



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Asociación de los niveles de Cortactina y HS1 con la clasificación de riesgo en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda Infantil.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PEDIATRÍA

P R E S E N T A

DRA. MIRELLA VELÁZQUEZ ÁVILA



DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE JUÁREZ VILLEGAS

ASESORES DE TESIS: DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ
DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO

Ciudad de México, febrero 2018





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.

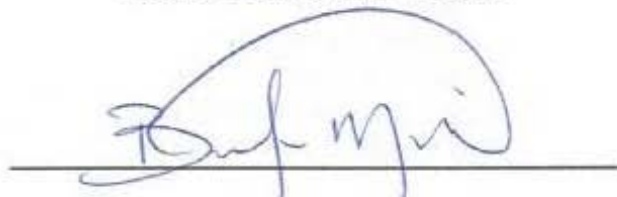
DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADÉMICO

DIRECTOR DE TESIS

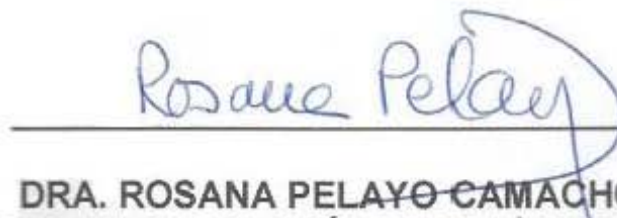


DR. LUIS ENRIQUE JUÁREZ VILLEGAS
JEFE DE DEPARTAMENTO DE ONCOLOGÍA

ASESORES DE TESIS



DRA. BRICEIDA LÓPEZ MARTÍNEZ
SUBDIRECTORA SERVICIOS AUXILIARES LABORATORIO
CLÍNICO



DRA. ROSANA PELAYO CAMACHO
UNIDAD DE ONCOLOGÍA DE CMN SIGLO XXI

DEDICATORIAS

A **YANIN MYLETH** porque ha sido y será siempre mi más grande inspiración para seguir adelante, por comprenderme, impulsarme y motivarme en mis objetivos, por enseñarme que una sonrisa basta para ser la base del éxito.

A MI MAMÁ Por apoyarme en todo momento incondicionalmente, por el impulso constante por cuidarme, por guiarme, por no dejarme caer, por sus consejos, su bondad, sus valores, y su infinito amor. Eterno agradecimiento por mi existencia, mis principios, valores morales y formación profesional.

A mis hermanas **Mary Chuy, Nelly y Martha** por ser el ejemplo de éxito, porque todo lo comprenden y dan lo mejor de sí mismas sin esperar nada a cambio, por la perseverancia y constancia que las caracterizan y que me han infundado siempre, por su amor y valentía para salir adelante.

A los **NIÑOS del Hospital Infantil de México Federico Gómez**, por su inocencia, bondad y valentía para seguir adelante, por esa sonrisa a pesar de las adversidades, por permitirme aprender de ellos y enriquecer mi formación profesional

A MIS MAESTROS:

Dr. Luis Enrique Juárez, Dra. Briceida López, Dra. Rosana Pelayo por su gran apoyo, conocimiento asesoría, consejería, metodología y motivación para la culminación de nuestra investigación y para la elaboración de esta tesis; a la **Dra. Martha Velázquez** por su apoyo ofrecido en este trabajo, por su tiempo compartido y por impulsar el desarrollo de nuestra investigación. A ellos, que marcaron cada etapa de nuestro camino en este estudio.

A **Dios** por darme la vida, salud y ganas de Superación Profesional.

A Todos por Confiar en míGRACIAS

ÍNDICE

1. Resumen.....	1
2. Introducción	2
3. Marco teórico	6
Definición	6
Epidemiología	6
Factores de riesgo	7
Genética	7
Ambiental	7
Exposición a sustancias químicas	7
Origen prenatal	8
Patogénesis	8
Clasificación	8
Morfológica	9
Inmunológica	9
Genética LLA B	11
Número de cromosomas	11
Traslocaciones	12
Presentación clínica	14
Clasificación de riesgo	15
Fases de tratamiento	17

4. Antecedentes	19
5. Planteamiento del problema	19
6. Pregunta de investigación	20
7. Justificación	20
8. Objetivos: General y específicos	21
9. Hipótesis	21
10. Métodos	22
11. Consideraciones éticas	23
12. Plan de análisis estadístico	24
13. Descripción de variables	24
14. Resultados	27
15. Discusión	32
16. Conclusión	33
17. Limitación del estudio	34
18. Cronograma de actividades	34
19. Referencias bibliográficas	35

RESUMEN

Introducción. La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer infantil más frecuente. Los pacientes son clasificados de acuerdo con los hallazgos clínicos, biológicos, moleculares y de respuesta a la terapia inicial. Este trabajo tuvo como objetivo establecer una relación entre los niveles de expresión de cortactina y HS1 en médula ósea de pacientes con la clasificación de riesgo de Leucemia Linfoblástica Aguda.

Métodos. Se revisaron muestras biológicas de pacientes previamente sanos con diagnóstico inicial de síndrome infiltrativo y síndrome anémico clínico y casos de recaída en niños mexicanos de 0 a 18 años en el Hospital infantil de México Federico Gómez con alta sospecha de Leucemia linfoblástica aguda para medición de proteínas por citometría de flujo e intensidad media de fluorescencia en busca de factor pronóstico.

Resultados. La media de edad fue de 6.8 años, los signos y síntomas para solicitar la atención médica fueron síndrome infiltrativo, síndrome anémico y síndrome febril. Las principales alteraciones hematológicas fueron anemia y trombocitopenia, presencia de porcentaje de blastos en sangre periférica medio fue 55.06%, inmunofenotipo y estudio citogenético Pro B 37.5%, Pre B 43.75%, Pre-Pro B 6.25% y no concluyente 12.5%. El 81.25 % de los pacientes fueron clasificados como alto riesgo y el 18.75% de riesgo habitual.

Conclusiones. Se establece una asociación directa entre los niveles de cortactina, por lo que se podría utilizar como factor de mal pronóstico de forma temprana para iniciar un tratamiento oportuno y de acuerdo a la sobreexpresión determinar el riesgo de recaída para normar estrategias terapéuticas.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es la enfermedad neoplásica más frecuente de la población infantil en nuestro país y a nivel mundial, y una de las principales causas de muerte en pacientes que presentan recaídas. Lamentablemente, tanto el manejo quimioterapéutico de la enfermedad, como el trasplante de células hematopoyéticas de médula ósea, no resultan ser eficaces en todos los casos, logrando la remisión completa a 5 años en solo 60% de los casos. La heterogeneidad clínica, biológica y molecular entre los individuos incluye resistencia a fármacos, desarrollo de enfermedad mínima residual y extravasación de las células leucémicas, lo que en la mayoría de los casos implica un pronóstico desfavorable y desenlace fatal. De particular impacto clínico es la infiltración celular a órganos extramedulares, particularmente al sistema nervioso central, hígado, pulmón y testículos. Hasta el momento se desconoce la naturaleza de las células hematopoyéticas responsables de este fenómeno los progenitores iniciadores de leucemia o blastos leucémicos, así como los factores y mecanismos que promueven su movilización y colonización periférica, incluyendo un posible papel del endotelio como facilitador o represor de la infiltración.

Las enfermedades neoplásicas en la población infantil son consideradas actualmente una prioridad de salud a nivel mundial (1, 2). En México, representan la segunda causa de muerte entre los 4-15 años de edad, con una incidencia de 150.3 casos por millón por año, de los cuales 75.3 casos por millón corresponden a leucemias agudas (INEGI, (2). Algunas alteraciones genéticas están relacionadas con 5 el síndrome de Shwachman, el síndrome de Bloom, la ataxia telangiectasia.

La sospecha diagnóstica de LLA se basa en la clínica que debe ser complementada con pruebas diagnóstico es el aspirado de médula ósea, de donde se obtiene muestra para realizar estudios de morfología, Además, deben realizarse la punción lumbar para análisis. Hemorragias (en 48%), dolor óseo (en 23%), linfadenopatías.

De las leucemias agudas, la leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer infantil más común, y está caracterizado por la producción descontrolada de células precursoras hematopoyéticas de la serie linfóide en la médula ósea (MO). Aproximadamente el 80% de los casos de LLA debutan con un inmunofenotipo de precursores de células B, en tanto alrededor del 15% lo hace con inmunofenotipo de células T, y del 5-10% restante presenta leucemia de linaje ambiguo o leucemia bifenotípica (2-4).

Con base en las características morfológicas de los linfoblastos, la LLA se clasifica en L1, L2 y L3, de acuerdo al Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB).¹⁵ El fenotipo más común en pacientes con LLA corresponde al de células precursoras B y representa el 80-85% de los casos de LLA infantil. El inmunofenotipo T se asocia con características clínicas de mal pronóstico. Se han identificado alteraciones citogenéticas que se relacionan con el pronóstico de estos pacientes. Algunas alteraciones numéricas (hiperdiploidia y las trisomías 4, 10 y 17) se asocian con un pronóstico favorable, mientras que otras se relacionan con un resultado adverso (hipodiploidia,

tetraploidia). De igual manera, existen traslocaciones que se asocian con un buen pronóstico, como el caso de la t(12;21), mientras que otras, como la t(9;22), t(4;11), y t(1;19), parecen influir adversamente en la respuesta al tratamiento y, por ende, en el pronóstico.¹⁸⁻²⁰ Como resultado de estudios epidemiológicos, se sabe que los pacientes con edades de 1 año a 9 años 11 meses presentan mejor supervivencia que los que se encuentran fuera de este rango de edad.²¹ El pronóstico también resulta desfavorable para los pacientes con cuenta leucocitaria de más de 50,000/mm³ al diagnóstico, además de la respuesta a la quimioterapia inicial.

Aunque la etiología de la LLA es probablemente multifactorial, se reconoce que además de la participación de múltiples alteraciones genéticas y microambientales, una población celular hematopoyética con características biológicas primitivas y/o troncales puede fungir como célula iniciadora de la leucemia y ser responsable además, del mantenimiento y progresión maligna, así como de fenómenos como la inestabilidad de linaje, la enfermedad mínima residual y la infiltración extramedular. Adicionalmente, el proceso de hematopoyesis temprana normal a partir de células progenitoras de linaje linfóide B o T se encuentra severamente comprometido, con daño en la capacidad de proliferación y diferenciación (5). La infiltración de células leucémicas a sistema nervioso central (SNC), hígado, bazo y testículos, así como las recaídas asociadas cambian el pronóstico de la enfermedad (6, 7).

Las señales ambientales y los mecanismos moleculares que dirigen la infiltración celular son poco entendidas. El SNC es el sitio extramedular con infiltración más frecuentemente afectado durante la recaída (30-40%) con un rango estimado de 6.8% después de 8 años, y una incidencia general cerca del 11%. Un número de factores de riesgo relacionados con la recaída a SNC, incluyendo el inmunofenotipo T, las traslocaciones de alto riesgo t(9;22) y t(4;11), hiperleucocitosis (arriba de 100X10⁹/L) y blastos leucémicos presentes en el SNC, son parámetros de gran utilidad y usados universalmente, pero muestran ser insuficientes para el establecimiento de una temprana estratificación, y para la comprensión de la patobiología de la enfermedad. La permanente alta mortalidad de las leucemias infiltrativas subraya la necesidad de identificar la/las células implicadas y sus posibles mecanismos de acción.

HS1 Y CORTACTINA: Proteínas de unión a actina, involucradas en la adhesión celular y migración y su relación con leucemia. Cortactina y HS1 (Hematopoyetic cell-specific lyn substrate) son proteínas de unión a actina homólogas. Mientras cortactina se expresa de forma ubicua, excepto para las células hematopoyéticas, HS1 está restringido a las células hematopoyéticas. Cortactina y HS1 participan en la adhesión celular y migración por el control de los niveles de activación de GTPasas, dinámica de actina y reclutamiento de moléculas de adhesión como ICAM-1 en células endoteliales (cortactina) y β 2-integrinas en leucocitos (HS1) (35). Ambas proteínas, cortactina y HS1 han sido reportadas como relevantes en la progresión de leucemia linfóide crónica de células B (LLC-B). En pacientes con pobre pronóstico, HS1 es sobre-expresado y fosforilado, y se relaciona con anomalías en la migración de células B leucémicas y la inhibición del "homing" (8, 9,10). Por otro lado, cortactina se encuentra sobre-expresada en varios tipos de cáncer, por lo cual se le relaciona con la capacidad migratoria celular y metástasis. Muy recientemente, se demostró que cortactina se expresa en células B de pacientes adultos

con LLC-B y que su expresión se asocia con los factores ZAP70 y CD38 en los casos de alto riesgo de LLC-B (38) aunque se desconoce si cortactina es también hiperfosforilado en esta patología. Sin embargo, este escenario parece probable, ya que cortactina es un blanco bien conocido de la familia src kinases SFK (Src Family Kinases) (39). HS1 y cortactina pueden ser tirosin fosforilados por varios miembros SFK, en la actualidad se sabe que la señalización de SFK no controlada contribuye a diversas formas de leucemias e inclusive se utilizan estrategias terapéuticas como el empleo de dasatinib para la inhibición de la SFK (junto con Abl tirosina cinasa que también apunta a HS1) (15)

La participación del endotelio en la leucemia extramedular en la cual se incluye la interacción de moléculas de adhesión entre las células cancerosas y las células endoteliales de los órganos blanco es indispensable para el arresto de las CTC (células circulantes tumorales) dentro de los capilares lo que desencadena eventos que culminan en extravasación, colonización y crecimiento metastásico.

Particularmente, en LLA con infiltración a SNC las células leucémicas circulantes son transportadas por arterias de la carótida hacia la barrera hemato-encefálica, la cual es una barrera hermética que tiene como función principal mantener aislado al parénquima del cerebro de la circulación general y de regular el paso de material dentro y fuera del SNC. La barrera endotelial está formada por células endoteliales que están conectadas por estructuras membranales integrales de dos tipos: las denominadas uniones estrechas TJ (Tight Junctions) y por uniones adherentes AJ (Adherens junctions), las cuales son necesarias para dar estabilidad a la barrera endotelial y permitir ser selectivamente semi-permeable, por lo cual debe estar estrictamente controlada para permitir el paso de moléculas y sustancias necesarias, así como para permitir el reclutamiento y extravasación de leucocitos durante procesos de inflamación (16).

La migración transendotelial TEM (Transmigration endotelial migration) es regulada primero por las moléculas de adhesión que se encuentran concentradas en el borde apical de las células endoteliales, tal como selectinas, ICAM-1 y VCAM-1 y su interacción con los leucocitos que tienen función en la adhesión primaria de los leucocitos al endotelio, el rolling y la adhesión firme. Para que la adhesión se lleve a cabo es necesario que moléculas como ICAM-1 y VCAM-1 se agrupen en el borde de las células endoteliales. Para el agrupamiento de ICAM-1 se requiere de la fosforilación de cortactina (dependiente de c-Src) (13,14), que es una proteína que está involucrada en la remodelación de actina por interacción tanto con F-actina como Arp 2/3 complex (Actin-related protein 2/3) para la nucleación y formación de redes de actina, además de tener una contribución indirecta con la regulación de la activación de Rho GTPasas para dicho evento (44), ya que cortactina fosforilada activa a RhoA, que activa a ROCK (Rho kinase), quien a su vez inactiva a PP1c (Protein phosphatase 1c) e inhibe la inactivación MLCK (Myosin Light Chain Kinase) cambiando a MLCK activa quien participa en la formación de filamentos de estrés que desestabilizan a las TJ y AJ. Schnoor y cols reportaron en un modelo *in vivo* que la ausencia de cortactina en células endoteliales se relaciona con defectos en el agrupamiento de ICAM y consecuentemente en el reclutamiento de leucocitos pero la permeabilidad vascular aumenta. Adicionalmente el agrupamiento de VCAM-1 se relaciona con el aumento de Ca⁺⁺ intracelular que se une a la proteína Calmodulina CaM (Calcium-modulated-protein) y que funciona como mensajero para la

activación de MLCK, así mismo, VCAM-1 recluta a Rac1, quien participa en la modulación de las uniones endoteliales.

Así mismo, se ha reportado que cortactina y HS1, proteínas homólogas de unión a actina que participan en eventos de adhesión celular y migración son relevantes en la progresión de algunos tipos de leucemia sin embargo se desconoce si en LLA pudiesen tener una participación en la extravasación de las células leucémicas, lo que podría estar relacionado al mal pronóstico del paciente.

A través de modelos de estudio de infiltración celular, en este proyecto se pretende contribuir al entendimiento de las leucemias de pronóstico pobre, definiendo si la infiltración en leucemia linfoblástica aguda resulta de la convergencia de propiedades biológicas especiales de células leucémicas primitivas y un daño en las barreras endoteliales.

MARCO TEÓRICO

1. DEFINICIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), es una enfermedad que se caracteriza por una proliferación desordenada de células inmaduras de la línea linfoide (blastos) que surgen de la célula madre (stem cell) en la médula ósea. El crecimiento desordenado de las células blancas en la médula ósea, bloquea el desarrollo normal de las células rojas y las plaquetas.

La leucemia linfoblástica es una alteración de la serie linfoide, B o T que produce formas inmaduras de una manera descontrolada provocando malignización, reflejándose como una expansión clonal del proceso de hematopoyesis, con la particularidad de diseminarse e infiltrar órganos a distancia, los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, el sistema nervioso central, los testículos u otros órganos.

2. EPIDEMIOLOGÍA

La leucemia linfoblástica aguda es el tipo de cáncer más frecuente en la edad pediátrica y representa el 23% de los diagnósticos de cáncer en menores de 15 años, con una incidencia anual de 30 a 40 por millón. En pediatría la edad más frecuente de presentación es en el grupo de 3 a 5 años. Aproximadamente 2400 niños y adolescentes menores de 20 años, son diagnosticados de LLA cada año en Estados Unidos; esta incidencia ha aumentado gradualmente en los últimos 25 años.

En México La leucemia linfocítica aguda es más común en la infancia temprana, y alcanza su mayor incidencia entre las edades de 2 a 3 años (> 80 por millón por año), con tasas que disminuyen a 20 por millón entre niños de 8 a 10 años de edad. La incidencia de LLA en pacientes de 2 a 3 años de edad es aproximadamente 4 veces mayor que entre niños menores de 2 años y casi 10 veces mayor que entre los de 19 años de edad.

La leucemia linfocítica aguda es ligeramente más común entre los niños de raza blanca que en los de raza negra y asiáticos, y en los varones que en las niñas.

La relación de casos de leucemias agudas en nuestro medio, entre linfocíticas y no linfocíticas es de 6:1 en favor de las agudas. El número general de egresos hospitalarios por leucemia para el año 2001 fue de 13.558 personas con una tasa de 13,4 por 100.000 habitantes. Las defunciones registradas en México para el año 2001 en el grupo de edad de 1 a 4 años ocurrieron 232 muertes para una tasa de 2.69 por 100.000 habitantes, para el grupo de 5 a 14 años el número de muertes por leucemias fue de 588 para una tasa de 2.60 por 100.000 habitantes. (SSA, 2001).

3. FACTORES DE RIESGO.

3.1 Genética

Las alteraciones genéticas son muy frecuentes en las Leucemias linfoblásticas agudas, se encuentran en alrededor de 40% de los pacientes. Existen deficiencias inmunológicas que actúan como factores de riesgo para presentar una mayor tendencia.

El síndrome de Down. Estos niños tienen un mayor riesgo de contraer leucemia, tienen 15 a 20 veces más probabilidades que otros niños. Tienen un riesgo acumulativo de desarrollar leucemia de 2.1% al llegar a los 5 años de edad, y de 2.7% al llegar a los 30 años. Aproximadamente dos tercios de los casos de leucemia aguda en niños con síndrome de Down son LLA.

El hermano de un gemelo idéntico que contrae la leucemia linfocítica aguda antes de los 6 años de edad tiene de un 20% a un 25% de probabilidad de contraer leucemia.

Los gemelos que no son idénticos los hermanos tienen una probabilidad ligeramente mayor de 2-4 veces de contraer leucemia.

Otros trastornos genéticos como la neurofibromatosis, la ataxia telangiectasia, el Síndrome de Wiscott-Aldrich y la anemia de Fanconi también llevan consigo un mayor riesgo de contraer leucemia, pero más comúnmente dan lugar al linfoma no Hodgkin y a otros tipos de cáncer el síndrome de Li-Fraumeni y El síndrome de Klinefelter.

3.2 Ambiental

Exposición a la radiación es un factor de riesgo para adquirir leucemia en niños, se estima un riesgo presente después de la exposición hasta por 8 años. Si un feto es expuesto a radiación durante los primeros meses de su desarrollo aumenta el riesgo aunque no es claro el grado. Los posibles riesgos de la exposición fetal o infantil a niveles menores de radiación, como la exposición a estudios de rayos X o por la Tomografía computarizada, cualquier aumento del riesgo probablemente es pequeño, pero por cuestión de seguridad.

3.3 Exposición a sustancias químicas. Los niños que reciben tratamiento con medicamentos de quimioterapia tienen un mayor riesgo de desarrollar otro tipo de cáncer. Los medicamentos como ciclofosfamida, clorambucil, etopósido han sido relacionados con un mayor riesgo de leucemia. Estas leucemias generalmente se desarrollan en un plazo de 5 a 10 años a partir del tratamiento y tienden a ser difíciles de tratar. La exposición a químicos como benceno, un solvente usado en la industria de limpieza y en la producción de algunos medicamentos, plásticos y tintes puede causar leucemia aguda en adultos y, rara vez, en niños. Varios estudios han encontrado un posible vínculo entre la leucemia en niños y la exposición a pesticidas en los hogares, ya sea durante el embarazo o durante los primeros años de la

infancia. Además otros estudios han encontrado un posible aumento en el riesgo para las madres con exposición a pesticidas en el lugar de trabajo antes del parto. Sin embargo, la mayoría de estos estudios han confrontado graves limitaciones en la manera que fueron conducidos. Se necesita más investigación para tratar de confirmar estos hallazgos y para proveer información más específica sobre los posibles riesgos ya que hasta el momento la leucemia linfocítica aguda no ha sido asociada con ninguno de los productos químicos que causan cáncer.

Los pacientes que reciben tratamiento intensivo para suprimir su función inmunológica sobre todo los pacientes con trasplantes de órganos tienen mayor riesgo de contraer cáncer, especialmente del sistema linfóide. Esto incluye la leucemia linfocítica aguda.

3.4 En el origen prenatal de la leucemia linfoblástica aguda, se considera que en algunos casos la alteración genómica inicial se presenta in útero, la sospecha proviene de la observación de reordenamientos de la inmunoglobulina o el receptor de la célula T, esto es parte de algunas muestras de sangre tomadas al nacimiento. Surge la teoría que los cambios genómicos posnatales son necesarios para la presentación de este tipo de Leucemia linfoblástica aguda.

4. PATOGÉNESIS

La suma de varios factores de inicio genético, ambiental, infecciones virales, inmunodeficiencias, radiación ionizante. La teoría de la patogénesis clonal surge a consecuencia del desarrollo de una mutación maligna, los rearrreglos de inmunoglobulinas y genes también se han estudiado como marcadores de clonalidad, que se han observado en las células leucémicas, sugiriendo enfermedad policlonal o clon en progresión; también existe la teoría molecular, donde se expone una alteración a nivel del ciclo celular en lo referente a la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis celular, que puede darse en las vías de señalización en células mutadas que afecta la acción o expresión de los protooncogenes.

5. CLASIFICACIÓN

En 1976 el grupo Franco-Americano-Británico propuso clasificar de acuerdo a las características morfológicas de las células, estadificando en L1 en frecuencia se encuentra en primer lugar con 85%, L2 en 14% y L3 en 1%. En la mayoría de los casos de LLA en las que se muestra una morfología L3 se expresa inmunoglobulina de superficie y tiene una traslocación del gen C-MYC idéntica a la que se presenta en el linfoma Burkitt t(8:14). Los blastos son positivos a PAS, no tienen granulos ni bastones de Auer y son negativos para sudan negro y mieloperoxidasa.

5.1 Clasificación morfológica según la FAB

Características citológicas	L1	L2	L3 (a)
<i>Tamaño celular</i>	Pequeñas principalmente	Grandes heterogéneas en tamaño	Grandes y heterogéneas
<i>Cromatina nuclear</i>	Homogénea	Variable heterogénea	Punteado fino y homogéneo
<i>Forma del núcleo</i>	Regular ocasional hendido o indentación	Irregular hendido y común indentación	Regular ovoide a redondo
<i>Nucléolos</i>	No visibles o pequeños discretos	1 ó más frecuentemente grandes	Prominentes 1 ó más vesiculares
<i>Cantidad del citoplasma</i>	Escaso	Variable, frecuentemente abundante	Moderadamente abundante
<i>Basofilia del citoplasma</i>	Leve o moderada rara vez intenso	Variable, profundo en algunos	Muy profundo
<i>Vacuolización del citoplasma</i>	Variable	Variable	Frecuentemente prominente

a) el único tipo inmunológicamente puro, de LLA que puede ser consistentemente reconocido morfológicamente e invariablemente, lleva un receptor de IgM de superficie en su membrana. De Lanzkowsky_Manual of Pediatric Hematology and Oncology 4th edición

5.2 Clasificación inmunológica:

Por medio de las técnicas como citometría de flujo se obtienen los marcadores de superficie celular y citoplasma de los blastos, conocidos como anticuerpos monoclonales, que a su vez permiten identificar el linaje del blasto ya sea precursor B, t o B maduro y también permite definir el estado de diferenciación del mismo integrando así el inmunofenotipo.

La clasificación inmunofenotípica permite conocer la ontogenia de cada tipo leucémico. Se conoce que esta clasificación tiene implicaciones pronósticas, las LLA de células B tienen un antígeno común llamado CD10 + en su superficie, que se asocia con traslocaciones MLL en particular con t (4:11); no está claro si la negatividad para CD10 tiene una importancia pronóstica independiente en ausencia de un reordenamiento del gen.

Se clasifican en 3 grupos, encabezando la lista por frecuencia las leucemias linfoblásticas precursora B en un 70-80% de los casos, posteriormente las células T en un 15% y finalmente las B maduras con un 2 a 5%.

5.2.1 Subtipos de LLA de células B precursoras

- **LLa de células B** común positiva para CD10 y sin inmunoglobulina de superficie o citoplasmática.
- **LLa ProB** negativa para CD10 sin inmunoglobulina de superficie o citoplasmática, presente en el 5% de los pacientes, este inmunofenotipo se presenta con mayor frecuencia en lactantes y se relaciona con reordenamientos del gen MLL

- **LLA preB** presencia de inmunoglobulina citoplasmática , el 25% de los casos presenta translocación t(1:19) de TCF3-PBX1

Se considera que 3 % de los pacientes presentan LLA pre B transicional, con expresión de Ig de superficie de cadena pesada sin expresión de cadena ligera, compromiso de gen CMYC o morfología L3.

Clasificación inmunológica de LLA según grupo EGIL

LAL de línea B: CD22+ y/o CD79a+ y/o CD19+

Pro-B (B-I): TdT+, CD10-, Igcitoplasma-, Igmembrana-, CD38+.

Común (Bi08-II): TdT+, CD10+, Igcitoplasma-, Igmembrana-, CD38+

Pre-B (B-III): TdT+, CD10+/-, Igcitoplasma +, Igmembrana-, CD38+/-

B madura (B-IV): CD20+, TdT-, CD10-, Igcitoplasma-, cadenas ligeras de superficie o citoplasmáticas +, CD38-

LAL de línea T: CD3 de citoplasma +

Pro-T (T-I): CD7+, CD2-, CD5-, CD8-, CD1a-

Pre-T (T-II): CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+, CD1a-, CD71+

T cortical: CD1a+, CD3 de superficie + o -, CD71-

T madura: CD3 de superficie+, CD1a-, CD2+, CD5+, CD4/8+

De Protocolo LAL/SEHOP – PETHEMA 2013

5.2.2 Leucemia linfoblástica aguda de células T

Se define por la expresión de los antígenos relacionados con las células T (CD3 citoplasmático, con CD7 mas CD2 o CD5 en los blastos; con frecuencia este tipo de leucemia se relaciona con características clínicas como sexo masculino, edad avanzada, leucocitosis, masa mediastinal.

Las anomalías citogenéticas comunes en la LLA de la línea B, por ejemplo hiperploidas son poco frecuentes en las de la línea T.

5.2.3 leucemia de linaje ambiguo

Menos del 5% de los casos de leucemia aguda infantil presenta linaje ambiguo, con características de línea linfoide y mieloides. Estos casos se diferencian de la LLA con coexpresión mieloides en el sentido de que el linaje predominante no se puede determinar por medio de estudios inmunofenotípicos e inmunohistoquímica. La definición varía según los estudio y actualmente la mayoría de los investigadores usan los criterios establecidos por la Europea Group for the immunological characterization of Leukemias (EGIL) o los criterios más rigurosos de la OMS, en

esta última es necesaria la mieloperoxidasa para determinar el linaje mieloide. Las leucemias con fenotipo mixto se dividen en dos grupos:

- Leucemias Bilineales: en las que existen dos poblaciones distintas de células.
- Leucemias bifenotípicas: en la que los blastos individuales exhiben características tanto linfóide como mieloide.

Criterios para la definición de leucemia fenotipo ambiguo.

MIXED PHENOTYPE ACUTE LEUCEMIA, MPAL (WHO 2008)

Línea mieloide

MPO* ó ≥ 2 Antígenos de diferenciación monocítica (NSE, CD11c, CD14, CD64, lisozima)

Línea linfóide T

CD3c** ó CD3s (raro en MPAL)

Línea linfóide B

CD19++ y ≥ 1 (expresión intensa): CD79a, CD22c, CD10

ó CD19+ ≥ 2 (expresión intensa): CD79a, CD22 c, CD10

*citometría de flujo, inmunohistoquímica o histoquímica

**citometría de flujo: Ac anti-CD3- ϵ ; inmunohistoquímica: Ac policlonal anti-CD3- ζ , no específica de célula T

De Protocolo LAL/SEHOP – PETHEMA 2013

5.3. Clasificación genética

La evolución en el análisis citogenético ha contribuido al mayor entendimiento de la biología y tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda de acuerdo a las técnicas de genética molecular del espectro del cariotipo.

5.4 Número de cromosomas

-Ploidías

La ploidía en citometría de flujo se plasma en histogramas que se comparan con los de poblaciones celulares control. En un tejido normal la mayor parte del contenido celular se encuentran en fase G0 y G1 del ciclo celular, es decir, permanecen en una fase donde no hay división y su carga cromosómica está formada por el número de pares de cromosomas propios de su especie. Cuando una distribución de células coincide con el control se habla que el índice de DNA es de 1, todos los índices de DNA que tienen valores diferentes de 1 se denominan aneuploides, los menores de 1 hipodiploides y los mayores hiperdiploides, los que llegan a valor de

2 se denominan tetradiploides. Por lo tanto se define el índice de DNA como el cociente entre la cantidad de fluorescencia vista en una célula diploide normal y el contenido de fluorescencia de los blastos en medula ósea.

-Hiperploidía alta

Se define como la presencia de 51 a 65 cromosomas por célula o índice de DNA mayor a 1.16. Aproximadamente se presenta en un 20-25% de los casos de LLA de células B precursoras, pero con muy poca frecuencia en la LLA de células T.

La hiperploidía se puede evaluar por medio de la medición del contenido de DNA de las células (índice de DNA) o cariotipo. Esta alteración genética, por lo general, se presenta en los casos con factores pronósticos clínicamente favorables como edad mayor a 1 año y menor de 10 años con recuento leucocitario bajo y es por sí misma un factor de pronóstico favorable independiente. Las células leucémicas hiperdiploides son especialmente susceptibles a la apoptosis y a acumular dosis más altas de metotrexate y sus metabolitos activos de poliglutamato, lo que explica el desenlace favorable, aunque se ha observado que factores adicionales como la edad, presencia de trisomías y la respuesta temprana al tratamiento modifican el pronóstico en conjunto.

-Hipoploidia (<46 cromosomas)

Se define como los casos de LLA de células B precursoras con un número de cromosomas menor que lo normal. Existen 4 grupos:

Casi haploidia: 24 a 29 cromosomas. En la LLA de esta clasificación son comunes las alteraciones dirigidas a la señalización de los receptores de la tirosin cinasa, la vía de señalización RAS y el IKZF3.

Hipodiploidia baja: 33 a 39 cromosomas. En esta son comunes las alteraciones genéticas que involucran TP53, RB1 e IKZF2, cabe destacar que el TP53 también está presente en un 40% de las células no tumorales, lo que indica que estas mutaciones son de línea germinal.

Haploidia alta ; 40 a 43 cromosomas.

Casi diploidia: 44 cromosomas.

Los pacientes con menos de 44 cromosomas en sus células leucémicas tienen un desenlace más precario que aquellos con 44 a 45 cromosomas.

6. TRASLOCACIONES

6.1 CROMOSOMA FILADELFIA t (9:22)

El cromosoma Philadelphia (Ph), es un cromosoma 22 acortado que resulta de la fusión entre el segmento 3' del protooncogen ABL, localizado en el cromosoma 9, y la región 5' del gen BCR del cromosoma 22. Esta translocación t(9;22) genera un gen híbrido BCR/ABL, que se transcribe en un RNA quimérico. Existen dos regiones principales de corte dentro del gen BCR que, a su vez, generan dos proteínas diferentes. Una región se denomina Mbcr (Major Breakpoint Cluster Region) que abarca los exones b1-b5 del gen BCR y codifica una proteína de 210 kD (p210). La

translocación a nivel de la región mBCR (Minor Breakpoint Cluster Region), genera una proteína de 190 kD (p190). Ambas proteínas de fusión tienen su actividad tirosín-quinasa aumentada, así como capacidad de transformación neoplásica.

Este cromosoma está presente en aproximadamente 3 a 5% de los niños con Leucemia Linfoblástica Aguda y conduce a la producción de una proteína de fusión de BCR-ABL 1 con actividad de tirosin cinasa. Este subtipo es más común en niños grandes con LLA de células precursoras y con recuento leucocitario alto. Este cromosoma se ha relacionado con un pronóstico extremadamente adverso, en especial en aquellos pacientes que presenten además recuento leucocitario alto o mala respuesta al tratamiento inicial. Los inhibidores de la tirosin cinasa de BCR-ABL como el mesilato de imatinib son eficaces en los pacientes positivos a este cromosoma.

6.2 TRASLOCACIONES DE MLL

El gen MLL se encuentra en el cromosoma 11 banda q23, donde reside el gen de Linaje Leucémico Mixto (Mixed Lineage Leukemia o MLL, también llamado ALL-1 o HRX), se ha descrito su presencia en más de 60 genes fusionados, por lo que se dice que es un oncogen el cual en estas translocaciones se pueden observar en una amplia gama de patologías malignas hematológicas, principalmente en LLA y LMA, así como también en síndromes mielodisplásicos y en el linfoma de Burkitt. Las traslocaciones que involucran este gen se presentan en hasta el 5% de los casos de LLA infantil y se relacionan con un aumento en el riesgo de fracaso del tratamiento. La traslocación t(4:11) es la más común e involucra el gen MLL en niños con LLA, lactantes con recuentos leucocitarios altos son más propensos a presentar infiltración a Sistema Nervioso Central con pobre respuesta a la terapia inicial.

6.3 TRASLOCACIÓN TCF3-PBX1(TRASLOCACIONDE E2A-PBX1; T(1:19)

La translocación t (1;19)(q23;p13) es una alteración molecular que se encuentra frecuentemente en niños con leucemias agudas linfoblásticas de fenotipo pre-B. Esta translocación implica a los genes E2A y PBX1, localizados respectivamente en los cromosomas 19p13 y 1q23. El gen E2A tiene un papel esencial en la linfopoyesis y regulación del desarrollo normal de las células B; El producto de fusión E2A/PBX1 resulta en una pérdida del control de la expresión normal de E2A que se ve sustituida por una proteína quimérica con función anómala. Los pacientes portadores de este reordenamiento tienen un pronóstico desfavorable. Esta traslocación t (1:19) se presenta en el 5% de los casos de LLA infantil e involucra la fusión del gen E2A en el cromosoma 19 con el gen PBX1 en el cromosoma 1. Esta se puede presentar como traslocación equilibrada o desequilibrada. Tiene principalmente una relación con la LLA preB (Ig citoplasmática positiva), se presenta con mayor frecuencia en niños afroamericanos.

6.4 TRASLOCACIÓN t (12:21)

Se ha demostrado por biología molecular la existencia de una translocación críptica, la t (12; 21) (p12;q22) en la LLA de tipo B, que no se detecta por las técnicas

citogenéticas convencionales e involucra los oncogenes TEL y AML1. Esta alteración es actualmente la más común en esta leucemia y se observa aproximadamente en el 25 % de los casos. Diversos investigadores han planteado que dicha translocación identifica a un subgrupo de pacientes con una evolución muy favorable, por lo que se considera un indicador de buen pronóstico. La determinación de la t (12; 21) en el estudio de LLA tiene importancia pronóstica, además de servir como marcador para la detección de la enfermedad mínima residual.

7. PRESENTACIÓN CLÍNICA

Al realizar una Historia clínica completa enfocada a identificar los factores de riesgo para desarrollar Leucemia Linfoblástica Aguda, incluyendo los antecedentes de enfermedades genéticas e inmunológicas, además de inmunizaciones aplicadas. En general los pacientes de inicio presentan un cuadro clínico insidioso y los signos y síntomas reportados en la literatura internacional incluyen fiebre (61%), hemorragias (48%), dolor óseo (23%), linfadenopatías (50%), esplenomegalia (63%) y hepatomegalia (68%).

La fiebre es el más común de los signos, en un tercio de los pacientes es producida por la misma leucemia y por lo general aparece después de la terapia de inducción por cursar con neutropenia grave.

La astenia y adinamia son en frecuencia el segundo síntoma que presentan estos pacientes casi en el 50% debido a la presencia frecuente de anemia.

La palidez de piel y tegumentos se presenta en tercer lugar con un 40%, atribuido a la anemia, enfatizando además que es debida a la hipoproducción de serie roja secundaria a la infiltración de blastos a nivel medular.

Presentan trastornos de la coagulación y trombocitopenia con la consecuente presencia de hemorragias en varios niveles en un 35% de los casos.

Aproximadamente en más del 50% cursa con adenopatías, hepatomegalia y esplenomegalia que son manifestaciones de diseminación linforeticular extramedular.

La masa mediastinal está presente especialmente en pacientes con LLA de células T y cursa con síntomas de compresión de inicio disnea hasta síndrome de vena cava superior.

Un sitio santuario involucrado son los testículos, es raro que se presente al diagnóstico, se presenta con aumento del volumen testicular, no doloroso sin cambios de coloración y frecuentemente unilateral, diagnosticado por biopsia en un 25% de los pacientes.

Investigar el tiempo de evolución de la sintomatología, tomando como base un promedio de 4 a 6 semanas e investigar la presencia de los 5 síndromes que se presentan en la Leucemia Linfoblástica Aguda.

1.- Síndrome anémico: Se caracteriza por la presencia de palidez y síntomas de hipoxia como: fatiga, irritabilidad, astenia, adinamia, somnolencia, secundarios a la disminución de la hemoglobina.

2.- Síndrome neutropénico: Se caracteriza por fiebre y/o procesos infecciosos persistentes o recurrentes, secundarios a neutropenia.

3.-Síndrome purpúrico: Se caracteriza por petequias púrpura, equimosis, epistaxis, gingivorragia u otras manifestaciones de sangrado secundarias a la trombocitopenia.

4.- Síndrome Infiltrativo: Se caracteriza por la presencia de dolor óseo; adenomegalias; hepatomegalia; esplenomegalia; infiltración a piel, parótidas, encías, testículos; formación de tumores sólido, leucocitosis y masa mediasinal.

5.- Síndrome metabólico: Se caracteriza por alteraciones bioquímicas que reflejan la carga tumoral total y son la consecuencia de la proliferación y destrucción excesiva de las células leucémicas. Las alteraciones encontradas son: hiperuricemia, hiperkalemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, elevación de la creatinina y elevación de la deshidrogenasa láctica. (síndrome de lisis tumoral).

La infiltración a Sistema Nervioso Central en general al momento del diagnóstico es de aproximadamente 5% en los pacientes con LLA de células B y puede llegar hasta un 15% para la LLA de células T. en general es asintomática pero cuando se llega a manifestar presentan incremento de la presión intracraneal, cefalea, vomito, papiledema y parálisis de nervios craneales, convulsiones, hemiparesia, síndromes cerebelosos, ataxia, dismetrías, hipotonías, hiperreflexia o síntomas hipotalámicos como polifagia, hirsutismo y alteraciones en el comportamiento.

Las tres categorías de involucro al Sistema Nervioso Central:

-SNC 1: Líquido cefalorraquídeo negativo para blastos independientemente del recuento leucocitario.

-SNC 2: Líquido cefalorraquídeo con menor de 5 células por microlitro y positivo para blastos.

-SNC 3: Líquido cefalorraquídeo con 5 o más células por microlitro y positivo para blastos.

8. FACTORES DE RIESGO

Se enlistan diversas características que afectan el pronóstico:

-EDAD: La edad en el momento del diagnóstico es de gran importancia biológica, ya que refleja la diferencia de la biología subyacente de LLA en diferentes grupos etáreos:

-- menores de un año: los lactantes con LLA tienen un riesgo particularmente alto de fracaso al tratamiento. El fracaso es más común en menores de 6 meses con recuentos leucocitarios extremadamente altos en el momento de la presentación, respuesta pobre a la profase de la prednisona y con reordenamiento del gen MLL y mayor incidencia de compromiso de SNC. Se revelaron diferencias importantes entre los pacientes menores de 90 días y los lactantes mayores, lo que indica comportamientos biológicos distintivos según la edad para la LLA por traslocación de MLL.

Los niños pequeños de 1 año a menores de 10 años tienen una mejor supervivencia, el pronóstico mejorado se explica por la mayor frecuencia de características citogenéticas favorables en los blastos leucémicos, como hiperploidia con 51 o más cromosomas o trisomías cromosómicas favorables.

Los niños mayores de 10 años, la tasas de supervivencia a aumentado hasta el 72%, se ha reportado que tienen un mejor desenlace cuando se tratan con protocolos usados en niños, en lugar de aquellos usados para adultos.

Un recuento leucocitario en el momento del diagnostico mayor a 50 000 por microlitro se utiliza, por lo general, como punto de corte operativo entre un mejor y peor pronóstico. Los pacientes con LLA de células B precursoras e hiperleucocitosis tienen un aumento de riesgo de fracaso en el tratamiento.

9. Grupos de Riesgo

Los grupos de ensayos clínicos que estudian la LLA han utilizado sistemas de clasificación de riesgo para asignar a los pacientes al tratamiento con base en el riesgo calculado de fracaso de tratamiento. En el sistema inicial se utilizan factores clínicos como edad y recuento de leucocitos, se agrega la respuesta morfológica temprana de la medula osea, actualmente se agrega características moleculares.

-Riesgo estándar: protocolo FARBER (debe cumplir con todos los criterios)

Edad >1 año y <9.9 años

Cuenta de leucocitos al diagnostico <50000/mm³

Punción lumbar en el día 0 con LCR en SNC-1

Si la punción es traumática con 10/mcl o LCR con > 100 eritrocitos en el frotis y no se observan blastos.

Ausencia de afectación a pares craneales

Inmunofenotipo B +

Ausencia de inmunofenotipo T

Ausencia de ensanchamiento mediastinal

Ausencia de infiltración testicular

Hiperploidia mayor de 50 cromosomas

Índice de DNA mayor a 1.6

T (12:21) o gen de fusión TEL/AML1

Buena respuesta a la ventana esteroidea

Medula ósea en el día 14 <5% de blastos

Medula ósea del día 28 con criterios de remisión completa

-Riesgo alto (debe cumplir con un solo criterio)

Edad menor de 1 año y mayor de 10 años

Cuenta de leucocitos al diagnostico >50000/mm³

SNC 2 o SNC 3

Si la punción es traumática con 10/mcl o LCR con > 100 eritrocitos en el frotis y se observan blastos.

Afectación a pares craneales

Inmunofenotipo T

Ensanchamiento mediastinal

Infiltración testicular

Hipoploidia menor de 50 cromosomas

Índice de DNA menor a 1.6

Traslocaciones t (1:19) o gen de fusión E2APBX1

T (4:11) o gen de fusión MLL o t (9:22) o gen de fusión de BCR/ABL que no tengas otros criterios para muy alto riesgo.

Pobre respuesta a la ventana esteroidea

Medula ósea en el día 14 >5% de blastos.

Dana Farber Cancer Institute

En el ensayo clínico actual realizado los pacientes con LLA de células B precursoras se clasifican inicialmente como de riesgo estándar o alto según la edad, el recuento leucocitario de presentación y la presencia o ausencia de enfermedad en el sistema Nervioso Central. Tras completar un régimen de inducción a la remisión con cinco fármacos a las cuatro semanas del diagnóstico, el índice de Enfermedad Residual Mínima (ERM) se determina por medio de ensayo de la PCR. Los pacientes con ERM alta (>0.001 se clasifica como de riesgo muy alto y reciben una consolidación más intensiva posterior a la remisión. Los pacientes con ERM baja <0.001 continúan recibiendo tratamiento según su clasificación inicial del grupo de riesgo. El objetivo de este nuevo esquema de clasificación es determinar si la intensificación del tratamiento mejorara el desenlace de los pacientes con ERM alta al final de la remisión. Los pacientes con LLA de células T se tratan de alto riesgo, independientemente del estado de la ERM. Todos los pacientes con traslocaciones de MLL o hipoploidia (<44 cromosomas) se clasifica como riesgo muy alto, independientemente del estado de la ERM o el fenotipo.

Enfermedad mínima residual

El estudio de enfermedad mínima residual por citometría de flujo ha permitido profundizar en el estudio de medula ósea. El nivel de células indetectable por métodos morfológicos u citoquímicos convencionales se ha modificado por medio de la enfermedad mínima residual que permite identificar este número de células. Es una medición molecular de la leucemia donde es capaz de detectar células anormales, una célula en 10000 células normales o más lo que es cuantitativamente más sensibles que las técnicas usuales.

Actualmente algunos grupos relacionan los niveles de Enfermedad mínima Residual en el día 19 con mejor pronóstico; el estudio se realiza al día 15 y 33 relacionándose como predictor de recaída en más del 90 % de los casos.

9. Fases de Tratamiento

9.1 Inducción a la remisión

El objetivo de la primera fase es inducir una remisión completa disminuyendo logaritmos de células tumorales hasta 10⁸, suele durar 4 semanas. En general cerca del 98% de los pacientes recién diagnosticados con células B precursoras alcanzan la remisión completa hasta el final de la fase, los pacientes con leucemia de células T o con recuentos leucocitarios altos en el momento de la presentación tiene tasas relativamente más elevadas. Los quimioterápicos que se incluyen son

vincristina, esteroides, L asparginasa, antraciclinas, doxorrubicina. De aquellos que no logran alcanzar la RC en las cuatro semanas, presentaran muerte por toxicidad durante la fase de inducción y la otra mitad presentara enfermedad resistente.

9.2 Fase de intensificación

Se administra tratamiento sistémico en conjunto con terapia dirigida a SNC; la intensidad de quimioterapia varía de acuerdo al grupo de riesgo, el esquema de intensificación se usa con mayor frecuencia la terapia básica. Incluye los siguientes aspectos: una consolidación inicial inmediatamente después de la fase de inducción inicial, en esta fase se incluye ciclofosfamida, citarabina en dosis baja y tiopurina (mercaptopurina tioguanina)

9.3 Fase de consolidación

Una consolidación inmediatamente después de fase de inducción inicial incluye ciclofosfamida, citarabina y mercaptopurina a diferentes dosis de acuerdo a la clasificación de riesgo.

9.4 Fase de mantenimiento

En la mayoría de los protocolos la terapia básica de mantenimiento incluye mercaptopurina oral diaria y metotrexate oral o parenteral cada semana, el control minucioso de los pacientes en esta fase es imprescindible tanto por la toxicidad relacionada a fármacos como al apego terapéutico, la quimioterapia intratecal para la terapia santuario del SNC continua durante la terapia de mantenimiento, se ha visto que la falta de apego al tratamiento oral se relaciona con aumento significativo del riesgo de recaída. Los pulsos de vincristina y corticosteroides se añaden con frecuencia a la terapia básica de estándar de mantenimiento, por lo general, la quimioterapia de mantenimiento hasta los 2 o 3 años de remisión completa. La prolongación de la terapia de mantenimiento por mas de 3 años no mejora el pronstico.

ANTECEDENTES

Cortactina y HS1 son proteínas homólogas de unión a actina, que participan en la adhesión y migración, se sobreexpresa en las células oncológicas y se asocian a la invasión.

La sobreexpresión de Cortactina en células de cáncer sólidos se asocia a mal pronóstico, relacionado con su agresividad y capacidad de invasión (3).

La sobreexpresión de Cortactina y HS1 muestra una asociación con mal pronóstico en pacientes con Leucemia Linfoblástica Crónica (4).

Estudios preliminares muestran que las células oncológicas de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda presentan heterogeneidad de altos niveles de Cortactina (Estudios preliminares proyecto HIM)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente aproximadamente el 80% de los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda que reciben diagnóstico oportuno y tratamiento adecuado sobreviven a largo plazo. Varios estudios ha reportado que existe en las células leucémicas una sobreexpresión de cortactina y HS1, basándose en la participación que tienen en la adhesión celular y en la migración controlados por GTPasas, dinámica de actina y reclutamiento de moléculas de adhesión en los leucocitos, lo que expresa una probable responsabilidad de la infiltración extramedular.

La relación que existe entre la presencia de estas proteínas y la clasificación de riesgo de la Leucemia Linfoblástica Aguda en el momento del diagnóstico proveerá información pronóstica para un tratamiento oportuno y evitar infiltración a diversos órganos, ya que se ha relacionado su participación en estudios previos con una alta capacidad de migración a tejidos.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Existe asociación entre el nivel de Cortactina y HS1 con la clasificación de riesgo en los pacientes con Leucemia Linfoblástica aguda infantil en Hospital Infantil de México Federico Gómez?

JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda LLA es una de las principales causas de muerte en infantes, y a pesar que el implemento de nuevos tratamientos ha logrado aumentar la sobrevivencia, factores como la infiltración de células leucémicas a sistema nervioso central, hígado, bazo, pulmón o testículo causando metástasis, cambian el pronóstico de la enfermedad y ponen en riesgo la remisión de estos pacientes. Hasta el momento se desconocen los mecanismos que permiten que estas células o sus precursoras tengan una localización extramedular, diversos grupos de investigación se han enfocado en el estudio de alteraciones en moléculas relacionadas con la capacidad migratoria y de su retención dentro de la médula ósea para tratar de explicar la infiltración en otros órganos. Se sabe que cortactina y HS1 están sobreexpresadas en células leucémicas, y que la ausencia de cortactina y HS1 reduce la transmigración de leucocitos Sin embargo, es incierto como éstas proteínas regulan la diseminación de las células progenitoras hematopoyéticas iniciadoras de la leucemia.

Las leucemias infantiles representan la principal causa de mortalidad en la población infantil, es considerada como prioridad de salud infantil.

La incidencia en México de 73.5 casos por millón en niños por un año. Y representa una mortalidad de 5.4 por cada 100 000 niños anualmente.

La Cortactina y HS1 podrían estar asociadas a la agresividad de la patología e invasión, por lo que la investigación de su papel biológico y la asociación con las características clínicas del paciente podrían tener un impacto favorable en el pronóstico y tratamiento oportuno de las leucemias agudas.

Actualmente el Hospital Infantil de México Federico Gómez es considerado un centro de referencia y concentración nacional para pacientes oncológicos y cuenta con la infraestructura para sospecha, diagnóstico y tratamiento de leucemias infantiles.

Este proyecto basado en el protocolo con registro HIM 2015-051, será dirigido con la colaboración activa de los siguientes institutos e investigadores:

Hospital Infantil de México Federico Gómez
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Biomedicina Molecular CINVESTAV

Tendrá un impacto social en caso de confirmar la hipótesis, pues ayudará con el pronóstico temprano y tratamiento oportuno para evitar las metástasis.

El resultado será de amplia magnitud para la salud por ser un problema prioritario.

OBJETIVOS

GENERAL

Determinar si existe asociación entre la expresividad de Cortactina y HS1 en médula ósea de pacientes con la clasificación de riesgo de Leucemia Linfoblástica Aguda.

ESPECÍFICOS

- Identificar la expresión de Cortactina y HS1 en médula ósea de pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.
- Clasificar el riesgo de la Leucemia Linfoblástica aguda en pacientes de nuevo diagnóstico.
- Relacionar los niveles de Cortactina y HS1 con la clasificación de riesgo de Leucemia Linfoblástica aguda a través de diversos métodos estadísticos.

HIPÓTESIS

Se espera que los niveles de cortactina y HS1 tengan una asociación directa con la clasificación de riesgo, considerando que Cortactina y HS1 se encuentran sobreexpresados en las células hematopoyéticas de niños con leucemia linfoblástica aguda.

MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, transversal, prospectivo y analítico en el que se estudiaron pacientes pediátricos mexicanos del Hospital Infantil de México Federico Gómez con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda de Novo y en recaída en edades de 0 a 18 años en un periodo de 01.12.15 a 01.12.16

Descriptivo: Todo estudio cuyos datos son utilizados con la finalidad puramente descriptiva.

Transversal: En el que se examina la relación entre una enfermedad y una serie de variables en una población determinada.

Prospectivo cuyo inicio es anterior a los hechos estudiados y los datos se recaban a medida que se van presentando.

Analítico porque evalúa una presunta relación causa efecto.

Se analizaron características clínicas, bioquímicas, por citometría de flujo e intensidad media de fluorescencia en aspirados de medula ósea en busca de determinación cuantificación de cortactina en el momento del diagnóstico y en los casos de recaída, además de estudiar la diferenciación celular por clasificación morfológica, inmunofenotipo y citogenética.

Se aplicó metodología con correlación de Pearson y diferencia de medias con U de Mann Whitney.

Criterios de inclusión:

Edad 0-18 años

Sexo indistinto.

Diagnóstico de primera vez y recaídas.

Sin terapia previa en primera vez.

Criterios de exclusión:

Edad mayor a 18 años

Pacientes con Leucemia Linfoblástica aguda con tratamiento previo.

Criterios de eliminación

Pacientes sin estudios moleculares.

Pacientes sin expediente clínico

CONSIDERACIONES ÉTICAS

En la investigación ética lleva implícito el reconocimiento de un juicio y es materia de discusión, análisis y evaluación; y de acuerdo al Código de Nuremberg sólo las personas mentalmente competentes pueden ser sujetos de investigación, cuestión que fue ampliada en la Declaración de Helsinki hacia las personas con discapacidad mental y los menores de edad mediante la introducción del consentimiento informado del representante o tutor legal. El juicio es efectuado por los miembros de los comités de ética.

La reflexión va encaminada a diversos documentos que definen los requerimientos éticos de las investigaciones, resumidos muy adecuadamente por Ezequiel Emanuel: Valor social y científico, validez científica, justa selección de los sujetos, positiva relación riesgos -beneficios, evaluación independiente, consentimiento informado, y respeto por la autonomía y bienestar de los sujetos. Tales requisitos, aplicables a la investigación biomédica y psicosocial han sido consensuados internacionalmente y se ha dado una extensa discusión al respecto.

Se tiene como consideración general, además, que la ética de la investigación incluye el respeto a su privacidad en la información que suministre, de acuerdo con reglas claras de confidencialidad en el manejo de muestras y datos, esto asociado a que el respeto ético debe considerar la formulación de un problema de investigación con sentido científico-humano, que deberá ser resuelto con análisis de datos. En conjunto se integran las consideraciones éticas con el objetivo de perpetuar el bienestar del paciente.

De acuerdo a lo anteriormente citado, se expone que nuestro estudio no conlleva ningún tipo de riesgo humano ni científico, por lo que la consideración ética aplicable es el respeto a la confidencialidad de datos.

PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA ESTADÍSTICA INFERENCIAL MEDIDAS DE CORRELACIÓN

El análisis de las variables se realizó utilizando el método de correlación de Pearson y diferencia de medias por el método U de Mann Whitney.

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	CONCEPTO	OPERACIONAL	ESCALA DE MEDICIÓN	TIPO DE VARIABLE
EDAD	Tiempo que ha transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo.	Interrogatorio	Años y meses	Numérica continua
SEXO	Características genóticas y fenotípicas de los seres humanos	Genero	cualitativa	Dicotómica nominal
CRITERIO DE RIESGO AL DIAGNÓSTICO	Clasificación de pacientes en base a características inmunobiológicas.	Análisis de características	Suma de variables	Dependiente
CUENTA LEUCOCITARIA AL DIAGNÓSTICO	Numero de glóbulos blancos en la primera biometría hemática	Reporte de laboratorio clínico	Cuantitativa en serie	Independiente
INMUNOFENOTIPO	Características inmunológicas y genéticas de un organismo	Detección de anticuerpos monoclonales de superficie T o B por citometría de flujo.	Cuantitativa	Dependiente

MORFOLOGÍA	Características estructurales de la célula.	Forma, tamaño, núcleo, citoplasma	Cualitativa	Descriptiva
TRASLOCACIONES	Intercambio entre dos fragmentos de cromosomas.	Cariotipo	Cuantitativa técnica de bandeado GTG	Dependiente
INFILTRACIÓN A SNC	Presencia de células leucémicas al SNC	Líquido cefalorraquídeo citometría de flujo	Cuantitativa de blastos	Dependiente
RESPUESTA MEDULAR	Persistencia de linfoblastos en medula ósea con quimioterapia.	Porcentaje de blastos. Observación medula ósea	Cualitativa Mayor o menor de 5%	Dicotómica nominal
INFECCIONES QUE RETRASEN LA QUIMIOTERAPIA	Invasión y crecimiento de un microorganismo en el cuerpo	Clínica	Abordaje infectológico	Independiente
SÍNDROME INFILTRATIVO	Se caracteriza por dolor óseo; adenomegalias; hepatomegalia; esplenomegalia; infiltración a piel, parótidas, encías, testículos.	Clínico	Cualitativa	Dependiente
SÍNDROME ANEMICO	Se caracteriza por la presencia de palidez y síntomas de hipoxia como: fatiga, irritabilidad, astenia, adinamia, somnolencia, secundarios a la disminución de la hemoglobina.	Clínico y hemograma	Cualitativa y cuantitativa de cifra de hemoglobina	Dependiente

SÍNDROME NEUTROPENICO	Se caracteriza por fiebre y/o procesos infecciosos persistentes o recurrentes, secundarios a neutropenia.	Clínico y hemograma	Cuantitativo de cifras de neutrófilos	Dependiente
SÍNDROME HEMORRAGIPARO	Se caracteriza por petequias púrpura, equimosis, epistaxis, gingivorragia secundarias a la trombocitopenia.	Clínico y hemograma	Cualitativa y cuantitativa de cuenta plaquetaria	Dependiente
SÍNDROME DE LISIS TUMORAL	Se caracteriza por alteraciones bioquímicas que reflejan la carga tumoral total y son la consecuencia de la proliferación y destrucción excesiva de las células leucémicas. Las alteraciones encontradas son: hiperuricemia, hiperkalemia, hipocalcemia, hiperfosfatemia, elevación de la creatinina y elevación de la deshidrogenasa láctica. (Síndrome de lisis tumoral).	Reporte de laboratorio clínico	Cuantitativa de valores bioquímicos	Dependiente

RESULTADOS

En el presente estudio se obtiene una muestra de 16 pacientes (100%), quienes ingresan con diagnóstico de síndrome infiltrativo y anémico con sospecha diagnóstica de Leucemia Linfoblástica Aguda, las principales características encontradas en la sintomatología fue palidez, astenia, adinamia, pérdida de peso, ganglios cervicales, axilares, inguinales, poplíteos, hepatoesplenomegalia.

Dentro de estos datos se obtiene

Característica		MUESTRA "N"	PORCENTAJE
sexo	Masculino	9	56.25%
	Femenino	7	43.75%
Edad	Menor de 1 año	0	0%
	1-2 años	4	25%
	3 a 5 años	3	18.75%
	6 a 9 años	3	18.75%
	Mayor a 10 años	6	37.5%
Leucocitos	>50000	4	25%
	<50000	12	75%
Línea celular	B	16	100%
	T	0	0%
Morfología	L1	4	25%
	L2	8	50%
	M1	2	12.5%
	M3	1	6.25%
	NO ENCONTRADO	1	6.25%
Inmunofenotipo	Pro B	6	37.5%

	Pre B	7	43.75%
	Pre –Pro B	1	6.25%
	NO CONCLUYENTE	2	12.5%
Respuesta al esteroide	Si	13	81.25%
	No	3	18.75%
Síndrome infiltrativo	Si	15	93.75%
	No	1	6.25%
Síndrome anémico	Si	13	81.25%
	No	3	18.75%
Respuesta medular	Día 7	6	37.5%
	Día 14	6	37.5%
	Día 21	2	12.5%
	Día 28	1	6.25%
	No reportado	1	6.25%
Traslocaciones	Positiva	6	37.5%
	Negativa	10	62.5%
Infiltración a SNC	Positivo	2	12.5%
	Negativo	14	87.5%
Recaída	Positivo	4	25%
	Negativo	12	75%

Se describen 9 pacientes masculinos (56.25%) y 7 femeninos (43.75%), con una relación de 1.2:1 con predominio masculino, el grupo etáreo más común de presentación se encuentra equiparable en un 18.75% en niños de 3-5 y 6-9 años, presentando un predominio en mayores de 10 años con un 37.5%. El recuento leucocitario se encontró en un 75% con valor pronóstico de riesgo habitual correspondiente a recuento leucocitario menor a 50 000; la línea celular alterada se encontró en un 100% de linaje B y morfológicamente un 50% de los pacientes con características de L2 de acuerdo a la FAB, con reporte de inmunofenotipo Pre B en un 43.75%, Pro B en un 37.5%, pre-pro B 6.25% y con reporte no concluyente en un 12.5%.

La respuesta al tratamiento se evaluó con la ventana esteroidea, en donde se observó que el 81.25% de los pacientes presentaron disminución del porcentaje de blastos y un 18.75% reportados sin respuesta al persistir con porcentaje elevado de células inmaduras.

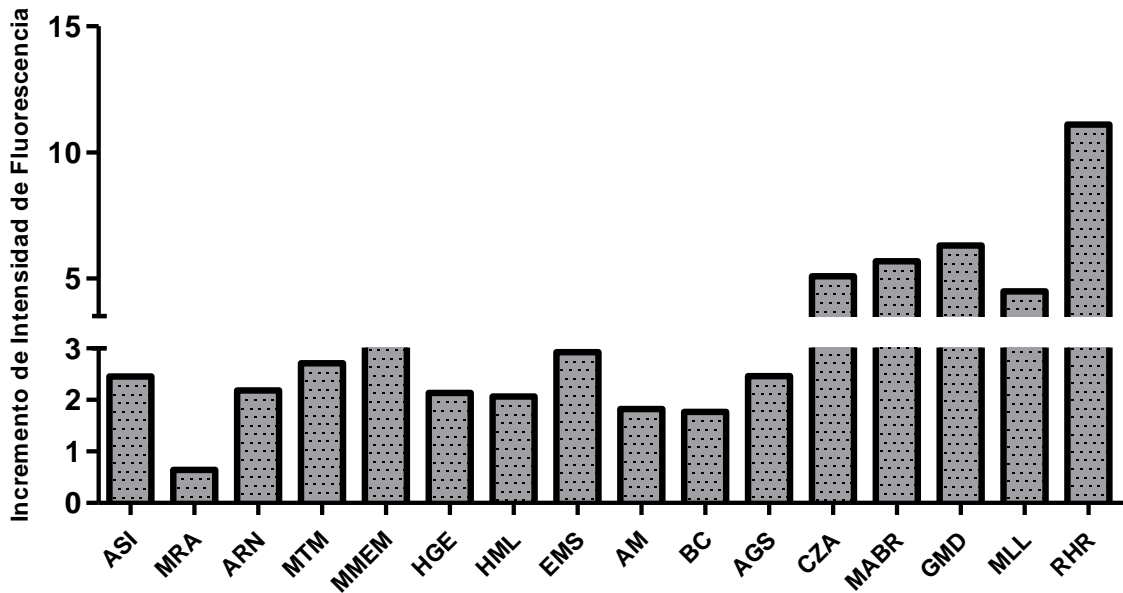
Se evaluó la remisión a medula ósea encontrando valores equiparables con 37.5% presentando remisión a los 7 y 14 días con reporte menor al 5% de blastos, y en un 12.5% no se presentó respuesta en medula ósea persistiendo hasta el día 21 con un reporte de blastos mayor al 5%, en menor porcentaje se encuentra 6.25% correspondiente a la remisión el día 28.

El panel de traslocaciones fue positivo en un 37.5% y negativo en 62.5% .

En el abordaje diagnóstico con punción lumbar se encontró en el 87.5% con reporte negativo a infiltración a Sistema Nervioso Central.

Clínicamente las manifestaciones que predominaron fueron el conjunto de signos y síntomas con integración de síndrome infiltrativo en 93.75% de los pacientes a expensas de adenomegalias dolorosas en región cervical, axilar, inguinal, poplítea, además de hepatomegalia y esplenomegalia. Al examen inicial clínico y con biometría hemática se reporta un 81.25% de los casos con presencia de síndrome anémico a expensas de palidez generalizada, sintomatología de malestar general y disminución en la cifra de hemoglobina.

EXPRESIÓN DE CORTACTINA



Grafica 1. Intensidad media de fluorescencia (IMF), correspondiente a los niveles de cortactina en las poblaciones de precursores y progenitores en médula ósea de pacientes con LLA.

Los niveles de expresión de cortactina analizados por citometría de flujo y reportados como intensidad media fluorescencia, se encuentran elevados en 81.25% de los pacientes correspondiente con los pacientes clasificados en Alto riesgo, correspondiendo a la adición de otras variables de riesgo como edad, hiperleucocitosis, presencia de traslocaciones, infiltración primaria a sistema nervioso central, pacientes sin respuesta a esteroide y recaída.

CORRELACIÓN DE VARIABLES

Variable	Valor de p
Edad	0.882
DHL	0.522
Hiperleucocitosis	0.722
Hemoglobina	0.329

Leucocitos	0.998
Plaquetas	0.095
Blastos en sangre periférica	0.691
Blastos en médula ósea	0.209

TABLA 1. Correlación de variables: SPSS Valores de cortactina y variables aplicando la correlación de Pearson.

DIFERENCIA DE MEDIAS ENTRE CORTACTINA Y VARIABLES

Variable	Valor de p
Respuesta inicial a esteroide	0.051
Adenomegalias	0.013
Recaída	0.005
Hiperleucocitosis	1.000
Hepatomegalia	0.711
Esplenomegalia	0.903
Citopenias	0.533
Inmunofenotipo	0.572
Traslocación	0.556
Infección en inducción a la remisión	0.545
Riesgo	0.382
Sexo	0.791
Edad	0.386
Defunción	0.313

TABLA 2. Diferencia de Medias entre Cortactina y variables estudiadas: SPSS Relación entre los valores de cortactina y las variables aplicando diferencia de medias mediante U Mann Whitney. Valores de p significativos <0.05 .Destacando Respuesta al esteroide (p= 0.051), adenomegalias (p= 0.013) y recaídas (p= 0.005) en pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda.

DISCUSIÓN

Se han analizado los niveles de expresión de cortactina en médula ósea en 16 pacientes diagnosticados con Leucemia Linfoblástica Aguda, de acuerdo al análisis de datos en expediente clínico y la aplicación de los métodos estadísticos hemos observado una correlación de los niveles de expresión de cortactina en médula ósea con el desarrollo de la enfermedad y factores de riesgo como las variables consideradas en éste estudio; es de destacarse que la mayoría de las variables, que se toman como factores de riesgo en éste análisis corresponden con el 81.25% de los pacientes que se encuentran clasificados en Alto Riesgo.

Se observa que en el 25% de los pacientes se presenta una expresión mayor de cortactina que supera los valores altos respecto a los pacientes considerados de alto riesgo y que de acuerdo al análisis clínico, bioquímico y estadístico se evidencia una correlación estrecha con pacientes que presentaron recaída a médula ósea y de estos el 50% adicionalmente se corroboró mala respuesta al esteroide, como factor de riesgo adicional; dichos sucesos son importantes ya que en otro tipo de neoplasias, incluyendo a LLC-B, cortactina se encuentra sobreexpresada y se le ha relacionado con factores de riesgo y metástasis.

Al ingresar los datos de nuestra base a un programa estadístico SPSS; informático de correlación para verificar la significancia entre variables, obtuvimos que la relación que existe entre los niveles de cortactina elevados y las variables estudiadas se evidencia con la diferencia de medias utilizando U de Mann Whitney, ya que la media de cortactina es mayor en pacientes que no respondieron a la terapia inicial con esteroides, lo cual representa una $p=0.051$, además de la forma de presentación de la enfermedad con síndrome infiltrativo representado por la presencia de adenomegalias principalmente, correspondiendo a un valor de $p=0.013$, y en cuanto a la expresión de cortactina mayor que la media en pacientes que presentaron recaída a médula ósea, correspondiente a una $p=0.005$, destacando esta última variable por la importancia en la evolución clínica.

De acuerdo al análisis estadístico existe la relación mencionada, sin embargo cabe mencionar que para ampliar y solidificar estos resultados se requiere una mayor muestra de pacientes.

CONCLUSIÓN

Con el estudio clínico, de acuerdo a la forma de presentación y al motivo de consulta; bioquímico con la medición de cortactina en médula ósea de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica aguda y estadístico con la aplicación de diferencia de medias con U de Mann Whitney y correlación de Pearson con lo que se integra de acuerdo a las variables estudiadas y factores de riesgo, se determina una asociación entre la expresión alta de cortactina con los pacientes clasificados como Alto Riesgo, llamando la atención una media mayor de cuantificación de cortactina en pacientes que en el seguimiento de la evolución de la enfermedad presentaron recaída.

La importancia del estudio coincide con los pacientes de alto riesgo, teniendo un nivel significativo de relación con los niveles de cortactina, integrando la forma de presentación clínica con síndrome infiltrativo, la probable respuesta o no a la terapia inicial con esteroide y la sospecha de recaída de la enfermedad. Basados en nuestros datos con la sobreexpresión de cortactina y falta de respuesta a terapia inicial con esteroide que se encuentra con $p=0.051$, la relación cortactina con la presencia de recaída, ya que se encuentra con $p=0.005$, con lo que se evidencia que existe una relación entre la expresión elevada de cortactina, factores de riesgo y mal pronóstico de la enfermedad, siendo estas características lo más relevante hasta el momento.

Concluyendo que se establece una asociación directa entre los niveles de cortactina, por lo que se podría utilizar como factor de mal pronóstico de forma temprana para iniciar un tratamiento oportuno y de acuerdo a la sobreexpresión determinar el riesgo de recaída para normar estrategias terapéuticas.

LIMITACIÓN DEL ESTUDIO

Los datos publicados en diferentes protocolos se han percatado de la actividad de cortactina sin embargo, hasta el momento no proveen las bases para realizar un análisis estadístico debido a que actualmente la “N” de estudio no es significativa.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Fecha de inicio: (mes/año)	Noviembre 2015									
	Nov 15	Dic 15	Ene- Feb 16	Mar- Abr 16	May- Jun 16	Jul- Ago 16	Sep- Oct 16	Nov- Dic 16	Ene	Feb
ACTIVIDAD										
Obtención de muestras	XX									
Estandarización de técnica	YA SE TIENE									
Inclusión de pacientes		XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Realización de estudios		XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Análisis de los estudios		XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX
Presentación de resultados										XX
Elaboración de manuscritos										XX
Publicación										XX

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Gupta S, Antillon FA, Bonilla M, Fu L, Howard SC, Ribeiro RC, et al. Treatment-related mortality in children with acute lymphoblastic leukemia in Central America. *Cancer*. 2011;117(20):4788-95.
2. Rivera-Luna R, Correa-Gonzalez C, Altamirano-Alvarez E, Sanchez-Zubieta F, Cardenas-Cardos R, Escamilla-Asian G, et al. Incidence of childhood cancer among Mexican children registered under a public medical insurance program. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2013;132(7):1646-50.
3. MacGrath S, Koleske A. Cortactin in cell migration and cancer at a glance. *Journal of Cell Science*. 2012; 125:621-1626
4. Gattazzo C, Martini V, Frezzato F, et al. Cortactin, another player in the Lyn signaling pathway, is over-expressed and alternatively spliced in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(6):1069-1077.
5. Purizaca J, Meza I, Pelayo R. Early lymphoid development and microenvironmental cues in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Archives of medical research*. 2012;43(2):89-101.
6. Cancela CS, Murao M, Viana MB, de Oliveira BM. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2012;34(6):436-41.
7. Kato I, Niwa A, Heike T, Fujino H, Saito MK, Umeda K, et al. Identification of hepatic niche harboring human acute lymphoblastic leukemic cells via the SDF-1/CXCR4 axis. *PloS one*. 2011;6(11):e27042.
8. Scielzo C, Bertilaccio MT, Simonetti G, Dagklis A, ten Hacken E, Fazi C, et al. HS1 has a central role in the trafficking and homing of leukemic B cells. *Blood*. 2010;116(18):3537-46.
9. ten Hacken E, Scielzo C, Bertilaccio MT, Scarfo L, Apollonio B, Barbaglio F, et al. Targeting the LYN/HS1 signaling axis in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2264-73.
10. Frezzato F, Gattazzo C, Martini V, Trimarco V, Teramo A, Carraro S, et al. HS1, a Lyn kinase substrate, is abnormally expressed in B-chronic lymphocytic leukemia and correlates with response to fludarabine-based regimen. *PloS one*. 2012;7(6):e39902.
11. Katz J. Experimentation without Restriction. En *Experimentation with Human Beings*. New York: Russell Sage Foundation, 1992, 283-292.
12. Emanuel, E. ¿Qué hace que la investigación sea ética? Siete requisitos éticos. OPS/OMS Serie Publicaciones 1999: Investigación en sujetos humanos: Experiencia Internacional. (pp. 33 - 46).

13. Yang L, Kowalski JR, Yacono P, Bajmoczy M, Shaw SK, Froio RM, et al. Endothelial cell cortactin coordinates intercellular adhesion molecule-1 clustering and actin cytoskeleton remodeling during polymorphonuclear leukocyte adhesion and transmigration. *Journal of immunology*. 2006;177(9):6440-9.
14. Yang L, Kowalski JR, Zhan X, Thomas SM, Luscinskas FW. Endothelial cell cortactin phosphorylation by Src contributes to polymorphonuclear leukocyte transmigration in vitro. *Circulation research*. 2006;98(3):394-402.
15. Winter SS. Pediatric acute leukemia therapies informed by molecular analysis of high-risk disease. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2011;2011:366-73.
16. Garcia-Ponce A, Citalan-Madrid AF, Velazquez-Avila M, Vargas-Robles H, Schnoor M. The role of actin-binding proteins in the control of endothelial barrier integrity. *Thrombosis and haemostasis*. 2014;112(6).
17. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. Elisa María Dorantes-Acost, Pérez-Saldivar et al. *BMC Cancer* 2011, 11:355
18. Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. Sabina Chiaretti,¹ Gina Zini² and Renato Bassan³ ¹ Division of Hematology, Department of Cellular Biotechnologies and Hematology, "Sapienza" University of Rome, Rome, Italy.
19. Incidence and risk factors for central nervous system relapse in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia. Camila Silva Peres Cancela Mitiko Murao Marcos Borato Viana Benigna Maria de Oliveira.