



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

FRECUENCIA DE LA DELECIÓN DE GEN IKZF1 (IKAROS) Y SUS
IMPLICACIONES CLÍNICAS EN PACIENTES CON DIAGNÓSTICO DE
LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE
MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A

Dra. Alejandra Jimena García Velázquez

Directora de tesis:
Dra. Aurora Medina Sansón

Febrero 2015





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.

Dra. Rebeca Gómez Chico Velasco
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico


Dra. Aurora Medina Sansón
Jefa del Departamento de Hemato-Oncología

AGRADECIMIENTOS.

Primero que nada a mi familia, que sin su apoyo incondicional no lo hubiera logrado.

A Toño, por que con tu apoyo y amor me guías en mi camino, por ser mi persona favorita en este mundo.

A mis amigos, que siempre estuvieron conmigo en los momentos buenos, pero sobre todo en los malos, y me enseñaron que la amistad es un motor para la vida diaria.

A los niños, por enseñarme todos los días, por hacerme ver la vida desde otra perspectiva y que la felicidad se puede encontrar en los lugares menos imaginados.

A mis Maestros, a todos los que en algun momento de mi residencia me enseñaron y lo siguen haciendo todos los días.

A Arturo y Selene, por su paciencia, interes y apoyo en la elaboracion de este trabajo.

A la Dra Aurora Medina, a quien admiro y quien me asesoró en todo momento y gracias a ella resultó un éxito este proyecto.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A MAMA, a la que dedico todos mis esfuerzos, gracias por acompañarme durante toda mi residencia y por estar conmigo en cada decisión difícil, en los momentos de alegría y en los de tristeza, y por que se que aunque no estes físicamente aquí, siempre caminaras a mi lado.

INDICE

Introducción.....	1
Marco Teórico.....	2
Epidemiología.....	2
Leucemogénesis.....	2
Cuadro Clínico.....	6
Clasificación y Factores Pronósticos.....	7
Gen IKAROS.....	9
Gen IKAROS y Leucemia.....	10
Antecedentes	11
Objetivos.....	13
Justificación.....	14
Pregunta de Investigación.....	15
Diseño del Estudio.....	16
Criterios de Inclusión y exclusión.....	16
Material y métodos.....	17
Resultados.....	19
Discusión.....	24
Conclusiones.....	26
Limitaciones del estudio.....	26
Referencias Bibliográficas.....	27
Anexo 1.....	29

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Aguda Linfoblástica (LLA) es la neoplasia hematológica mas frecuente en la edad pediátrica, con una incidencia de 3-4 casos por cada 100,000 habitantes menores de quince años. Con los protocolos de tratamiento actuales, la tasa de curación ha alcanzado el 80% en la ultima década.

A pesar de recibir un tratamiento adecuado, hasta un 20% de los pacientes pediátricos con LLA, presentará recaída en algún momento de la evolución de la enfermedad.

El progreso en las técnicas de biología molecular, incluyendo la secuenciación del genoma de células leucémicas, ha permitido la identificación de las mutaciones que ocurren de manera recurrente en pacientes con LLA y que modifican el riesgo de falla al tratamiento, esto a su vez han hecho posible una mejor estratificación de riesgo.

Anormalidades cromosómicas, como hiperdiploidia, hipodiploidia, las translocaciones t(12;21) (ETV6/RUNX1), t(9;22) (BCR-ABL1) y t(1;19) (TCF3-PBX1), además de rearrreglos de MLL (Leucemia de Linaje Mixto), son elementos esenciales en la definición de riesgo de todos los protocolos actuales de tratamiento.

Una de las mutaciones que modifican el pronóstico de los pacientes con LLA es la delección en el gen *Ikaros* (IKZF1), un gen localizado en 7p12, que codifica a una proteína que es un miembro de la familia de factores de transcripción de dedos de zinc, su expresión y regulación, es esencial para el desarrollo de linaje linfoide.

En múltiples estudios se ha identificado que la delección u otras mutaciones de IKZF1 se asocia a no solo a mayor riesgo de recaída, sino a efectos adversos durante el tratamiento, así como resistencia a fármacos.

Las mutaciones somáticas de IKZF1 se han observado en pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica de precursores B, y se ha asociado a un mal pronostico.

El primer estudio que descubrió a la delección *Ikaros* como factor pronóstico adverso independiente en pacientes pediátricos con Leucemia Linfoblástica Aguda, fue publicado en 2007, donde se identificaron aberraciones cromosómicas asociadas al desarrollo de LAL de linaje B. Además de las ya conocidas (PAX5, EBF1, TCF4), se identificó la delección IKZF1 como factor pronóstico adverso.

Se demostró también que el 80% de los pacientes con mutación BCR-ABL1, que es un factor de muy Alto riesgo para recaída, tenían concomitantemente delección IKZF1. Sin embargo, se encontró que la delección se asociaba a un mal pronostico independientemente de t(9;22) (q34;q11).

El propósito de este estudio es identificar la delección de IKZF1 en una cohorte de pacientes pediátricos mexicanos con LLA y correlacionar este hallazgo con la evolución clínica.

MARCO TEÓRICO

Epidemiología

La Leucemia Aguda es el cáncer más común en la edad pediátrica, representa 32% de todas las neoplasias malignas en niños y adolescentes (1), 80 a 85% de los casos corresponden a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).

Cada año en los Estados Unidos se diagnostican de 2,500 a 3,000 casos nuevos de LLA en pacientes pediátricos, con una incidencia de 39.9 casos por millón en menores de 18 años.

En un estudio Europeo que incluyó a 63 países, se observó que la incidencia de Leucemia Aguda en niños y adolescentes incremento en 1.3% por año de 1980 a 1999. En Inglaterra, la incidencia de esta neoplasia aumentó de 33 a 48 casos por cada millón de habitantes en el periodo de 1985 a 1990 (2)

El pico de incidencia de la LLA ocurre entre los 2 y 5 años de edad, afecta más al genero masculino y en los Estados Unidos, este tipo de leucemia es dos veces más frecuente entre la raza blanca, con una incidencia más alta en población hispana. (3)

Leucemogénesis

Aun se desconocen Los eventos patogénicos que llevan al desarrollo de una leucemia aguda. Únicamente el 5% de los casos de LLA están asociados a enfermedades genéticas predisponentes como Síndrome de Down, Síndrome de Bloom, Ataxia Telangiectasia o a la exposición a radiación ionizante.

Existen algunas hipótesis que lo asocian a enfermedades infecciosas, como la Hipótesis de Kinlens, que expone el desarrollo de Leucemia en pacientes pediátricos resulta de la exposición de una población susceptible a infecciones comunes. La hipótesis de Greaves, postula que hay algunos individuos susceptibles con una clona pre-leucemica adquirida de manera prenatal, que posteriormente se exponen a una infección que condiciona al sistema inmune de estos individuos a una respuesta patológica aberrante, con un incremento en la población linfoide.

Aberraciones cromosómicas recurrentes

El análisis citogenético revela anomalías cromosómicas en el 80% de los casos de LAL, incluyendo cambios numéricos como hipodiploidía e hiperdiploidía y estructurales como translocaciones, inversiones o deleciones.

Las translocaciones cromosómicas que activan genes específicos son una característica de las leucemias agudas linfoblásticas. Estudios genéticos han identificado que alteraciones cromosómicas específicas, se manifiestan como un subtipo único de enfermedad, generalmente las translocaciones activan factores de transcripción, que en muchos casos controlan la diferenciación celular.

El 25% de las LLA de precursores B, expresan TEL-AML1 generado por la t(12;21)(p13;q22), la presencia de este transcrito, lleva a un desarrollo de linfocitos B irregular, ya que juega un papel importante en la regulación de las células hematopoyéticas. Sin embargo, esta translocación se asocia a un mejor pronóstico.

La t(9;22) o también llamada cromosoma Philadelphia, causa la fusión de la proteína BCR al receptor ABL de tirosina cinasa, lo que resulta en una actividad incrementada de tirosina

cinasa, esta fusión tiene múltiples implicaciones biológicas, siendo una de las más importantes la activación de vías de señalización RAS (proteína de unión GTP que activa genes involucrados en la diferenciación celular, proliferación y supervivencia).

Hay también una correlación importante entre la naturaleza y frecuencia de las alteraciones cromosómicas y el subtipo de LAL. Por ejemplo, las Leucemias con rearreglos en MLL tienen muy pocas alteraciones genéticas adicionales, lo que sugiere que no se requieren alteraciones adicionales en presencia de rearreglos de MLL para el desarrollo de Leucemia. Por el contrario, las leucemias con mutaciones en ETV6-RUNX1 y BCR-ABL1 tienen más de 8 lesiones por caso. (4)

La mayoría de las leucemias del lactante (60 a 80%) involucran translocaciones en 11q23, este *locus* incluye al gen MLL. La proteína MLL es una histona metiltransferasa que se une en complejos de proteínas que regulan la transcripción de genes a través de la remodelación de cromatina. Los genes blanco de los complejos reguladores de MLL incluyen los genes HOX y a la familia IKZF1.

La **tabla 1** resume algunas de las anomalías cromosómicas identificadas recientemente y sus características

Tabla 1. Alteraciones Genéticas en Leucemia Aguda Linfoblástica de Alto Riesgo.

Alteración	Características
<i>BRC-ABL1</i>	Incrementa en frecuencia en adolescentes y adultos jóvenes, se asocia con mal pronóstico y con deleciones en IKZF1
<i>IKZF1</i>	IKZF1 codifica a IKAROS un factor de transcripción clave en el desarrollo de células linfoides, Las alteraciones incluyen pérdida de la función de genes enteros, deleciones focales o expresión de alelos dominantes negativos, y mutaciones puntuales. Se asocia a mal pronóstico independientemente si esta presente junto con BCR-ABL o no.
<i>CRLF2</i>	Codifica para factor 2 de receptor parecido a citosina. Que es un receptor de linfopoyética. Su re-arreglo se debe a una translocación de el locus que codifica a las cadenas pesadas (IGH@-CRLF2) o deleción focal Xp/Xy del gen. Esto resulta en sobre expresión de CRLF2. 50% de los casos co-expresan como mutación concomitante JAK2. Esta presente en 5 a 7% de los casos de ALL, se asocia a 50% de los casos con síndrome de Down y su significancia pronostica en pacientes No síndrome de Down es variable.
<i>JAK</i>	Se observa en un gran numero de Leucemias Agudas (Células B, Células T y Leucemia Aguda Megacarioblastica) Las mutaciones en JAK1 y JAK3 se observan en ALL células T. Las mutaciones en JAK2 se asocian a mutaciones en CRLF2. Asociada a síndrome de Down en 50% casos.
<i>ETP ALL</i>	Precursor temprano de Células T (ETP) ALL se asocia a mutaciones aberrantes. Tienen Muy mal pronóstico. No se ha identificado una mutación única asociada a este grupo de pacientes, algunos grupos proponen mutaciones en MEF2C como característica común en la mayoría de los pacientes.
<i>CREBBP</i>	Pacientes con LAL y mutaciones en CREBBP se asocia a recaída y falta de respuesta a esteroides, se sugiere que la terapia dirigida para inhibidores para histonadeacetilasa puede utilizarse como tratamiento en este grupo de pacientes con recaída.

Cuadro Clínico

La mayoría de los síntomas que preceden al diagnóstico de LLA son inespecíficos, y semejantes a los que ocurren en muchas enfermedades frecuentes de los niños. (5)

1. Dolor óseo: Se presenta en 21 a 38% de los pacientes con LLA, es causado por infiltración leucémica al periostio o por necrosis aséptica ocasionada por células leucémicas en la medula ósea.
2. Cefalea: Síntoma poco común, involucra menos del 5% de los casos de LLA en presentación inicial, es una manifestación de infiltración a Sistema nervioso Central.
3. Linfadenopatías: Se presenta en 50 a 60% de los pacientes con LLA, es una manifestación de diseminación extramedular, se considera un ganglio linfático anormal si mide más de 1.5cm, sin embargo depende de la localización, por ejemplo, un ganglio epitroclear mayor a 0.5cm es anormal en cualquier contexto.
4. Fiebre: Síntoma más común de presentación en LLA, reportado en 70 a 80% de los casos, se presenta como resultado de la liberación de pirógenos endógenos en respuesta a la presencia de células ajenas a la medula ósea.

Las anomalías en la Biometría Hemática están presentes en la gran mayoría de los pacientes al momento del diagnóstico, estas incluyen anemia, trombocitopenia y leucopenia o leucocitosis, así como presencia de blastos en sangre periférica. La mitad de los niños con LLA tendrán cuenta leucocitaria menor de 10,000/ μ L y 20% tendrán leucocitos mayor a 50,000/ μ L. Estos hallazgos sugieren la necesidad de realizar un aspirado de Medula ósea.

Clasificación

La Leucemia Aguda Linfoblástica puede ser dividida de acuerdo a sus características Morfológicas, inmunofenotípicas y citogenéticas.

Morfología. Históricamente, la LLA se ha clasificado morfológicamente de acuerdo al sistema Franco-Americano-Británico (FAB), que considera el tamaño, características del citoplasma y nucleolos en las células leucémicas observadas en el aspirado de médula ósea. Divide a las LLA en L1, L2 y L3. Esta clasificación no tiene implicaciones pronósticas ni para la elección del tratamiento.

Inmunofenotipo. Clasifica a las células leucémicas con base en su linaje y diferenciación, para lo cual se utiliza un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos nucleares, citoplasmáticos y de superficie llamados CD (*Clusters of differentiation*). De acuerdo con los marcadores identificados, las LLA se clasifican en leucemias de células B (pre-B tempranas o pro-B, pre-B, pre-B transicionales o pre-B tardías y B maduras) y de precursores de células T. El 70% de los casos de LLA son de precursores B y típicamente expresan CD10+, CD19+, CD20+. Mientras que las leucemias de precursores T representan 15 a 17% de los casos, y expresan CD2+, CD3+, CD5+ y CD7+.

Citogenética. Las alteraciones cromosómicas pueden ser numéricas o estructurales. Dentro de las alteraciones numéricas se distinguen las euploidias, en las que el número de cromosomas es múltiplo del número haploide (triploidías o tetraploidías) y las aneuploidías, en las que el número de cromosomas no es múltiplo del número haploide (monosomías, trisomías, tetrasomías, etc) y las alteraciones estructurales pueden ser traslocaciones, deleciones, inversiones, etc. Se debe realizar análisis estándar del cariotipo, complementado por análisis molecular de traslocaciones cromosómicas conocidas, utilizando técnicas de hibridación con fluorescencia (FISH) o RT-PCR. (5)

La Leucemia Aguda Linfoblástica se caracteriza por presentar anomalías cromosómicas recurrentes y por ello el análisis de mutaciones cromosómicas es esencial en el abordaje y estratificación de riesgo en pacientes con LLA. Estas mutaciones incluyen alteraciones en la ploidía y rearrreglos cromosómicos que involucran reguladores hematopoyético u oncogenes y genes tirosina cinasa (ETV6-RUNX1, TCF3-PBX1, BCR-ABL1 y MLL), la identificación de estas alteraciones ha permitido establecer una estratificación de riesgo más adecuada y por lo tanto un diagnóstico más preciso. Sin embargo, hay alteraciones genéticas que no son evidentes con los análisis convencionales y que también influyen en la leucemogénesis y el pronóstico de los pacientes.

Al contrario de los tumores sólidos, en la Leucemia Aguda Linfoblástica es poco común encontrar inestabilidad cromosómica, con un promedio de 6 a 8 alteraciones de copias de DNA (alteraciones en número de copias, deleciones o ganancias cromosómicas) por caso. La mayoría de las deleciones son focales (menos de 1Mb en tamaño) y generalmente involucran únicamente un gen.

Factores Pronósticos

Los protocolos actuales de tratamiento han logrado más de 80% de supervivencia en LLA, en gran parte por la correcta estratificación en grupos de riesgo, basada en los factores pronósticos, con e objetivo de reducir toxicidad de tratamiento en pacientes de bajo riesgo, y dar una terapia más intensa a los pacientes de alto riesgo. (6)

Ciertos hallazgos clínicos y de laboratorio se han correlacionado con el pronóstico:

1. Edad. La edad correlaciona con el pronóstico, los lactantes y adolescentes tienen peor pronóstico que los pacientes entre 1 y 10 años de edad, esto es explicado por la alta frecuencia de alteraciones genéticas más favorables en los pacientes entre 1 y 10 años de edad, como hiperdiploidia (51 a 65 cromosomas) y TEL/AML1. La edad menor a 1 año se asocia con hiperleucocitosis, y rearrreglos MLL en más del 80% de los pacientes, lo que empobrece el pronóstico.
2. Cuenta Leucocitaria. Es un factor independiente de pronóstico, una cuenta leucocitaria más de 50,000/ μ L se ha relacionado con pronóstico menos favorable.
3. Citogenética. Muchas anomalías cromosómicas recurrentes tienen significancia pronóstica en LLA. La hiperdiploidia alta (51 a 65 cromosomas o índice de ADN mayor a 1.16) y la fusión TEL/AML1 se asocian a pronóstico favorable. Estas dos alteraciones son más comunes en niños entre 1 y 10 años y LLA de precursores B. El pronóstico más favorable se asocia a trisomías de cromosomas 4, 10 y 17. Las alteraciones cromosómicas asociadas a pronóstico adverso son hipodiploidia (Menos de 44-45 cromosomas), rearrreglos en MLL en el cromosoma 11q23 (especialmente t(4;11) y el cromosoma Philadelphia t(9;22).
4. Inmunofenotipo. Aproximadamente 80 a 85% de todas las leucemias Agudas Linfoblásticas en niños son de precursores B y 10 a 15% de células T. Las características clínicas de presentación de LLA-T le confiere mayor riesgo. La co-expresión de antígenos mieloides se ve en el 10% de los casos, actualmente no se considera un factor de riesgo independiente.
5. SNC positivo. El 10 al 20% de los pacientes se presentan con linfoblastos detectables en líquido cefalorraquídeo al diagnóstico, eso se asocia con LLA-T y con leucemia en lactantes. Esto se correlaciona con un pronóstico más pobre, ya que se asocia a una mayor tasa de recaída en médula ósea y en SNC.
6. Respuesta morfológica temprana a quimioterapia. La rapidez con la que un paciente responde al tratamiento inicial con quimioterapia es un factor pronóstico importante, fue establecido por los estudios realizados por el BFM y se basa en la cuenta total de blastos en sangre periférica después de 7 días de tratamiento con esteroide.

La persistencia de linfoblastos después de 7 o 14 días de el inicio de la inducción a la remisión también correlaciona con pronóstico a largo plazo.

7. Enfermedad Mínima Residual (EMR). Es la medición más sensible de respuesta a tratamiento que hay en la actualidad, detecta niveles submicroscópicos de la enfermedad empleando métodos basados en PCR (Reacción en cadena de polimerasa) o por citometría de flujo. Estas técnicas tienen la capacidad de identificar una célula leucémica hasta en 100,000 células normales. Múltiples estudios han identificado que la medición de EMR al final de la inducción a la remisión es un importante predictor de pronóstico y actualmente es el único factor pronóstico común en todos los grupos internacionales.

Tratamiento y Resultados actuales

El tratamiento de LLA consiste en la administración de un régimen de quimioterapia que se divide en varias fases: inducción a la remisión, consolidación y mantenimiento e incluye terapia dirigida al sistema nervioso central. La mayoría de los protocolos tienen una duración de dos a tres años, pero el régimen específico varía de acuerdo a la estratificación de riesgo establecida al inicio del tratamiento y en función de la respuesta.

1. Inducción a la remisión: Es la etapa inicial del tratamiento y tiene como objetivo reducir en por menos 3 logaritmos la carga leucémica. Al final de esta fase, más del 90% de los pacientes alcanzan remisión de la enfermedad. Incluye la administración semanal de Vincristina por 4 dosis, corticoesteroide diario (dexametasona, prednisona o prednisolona), Asparaginasa por 6 a 12 dosis y un cuarto agente (antraciclina) puede incluirse en la inducción a la remisión particularmente en pacientes de alto riesgo. Algunos protocolos intensifican esta fase con uno o más fármacos adicionales.
2. Terapia dirigida a SNC: El uso rutinario de terapia dirigida a la prevención de Leucemia en SNC ha sido uno de los mayores avances terapéuticos en el tratamiento de la LLA. Inicia durante la inducción y continúa durante parte del mantenimiento. Esta incluye la aplicación quimioterapia intratecal con tres fármacos y el uso de Metotrexate u otros antimetabolitos a altas dosis por vía intravenosa.
3. Consolidación: Inicia al terminar la etapa de inducción, siempre y cuando se documente la remisión. Su objetivo es reducir la clona leucémica en médula ósea a pesar de haber documentado remisión, para ello se utilizan medicamentos diferentes a los utilizados en la inducción a la remisión, con distintos mecanismos de acción, con el objetivo de maximizar la sinergia entre fármacos y evitar el desarrollo de resistencia.
4. Mantenimiento: Esta etapa se caracteriza por de intensidad dirigida a riesgo, de manera que en los pacientes de bajo riesgo la terapia de mantenimiento se basa en antimetabolitos, mientras que en los esquemas de alto riesgo se incluyen combinaciones de fármacos de manera rotacional. Tiene el objetivo de erradicar la leucemia residual.

El éxito actual del tratamiento para LLA y por lo que se ha podido alcanzar supervivencia global de hasta 85% se debe en gran parte a la correcta asignación de riesgo, lo que permite dar una terapia dirigida. La **tabla 2** resume el tratamiento recomendado de acuerdo a el grupo de riesgo.

Tabla 2. Asignación de Riesgo y terapia sugerida para LLA en pediatría, (6)

Grupo de Riesgo	Características	Porcentaje	Terapia Recomendada	Super-vivencia a 5 años
Bajo	Leucocitos < 50,000 μ L edad 1-10 años, EMR negativa al día 8 y 29. Trisomías 4,10 o 17 ETV-RUNX1	15%	Terapia basada en antimetabolitos	Más de 95%
habitual	EMR positiva día 8 y negativa día 29. Sin traslaciones de riesgo	36%	Terapia con antimetabolitos intensificada	90 a 95%
Alto	Leucocitos > 50,000 o edad < 1 año y > 10 años SNC positivo al diagnóstico infiltración testicular	25%	Quimioterapia intensiva con múltiples fármacos	88%
Muy Alto	EMR positiva al día 29 Falla a la inducción Menor de un año, rearrreglos MLL	24%	Considerar TCPH en la primera remisión.	Menos de 80%
Grupo especial	t(9;22) positiva		Quimioterapia intensiva que incluya un inhibidor de tirosina cinasa	Menos de 70%

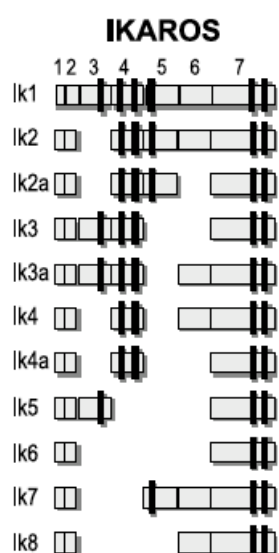
Gen IKAROS

El gen *IKAROS* (*IKZF1*), está localizado el cromosoma 7p12 y codifica para el factor de transcripción Ikaros, su estructura se muestra en la figura 1.

Esta proteína fue descubierta por K. Georgopoulos *et al* en 1991, y atrajo la atención de la comunidad científica debido al papel que juega en la hematopoyesis, en la función inmune y como supresor de tumores.

Estructura Molecular del Gen y las Proteínas Ikaros

La estructura del gen es compleja, involucra 8 exones que codifican a 11 variantes. (figura 1). Cinco de ellas se traducen a proteínas que son activadores de transcripción (1, 2, 2a, 3, 3a) y seis resultan en versiones de *IKAROS* dominantes negativas (4, 4a, 5, 6, 7, 8). Los exones 4 a 6 de *IKAROS*, codifican 4 dedos de zinc, de los cuales 3 son necesarios para la unión al DNA. El exón 8 codifica dos dedos de zinc adicionales. (7)



Isoformas y Dominios Funcionales de IKAROS

Las deleciones del gen *IKAROS* se pueden expresar de diferentes maneras (isoformas) y se denotan con Ik's, las más estudiadas son Ik1, Ik2, Ik3, Ik4, Ik5 e Ik6, cada una con diferentes repercusiones clínicas. Se ha demostrado que la deleción Ik6 es la que tiene mayores implicaciones pronósticas, ya que pierde casi la totalidad de sus dominios. (Figura1)

Fig 1. Isoformas de Ikaros. Ik1 representa la estructura normal del gen y las isoformas Ik2 a 8 tienen pérdida de algunos dominios. En la figura se puede observar que la isoforma Ik6 es la que presenta mayor pérdida de material genético. (8)

La proteína Ikaros contiene varios dominios funcionales. (Fig. 2)

A. Dominio de Unión a Proteínas

El dominio N-terminal contiene un sitio de unión al ADN que consiste en 3 dedos de zinc con una estructura típica de C_2H_2 .

B. Dominio de Dimerización

El dominio C-terminal contiene dos dedos de zinc que son esenciales para la interacción con otras isoformas de la familia ikaros. Este dominio permite la formación de diversas proteínas entre la misma familia de ikaros y sus isoformas.

C. Dominio de Activación Bipartita

Este dominio se encuentra adyacente al dedo de zinc C-terminal, la presencia de este dominio estimula los niveles habituales de transcripción génica.

D. Dominio de activación de ikaros Humano

Es un dominio de 20 aminoácidos que se encuentra adyacente al dedo de zinc N-terminal, regula la unión al ADN y funciona como factor de transcripción en los genes blanco de ikaros.

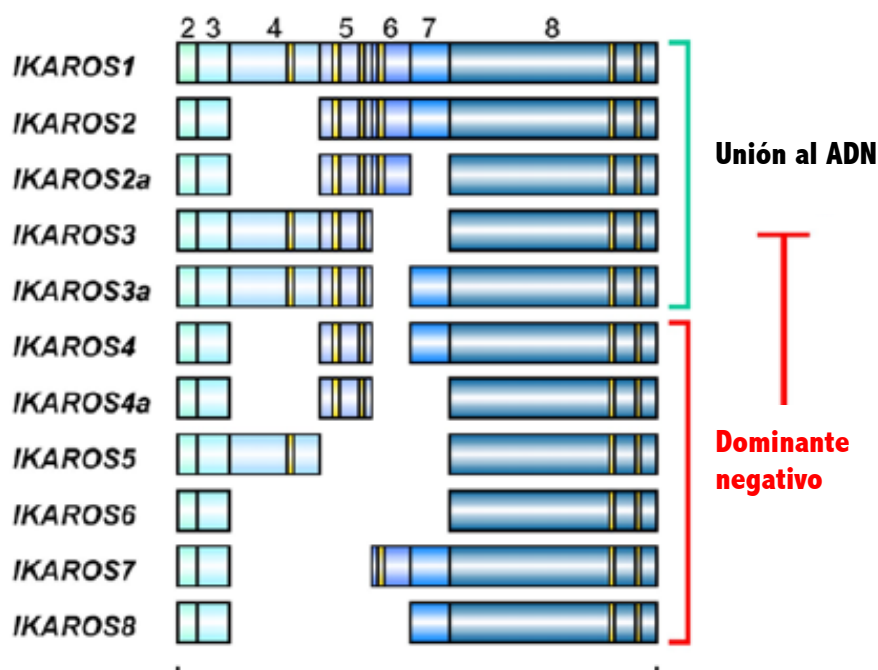


Figura 2.
El gen IKZF1 humano, esta compuesto por 8 exones.

Funciones de la proteína Ikaros

Mecanismo de actividad como supresor de tumores.

El mecanismo por el cual ikaros suprime la malformación maligna y el desarrollo de LLA aun es desconocido, El descubrimiento de genes blanco de ikaros ha dado informaron de su mecanismo de acción como tumor supresor. Los hallazgos se resumen en los siguientes puntos:

❖ Regulación positiva para Células B

La expresión de varios genes que son esenciales para la diferenciación de células B normales esta directamente regulada por Ikaros.

Ikaros se une al promotor Igl1 que regula la expresión de genes en los estadios precursores de Células B tempranas. El gen Igl1 codifica a Lambda 5, un componente del receptor para células pre-B, que es esencial para la diferenciación de células B. Por lo tanto, Ikaros controla un paso crítico en la diferenciación temprana de células B

❖ Ikaros se une al promotor rag1, y regula positivamente la transcripción de *rag1* y *rag2*.

La regulación a la alta de la expresión de RAG1 y RAG2, además de el control mediado por Ikaros se ha detectado en el locus de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, por lo tanto, Ikaros controla otro paso esencial en la diferenciación de células B maduras. (9)

❖ Regulación Positiva de diferenciación de Células T

Ikaros ha demostrado regular múltiples genes necesarios para la diferenciación de células T.

La regulación de Tdt (deoxinucleotido transferasa terminal) durante la diferenciación del timocitos por Ikaros se ha estudiado en múltiples ocasiones. Ikaros se une al terminal D del promotor *dntf*, esta región contiene un sitio de unión que interacciona con Elf-1, un miembro de la familia de factores de transcripción.

Regulación negativa de la proliferación Celular

La regulación negativa de la proliferación de células Pre-B por Ikaros se demostró por Ma et al (10). El mecanismo de inhibición de la proliferación celular involucra la unión directa de Ikaros al promotor del gen c-Myc y la inducción de la expresión de p27, y una regulación a la baja de la ciclina D3.

También se ha demostrado que Ikaros puede tener una regulación negativa en el ciclo celular evitando la progresión de G1/S, sugiriendo que tiene un papel en el punto de control de G1/S del ciclo celular.

Regulación de la apoptosis

La pérdida de la función de Ikaros se asocia con un incremento de la expresión de Bcl-XL, lo que sugiere que tiene un efecto de regulación a la baja. Esto lleva a la hipótesis de que Ikaros regula la apoptosis, y que la disminución de la actividad de Ikaros en Leucemia se relaciona con resistencia a la quimioterapia.

Supresión de Tumores

La fosforilación durante el ciclo celular de Ikaros regula la habilidad de unión del DNA durante la mitosis, en las células en división, Ikaros es un producto directo de la cinasa CK2. La fosforilación de Ikaros por CK2 regula la localización subcelular de Ikaros en la heterocromatina pericentrométrica, y su afinidad para unión de DNA, así como la capacidad de Ikaros para regular el ciclo celular en G1/S

Otras Funciones

También se ha encontrado que IKZF1 esta involucrado en la regulación del eje hipotalámico pituitario adrenal, que controla las reacciones del cuerpo al estrés y coordina reacciones inmunitarias e inflamatorias. (11)

Ikaros se localiza abundantemente en el núcleo, específicamente en la heterocromatina

pericentromérica. Se ha demostrado que la proteína Ikaros se une al ADN y regula directamente la expresión de los genes blanco, se propone que esto lo realiza a través de remodelación de la cromatina.

Ikaros interacciona con *Brg-1*, una subunidad catalítica de del complejo remodelador de cromatina SWI/SNF (Switch/Sucrose non Fermentable), que funciona como un activador de la expresión de genes. Se ha sugerido que Ikaros funciona como activador de transcripción por reclutamiento de SWI/SNF. (12)

Ikaros y Leucemia Aguda Linfoblástica de precursores B

Desde su descubrimiento se identificó el papel de Ikaros como un regulador de la diferenciación de linfocitos y como gen supresor de tumores en ratones.

Los primeros estudios en humanos se concentraron en determinar si Ikaros funciona como un tumor supresor en LLA y en los últimos años se ha establecido el papel de este gen como uno de los supresores de tumor con mayor relevancia pronóstica en LLA (13).

Estudios posteriores identificaron el papel pronóstico de la isoforma Ik1 de este gen en la leucemia Aguda Linfoblástica de precursores B en la edad pediátrica (14). Los hallazgos más importantes fueron los siguientes:

1. Una pequeña disminución en la actividad de Ikaros (p.ej. haploinsuficiencia) es suficiente para contribuir a la leucemogénesis.
2. La delección de un solo alelo de *ikzf1* se detectó en 15% de los casos de pacientes pediátricos con LLA pre-B. Cada una de estas mutaciones resulta en una haploinsuficiencia del gen *ikzf1*, junto con la expresión de una forma funcionalmente inactiva de Ikaros.
3. La delección de un alelo de *ikzf1* se detectó en el 80% de LLA con mutación BCR/ABL1 y en 66% de los pacientes con Leucemia mieloide crónica en fase blástica.
4. La delección de *ikzf1* se identificó en un tercio de los casos de pacientes con LMC BCR/ABL negativo, la haploinsuficiencia de *ikzf1* se asocia a un riesgo hasta 3 veces mayor de recaída.
5. Las variaciones genéticas de *ikzf1* se asocian con incremento en el riesgo de recaída y mal pronóstico en LLA en pediatría
6. En 145 de los pacientes con LLA de alto riesgo que portaban delecciones en *ikzf1*, se encontró una sobre expresión del gen *CRLF2*, que a su vez se asocia con mutaciones en el gen *JAK*.
7. En modelos animales se ha demostrado que la expresión dominante del alelo negativo de *ikzf1* en células CD34+ resulta en una alteración en la diferenciación de linfocitos y favorece el desarrollo de clones anormales, por lo tanto, de leucemia linfoblástica aguda.

Ikaros y Leucemia Aguda Linfoblástica de precursores T

Los estudios iniciales de Ikaros en LLA de células T arrojaron datos no concluyentes. El primero de ellos demostró que 18 pacientes con inmunofenotipo T expresaban el dominio negativo de la isoforma 1 (por Western Blot y RT-PCR), sugiriendo una fuerte correlación entre este gen y el desarrollo de LLA de células T. (15). Sin embargo, estudios posteriores no encontraron pudieron reproducir este hallazgo.

La delección de una copia de Ikaros se detecta en 5% de los pacientes con LLA-T, una relación menos frecuente que LAL pre-B (15%) y LLA pre-B BCR/ABL positivo (80%). Aún es necesario establecer el papel pronóstico de Ikaros en LLA-T.

ANTECEDENTES

El primer estudio que demostró la importancia de IKZF1 en LLA pediátrica fue publicado en 2007 por Mullighan (16). Se llevó a cabo en células leucémicas de 242 pacientes con LLA en las que se realizaron SNP's (Polimorfismos de un solo nucleótido, por sus siglas en inglés) de alta resolución y secuenciación genómica de ADN. Este análisis identificó diversas mutaciones en genes que codifican para los principales reguladores del desarrollo de linfocitos B, específicamente en PAX5, E2A, EBF1, LEF1, IKZF1 e IKZF3.

Estos hallazgos fueron validados por un segundo estudio que involucro a 40 pacientes (17). Se confirmaron mutaciones en los mismos genes, identificando bloqueo en las proteínas necesarias para la diferenciación de los linfocitos B en pacientes con Leucemia. Lo que resultaba en células más inmaduras, y por lo tanto, un peor pronóstico.

Lacobucci y colaboradores, estudiaron una serie de 106 pacientes con diagnóstico de LLA de muy alto riesgo por Cromosoma Philadelphia positivo. De todos los pacientes previamente estudiados con BCR/ABL positivo, el 80% se identificaron con deleciones de IKZF1. Cuarenta y cuatro de estos pacientes presentaron una deleción en los exones 4 a 7 de *IKAROS*, lo que resultaba en la expresión de una variante dominante negativa. Los otros 19 pacientes, presentaron una deleción en exón 2. Aún no se conocen las implicaciones clínicas o pronósticas de esta mutación.

Múltiples estudios han correlacionado la deleción IKZF1 con mal pronóstico en pacientes con LLA de precursores B. Petra Dorge y colaboradores, estudiaron la deleción en pacientes tratados según el protocolo BFM 2000 (Berlin-Frankfurt-Münster Study Group), en 694 pacientes. Se detectó la alteración en 84 casos, que corresponde al 12% de la muestra. Veintinueve de estos pacientes involucraron el gen completo, mientras que 55 fueron deleciones focales. La deleción de IKZF1 se asoció con mayor cuenta leucocitaria al diagnóstico, inmunofenotipo de precursores B y mayor incidencia de rearreglos de BCR/ABL. (18)

Los pacientes con la deleción IKZF1 tuvieron una supervivencia libre de enfermedad a 5 años menor que los que no presentaron la deleción. (0.69 vs 0.85 , $p < 0.001$), principalmente por una alta incidencia de recaídas en el grupo que portaba la deleción. (19)

Desde la descripción de alteraciones en la expresión de CRLF2 en LLA de precursores B en 2009, el Children's Oncology Group (COG) ha realizado diversos estudios para correlacionar diversas alteraciones moleculares con el pronóstico. Se encontró que mutaciones en IKZF1, JAK y el receptor de Interleucina 7 (IL7R), se asociaban con una presentación aberrante de CRLF2. EL COG en sus protocolos P9905 y P9906 (20), estudió a 1061 pacientes clasificados como de Alto Riesgo o de Riesgo estándar de acuerdo a los niveles de Enfermedad Mínima Residual al final de la inducción, de los 49 casos en que se identificaron mutaciones en CRLF2, 14 presentaron deleción de *IKZF1* (28%).

En 2009, Charles Mullighan y cols., realizaron el primer estudio en el que se correlacionaron las deleciones en *IKZF1* con el pronóstico. (21) Se estudiaron 221 niños con LLA de precursores B, de alto riesgo, analizando SNP's, el perfil transcripcional y la secuenciación de las muestras de médula ósea obtenidas al diagnóstico; excluyendo a los pacientes con muy alto riesgo (BCR/ABL positivo, hipodiploidia y lactantes). Se encontraron más de 50 anomalías que involucran genes reguladores de linfocitos B, PAX5 se encontró en 31% pacientes, IKZF1 en 28%, ETV6 en 12% y BTG1 en 10%. La deleción IKZF1 se encontró en 16 de los 221 pacientes; adicionalmente se encontraron deleciones parciales que involucraban los exones 3 y 6 en 47 pacientes, lo que resulta en la expresión de una forma negativa dominante de *IKAROS*, llamada ik6, que no tiene ningún dedo de zinc. De todas las

mutaciones estudiadas, únicamente IKAROS tuvo un impacto en la supervivencia global. La delección en IKZF1 se asoció significativamente a incremento en la tasa de de recaídas (55.2 vs 14.3) y de efectos adversos durante el tratamiento (69.2 vs 30.4), con lo que se determinó que esta delección de IKZF1 representa un factor pronóstico independiente de la edad, cuenta leucocitaria o presencia de Cromosoma Philadelphia para pacientes con LLA-B.

La delección en IKZF1 también se correlacionó con el pronóstico en una cohorte de 160 pacientes en la que se midió la enfermedad Mínima Residual, encontrando un nivel alto de EMR en este grupo de pacientes. Una EMR de más de 1% al día 19 se detectó en 19 pacientes con delección de IKZF1 (61%) comparado con 9.3% de los pacientes que no presentan la mutación. Esta asociación también se observó al medir EMR al día 46 (33% vs 0.07%). (22)

Un estudio realizado en los países bajos en pacientes con Síndrome de Down (23), reporta 88 casos en quienes se estudiaron mutaciones en genes que involucran la diferenciación de linaje B. En total, 50% de los pacientes mostraron alguna alteración en alguno de estos genes: PAX5 (12%), VPRED1 (18%) e IKZF1 (35%). Se encontró mutación de JACK2 en el 15% de los casos, y rearrreglos genómicos de CRL2 en 62%. El pronóstico fue significativamente más pobre en los pacientes con delección de IKZF1. Con una supervivencia global a 6 años de 45% vs 95% ($p=0.002$). La delección IKZF1 fue un factor pronóstico independiente.

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar en una cohorte incipiente de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, la frecuencia de la delección en IKZF1 (ikaros) y sus implicaciones clínicas.

Objetivos específicos:

- 1) Comparar la tasa de remisiones entre los pacientes que portan delecciones de ikaros y los que no presentan mutaciones en este gen.
- 2) Comparar la tasa de Recaídas tempranas entre los pacientes que portan delecciones de ikaros y los que no presentan mutaciones en este gen
- 3) Comparar la tasa de toxicidad y complicaciones infecciosas entre los pacientes que portan delecciones de ikaros y los que no presentan mutaciones en este gen

Objetivo Secundario:

- 1) Implementar la técnica para la identificación de mutaciones del gen IKAROS en el laboratorio de Oncología para emplearla en lo futuro como un recurso diagnóstico para los pacientes con LLA.

JUSTIFICACIÓN

El rol de la delección de *IKZF1* en el pronóstico de la leucemia Aguda Linfoblástica en niños ha sido estudiado en los últimos 10 años en el contexto internacional.

Hasta hoy, hay POCOS o NULOS estudios del impacto de dicha delección en la población pediátrica mexicana y de su implicación en el pronóstico y respuesta a tratamiento.

La población latinoamericana tiene una mayor incidencia de Leucemia Linfoblástica Aguda comparada con la población de países en los que predomina la población caucásica, de igual manera, la proporción de pacientes con LLA de alto riesgo parece ser mayor en población de origen hispano (24).

Lo anterior denota la relevancia de investigar factores potencialmente implicados en estas diferencias. Hasta el momento se desconoce si también hay una diferencia en la frecuencia de mutaciones en *IKZF1* entre la población mexicana y otras poblaciones.

El HIMFG, siendo un centro de referencia para el tratamiento de LLA en el país, es un lugar ideal para estudiar dicha alteración.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es la frecuencia de la delección del gen *IKAROS* (IKZF1) en los pacientes pediátricos con Leucemia Aguda Linfoblástica del Hospital Infantil de México Federico Gómez y cuales son sus implicaciones clínicas?

DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio: Cohorte

Direccionalidad: Prospectivo

Fuente de obtención de datos: Retrolectivo

Temporalidad: longitudinal

Criterios de Inclusión:

1. Todos los pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Aguda Linfoblástica corroborada por examen morfológico e inmunofenotipo, que ingresen al Hospital Infantil de México Federico Gómez a partir de Junio 2013
2. Ningún tratamiento previo
3. Disponer de muestra suficiente de medula ósea antes del inicio del tratamiento, para determinar deleciones en el gen *IKAROS* por métodos de biología molecular.

Criterios de Exclusión:

1. Imposibilidad para obtener los datos del expediente clínico (extraviado o incompleto)
2. Leucemias de células B maduras (L3)

Criterios de Eliminación:

1. Abandono temprano de tratamiento
2. Cambio en el diagnóstico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diagnóstico de LLA: en todos los casos se obtuvo una muestra de médula ósea para el análisis citomorfológico (las LLA se clasifican en L1 y L2) y para la definición del inmunofenotipo.
2. Asignación de riesgo con base en los factores pronósticos ya conocidos que se muestran en la tabla 3.

Tabla3. Asignación de Riesgo. (Guías Clínicas del Servicio de Oncología del HIMFG)

Riesgo	Bajo	Alto	Muy Alto
Edad	Mayor de un año Menor de 10 años	Menor de un año Mayor de 10 años	
Respuesta a esteroide	Ausencia de blastos en SP el día 7	Presencia de blastos en SP al día 7	
Respuesta a la Inducción	Respondedor temprano		Respondedor Lento
Cuenta de Leucocitos	Menos de 50,000	Más de 50,000	
Inmunofenotipo	Pro B, Pre B y Pre B transicional	T	
Citogenética	Hiperdiploidia t(12;21)	t(1;19) t(4;11) en mayores de 1 año	t(9;22) t(4;11) u otro arreglo MLL en menores de 1 año
Sistema nervioso Central al Diagnóstico	SNC 1	SNC 2 o SNC 3	
Enfermedad Extramedular	Ausente	SNC, testicular o Mediastinal	

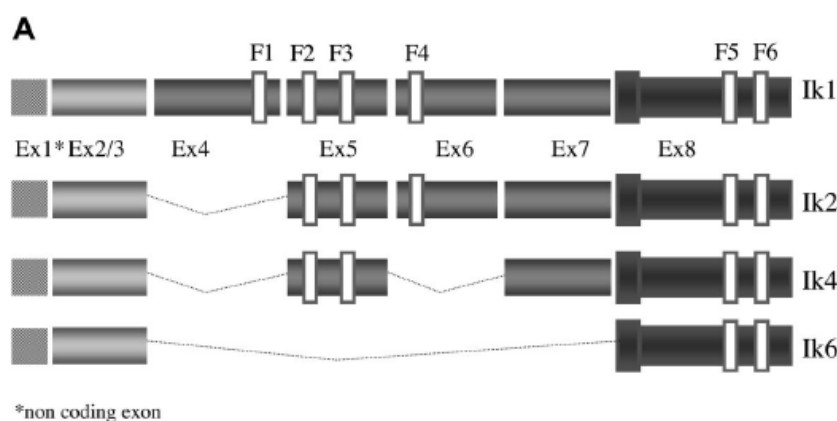
3. **Material biológico para la identificación de deleciones del gen *IKAROS*:** se utilizó una fracción de la muestra de médula ósea obtenida al diagnóstico. Los pacientes no recibieron hemotransfusiones ni fármacos antes de la toma de la muestra.
4. **Análisis de RT-PCR (reacción en cadena de polimerasa)**
Se extrajo RNA de los leucocitos de médula ósea usando el KitQIAamp® RNA Blood mini Kit, (Dusseldorf, Alemania) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. (Quiagen). Posteriormente, El cDNA fue sintetizado a partir de 3 µg de RNA usando el KitTaq® RT PCR AMV LongAmp (New England Biolabs inc.) (Beverly, MA USA). Se realizó la amplificación del transcrito de *IKAROS* usando los primers específicos para los exones 2 y 8 del gen *IKZF1* (ver tabla 4), usando 3 µL de cDNA, dNTP 2.5mM, buffer 1X (20 mM Tris HCL, 2 mM MgSO₄) y 0.5 UI de Taq ADN polimerasa (New England Biolabs).

Tabla 4. Secuencia de iniciadores empleados para la amplificación del gen IKZF1(25)

Iniciador	Secuencia	Peso molecular
Ik1	5'CAC ATA ACC TGA GGA CCA TG3'	945 pb
Ik2	5' AGG GCT TTA GCT CAT GTG GA3'	684 pb
Ik3	5' ATG GAT GCT GAT GA _g GGT CAA GAC3'	558 pb
Ik6	5' GAT GGC TTG GTC CAT CAC GTG G 3'	255 pb

Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización inicial a 95 grados por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos a 95 grados por 30 segundos, 57 grados por 30 segundos y 72 grados por 90 segundos y extensión final a 72 grados por 7 minutos.

Para incrementar la sensibilidad y una mejor caracterización de las isoformas específicas de *IKAROS*, EL cDNA se amplificó con los oligos Ik3 e Ik4. Se usaron las siguientes condiciones de amplificación:



Desnaturalización inicial a 95° por 5 minutos, posteriormente 35 ciclos a 95° por 30 segundos, 62° por 30 segundos y 72° por 30 segundos y extensión final a 72° por 7 minutos.

La integridad del RNA fue confirmada por la amplificación de PCR de GAPDH mRNA, que se expresa constitutivamente en células hematopoyéticas humanas.

Todos los productos de RT PCR fueron visualizados mediante luz ultravioleta en un gel de agarosa al 2% tenido con bromuro de etidio.

Cada isoforma de Ikaros presenta un tamaño específico, que se menciona en la tabla 4

Plan de Análisis estadístico

Se utilizará estadística descriptiva empleando frecuencias y porcentajes de las variables, medias y medianas. Se evaluará la relación entre los casos positivos y el riesgo asignado, así como una descripción y análisis de cada caso positivo.

RESULTADOS

En el periodo comprendido de junio del 2013 a mayo del 2014, se recibieron en el HIMFG un total de 55 pacientes con el diagnóstico de LLA, de ellos 17 fueron eliminados por no cumplir los criterios de inclusión, en 11 pacientes, no fue posible obtener muestra suficiente de médula ósea para realizar el estudio y en 1 paciente se hizo diagnóstico posterior de Leucemia Mieloide, por lo que fue eliminado. Un total del 43 pacientes fueron elegibles para el estudio.

Características demográficas

Veintiún pacientes fueron de género femenino (48.8%) y 22 masculino (51.1%). La mediana de edad al diagnóstico fue de 66 meses, que corresponde a 5.5 años (rango 3 a 180 meses), con media de 79.7 meses; 4 pacientes (9.3%) se diagnosticaron antes de los 12 meses de edad, 27 pacientes (62.7%) entre 1 y 10 años y 12 (27.9%) fueron mayores de 10 años de edad al diagnóstico .

Hallazgos de laboratorio.

Con respecto a la biometría hemática inicial, 9 pacientes (20.9%) tenían más de 100,000 leucocitos, 3 (6.1%) entre 50,000 y 100,000 y 31 pacientes (72%) menos de 50,000 leucocitos. Al ingreso, 28 pacientes (65.5%) tenían menos de 50,000 plaquetas y 15 (34.5%) más de 50,000 plaquetas. En cuanto a la hemoglobina, 7 pacientes (16.2%) debutaron con anemia grave (Hb menor a 5g/dL), 33 (76.7%) con Hb entre 5 y 12 g/dL y 3 (6.9%) con Hb en rango normal.

El líquido cefalorraquídeo fue positivo en 8 pacientes al diagnóstico (18.6%), uno de ellos tenía afección en el VI pare craneal además del LCR +.

Por morfología 20 pacientes fueron clasificados con L1 y 13 como L2.

De acuerdo al inmunofenotipo, 40 pacientes fueron catalogados como de estirpe B (Pro-B, Pre-B y B tardío) lo que corresponde al 93.1% y 3 pacientes con inmunofenotipo T (6.9%).

Hallazgos moleculares

Mediante el estudio citogenético y molecular, identificamos traslocaciones en 6 casos (14%), de los cuales 4 (9.3%) tuvieron t(9;22) y 2 rearrreglos del cromosoma 11, un caso con t(4;11) y otro con t(6;11). En 37 pacientes (86%) no se identificaron translocaciones.

Respuesta a tratamiento

Seis pacientes (13.9%) mostraron mala respuesta a dexametasona y 37 (86.1%) tuvieron buena respuesta.

En cuanto a la respuesta morfológica en médula ósea, 12 pacientes (27.9%) presentaron remisión al día 7 de la inducción, 26 pacientes (60%) al día 14 de inducción y 3 (6.9%) al día 21.

Asignación de Riesgo

Veinte pacientes se catalogaron como de Alto Riesgo (46.5%), 16 como de riesgo habitual (37.2%) y 5 como de Muy Alto Riesgo (11.6%).

Deleción de IKZF1

En los 43 casos analizados, identificamos 3 casos (7%) con deleción del gen *IKAROS*, 2 con la isoforma Ik6 y uno con Ik2.

A continuación se resumen las características de los tres pacientes con delección de *IKAROS*:

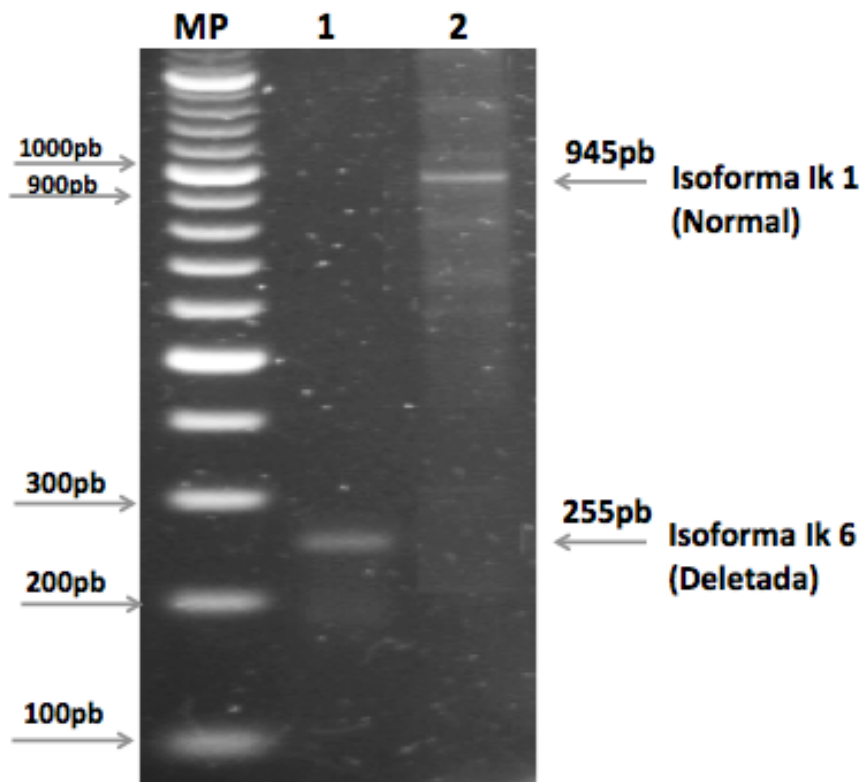
Caso 1:

Tipo de Delección: IK6

Paciente de 3 años de edad con historia de síndrome anémico y síndrome febril 3 semanas previas al ingreso. Biometría hemática inicial con Hb 7.7, leucocitos 3,600 y 8,000 plaquetas. Aspirado de médula ósea con 97% de blastos morfología L1, líquido cefalorraquídeo negativo al diagnóstico, estudio molecular negativo para translocaciones e inmunofenotipo de precursores B.

Buena respuesta a los 7 días de esteroide. Remisión morfológica al día 14. Se le asigna riesgo habitual. Actualmente paciente en mantenimiento en semana 14

El hallazgo de la delección en IK6, obligó a la reclasificarlo como de alto riesgo.



MP = Marcador de peso molecular de 100 pb

1= Paciente

2= Control gen normal

Caso 1

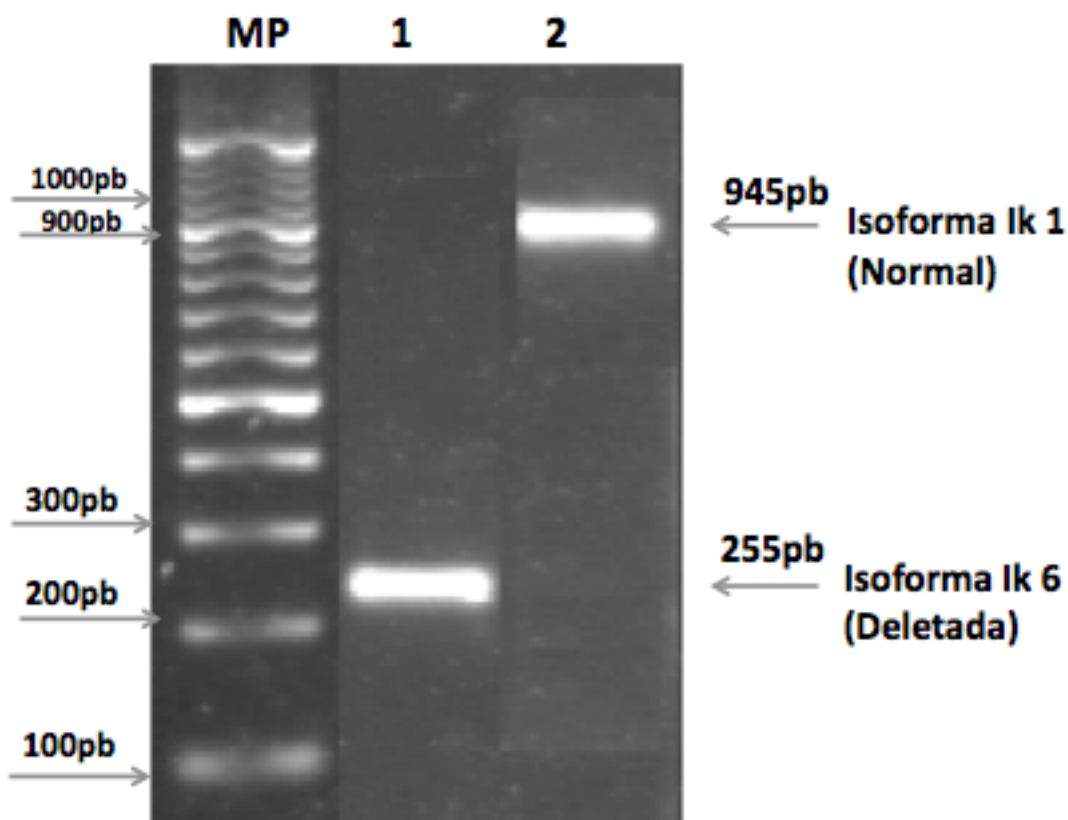
Caso 2:

Tipo de Delección: IK6

Masculino de 8 años de edad con historia de dos semanas de evolución con dolor óseo, fiebre y palidez, a su ingreso con Hb de 6.2, leucocitos 189,000 y plaquetas de 11,000. Durante su ingreso presenta síndrome de lisis tumoral. Se realiza aspirado de médula ósea, con 92% de blastos morfología L2. Citogenética positiva para t(9;22), inmunofenotipo de precursores B, liquido cefalorraquídeo negativo al diagnóstico.

Mala respuesta a esteroide (6,200 blastos en sangre periférica a los 7 días de tratamiento con dexametasona). Remisión morfológica al día 14 de la inducción. Actualmente en mantenimiento en semana 12

Debido a la presencia de la t(9;22) asociada a delección de *IKAROS*, se encuentra en protocolo de trasplante



MP = Marcador de peso molecular de 100 pb

1= Paciente

2= Control gen normal

Caso 2

Caso 3:

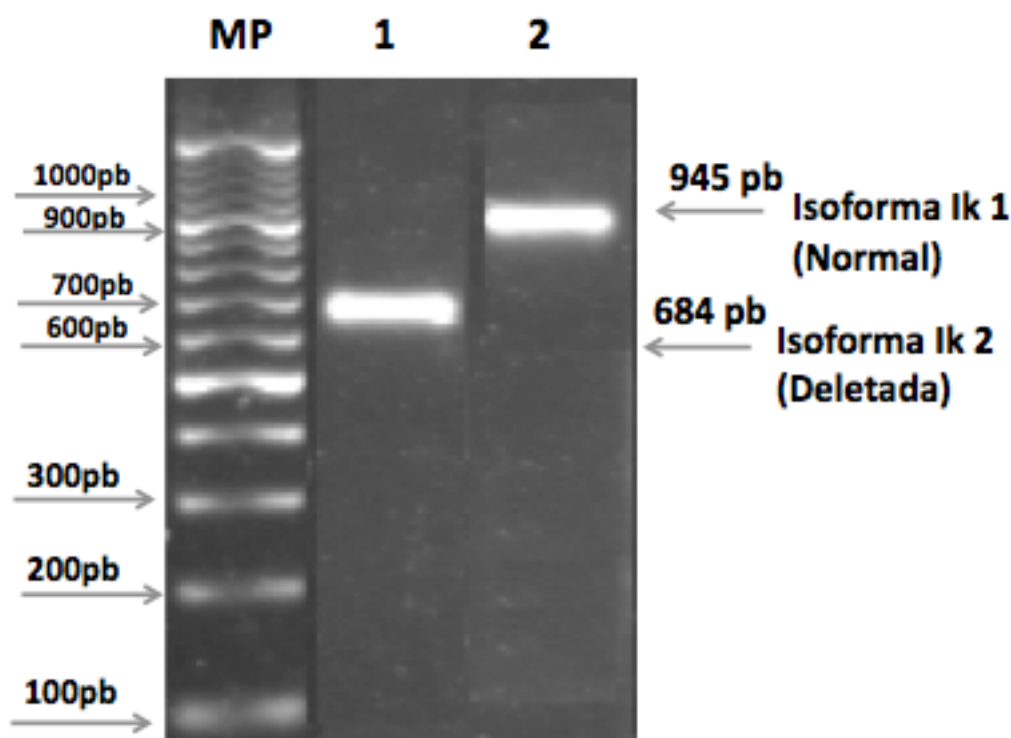
Tipo de Delección: Ik2

Paciente de 13 años de edad con historia de 4 semanas de evolución con palidez, dolor óseo y astenia y adinamia, a su ingreso con Hb 2.5 g/dL, leucocitos 58,000 y 5,000 plaquetas, aspirado de médula ósea con 98% de blastos morfología L1, líquido cefalorraquídeo positivo a blastos, citogenética positiva para t(9;22), inmunofenotipo de precursores B.

Presenta durante ventana de esteroide Diabetes Mellitus por lo que no se completaron 7 días de tratamiento y no fue posible evaluar respuesta a dexametasona. Durante la inducción a la remisión presenta choque séptico refractario a aminas, síndrome colestásico y pancreatitis grave y requiriendo manejo en la unidad de Terapia Intensiva, debido a lo anterior la remisión se documentó en aspirado de médula ósea correspondiente al día 21 de la inducción. Actualmente se encuentra en mantenimiento en semana 9.

Debido a la presencia de la t(9;22) asociada a delección de *IKAROS*, se encuentra en protocolo de trasplante

En la tabla 5 se muestra la relación de los pacientes que presentaron la delección ikaros, con respecto al total de la muestra estudiada.



MP = Marcador de peso molecular de 100 pb

1= Paciente

2= Control gen normal

Caso 3

Tabla 5. Comparación de las características de los pacientes de acuerdo al estatus del gen *IKAROS*

Características de los Pacientes	Delección IKZF1 presente	Delección IKZF1 ausente
Total de pacientes	3 (7%)	40 (93%)
Riesgo de acuerdo a otras características		
Muy alto	2	3
Alto	0	20
Bajo	1	17
Hiperleucocitosis	1	8
Inmunofenotipo precursores B	3	40
Inmunofenotipo precursores T	0	3
Citogenética positiva para t(9;22)	2	4
Citogenética negativa	1	37
Buena Respuesta a esteroide	2	37
Mala Respuesta a esteroide	1	6
Presento recaída durante tratamiento	0	5
Seguimiento medio	10 meses	10 meses

Se presentaron 5 recaídas en todo el grupo 43 pacientes, 3 fueron a médula ósea y una combinada a medula ósea y SNC; 4 de estos pacientes fueron clasificados inicialmente como alto riesgo y uno como de riesgo habitual, éste último abandonó el tratamiento por 6 meses y reingresa con recaída a medula ósea. Ninguno de los pacientes que recayeron portaba delección del gen *IKAROS*.

Ocho pacientes (18.6%) habían fallecido hasta el momento de la recolección de datos, de los cuales uno murió en remisión durante mantenimiento por complicaciones infecciosas, 3 durante inducción a la remisión también por complicaciones infecciosas, uno por antes del inicio de quimioterapia, cuando se encontraba en la ventana de esteroide, 3 pacientes durante recaída. Cuatro defunciones fueron relacionadas con el tratamiento (en remisión) y 4 relacionadas con la leucemia (antes de documentar remisión o después de recaída). Ninguno de los pacientes que fallecieron portaba delección del gen *IKAROS*.

DISCUSIÓN

La estratificación adecuada de riesgo es clave en el tratamiento de niños con Leucemia Linfoblástica Aguda, ya que justifica dar un tratamiento más agresivo a los pacientes con mayor riesgo de recaída y un tratamiento menos tóxico a pacientes con menor riesgo, reduciendo con ello los efectos adversos a corto y largo plazo para el grupo de pacientes de bajo riesgo y el riesgo de falla a tratamiento en los casos de alto riesgo.

La asignación de riesgo actual está basada en características clínicas, de laboratorio, en el inmunofenotipo, en los hallazgos citogenéticos, en la respuesta a esteroide y en la respuesta a la terapia de inducción, sin embargo, hay un porcentaje de pacientes que presenta recaída a pesar de no tener factores pronósticos adversos.

El objetivo de este estudio fue identificar en una cohorte incipiente de pacientes con Leucemia Aguda Linfoblástica del Hospital Infantil de México Federico Gómez, la frecuencia de la delección en IKZF1 (*IKAROS*) y sus implicaciones clínicas.

IKZF1 es un factor de transcripción que tiene un rol esencial en la linfopoyesis normal, este factor de transcripción, tiene cuatro dedos de zinc que se necesitan para su unión al DNA, de manera que el desarrollo linfoide normal requiere una estructura de *IKAROS* completa.

En el presente estudio encontramos delección de IKZF1 en 3 de 43 casos, lo que corresponde al 7% de la población estudiada. En la literatura se reporta una frecuencia de 10 a 15% de casos positivos para la delección de este gen en cualquiera de sus formas. Si bien es posible que en nuestra población tengamos menor proporción de pacientes que porten delecciones del gen *IKAROS*, esta diferencia se puede explicar por el tamaño de la muestra.

Corresponde a la literatura, el que 2/3 partes de los positivos sean también pacientes con t(9;22), y únicamente un 33% de los pacientes, o 1/3 parte, sean negativos.

En los últimos estudios se ha dado a *IKAROS* un factor pronóstico adverso independiente para mal pronóstico, ya que se asocia a un mayor número de recaídas y falla al tratamiento. Al momento de concluir el presente estudio, los pacientes positivos para delección Ik2 e Ik6 se encuentran en mantenimiento. Es necesario darles un seguimiento de más tiempo para poder determinar si se presenta recaída temprana o falla al tratamiento.

Uno de los pacientes que resultaron positivos a la delección de Ik6, se catalogó inicialmente con riesgo habitual, sin embargo, por los hallazgos de este estudio, se modificó el riesgo de este paciente, para que reciba tratamiento más intenso de acuerdo a los grupos de alto y muy alto riesgo.

La proporción de casos de pacientes de alto riesgo es mayor en nuestra serie que otros reportes internacionales, este hallazgo ha sido consistente con otros reportes de series mexicanas (referencia). De acuerdo con los datos obtenidos en este estudio, no podemos atribuir el mayor riesgo a las mutaciones del gen *IKAROS*.

En el pasado, el tratamiento de los pacientes con t(9;22) era el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas (TCPH), sin embargo actualmente y debido a la introducción de imatinib, estos pacientes pueden ser tratados sin trasplante y solamente aquellos que portan concomitantemente delecciones en el gen *IKAROS* y t(9;22) tienen indicación absoluta de TCPH.

Uno de nuestros pacientes había sido catalogado al diagnóstico como de riesgo habitual y el hallazgo de delección en IKZF1, permitió la reasignación de riesgo.

Estos tres pacientes son ejemplo de la trascendencia de la identificación de la delección del gen *IKAROS* en los pacientes con LAL.

A lo largo de la realización del presente estudio, se implemento en nuestro hospital la técnica para la detección de la delección de *IKZF1*. Lo anterior permitirá realizar de manera rutinaria esta prueba diagnóstica en todos los pacientes con LLA antes de iniciar tratamiento. Esto es un avance en el estudio molecular de los pacientes de nuestro hospital, que contribuye a una mejor estratificación de riesgo.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Se requiere una muestra mas amplia para poder determinar con mas precisión la frecuencia de la delección en los pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Este es el primer estudio que se realiza en pacientes mexicanos, pero únicamente incluye una Institución, la cual es un centro de referencia para leucemia linfoblástica aguda, por lo que existe un sesgo demográfico.

CONCLUSIONES

La detección de la delección del gen *IKAROS* en el presente estudio, se encontró una frecuencia menor a la reportada en la literatura.

Se encontró una proporción mayor de pacientes de Alto Riesgo que de Riesgo habitual.

El hallazgo de delecciones en *IKZF1* no se correlaciono con falla temprana al tratamiento
Las delecciones del gen *IKAROS* no se correlacionaron con mayor mortalidad relacionada con el tratamiento.

Con el presente estudio, se logro estandarizar la técnica de detección de dicho gen, con el objetivo de buscar la delección en todos los pacientes que lleguen al Hospital Infantil de México con diagnostico reciente de Leucemia Linfoblástica aguda, y con esto, poder asignar un riesgo mas preciso y por lo tanto un tratamiento mas adecuado.

Sera necesario ampliar la cohorte y el tiempo de seguimiento para poder establecer una conclusión mas precisas con respecto a la delección de este gen en población mexicana.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SIOP (International Society of Pediatric Oncology) Educational Book 2010.
2. Steliarova-Foucher E, Stiller C, "Geographical patterns and time trends of cancer incidence and survival among children and adolescents in Europe: ACCIS project: epidemiological study. *Lancet* 2004; 364 (9451): 2097
3. Dores GM, Devesa SS. "Acute Leukemia incidence and patients survival among children in USA from 2001 to 2007", *Blood*. 2012;119 (1):34
4. Mullighan et al. "Advances in the Biology of Acute Lymphoblastic Leukemia". *J Adol Oncol*. Volumen 1 Number 2, 2011. 77-86
5. Ching-Hon Pui "Childhood Leukemias". Cambridge University Press 2012
6. Ching-Hon Pui, Robinson. "Acute Lymphoblastic Leukaemia". *Lancet* 2008; 371:1030-43
7. Meyer et al. "Refinement of IKZF1 recombination hot spots in pediatric BCP-ALL Patients". *Am J Blood Res* 2013; 3(2): 165-173
8. Ikaros, Ailos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunology and Cell Biology* 2003; 81: 171-176)
9. Zhanjun L, Song C, Ouyang. "Cell Cycle Specific Function of Ikaros in Human Leukemia". *Pediatr Blood Cancer* 2012; 59:69-76
10. Ma Katsner P, Chan S. "Role of Ikaros in T-cell acute lymphoblastic leukemia"; *World J BiolChem* 2011; 2(6): 108-114
11. Mullighan, Miller, Coustman-Smith. "Genomic wide analysis of genetic alterations in ALL" *nature*, 2007; 446: 758-764
12. Kim J, Sif S, Jones B, Georgopoulos K. Ikaros DNA binding proteins direct formation of chromatin remodeling complex in lymphocytes. *Immunity* 1999; 10(3): 345-355
13. Katsner P, Dupuis A, Gaub M. "Function of Ikaros as a tumor suppressor in B cell acute lymphoblastic leukemia". *Am J Blood Res* 2013;3(1):1-13
14. Dorge P, Meissner B, Zimmermen M. "IKZF1 deletion as independent predictor of outcome in Pediatric Lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol" *Haematologica, Pediatric Leukemias* 2013; 98 (3)
15. Sun L, Crotty ML, Expression of dominant negative ikaros isoforms in T cell Acute Lymphoblastic leukemia. *ClinCancer Res*. 1999; 5(8): 2112-2120
16. McMullighan C, Xiaoping Su, Jinghii Z. "Deletion of IKZF1 and prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia", *N Eng J Med* 2009; 360: 470-80
17. Kuiper RP, Schoenmakers EF. "High resolution genomic profile in childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesion saffecting pathways involving lymphocyte differentiation and cell cycle progresion. *Leukemia* 2007; 21: 1258-1266
18. P Dorge et al. "IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia treated according to ALL BFM 2000 protocol", *Pediatric leukemias* 2013; 98 (3)
19. Ming Chen, Richard C, Mullighan C. "Outcome modeling with CRLF2, IKZF1, JAK and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Childrens Oncology groupStudy". *Blood* 2012; 119: 3512-3522
20. Ming Chen, harvey et al. "Outcome modeling with CRL2, IKZF1, JAK and minimal residual disease in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a Children´s Oncology Group Study". *Blood*, 2012; 119: 3512-3522
21. Mullighan et al. "Deletion of IKZF1 and prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia" *N Eng J Med* 2009; 360: 470-80
22. Claus M, Escherich G, Binato R. "Refinementof IKZF1 recombination hot spots in pediatric BCP-ALL", *An J Blood* 2013; 3(2): 165-173

23. TD Buitenkamp, "Outcome in children with Down Syndrome and Acute lymphoblastic Leukemia: role of IKZF1 deletion and CRLF2 aberrations". *Leukemia* (2012), 26, 2204 a 2211.
24. Ching-Hon Pui "Childhood Leukemias". Cambridge University Press 2012
25. Expresión of spliced oncogenic Ikaros isoforms in Ph positive ALL, *Blood*, 112; 9 (2008)
26. Buitenkamp T, Pieters R, Gallimore N. "Outcome in Children with Down Syndrome and Acute Lymphoblastic Leukemia: Role of IKZF1 deletion and CRLF2 aberrations". *Leukemia* 2012; 26: 2204-2211
27. Kuiper RP, Schoenmakers EF. "High resolution genomic profile in childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesion affecting pathways involving lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007; 21: 1258-1266
28. Schultz et al; Improved early event free survival COG Study. *J Clin Oncol* 2009; 27:5175

ANEXO 1

Hoja de recolección de datos

Hoja de recolección de Datos

IKZF1

Fecha _____ N. Paciente: _____

Nombre completo _____ Expediente _____

Fecha de nacimiento _____ Edad al Dx _____

Genero: Femenino () Masculino ()

Comorbilidades previas al Diagnóstico _____

Fecha de Diagnóstico _____

Tiempo de evolución de los síntomas _____

BH Inicial: Hb _____ Leucos _____ Blastos% _____ Plaq _____

AMO diagnóstico _____

LCR Diagnóstico: _____

Inmunofenotipo (Solo macar positivos) _____

Citogenetica: _____ t (9;22) positiva _____

Complicaciones al diagnóstico: (Lisis tumoral, leucoferesis, requirió UTIP, IOT o aminas)

Inicio ventana de esteroide Fecha: _____

Evaluacion de la inducción a la remisión:

Se documento remisión al dia: _____

Complicaciones durante inducción a la remisión : _____

Complicaciones durante consolidación: (incluida toxicidad por MTX): _____

Alergia a algún fármaco? _____

EL paciente ha tenido eventos de fiebre y neutropenia? Cuantos y en que parte del tratamiento: _____

Actualmente se encuentra en que parte de tratamiento: _____

Fallecio? SI () Causa de muerte: _____

Presento recaída durante el tratamiento? _____

NOTAS:
