse; HR, unadjusted hazard ratios; aHR, adjusted hazard ratios; CI, confidence interval.

In bold the significant values.

<sup>a</sup>The model was adjusted by NCI risk classification and chemotherapeutic schema.

Consequently, the purpose of this study was to investigate the association between the CNA profiles and the risk of VER.

Screening for *EBF1*, *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *BTG1*, *RB1*, and *PAR1* deletions was carried out via MLPA. Overall, copy number losses in those B-ALL related genes were found in 60.3% of samples. Comparable prevalence (55–71%) was reported in studies comprising the major cytogenetic subtypes of pediatric B-ALL (14,15,20,23–26). Of note, a low occurrence (46.6%) of gene deletions has been documented across patients lacking prognostically relevant gene fusions (27). Particularly, we observed a higher deletion frequency (~32%) of the unfavorable prognostic factor *CDKN2A/B* compared to Italian patients (11%) (26). This could partially explain the aggressive disease course of Mexican children with B-ALL. Consistent with a previous study (28), the deletion of *CDKN2A/B* was more frequent for patients who developed relapse compared to the non-relapse group. Noteworthy, these tumor suppressor genes have been associated with decreased DFS (27).

In the present study, two patterns of co-occurrence in genes commonly deleted in B-ALL were observed: a) *CDKN2A/B* with *PAX5*, and 2) *IKZF1* with *BTG1*. These findings were like the previously reported concomitant deletions of *CDKN2A* and *PAX5*, and of *IKZF1* and *BTG1* in non-high hyperdiploid and non-*ETV6-RUNX1* B-ALL patients (26). Noteworthy, in the present investigation a low frequency of *ETV6-RUNX1* gene rearrangement was noted.

Regarding the study of the prognostic relevance of CNAs in childhood B-ALL in Mexico, a previous research effort was focused on *IKZF1* gene alterations, reporting a deletion frequency of 20% at the time of diagnosis (29). In the present investigation, from comparison of patients who did not relapse (controls) and those who developed VER (cases), our findings indicated that the incidence of *IKZF1* gene deletions in the group of cases was high at diagnosis (40%). Previous studies have been reported a relationship between deletions in *IKZF1* and unfavorable clinical outcomes (9,23,30,31) or the persistence of

minimal residual disease (MRD) during early phases of chemotherapy treatment (32). Additionally, functional approaches have revealed the association between *IKZF1* copy number loss and attenuated effects of *in vivo* prednisolone response and an increased *in vitro* glucocorticoid resistance (33). Nonetheless, Palmi C, et al. (34) have questioned the application of the *IKZF1* copy number status as a stratification marker of prognosis when patients are negative to *BCR-ABL1* gene fusion. Of significance, the complex interplay existing between treatment response and the underlying disease biology are fundamental to determine the prognostic impact of *IKZF1* deletions (30).

Consequently, the individual copy number changes associated with disease outcome does not consider the functional implications with other concomitant alterations. Then, the integration of CNA profiles may be essential for improving risk assessment and monitoring the response to the treatment. In the present study, the patients were grouped into the three risk categories described by the UKALL-CNA classifier. Specifically, 48% presented intermediate and poor-risk, which was slightly higher than in the UKALL97/99 cohort (39%) studied by Moorman AV, et al. (14). Although the present research examined a relatively small sample size of B-ALL patients, a significantly higher risk of very early relapsed disease was observed in children with an intermediate/poor risk CNA profile versus those with CNA-good risk status.

An additional CNA-based risk stratification classifier was integrated by Kiss R, et al. (35) relying on a next-generation sequencing-based multiplex ligation-dependent probe amplification variant (digitalMLPA), a novel approach for simultaneously investigating hundreds of genomic loci at exon-level resolution. The digitalMLPA-based CNA profiles divide ALL patients into 4 subgroups with varying clinical outcomes. However, in sharp contrast with our results, those authors were unable to distinguish the risk groups recognized by the UKALL-CNA classifier. With regard to the *IKZF1*<sup>plus</sup> profile (*IKZF1* deletions occurring simultaneously with deletions in *CDKN2A/B*, *PAX5*, or *PAR1* in the absence of *ERG* deletion) (36,37), prognostic impact strongly depends on detectable MRD. There are three considerable differences between the present study and those investigations which have described the association of CNA-profiles with clinical outcomes in children with leukemia: a) the uniformity of chemotherapy scheme; b) MRD detection as stratifying variable and c) differences in the search for recurrent genetic aberrations at diagnosis, so that approximately 75% of patients can be assigned to a particular category of cytogenetic risk. We recognize this as a limitation of our study; however, we would like to emphasize that the associations we report were analyzed having considered the chemotherapeutic scheme as an adjustment variable within the multivariate analysis. Furthermore, regarding MRD detection as well as the analysis of a complete panel of recurrent genetic

aberrations at diagnosis, although they are important variables in risk stratification, they are not routinely performed in Mexico City's public hospitals due to lack of economic resources. On the other hand, it is worth mentioning that a relationship between CNA profiles and clinical results has also been reported through protocols based or not on MRD detection. For example, in the Hamadeh L, et al. study (20), the authors reported that their UKALL-CNA classifier was predictive of outcomes in many different pediatric leukemia protocols, both MRD-based and non-MRD-based, even though significant differences in genetic aberrations had been observed.

In this study, stratification into three risk classes by the UKALL-CNA classifier showed significant differences on DFS, highlighting the prognostic importance of gene deletions among B-ALL patients. Furthermore, in accordance with previously published results (24,25), the CNA information would enable a more refined stratification of patients at the time of diagnosis. In this regard, eight (61.5%) out of thirteen relapsed patients that presented standard risk clinical features according to NCI criteria were reassigned into an intermediate or poor-risk category by the UKALL-CNA classifier. We found that one NCI high risk patient with VER was reclassified as good risk based on their CNA status. Of interest, this case was identified as having a high hyperdiploid (HeH) karyotype during a pilot SNP-based analysis performed by our research group. Although HeH is typically related to favorable outcomes, about 15% of patients with this genomic subtype of B-ALL relapse. The high concordance rate of sequence mutations observed in relapsed HeH cases affecting the CREBBP HAT domain and the Ras pathway gene *KRAS*, may contribute to therapeutic resistance and could, at least in part, explain the clinical outcome seen for this patient (38).

Considering that treatment regimens are typically risk-adapted, the subset of NCI standard risk patients, reclassified as poor/intermediate status depending on their CNA profile, could have been received a more intensive chemotherapy for relapse prevention.

Furthermore, the UKALL-CNA classifier can be integrated with known cytogenetic risk groups to establish two genetic risk categories with prognostic impact. Notably, the poor genetic status was recently associated with an *ex-vivo* drug resistance to medications such as thiopurines and L-asparaginase, and consequently, with treatment failure in children with leukemia (24).

It is important to consider that these tools are still expensive for a country that has not developed its own technology, however, knowing their usefulness, it is possible to consider laboratories for centralizing this type of tests so that they could be more accessible to all patients. In countries where mortality by childhood leukemia has not been reduced, it is relevant to make all the efforts for identifying which children will require for a more intensive

chemotherapy regimens to improve their survival chances and, on the other hand, to identify which patients will require for a less intensive chemotherapy and reduce the adverse events associated with treatment.

## Conclusions

Our findings support previous results about the utility of the recently developed CNA profile-based risk classification. Using this approach, we demonstrated for the first time, that copy number changes are associated with relapses occurring very early during treatment of Mexican children with B-ALL. Based on these results, the UKALL-CNA classifier provides a valuable strategy, which could be implemented and potentially improve current risk stratification schemes of Mexican pediatric patients with this disease. Nonetheless, further study is required to elucidate its predictive value with long-term outcomes and treatment response markers such as MRD detection.

## Declaration of Interest

No potential conflict of interest was reported by the authors.

## Acknowledgments

The authors would like to thank to the collaborators of the following participating Hospitals and Institutions: Secretaría de Salud (Hospital Infantil de México, Hospital General de México y Hospital Juárez de México); Instituto Mexicano del Seguro Social (UMAE Hospital General Centro Médico Nacional “La Raza” “Dr. Gaudencio González Garza”, UMAE Hospital de Pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI “Dr. Silvestre Frenk Freund” and Hospital Regional No 1 “Carlos McGregor Sánchez Navarro”); Secretaría de Salud de la Ciudad de México (Hospital Pediátrico Moctezuma), and the Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado (Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, Hospital Regional 1º. de Octubre, and Hospital Regional Tipo B de Alta Especialidad Bicentenario de la Independencia). We also thank to Luisa Javier Matus for her technical assistance. The first author thanks to the Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); this article was submitted in partial fulfilment of requirements for the degree of PhD in Biological Sciences.

**Funding:** This work was funded by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT): Grant numbers: PDCPN2013-01-215726, FIS/IMSS/PROT/1364; SALUD 2015-1-262190, FIS/IMSS/PROT/1533; CB-2015-1-258042, FIS/IMSS/PROT/1548, FONCICYT/37/2018, FIS/IMSS/PROT/1782; and by the Instituto Mexicano del Seguro Social: Grant numbers: FIS/IMSS/PROT/PRI0/14/031, FIS/IMSS/PROT/PRI0/15/048, FIS/IMSS/PROT/PRI0/18/080 and FIS/IMSS/PROT/PRI0/19/088. B. R.-R. was supported with a scholarship from the CONACyT (CVU 508873) and the Instituto Mexicano del Seguro Social (Becario: 2017-56).

## Supplementary Data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.12.013>.

## References

1. Jaime-Pérez JC, Pinzón-Uresti MA, Jiménez-Castillo RA, et al. Relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia and outcomes at a reference center in Latin America: organomegaly at diagnosis is a significant clinical predictor. *Hematology* 2018;23:1–9.
2. Jiménez-Hernández E, Jaimes-Reyes EZ, Arellano-Galindo J, et al. Survival of Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukaemia under treatment with the protocol from the Dana-Farber Cancer Institute 00-01. *Biomed Res Int* 2015;2015:576950.
3. Lim JY-S, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2014;120:955–962.
4. Nguyen K, Devidas M, Cheng S-C, et al. Factors influencing survival after relapse from acute lymphoblastic leukemia: A Children's Oncology Group study. *Leukemia* 2008;22:2142–2150.
5. Oskarsson T, Söderhäll S, Arvidson J, et al. Relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia in the Nordic countries: prognostic factors, treatment and outcome. *Haematologica* 2016;101:68–76.
6. Bekker-Méndez VC, Miranda-Peralta E, Núñez-Enríquez JC, et al. Prevalence of gene rearrangements in Mexican Children with acute lymphoblastic Leukemia: A Population Study - Report from the Mexican Interinstitutional Group for the identification of the causes of childhood Leukemia. *Biomed Res Int* 2014;2014:210560.
7. Thakral D, Kaur G, Gupta R, et al. Rapid identification of key copy number alterations in B- and T-cell acute lymphoblastic leukemia by digital multiplex ligation-dependent probe amplification. *Front Oncol* 2019;9:871.
8. Forero-Castro M, Robledo C, Benito R, et al. Genome-wide DNA copy number analysis of acute lymphoblastic leukemia identifies new genetic markers associated with clinical outcome. *PLoS One* 2016;11:e0148972.
9. Kuiper RP, Schoenmakers EFP, van Reijmersdal SV, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007;21:1258–1266.
10. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007;446:758–764.
11. Strefford JC, Worley H, Barber K, et al. Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Oncogene* 2007;26:4306–4318.
12. Greaves M. Childhood leukaemia. *BMJ* 2002;324:283–287.
13. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2018;18:471–484.
14. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2014;124:1434–1444.
15. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: Association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica* 2013;98:1081–1088.
16. Ma X, Liu Y, Liu Y, et al. Pan-cancer genome and transcriptome analyses of 1,699 paediatric leukaemias and solid tumours. *Nature* 2018;555:371–376.
17. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic

- leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2011; 118:3080–3087.
18. Jiménez-Hernández E, Fajardo-Gutiérrez A, Núñez-Enríquez JC, et al. A greater birthweight increases the risk of acute leukemias in Mexican children—experience from the Mexican Interinstitutional Group for the Identification of the Causes of Childhood Leukemia (MIGICCL). *Cancer Med* 2018;7:1528–1536.
  19. Rosales-Rodríguez B, Fernández-Ramírez F, Núñez-Enríquez JC, et al. Copy number alterations associated with acute lymphoblastic leukemia in Mexican children. A report from The Mexican Inter-Institutional Group for the identification of the causes of childhood leukemia. *Arch Med Res* 2016;47:706–711.
  20. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Adv* 2019;3:148–157.
  21. Zhang X, Wu H, Fan H, et al. Clinical characteristics and prognosis of pediatric patients with B cell acute lymphoblastic leukemia relapse. *Oncol Lett* 2018;16:2929–2934.
  22. Fuster JL. Current approach to relapsed acute lymphoblastic leukemia in children. *World J Hematol* 2014;3:49–70.
  23. Singh M, Bhatia P, Trehan A, et al. High frequency of intermediate and poor risk copy number abnormalities in pediatric cohort of B-ALL correlate with high MRD post induction. *Leuk Res* 2018;66:79–84.
  24. Steeghs EMP, Boer JM, Hoogkamer AQ, et al. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep* 2019;9:4634.
  25. Gupta SK, Bakhshi S, Kumar L, et al. Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2017;58:333–342.
  26. De Smith AJ, Kaur M, Gonseth S, et al. Correlates of prenatal and early-life tobacco smoke exposure and frequency of common gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 2017;77:1674–1683.
  27. Messina M, Chiaretti S, Fedullo AL, et al. Clinical significance of recurrent copy number aberrations in B-lineage acute lymphoblastic leukaemia without recurrent fusion genes across age cohorts. *Br J Haematol* 2017;178:583–587.
  28. Erbilgin Y, Firtina S, Mercan S, et al. Prognostic gene alterations and clonal changes in childhood B-ALL. *Leuk Res* 2019;83:106159.
  29. Ayón-Pérez MF, Pimentel-Gutiérrez HJ, Durán-Avelar MDJ, et al. Ikaros gene deletion in pediatric patients diagnosed with acute lymphoblastic leukemia in Mexico. *Cytogenet Genome Res* 2019; 158:10–16.
  30. Olsson L, Ivanov Öfverholm I, Norén-Nyström U, et al. The clinical impact of IKZF1 deletions in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia is independent of minimal residual disease stratification in Nordic Society for Paediatric Haematology and Oncology treatment protocols used between 1992 and 2013. *Br J Haematol* 2015;170:847–858.
  31. Stanulla M, Cavé H, Moorman A. IKZF1 deletions in pediatric acute lymphoblastic leukemia: Still a poor prognostic marker? *Blood* 2020; 135:252–260.
  32. Patkar N, Subramanian P, Tembhare P, et al. An integrated genomic profile that includes copy number alterations is highly predictive of minimal residual disease status in childhood precursor B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Indian J Pathol Microbiol* 2017;60: 209–213.
  33. Marke R, Havinga J, Cloos J, et al. Tumor suppressor IKZF1 mediates glucocorticoid resistance in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2016;30:1599–1603.
  34. Palmi C, Valsecchi MG, Longinotti G, et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica* 2013;98:1226–1231.
  35. Kiss R, Gángó A, Benard-Slagter A, et al. Comprehensive profiling of disease-relevant copy number aberrations for advanced clinical diagnostics of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol* 2020;33:812–824.
  36. Dagdan E, Zaliouva M, Zimmermann M, et al. Concurrent deletions of IKZF1 and PAX5, CDKN2A, CDKN2B or PAR1 (IKZF1plus) confer a very poor prognosis in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Klin Pädiatrie* 2014;226:A10.
  37. Stanulla M, Dagdan E, Zaliouva M, et al. IKZF1plus defines a new minimal residual disease-dependent very-poor prognostic profile in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2018;36:1240–1249.
  38. Malinowska-Ozdowy K, Frech C, Schönegger A, et al. KRAS and CREBBP mutations: A relapse-linked malicious liaison in childhood high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2015;29: 1656–1667.

## Cartas de consentimiento informado



### Carta de Consentimiento Informado para participar en un proyecto de investigación

#### **Título: "Identificación de nuevos rearrreglos génicos que causan la mayor incidencia y mayor mortalidad en la leucemia linfoblástica aguda de niños mexicanos".**

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

#### **Justificación y propósito del estudio**

Le estamos invitando a participar en este estudio de investigación porque sabemos que su hijo(a) fue recientemente diagnosticado con leucemia linfoblástica aguda. Al igual que a usted, se invitará a participar a padres de 100 niños con esta enfermedad que son atendidos los hospitales públicos que atienden niños con leucemia en la Ciudad de México.

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

#### **Descripción general del estudio y Procedimientos**

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

- a) Usted y su pareja responderán a un cuestionario. El cuestionario incluye preguntas acerca de sus nombres completos, fecha de nacimiento, características de su vivienda, escolaridad, ocupación, ingreso económico y número de hijos, etc.
- b) En segundo lugar, Se tomará a una muestra de la médula ósea a su hijo(a) la cual es parte de los exámenes que por rutina se le realizarán a su hijo(a) para confirmar su diagnóstico; además y si usted así lo autoriza, una cantidad de la muestra se conservará por 5 años para otros estudios con fines de investigación y será manejada, procesada y almacenada bajo la supervisión del Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré.

#### **Riesgos e inconvenientes relacionados con el estudio**

En cuanto a la entrevista, ni usted ni su pareja ni su hijo corren algún riesgo; realizaremos la entrevista en este Hospital y lo haremos en un lugar privado. Nadie más que los investigadores, conocerá la información que usted nos proporcione. En cuanto a la muestra de Médula Ósea, ésta se obtendrá de la misma toma de muestra que se le realice a su hijo para confirmar el diagnóstico de leucemia.

#### **Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio.**

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



SALUD  
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL  
GENERAL  
de MÉXICO



## Confidencialidad

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

## Resultados

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

## Participación o retiro

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

Si en un principio desea participar y posteriormente cambia de opinión, usted puede abandonar el estudio en cualquier momento, es decir puede solicitar que se destruya y no se analice la muestra de su hijo, y puede también solicitar que los datos de la entrevista no se utilicen en la investigación. El abandonar el estudio en el momento que quiera no modificará de ninguna manera los beneficios que usted tiene como paciente de esta Institución, solo tendría que ponerse en contacto con los investigadores principales a los teléfonos o en la dirección que aparecen al final de este documento.

## Personal de contacto para dudas y aclaraciones

Si usted(es) tiene(n) dudas, preguntas o quieren tener contacto con los investigadores principales del presente estudio, ustedes podrán comunicarse con el Dr. Juan Manuel Mejía Aranguré Teléfono 56276900 extensión 21216. Correo electrónico: arangurejm@hotmail.com; juan.mejiaa@imss.gob.mx.

## Declaración de consentimiento informado

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

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



SALUD  
SECRETARÍA DE SALUD



HOSPITAL  
GENERAL  
de MÉXICO



Nombre del Paciente

Nombre del papá o Tutor

Firma del papá o Tutor

Fecha

Nombre de la mamá o Tutora

Firma de la mamá o Tutora

Fecha

**Firma del encargado de obtener el consentimiento informado**

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

Nombre del encargado de obtener el consentimiento informado

Firma del encargado de obtener el CI

Fecha

**Firma de los testigos**

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

Nombre del Testigo 1

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

Nombre del Testigo 2

Parentesco con participante

Firma del Testigo

Fecha

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

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

*Con copia para los padres del participante.*



### Carta de Asentimiento Informado

**Nombre del Estudio: “Identificación de nuevos re-arreglos génicos que causan la mayor incidencia y mayor mortalidad en la leucemia linfoblástica aguda de niños mexicanos”.**

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

Si tú quieres puedes estar en nuestro estudio, el cual se trata de tomarte un poco de médula ósea al momento que tu médico tratante te realice un estudio que se llama aspirado de médula ósea. Después de tomar un poco de tu médula ósea nosotros revisaríamos en un laboratorio los genes que hay en tu médula ósea. De esta forma tú ayudarás a que se conozca más acerca de la leucemia. Debo decirte que ni tú ni tus papás ni nadie más que las personas que hacen este estudio sabrán cómo están tus genes, es decir no se te dará ni a ti ni a tus papás el resultado de este estudio.

Tu(s) papás (papá/mamá) saben que te estamos invitando a que seas parte de este estudio y a ellos también se les preguntará si nos dejarían tomarte un poco de la médula ósea que tu médico tratante te tomará al momento de realizarte el estudio que te comenté y así estudiar tus genes. Si ellos dicen que SI, y tú también dices que SI, tomaremos un poco de tu médula ósea.

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

\_\_\_\_\_  
Nombre del participante

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Fecha