



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA**

**“ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE CINASAS ASOCIADAS AL
SUBTIPO SIMILAR BCR-ABL1 EN PACIENTES CON LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA”**

PRESENTA:

DRA. MARÍA EMILIA MENDIZÁBAL RODRÍGUEZ

TUTOR DE TESIS:

DRA. DAFNE LINDA MORENO LORENZANA

CO-TUTOR:

DRA. VICTORIA DEL CASTILLO RUÍZ

ASESORES METODOLÓGICOS:

**DRA. PATRICIA CRAVIOTO Q.
FIS. MAT. FERNANDO GALVÁN C.**

Ciudad de México, 2023



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.

ÍNDICE

1.1 Resumen

1.2 Marco teórico

1.3 Pregunta de investigación 1.4 Planteamiento del problema 1.5 Justificación

1.6 Hipótesis

1.7 Objetivo General

1.7.1 Objetivos secundarios

1.8 Metodología

1. 1.8.1 Tipo y diseño del estudio

2. 1.8.2 Población y tamaño de muestra

3. 1.8.3 Criterios de inclusión

4. 1.8.4 Criterios de exclusión

5. 1.8.5 Reclutamiento de datos clínicos y de laboratorio

6. 1.8.6 Procesamiento de muestras

7. 1.8.7 Definición de variables

8. 1.8.8 Análisis estadístico

1.9 Resultados

1.10 Discusión

1.11 Conclusiones

1.12 Referencias

1.1 Resumen

Título de tesis	Análisis de las vías de señalización de cinasas asociadas al subtipo similar BCR-ABL en pacientes con leucemia linfoblástica aguda.
Autor y tutor	Dra. María Emilia Mendizábal Rodríguez; Dra. Dafne Linda Moreno Lorenzana.
Introducción	El cáncer en población pediátrica es una entidad de gran importancia dada su alta morbilidad y mortalidad en niños menores de 15 años. En México existen anualmente entre 5 mil y 6 mil casos nuevos de cáncer en menores de 18 años. Las leucemias representan el 52% del total de los casos. La mortalidad de esta patología está relacionada directamente con el nivel de falla medular, retraso en el diagnóstico y nivel de clasificación de riesgo. La identificación de alteraciones genéticas, es una herramienta que se ha sugerido como un predictor de mortalidad en pacientes con LLA, asociado a su respuesta al tratamiento.
Justificación	Las alteraciones o anomalías genéticas encontradas en la clona leucémica tienen un impacto importante en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Se han empleado diversos métodos genómicos y moleculares para la identificación de alteraciones en las vías de genes asociados a LLA, sin embargo algunos de ellos no son fácilmente accesibles en nuestro país.
Planteamiento del problema	En México el acceso a metodologías de análisis genómico y bioquímico es limitado.
Objetivo general y específicos	Objetivo general. Analizar las vías de señalización de cinasas asociadas al subtipo similar a BCR-ABL1 en paciente con leucemia linfoblástica aguda. Objetivos secundarios. Identificar la frecuencia de pacientes con alteraciones en la vía de señalización ABL1 y determinar si tiene algún valor pronóstico en la recaída y supervivencia. Identificar la frecuencia de pacientes con alteraciones en la vía de señalización RAS y determinar si tiene algún valor pronóstico en la recaída y supervivencia. Identificar la frecuencia de pacientes

	con alteraciones en la vía de señalización JAK2 y determinar si tiene algún valor pronóstico en la recaída y supervivencia.
Tipo de estudio	Estudio retrospectivo
Criterios de selección	<p>Criterios de inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Con diagnóstico de LLA pre-B, basado en criterios clínicos, citomorfológicos e inmunológicos - En edad pediátrica (0 a 18 años) - Que acepten participar en el proyecto a través de una carta de consentimiento/asentimiento informado. - Con material biológico disponible para realizar análisis de activación de vías de señalización: JAK-JAK-STAT5, ABL, RAS. <p>Criterios de exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Pacientes en los que no se hayan podido obtener muestras con material suficiente (células) para llevar a cabo el estudio.
Va JakAnálisis estadístico	A partir de una base de datos se obtendrán las características clínicas (edad al diagnóstico, cuenta de leucocitos al diagnóstico, estratificación de riesgo, recaídas y supervivencia) de los pacientes analizados en este trabajo. Posteriormente se analizará de manera descriptiva la variante con el cuadro clínico del paciente.

1.2 Marco teórico

Epidemiología

Los cánceres en población pediátrica son entidades raras pero de gran importancia dada su alta morbilidad y mortalidad en niños menores de 15 años. El cáncer infantil en México es un problema de salud pública, al ser la principal causa de muerte por enfermedad entre los 5 y 14 años de edad. (4) En México se estima que existen anualmente entre 5 mil y 6 mil casos nuevos de cánceres en menores de 18 años. Entre los que destacan principalmente las leucemias representando el 52% del total de los casos; linfomas el 10% y los tumores de sistema nervioso central el 10%. (3)

Las leucemias son un grupo de trastornos hematológicos caracterizados por una proliferación disfuncional de células hematopoyéticas que conlleva a falla medular (1). Se pueden clasificar de acuerdo su nivel de diferenciación celular en agudas o

crónicas, así como en mielocíticas o linfocíticas según el tipo celular predominantemente afectado. (2).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) representa el subtipo más frecuente en la población infantil (1). La incidencia en México de pacientes con leucemia linfoblástica aguda en 2015 fue de 79.8/1,000,000 con una tasa de mortalidad de 5.3/100,000 (6). La incidencia específica por edad es más alta en niños de 0 a 4 años y la más baja en niños de 15 a 18 años. La relación entre hombres y mujeres es de aproximadamente 1.2:1, siendo más frecuente en el género masculino. (6)

Factores de riesgo

Se desconoce la etiología de la LLA (7), sin embargo, algunos factores predisponentes son las alteraciones genéticas, hereditarios, ambientales, ocupacionales, nutricionales, fármacos, raza, sexo y agentes infecciosos virales. (9). Se clasifica de acuerdo a sus características morfológicas, bioquímicas, moleculares y citogenéticas. (8).

Dentro de los factores de riesgo asociados a predisposición genética, se han identificado variantes alélicas que se han relacionado con una mayor susceptibilidad a la enfermedad con un efecto adicional. Por lo pronto, la base genética parece ser poligénica. Los genes identificados en estudios de asociación de todo el genoma humano para esta patología están directamente relacionados en la proliferación y diferenciación de las células sanguíneas, lo que sugiere que la variante genética heredada probablemente contribuye directamente a una susceptibilidad genética de las células hematopoyéticas, promoviendo tumorigénesis desde etapa prenatal. (10)

Fisiopatología

La leucemia se origina secundario a la transformación maligna de células troncales hematopoyéticas pluripotenciales. En raras ocasiones, también puede involucrar una célula troncal más comprometida que tiene una capacidad de autorrenovación limitada. En las leucemias agudas, estas células malignas son generalmente leucocitos inmaduros (blastos) poco diferenciados. Estos blastos pueden experimentar expansión y proliferación clonal, lo que lleva al reemplazo y la interrupción del desarrollo y función de los productos sanguíneos normales con células malignas.

Cuadro clínico

La presentación clínica puede ser de inicio abrupto o incidioso y generalmente se asocia al grado de falla medular y la extensión de la infiltración extramedular (8). Los hallazgos más frecuentes son palidez, petequias, equimosis, hepatoesplenomegalia y adenopatías(11). Aproximadamente 50% de los pacientes presenta fiebre, fatiga y letargo, 25% cursan con dolor óseo, mientras que la sintomatología menos común incluye cefalea, vómito, oliguria y anuria. Los pacientes con alta carga tumoral pueden presentar ocasionalmente un recuento total de glóbulos blancos muy alto ($> 1,00, 000/\text{mm}^3$) o síndrome de lisis tumoral. (1)

Diagnóstico

El diagnóstico se confirma por frotis de sangre periférica y/o aspirado de médula ósea. El frotis de médula ósea con $> 25\%$ de linfoblastos leucémicos es confirmatorio de LLA. Si bien la morfología de los blastos puede brindar datos importantes para el diagnóstico, debe confirmarse mediante inmunofenotipificación de la médula ósea. El inmunofenotipo da lugar a las diferentes linajes celulares de LLA, ya sea células pre-B, células T y células B maduras. Se deben realizar las características morfológicas, citoquímicas, inmunofenotípicas, citogenéticas de las células malignas y la búsqueda de rearrreglos genéticos por RT-PCR cuantitativa. (1)

Clasificación

Las células linfoblásticas se pueden clasificar utilizando los criterios franco-estadounidense-británicos (FAB) en subtipos morfológicos. Los linfoblastos de morfología L1 son el subtipo más común (85%) y se asocian con un mejor pronóstico. El subtipo L2 representa el 15% de los casos. Solo el 1-2% de los pacientes con LLA presentan morfología L3. El linfoblasto tiene una relación nuclear:citoplasmática alta y cromatina condensada en comparación con el mieloblasto, que tienen una relación nuclear:citoplasmática baja y una cromatina nuclear esponjosa. (1)

La clasificación por inmunofenotipo describe a la LLA de acuerdo a su derivación de células B o de células T. El 85% de las LLA derivan de células B progenitoras, el 15% deriva de células T y el 1-2% de células B maduras. Existe una relación directa entre el tipo de célula y los tipos de marcadores de superficie presentes en las células. (1)

Las alteraciones o anomalías genéticas encontradas en la clona leucémica tienen un impacto importante en el tratamiento y pronóstico de la enfermedad. Se deben realizar inicialmente estudio de citogenética convencional e hibridación fluorescente in situ (FISH) en la muestra de médula ósea para buscar alteraciones genéticas frecuentes en LLA. Se deben realizar con fines diagnóstico y de seguimiento durante el tratamiento. La presencia de hiperdiploidía (número total de cromosomas > 50, índice ADN > 1.16) se asocia con un buen pronóstico en contraste con el mal pronóstico en pacientes con hipodiploidía (número total de cromosomas < 45 por célula).

Se han reportado translocaciones cromosómicas específicas en la LLA, incluida la t(8;14) asociada con linfoma de Burkitt en LLA de células B, t(4;11) en la leucemia infantil y la t(9;22) conocida como cromosoma Filadelfia, están asociadas con un mal pronóstico. (1).

Las alteraciones citogenéticas más frecuentes en la LLA de células B son la hiperdiploidía en un 25%, t(12;21), MLL en un 5%, hipodiploidía en un 1-5% y t(9;22) en un 4%. (1)

El tratamiento adaptado al riesgo de LLA, que reconoce los grupos de riesgo estándar, intermedio y alto, ha llevado a diferentes enfoques de terapia. Los elementos que forman parte de la definición de estos tres grupos son los factores del huésped como la edad, el sexo, la etnia y las características de la enfermedad, como el recuento total inicial de leucocitos, el inmunofenotipo, las alteraciones citogenéticas y la respuesta al tratamiento. (1). Los dos factores que cobran mayor importancia respecto al pronóstico son la edad en el momento del diagnóstico y el recuento inicial de leucocitos. (1)

Debido a la existencia de métodos de análisis genético más avanzados, como la secuenciación del genoma completo y del transcriptoma, se han podido evidenciar nuevos subtipos genéticos. Una nueva clase de aberraciones genéticas involucra las lesiones que activan la tirosina quinasa, que incluyen translocaciones y reordenamientos de genes receptores de tirosin quinasa y citocina; Habitualmente estas alteraciones genéticas son crípticas e involucran uno de varios genes de tirosina cinasa como el homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson v-abl (ABL1), homólogo 2 del oncogén viral de leucemia murina de Abelson v-abl (ABL2), polipéptido beta del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFRB), cada uno de los cuales se puede fusionar con hasta 15 genes asociados. Juntos disponen el 2-3% de la LLA-B (BCP-ALL), que es similar en tamaño al conocido sugrupo del gen de fusión BCR-ABL1. (13)

En la actualización del 2016 de la clasificación de tumores de tejido hematopoyético de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la leucemia linfoblástica aguda B (LLA -B) se clasifica como LLA-B con alteraciones genéticas recurrentes y LLA-B sin otra especificación. Las anomalías genéticas incluyen t(12;21) (*ETV6-RUNX1*), t(1;19) (*TCF3-PBX1*), t(9;22) (*BCR-ABL1*), t(5;14) (*IL3-IGH*), reordenamiento de *KMT2A*, hipodiploidía e hiperdiploidía. La leucemia linfoblástica aguda con amplificación intracromosómica del cromosoma 21 (*iAMP21*) y la LLA -B similar a *BCR-ABL1* se agregaron como dos nuevas entidades provisionales. (12).

La leucemia linfoblástica B similar a *BCR-ABL1* positivo (Ph like) es una proliferación neoplásica de linfoblastos que tiene un perfil de expresión génica similar al de LLA-B con t(9;22)(q34.1;q11.2) *BCR-ABL1*, pero carece de esa fusión génica. (13).

Actualmente se han descrito más de 60 reordenamientos diferentes y mutaciones genéticas asociadas con esta entidad. Sin embargo, todas estas alteraciones coinciden en una firma de expresión génica común, que se manifiesta como resultado de alteraciones en los genes que activan la señalización del receptor de cinasas y citocinas. Estas alteraciones pueden ser susceptibles a terapias dirigidas con inhibidores de la tirosin quinasa (TKI), incluidos los inhibidores de la vía de la clase ABL y JAK/ STAT, adicionales al tratamiento con quimioterapia convencional. (13)

Las anomalías genéticas asociadas con LLA subgrupo de alto riesgo similar a *BCR-ABL1* positivo coinciden en la activación de las vías de señalización de las cinasas; implicadas en la vía JAK/STAT, los genes de clase ABL y otras que conducen a un aumento en la señalización de las cinasas como IKZF1, FGFR1 y RAS. (13)

Estudios recientes han demostrado que la LLA similar a *BCR-ABL1* se asocia con un pronóstico desfavorable y características clínicas de mayor riesgo como mayor edad, recuento inicial elevado de leucocitos y una tasa más alta de enfermedad mínima residual al final de la fase de inducción. (13).

Debido a las múltiples anomalías genéticas asociadas con la enfermedad, se han descrito distintos enfoques para el diagnóstico de LLA similar a *BCR-ABL1*. Los estudios más utilizados actualmente son el análisis de expresión génica, el análisis de citometría de flujo para la sobreexpresión de CRLF2, la hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y la secuenciación de ARN y ADN de alto rendimiento. El análisis de expresión génica se considera el estándar de oro para identificar LLA similar a *BCR-ABL1* debido a que es la forma más concisa de identificar los casos. (13)

1.3 Pregunta de investigación.

¿Cuál es la alteración de cinasa más frecuente en pacientes con leucemia linfoblástica aguda en nuestra población?

1.4 Planteamiento del problema.

La LLA es un padecimiento asociado a alta morbilidad y mortalidad en población pediátrica en nuestro país. La mortalidad de esta patología esta relacionada directamente con el nivel de falla medular, retraso en el diagnóstico y nivel de clasificación de riesgo. La identificación de alteraciones genéticas y bioquímicas, es una herramienta que se ha sugerido como un predictor de mortalidad en pacientes con LLA, asociado a su respuesta a tratamiento.

1.5 Justificación.

La presencia de activación de vías de señalización independientes de la presencia de positividad de *BCR-ABL* pueden asociarse a peor pronóstico en los pacientes con LLA y representar un blanco terapéutico distinto a los que comúnmente se utilizan para tratar estos pacientes.

1.6 Hipótesis.

Aquellos pacientes con activación de vías de fosforilación tendrán una mayor mortalidad comparada con aquellos que no cuentan con activación de vías de fosforilación.

1.7 Objetivo general.

Analizar las vías de señalización de cinasas asociadas al subtipo similar a *BCR-ABL1* en paciente con leucemia linfoblástica aguda.

1.7.1 Objetivos secundarios.

1. Identificar la frecuencia de pacientes con alteraciones en la vía de señalización ABL1 y determinar si tiene algún valor pronóstico en la recaída y supervivencia.
2. Identificar la frecuencia de pacientes con alteraciones en la vía de señalización RAS y determinar si tiene algún valor pronóstico en la recaída y supervivencia.
3. Identificar la frecuencia de pacientes con alteraciones en la vía de señalización JAK2 y determinar si tiene algún valor pronóstico en la recaída y supervivencia.

1.8 Metodología.

1.8.1 Tipo y diseño del estudio.

Este es un estudio de tipo descriptivo observacional, en el que se busca conocer las características genéticas del subtipo Ph-like en una cohorte de pacientes pediátricos mexicanos con LLA pre-B.

1.8.2 Población y tamaño de muestra

Se revisaron datos clínicos y bioquímicos de 66 pacientes pediátricos (0-18 años) atendidos en el periodo 2013-2019 en el Instituto Nacional de Pediatría, que aceptaron participar en el estudio por medio de una carta de consentimiento informado.

1.8.3 Criterios de inclusión

- Con diagnóstico de LLA pre-B, basado en criterios clínicos, citomorfológicos e inmunológicos.
- En edad pediátrica (0 a 18 años).
- Que acepten participar en el proyecto a través de una carta de consentimiento/asentimiento informado.
- Con material biológico disponible para realizar análisis de activación de vías de señalización: JAK-JAK-STAT5, ABL, RAS.

1.8.4 Criterios de exclusión

- Pacientes en los que no se hayan podido obtener muestras con material suficiente (células, RNA,DNA) para llevar a cabo el estudio.
- Pacientes con datos faltantes en la activación de las vías de señalización

1.8.5 Reclutamiento de datos clínicos y de laboratorio

Este es un estudio ambispectivo en donde los resultados de las determinaciones bioquímicas (activación de las vías de señalización de ABL1, RAS y JAK-JAK-STAT5), fueron realizadas previamente dentro del Laboratorio de Genética y Cáncer.

1.8.6 Procesamiento de muestras

Se contó con un banco de muestras de médula ósea previamente recolectadas, procesadas y preservadas en nitrógeno líquido de los pacientes para la obtención de material biológico para el estudio.

En los blastos leucémicos se analizó la activación de las vías de señalización características de los pacientes del subgrupo Ph-like: ABL, RAS y JAK-JAK-STAT5 mediante Phosphoflow (BD Biosciences, USA).

Las alteraciones de cada una de las vías se evaluaron mediante anticuerpos monoclonales que reconocen blancos directos y fosforilados (o activados), la alteración en la vía JAK-JAK-STAT 5 por su blanco directo JAK-STAT5, la vía ABL por su blanco Crkl y la vía RAS mediante su blanco Erk. Las células fueron analizadas en el citómetro FACSVerse (BD biosciences, USA) y con el software Flowjo 10.0.

1.8.7 Definición de variables

Variable independiente	Definición	Indicadores	Unidades	Escala de medición	Estadísticas
ABL	Alteración en vía de señalización	Activa Inactiva	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica

JAK2	Alteración en vía de señalización	Activa Inactiva	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
RAS	Alteración en vía de señalización	Activa Inactiva	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
Supervivencia	Período después de terminar tratamiento primario durante el que el paciente sobrevive sin signos ni síntomas de la enfermedad.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica
Recaída	Reaparición de la enfermedad o de signos y síntomas después de un período de mejoría.	Presente Ausente	Frecuencia (%)	Nominal	No paramétrica

1.8.8 Análisis Estadístico

Se utilizará el paquete estadístico IBM SPSS v25.0 para realizar el análisis estadístico de los datos.

Los datos se expresaron como medias con desviación estándar en caso de variables de distribución normal, o medianas con rango intercuartilar (P25 -P75) en caso de variables de libre distribución. Las variables cualitativas serán presentadas como frecuencias y proporciones.

Se realizó análisis de supervivencia para cada una de las vías de activación de pERK, STAT5, Src1 y CRKL, comparando los pacientes con la activación de estas vías contra aquellos que no presentaban la activación. Se realizaron gráficas de frecuencia para la expresión de dichos genes.

1.9 Resultados

1.9.1 Datos generales de los pacientes

Se incluyeron un total de 66 pacientes siendo la mitad hombres. La mayoría residían en la Ciudad de México (25 pacientes, 38.5%) y en el Estado de México (13 pacientes, 20%). El resto residían en Guerrero (6.2%), Oaxaca (3%) y otros estados.

Sólo el 5% de los pacientes presentaban algún síndrome genético, siendo estos Asperger, síndrome de Down y síndrome de Klinefelter (1.5% de los pacientes, respectivamente).

Se registró que el 17% de los pacientes presentaban metástasis al sistema nervioso central mientras que 4 pacientes (6%) presentaron metástasis en testículo.

Tabla 1. Características generales de los pacientes

	n=66
Edad, (media, desviación estándar)	8.6 (4.9)
Sexo	
Hombre	33 (50%)
Mujer	32 (48%)
Cuenta leucocitaria al diagnóstico	
<50 x10 ³	24 (36%)
>50 x10 ³	26 (39%)
Riesgo	
Muy alto	1 (2%)
Alto	45 (68%)
Estándar	6 (9%)
Desconocido	14 (21%)
Presencia de síndrome genético	3 (5%)
Esplenomegalia	32 (49.2%)
Hepatomegalia	29 (44.6%)

Tabla 1. Características generales de los pacientes

	n=66
Metástasis en SNC	11 (17%)
Metástasis en testículo	4 (6%)
Síndrome de lisis tumoral	16 (25%)

1.9.2 Desenlaces

En cuanto a los desenlaces, se observó que la gran mayoría de los pacientes presentaron buena respuesta a la inducción (32 pacientes, 49%). Únicamente 1 paciente presentó falla a la inducción con cambio de tratamiento y se registraron 6 pacientes con mala respuesta (9%).

Se observó que 26% de los pacientes presentaron recaída, siendo el sitio más frecuente médula ósea y médula ósea con SNC.

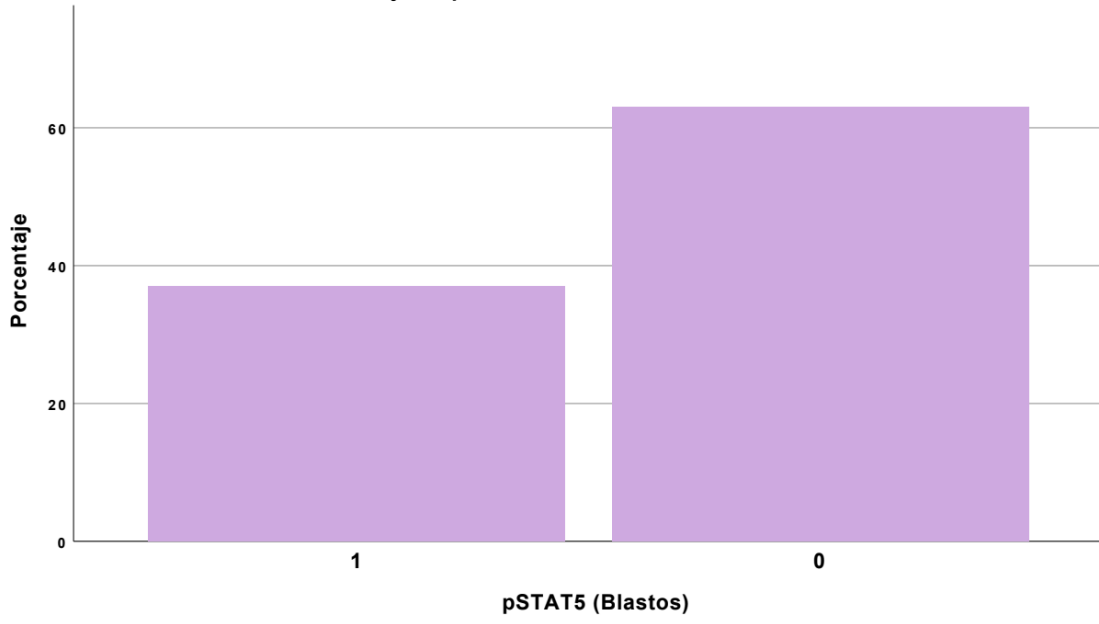
Tabla 2. Desenlaces

	n=66
Respuesta a la inducción	
Buena	32 (50%)
Mala	6 (9%)
Falla a la inducción	1 (2%)
Recaída	
Sí	17 (26%)
No	29 (45%)
Estándar	6 (9%)
Desconocido	14 (21%)

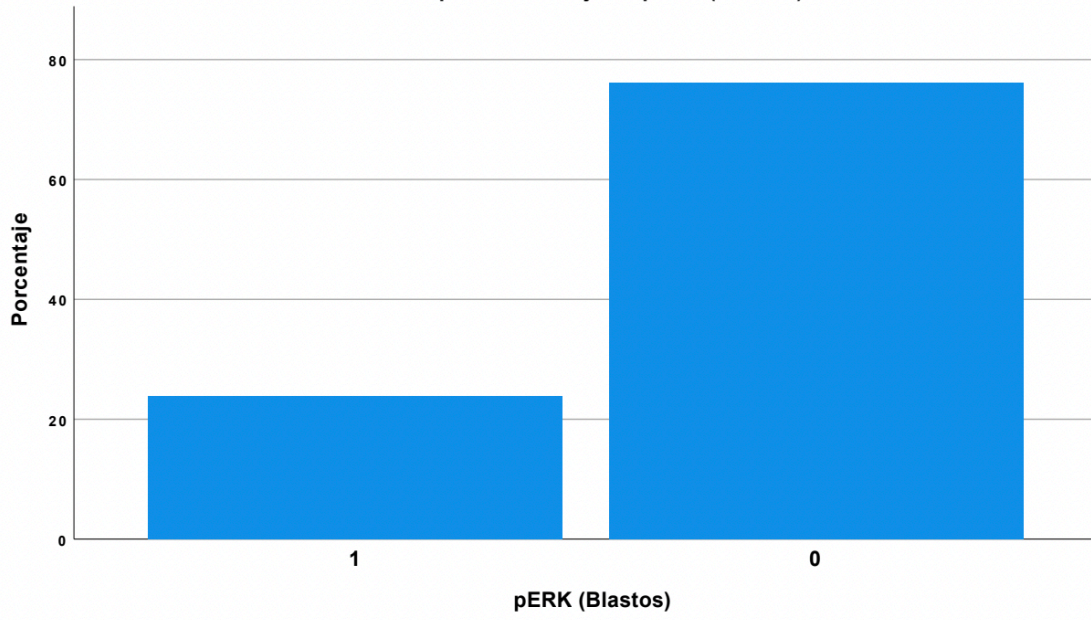
1.9.4 Frecuencia de positividad de los blancos fosforilados.

A continuación se muestran las gráficas de porcentaje de positividad de los blancos fosforilados en la población estudiada.

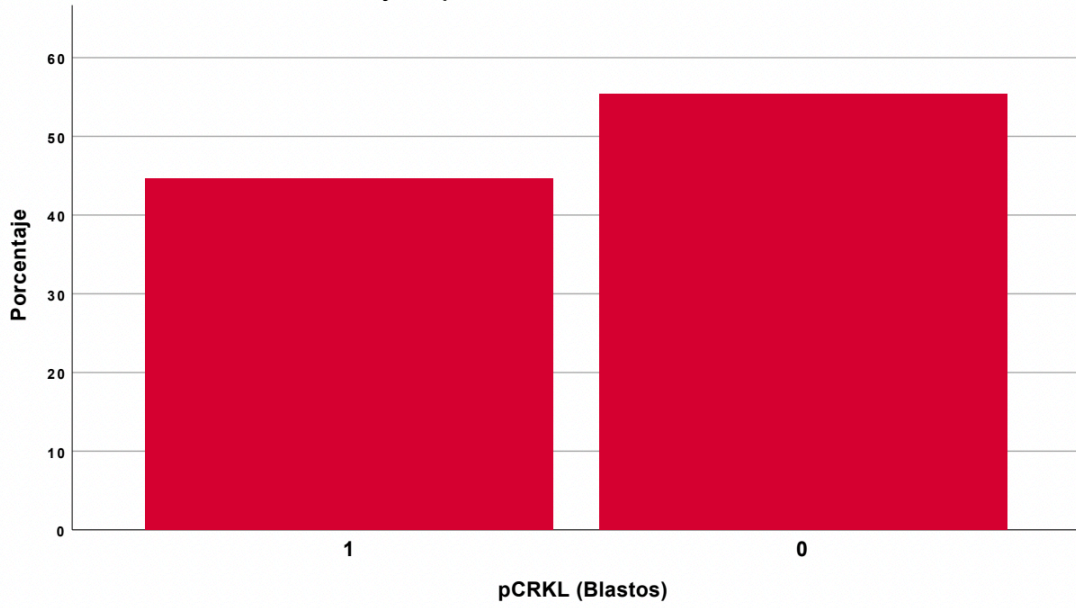
Porcentaje de positividad de blancos fosforilados



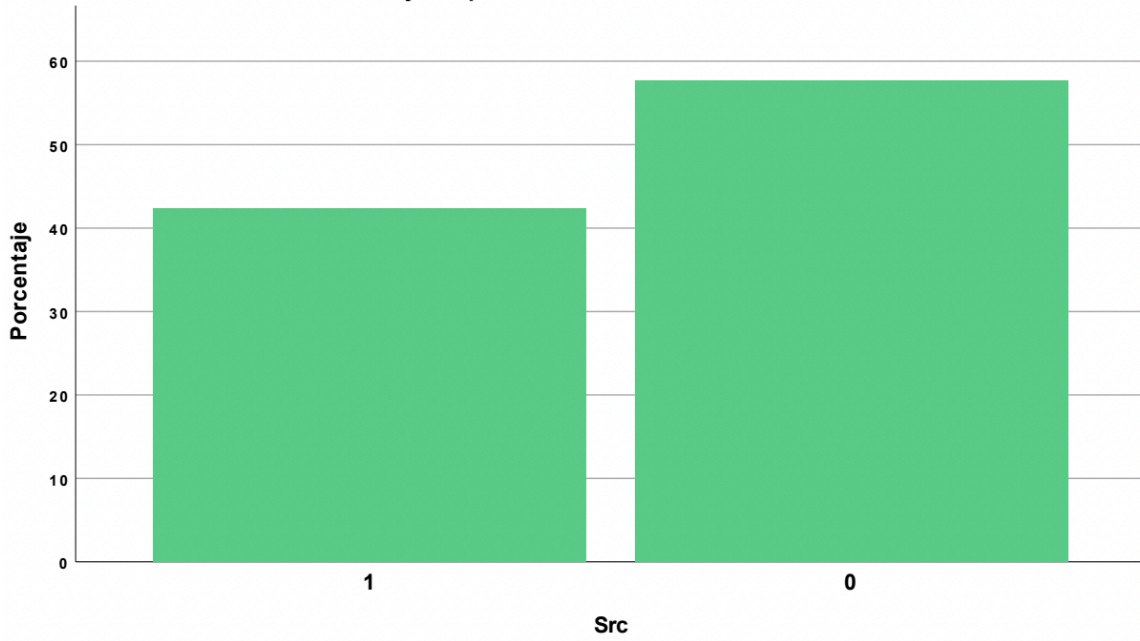
Barras simples Porcentaje de pERK (Blastos)



Porcentaje de positividad de blancos fosforilados



Porcentaje de positividad de blancos fosforilados

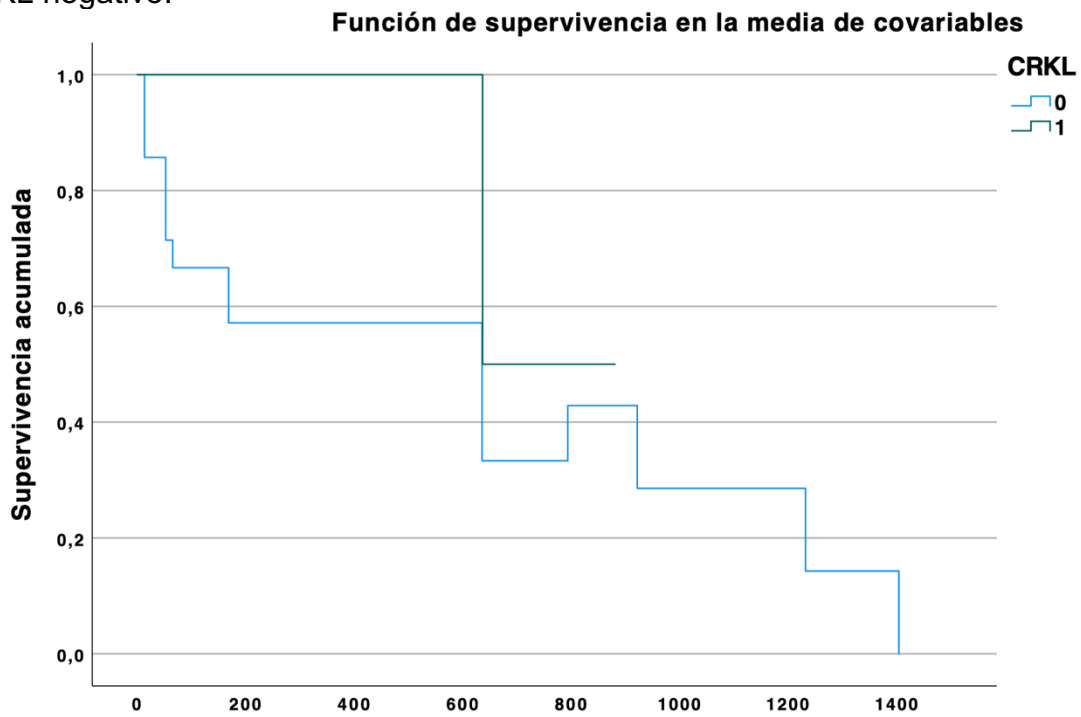


1.9.3 Análisis de supervivencia

CRKL

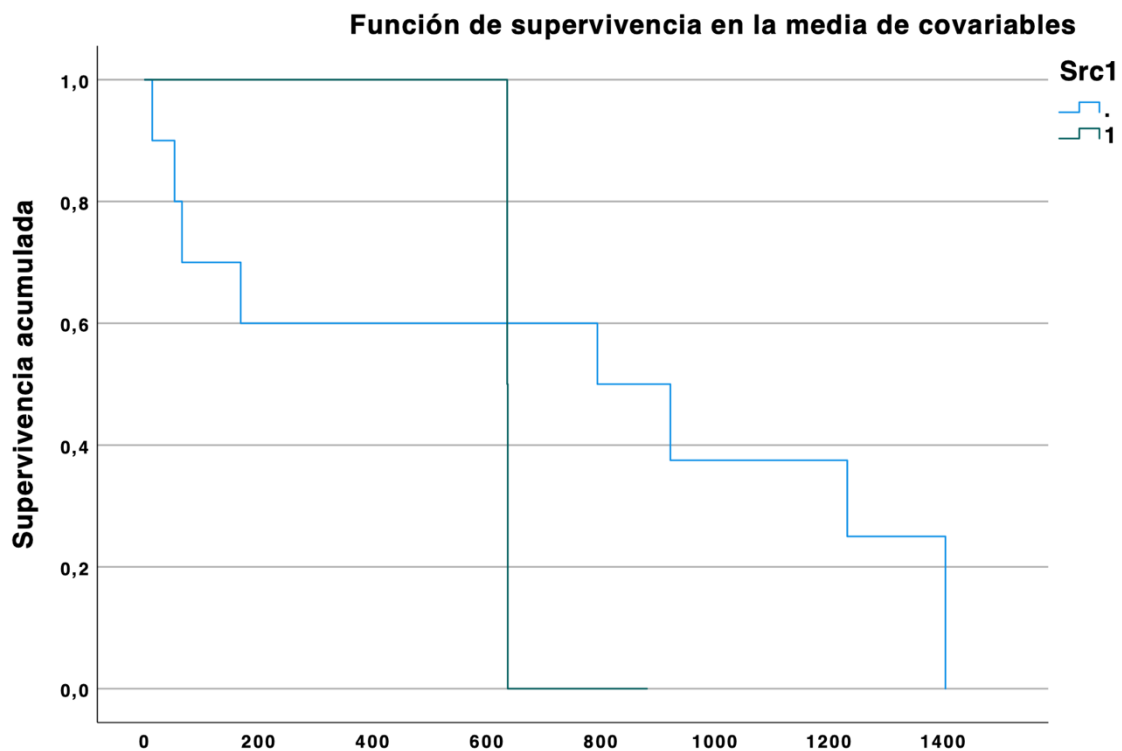
Para la diferencia de supervivencia para la presencia de CRKL se obtuvieron 4 casos para los cuales se conocía el estatus vital y la presencia de CRKL, de los cuales 3 fueron negativos y 1 positivo.

Al inicio del tiempo de seguimiento el paciente positivo se mantenía vivo hasta el día 800 de seguimiento en el que se igualó la supervivencia con los pacientes con CRKL negativo.



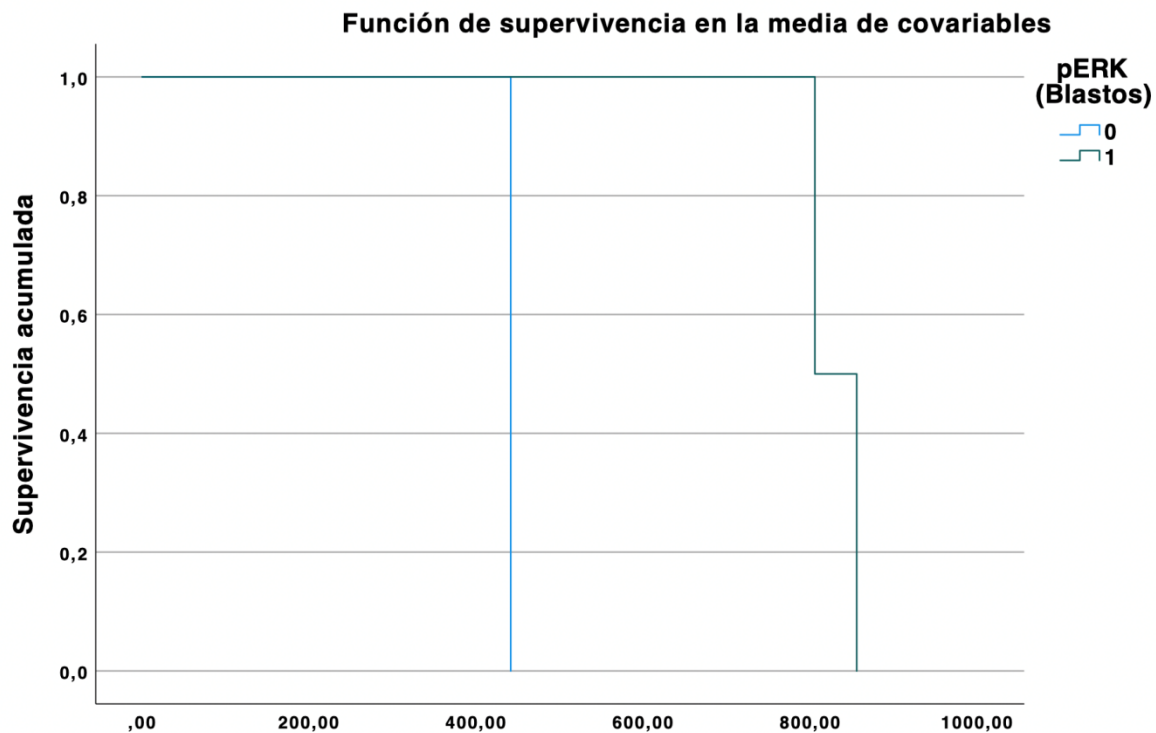
Src1

En el caso de Src1 se encontraron 11 pacientes de los cuales 9 eran negativos y 2 positivos. Se observa que aquellos positivos presentaron mortalidad temprana en comparación de los pacientes que no tenían el Src1 positivo.



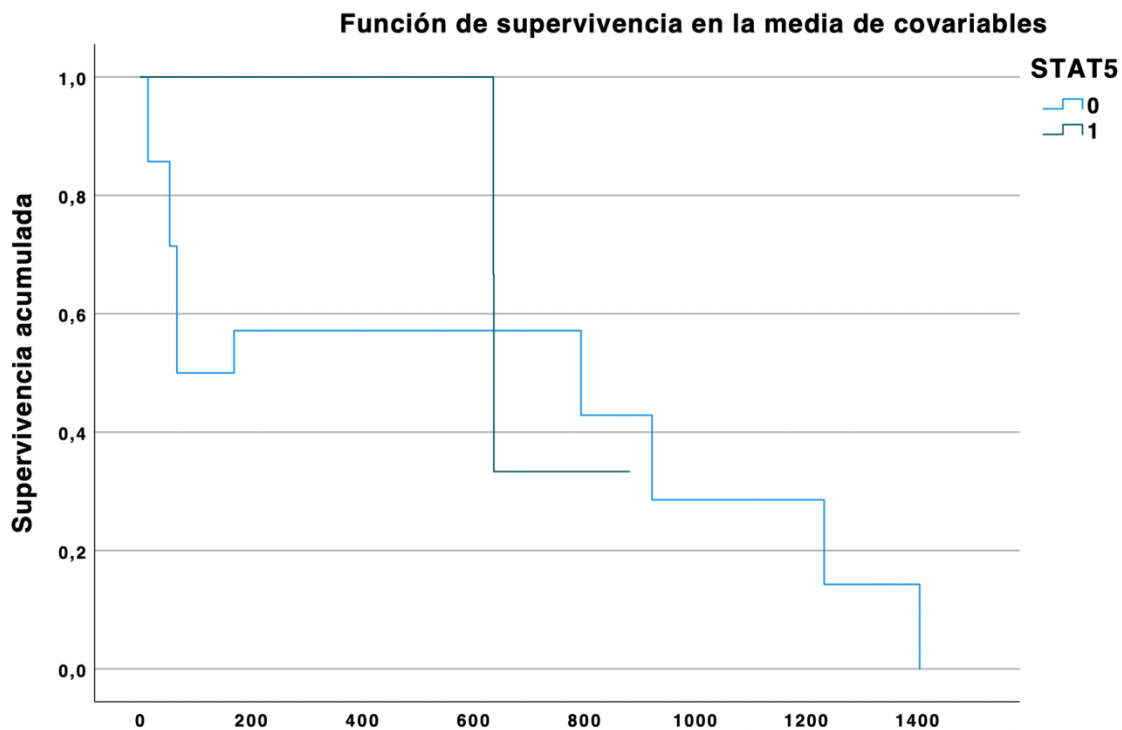
pERK

Para el caso de pERK se encontraron 4 pacientes de los cuáles uno fue positivo y 3 fueron negativos para la presencia de pERK. Aunque al inicio hay una caída abrupta de supervivencia en los primeros 200 días de seguimiento, la mortalidad se iguala al 50% en el día 800, sin embargo la supervivencia de pERK fue superior en el grupo negativo.



STAT5

Para el grupo de STAT5 se encontraron 4 pacientes de los cuales 2 eran negativos y 2 positivos. Se observa que la mortalidad fue más temprana en el grupo con STAT5 positivo comparada con el grupo negativo, pues todos los pacientes de este grupo habrían fallecido para el día 800, mientras que los positivos siguieron vivos hasta el día 1400 de seguimiento.



1.10 Discusión

En este estudio retrospectivo observacional, se identificó una diferencia estadísticamente significativa en la tasa de mortalidad de los pacientes positivos a la fosforilación de ERK, STAT5, Src1 y CRKL comparado con aquellos que no presentaban la fosforilación de estas proteínas. Los pacientes positivos a la fosforilación de estas proteínas morían alrededor del día 600 de seguimiento, por otro lado, algunos de los pacientes negativos a la fosforilación presentaron

supervivencia hasta el día 1400 de seguimiento, que es el momento en el que se terminó el seguimiento.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) del subtipo Philadelphia-like (Ph-like) se define generalmente por un patrón de expresión molecular que tiene un traslape significativo con el perfil de los pacientes con Philadelphia positivo, pero que carecen de la fusión de *BCR-ABL1*, aunque las alteraciones genómicas de la Ph-like también generan una activación de las proteínas con actividad tirosina cinasa. (13)

Los pacientes del subtipo Ph-like suelen tener enfermedad residual mínima posterior a la inducción de la remisión y una tasa baja de supervivencia libre de eventos, pero alrededor del 40% de los pacientes pediátricos lograrán la curación con tratamiento de intensidad relativamente leve. (14)

En general se ha observado que la prevalencia del subtipo Ph-like incrementa con la edad, siendo aproximadamente del 12% en niños y del 21% en adolescentes, con un pico de incidencia en adultos jóvenes de 21-39 años. En nuestro estudio, la edad media de diagnóstico fue de 8.6 años (± 4.9), mientras que la edad media de defunción fue de 10.2 (± 4.8) lo cual puede sugerir una mayor mortalidad a mayor edad. (14)

Existe una asociación entre síndrome de Down y la presencia del subtipo Ph-like, asociado principalmente a alteraciones estructurales y mutaciones en los genes *CRFL2* y *JAK*, respectivamente. En nuestra cohorte solo se encontró un paciente con Síndrome de Down, sin embargo dado que no se secuenciaron estas mutaciones no se puede saber si la baja frecuencia de LLA Ph-like en nuestra población es porque son más frecuentes otras mutaciones o si se trata de un sesgo de selección. (13)

Como se mencionó anteriormente, el subtipo Ph-like se asocia a un mal pronóstico determinado por una baja respuesta a la terapia de inducción a la remisión, una mayor tasa de recaídas y una menor supervivencia (15) Por lo general, los niños que presentan este subtipo de leucemia debutan con una mayor carga leucocitaria, lo cual también dicta un peor pronóstico. Esto es consistente con los hallazgos de nuestro estudio, en el cual 69% de los pacientes se clasificaron como alto riesgo al momento de diagnóstico, mientras que sólo 3% se consideraron de riesgo estándar y 6% de riesgo habitual. Sólo el 1.5% fue considerado de riesgo muy alto. El resto de los pacientes no tenían clasificación del riesgo.

Sin embargo, a pesar de la pobre respuesta a la inducción a la remisión, nuestros pacientes presentaron buena respuesta a dicha terapia en un 49%, mientras que sólo 6 pacientes presentaron mala respuesta (9%) y uno requirió cambio de esquema.

En cuanto a la recaída, se observó que alrededor de 26% de los pacientes presentaron recaída, lo cual coincide con lo observado en otras cohortes. Chiaretti et al reportaron un incremento en el riesgo de menor supervivencia libre de eventos de 2.6 veces en aquellos pacientes con diagnóstico de Ph-like (15).

En cuanto a factores de riesgo exposicionales, no se observó más que en un paciente la exposición a pesticidas, ninguno de los pacientes vivía cerca de fuentes electromagnéticas, consumía agua de algún río que pudiese estar contaminado o vivían cerca de plantas petroquímicas. Un estudio en México reportó un mayor riesgo de presentar LLA en niños cuyas madres hubieran estado expuestas a pesticidas durante los 3 meses previos al embarazo, sin embargo, nuestra población fue interrogada del uso actual de pesticidas. (16)

Algunos otros factores de riesgo mencionados como exposición a fuentes electromagnéticas han sido estudiados en algunas cohortes y se han observado un incremento en el riesgo de LLA cuando hay exposiciones a $\geq 0.4 \mu\text{T}$, aún después

de ajustar por confusores (17). En nuestro estudio no se registro la magnitud de la exposición, sin embargo no había pacientes que vivieran cerca de fuentes electromagnéticas.

Algunas de las alteraciones más frecuentemente encontradas en las LLA del subtipo Ph-like son rearrreglos o mutaciones en los genes: *ABL1*, *ABL2*, *CRLF2*, *CSF1R*, *EPOR*, *JAK2*, *NTRK3*, *PDGFRB*, *PTK2B*, *TSLP*, o *TYK2*, todas estas son alteraciones activadoras de cinasas y de acuerdo con algunos reportes se encuentran hasta en el 91% de los pacientes con Ph- like. (15, 17)

En nuestro estudio se evaluó la activación de algunas proteínas con actividad tirosina cinasa como CRKL, que se une a una región rica en poliprolinas en la región ABL del BCR/ABL (19). La presencia de CRKL se observó en un paciente, observando una diferencia en la mortalidad comparado con los otros tres casos evaluados a pesar de tratarse de una muestra pequeña.

Otra proteína evaluada para determinar su fosforilación fue STAT5, un factor de transcripción encargado de la supervivencia de células B mediante la activación del gen prosupervivencia Mcl1. El rol leucemiogénico de STAT5 es mediante su función de supervivencia de los linfocitos B y se ha observado que en pacientes con traslocación BCR/ABL + hay una activación constitutiva del gen STAT5, aunque la mutación de ambos genes en ratones no se ha relacionado con la presencia inequívoca de LLA. (17)

Dado que los pacientes incluidos en este estudio eran BCR-ABL negativo llama la atención que la expresión de STAT5 también se asoció a un incremento en la mortalidad. Esto sugiere que otras vías de activación de tirosin cinasa podrían causar una activación de STAT5 similar a la observada en los pacientes con LLA Ph +. (20)

En este estudio también se analizó la fosforilación del oncogén c-Src, cuya activación se ha observado incrementada en una gran variedad de cánceres en el ser humano, incluyendo leucemias y tumores sólidos comparado con tejido sano. Así mismo, parece que el grado del tumor correlaciona con la expresión de este gen, incremento en la proteína y su activación. (21)

Así como en el gen STAT5, en las leucemias linfoblásticas agudas, se ha observado que BCR-ABL induce la activación del gen c-Src y por lo tanto de la familia de cinasas de Src. De manera interesante se ha demostrado que el uso de inhibidores de BCR-ABL como imatinib no suprimen necesariamente la actividad de Src, sugiriendo que existen otras vías de activación de esta familia de cinasas (22). En nuestro estudio, la expresión de Src se asoció a una mayor mortalidad a menor tiempo de seguimiento, con un 100% de pacientes fallecidos a los 600 días de seguimiento, siendo el de mayor mortalidad de los 4 genes estudiados.

Por último, también se evaluó la fosforilación de ERK. Su actividad oncogénica propuesta es como driver de la expresión de LCN2 (lipocalina 2) que es un mediador inflamatorio que contribuye a la iniciación y mantenimiento de neoplasias hematológicas de linaje mieloide, pues se ha demostrado su presencia en la sangre de pacientes con estas malignidades (23).

En los pacientes analizados durante este estudio, la fosforilación de ERK no se vio asociado a un incremento de la tasa mortalidad, ya que no presenta alguna diferencia estadísticamente significativa con los pacientes que no presentan ERK fosforilada.

Entre las fortalezas de este estudio se encuentran el análisis funcional de distintas proteínas con función tirosina cinasa y su actividad se incrementa en pacientes con LLA del subtipo Ph-like, lo cual permite una mejor clasificación de estos pacientes y una selección más dirigida de las terapias que pueden reducir las tasas de recaída y mortalidad. Al ser un estudio retrospectivo es difícil determinar causalidad entre la

fosforilación de estas proteínas y los desenlaces adversos. De igual forma no se puede descartar la presencia de confusión residual.

La relevancia de una adecuada clasificación de estos pacientes radica en la elección personalizada de tratamiento, en especial para pacientes que a pesar de no ser Ph positivo pueden beneficiarse de la terapia con inhibidores de tirosina cinasa (13). Como se mencionó previamente, los pacientes Ph-like tienen un mayor riesgo de recurrencia y de muerte, por lo que un tratamiento dirigido es de suma importancia en esta población.

1.11 Conclusiones

La presencia de vías de activación de tirosin cinasa se asocian a una mayor mortalidad comparada con aquellos pacientes que no las presentan, aún en ausencia de BCR-ABL.

Bibliografía

1. Seth R, Singh A. Leukemias in Children. *Indian J Pediatr.* 2015;82(9):817-824.
2. Lyengar V, Shimanovsky A. Leukemia. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; August 10, 2020.
3. <https://www.gob.mx/salud/articulos/cancer-infantil-en-mexico>
4. http://www.censia.salud.gob.mx/contenidos/descargas/transparencia/especiales/PAE_Cancer.pdf
5. Roberto Rivera-Luna, Liliana Velasco-Hidalgo, Marta Zapata-Tarrés, Rocío Cárdenas-Cardos & Marco R. Aguilar-Ortiz (2017) Current outlook of childhood cancer epidemiology in a middle-income country under a public health insurance program, *Pediatric Hematology and Oncology*, 34:1, 43-50
6. P.Imbach, T. K. (2006). *Pediatric Oncology , A Comprehensive Guide*. Alemania: Springer- Verlag Berlin Heidelberg
7. Pui, C. H. (2006). *Childhood Leukemias (Vol. 2)*. EUA, New York: Cambridge University Press.
8. E, C. -H. (2009). Leucemia Linfoblastica Aguda . *Revista Médica MD* , 3-10.
9. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet.* 2020;395(10230):1146-1162
10. Larson, R. A. (2015). *Williams Hematology (Vol. 9)*. EUA: McGraw - Hill

11. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, et al. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood*. 2016;127(20):2375-2390.
12. Boer JM, den Boer ML. BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia: From bench to bedside. *Eur J Cancer*. 2017;82:203-218.
13. Conant JL, Czuchlewski DR. BCR-ABL1-like B-lymphoblastic leukemia/lymphoma: Review of the entity and detection methodologies. *Int J Lab Hematol*. 2019;41 Suppl 1:126-130.
14. Tasian, S. K. (2017). Philadelphia chromosome–like acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2064-2071.
15. Pui, C. R. (2017). Philadelphia Chromosome-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clinical Lymphoma Myeloma Leukemia*.
16. Chiaretti, S. e. (2021). Philadelphia-like acute lymphoblastic leukemia is associated with minimal residual disease persistence and poor outcome. First report of the minimal residual disease-oriented GIMEMA LAL1913. *Haematologica*.
17. Hernández-Morales, A. Z.-N.-S. (2009). Factores asociados a leucemia aguda en niños. Estudio de casos y controles. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*.
18. Ahlbom, A. D. (2000). A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *British Journal of Cancer*.
19. Roberts, K. L.-T. (2014). Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine*.
20. Heisterkamp, N. G. (2002). Philadelphia-positive leukemia: a personal perspective. *Oncogen*.
21. Malin, S. M. (2010). STAT5 in B cell development and leukemia. *Current Opinion in Immunology*.
22. Irby, R. Y. (2000). Role of Src expression and activation in human cancer. *Oncogene*.
23. Li, S. (2007). Src kinase signaling in leukaemia. *The international journal of biochemistry & cell biology*.