



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
DEL SUBTIPO PH-LIKE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

B.Q.D MARTÍNEZ ANAYA DANIEL ALEJANDRO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO JOAQUÍN CÓRDOVA ALARCÓN
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

DR. FELIPE VACA PANIAGUA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Julio, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

OFICIO CPCB/679/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 25 de marzo de 2019, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **MARTÍNEZ ANAYA DANIEL ALEJANDRO** con número de cuenta **411025209**, con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PACIENTES CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA DEL SUBTIPO PH-LIKE**", realizada bajo la dirección de la **DRA. SILVIA PATRICIA PÉREZ VERA**:

Presidente: DR. ENRIQUE ISABEL MIRANDA PERALTA
Vocal: DR. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO
Secretario: DR. EMILIO JOAQUÍN CORDOVA ALARCÓN
Suplente: DR. MARIO AGUSTÍN ALTAMIRANO LOZANO
Suplente: M. EN C. MARÍA EUGENIA ISABEL HERES Y PULIDO

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de junio de 2019



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme las herramientas necesarias para continuar mi formación en la investigación científica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo económico brindado. Beca de maestría No 816116.

Al apoyo PAEP 2018, por el apoyo económico para asistir al LIX Congreso Anual de la Agrupación Mexicana para el Estudio de la Hematología A.C (AMEH).

A los Fondos CONACYT Proyecto 248591 PDCPN2014-01: Identificación del subgrupo de alto riesgo similar a BCR-ABL1 positivo (Ph-like) en niños con leucemia linfoblástica aguda y análisis in vitro de su respuesta a inhibidores de tirosina cinasa.

A los Recursos Fiscales 2015 del Instituto Nacional de Pediatría por el apoyo para desarrollar esta investigación (Proyecto INP 019/16).

A mi comité tutor: Dra. Silvia Patricia Pérez Vera, Dr. Emilio Joaquín Córdova Alarcón y Dr. Felipe Vaca Paniagua. Por su disposición, consejos y aportaciones.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezco a los pacientes incluidos en este trabajo y a sus familiares, quienes son el motivo principal de esta investigación

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme cultivar la mente y el espíritu, y por reforzar mi convicción de participar en la construcción de una mejor sociedad.

Agradezco sinceramente a las Dras. Silvia Patricia Pérez Vera, Rocío Juárez Velázquez y Adriana Reyes León por sus valiosos consejos.

A todos los integrantes del laboratorio de Genética y Cáncer, especialmente a la Dra. Consuelo Salas, por sus valiosas aportaciones a mi formación profesional.

Gracias a las siguientes personas por toda su ayuda: Dra. Martha Herrera Almanza, Dr. Oscar Soto Lerma, Biól. Berenice Jarquín Ramírez, Biól. Netzi Rivera Sánchez y Biól. Adrián Hernández Monterde.

Al Instituto Nacional de Pediatría, el Hospital infantil de México Federico Gómez y el Hospital Infantil Teletón de Oncología por la facilidad para la obtención del material biológico utilizado en este trabajo.

Con estas breves palabras, quiero expresar mi agradecimiento y dedicar este trabajo, que representa un gran esfuerzo, a las siguientes personas:

A los niños con cáncer, deseando que algún día mi esfuerzo contribuya a una mejor vida para estos pequeños.

A mi Mamá, Iván, Vanesa y Roseta. Los amo con todas mis fuerzas.

A mis primos, tíos y tías, especialmente a Claudia Kahlo (Tala).

A Paty, gracias por tanta paciencia y por tu cercanía, como tutor de Maestría, compañera y amiga. Te admiro y te respeto mucho, sinceramente considero un privilegio el poder aprender de ti.

A Chio, gracias por tu ayuda, tu amistad y tus buenos consejos, eres una excelente maestra, compañera y amiga.

A mis amigos, especialmente a Emilia e Itzel, que estuvieron conmigo en los momentos importantes.

A Jesús Guillermo, Edgar Benigno, Enrique Velázquez, Jhony Rosas, Omar Jerónimo y Rogelio Laguna, gracias por su compañía y su cariño.

“ Una persona puede tener éxito en casi cualquier cosa para la cual tenga un entusiasmo ilimitado”

Charles M Schwab

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Cáncer pediátrico en México.....	3
1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda	4
1.2.1 Definición.....	4
1.2.2 Etiología.....	4
1.3 Clasificación de la LLA y estratificación en grupos de riesgo.....	4
1.4 Alteraciones genéticas de la LLA pre-B.....	6
1.4.1 Subtipos moleculares de LLA pre-B.....	7
1.4.2 LLA pre-B del subtipo Philadelphia positivo.....	8
1.4.3 LLA pre-B negativa a las alteraciones genéticas recurrentes.....	8
1.5 Subtipo Ph-like	9
1.5.1 Alteraciones genéticas del subtipo Ph-like.....	11
1.5.2 Alteraciones del gen <i>CRLF2</i>	11
1.5.3 Otras alteraciones que afectan la señalización Jak2-Stat5.....	13
1.5.4 Alteraciones que desregulan la señalización de Abl y Ras.....	14
1.5.5 Alteraciones en <i>IKZF1</i>	14
1.6 Características clínicas del subtipo Ph-like.....	15
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	17
3. JUSTIFICACIÓN	19
3.1 Preguntas de investigación.....	19
4. OBJETIVOS	20
4.1 Objetivo General.....	20
4.2 Objetivos Particulares.....	20
5. HIPOTESIS	20
6. METODOLOGÍA	20
6.1 Clasificación del estudio.....	20
6.2 Selección de pacientes.....	20
6.2.1 Criterios de inclusión.....	21
6.2.2 Criterios de exclusión.....	21

6.3 Estrategia de análisis.....	21
6.4 Técnicas de laboratorio.....	23
6.4.1 Aislamiento de células mononucleares.....	23
6.4.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc.....	23
6.4.3 Cuantificación de la expresión relativa de <i>CRLF2</i> por RT-PCR en tiempo real.....	23
6.4.4 Detección de la delección <i>P2RY8-CRLF2</i> por RT-PCR punto final	24
6.4.5 Detección de la delección <i>P2RY8-CRLF2</i> por FISH.....	24
6.4.6 Detección de transcritos de isoformas con efecto dominante negativo de <i>IKZF1</i>	25
por RT-PCR anidada punto final	
6.4.7 Detección de la translocación <i>IGH-CRLF2</i> por FISH.....	25
6.4.8 Detección de la amplificación <i>iAMP21</i>	26
6.4.9 Extracción de ADN de células mononucleares.....	26
6.4.10 Búsqueda de CNV's asociadas al subtipo Ph-like por microarreglos de aCGH.....	26
6.5 Interpretación de resultados.....	27
6.5.1 Análisis estadístico.....	29
7. RESULTADOS.....	29
7.1 Población de estudio.....	29
7.2 Alteraciones en <i>CRLF2</i>	31
7.2.1 Análisis de la expresión de <i>CRLF2</i>	31
7.2.2 Presencia de rearrreglos en <i>CRLF2</i>	33
7.2.2.1 Pacientes con la delección <i>P2RY8-CRLF2</i>	34
7.2.2.2 Búsqueda de la amplificación <i>iAMP21</i> en pacientes <i>P2RY8-CRLF2</i> positivos.....	35
7.2.2.3 Pacientes <i>P2RY8-CRLF2</i> positivos al diagnóstico pero negativos	37
a la delección en recaída.	
7.2.2.4 Pacientes con la translocación <i>IGH-CRLF2</i>	37
7.3 Presencia de transcritos de isoformas con efecto dominante negativo de <i>IKZF1</i>	40
7.4 Identificación de pacientes Ph-like.....	42
7.4.1 Búsqueda de CNV's asociadas al subtipo Ph-like	44
7.5 Frecuencia de los subtipos moleculares de LLA pre-B en la población de estudio.....	46
7.6 Comparación de las características clínicas del subtipo Ph-like y no Ph-like	49
y de pacientes con y sin alteraciones de <i>CRLF2</i> y/o <i>IKZF1</i> .	
8. DISCUSIÓN.....	55
8.1 Alteraciones en <i>CRLF2</i>	55
8.1.1 Presencia de la delección <i>P2RY8-CRLF2</i> y la amplificación <i>iAMP21</i>	59
8.1.2 Presencia de la translocación <i>IGH-CRLF2</i>	61
8.2 Presencia de alteraciones en <i>IKZF1</i>	63
8.3 Identificación de pacientes Ph-like.....	66

8.3.1 Búsqueda de CNV's en pacientes Ph-like.....	69
8.3.2 Pacientes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like (Probable Ph-like).....	70
8.3.3 Pacientes no Ph-like.....	71
8.4 Frecuencia de los subtipos moleculares de LLA pre-B en la población de estudio.....	71
8.5 Comparación de las características clínicas del subtipo Ph-like y no Ph-like y de pacientes.....	73
con y sin alteraciones de <i>CRLF2</i> y/o <i>IKZF1</i>	
9. PERSPECTIVAS.....	76
10. CONCLUSIONES.....	77
11. LITERATURA CITADA.....	78
12. ANEXOS.....	82
Anexo 1. Información complementaria de introducción.....	82
Anexo 2. Información complementaria de las metodologías.....	84
Anexo 3. Tablas complementarias de los resultados.....	93
Anexo 4. Información complementaria de discusión.....	97

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS	PÁGINA.
Figura 1. Prevalencia de leucemia en 2038 pacientes pediátricos registrados en el seguro popular....3 entre el 2007 y 2015.	
Figura 2. Origen genético de la LLA.....5	
Figura 3. Subtipos moleculares de LLA pre-B.....9	
Figura 4. Características del subtipo Ph-like de acuerdo a dos tipos de clasificadores.....10	
Figura 5. Alteraciones genéticas del subtipo Ph-like.....11	
Figura 6. Rearreglos de <i>CRLF2</i>12	
Figura 7. Isoformas dominante negativas de <i>IKZF1</i>15	
Figura 8. Estrategia de análisis.....22	
Figura 9. Interpretación del microarreglo de aCGH.....27	
Figura 10. Expresión relativa de <i>CRLF2</i> en la población de estudio.....32	
Figura 11. Frecuencia de alteraciones en <i>CRLF2</i> en la población de estudio.....33	
Figura 12. Detección de la delección <i>P2RY8-CRLF2</i>34	
Figura 13. Frecuencia de clonas <i>P2RY8-CRLF2</i> positivas (negro) con respecto al nivel.....35 de expresión de <i>CRLF2</i> (gris) en 6 pacientes	
Figura 14. Detección de la amplificación <i>iAMP21</i> en pacientes <i>P2RY8-CRLF2</i> positivos.....36	
Figura 15. Porcentaje de clonas <i>P2RY8-CRLF2</i> (gráfica negra) e <i>iAMP21</i> (grafica gris)..... 36 positivas en 5 pacientes.	

Figura 16. Detección de la translocación <i>IGH-CRLF2</i>	38
Figura 17. Proporción de clonas con la ruptura de los genes <i>IGH</i> (en gris) y <i>CRLF2</i> (en negro).....	39
Figura 18. Detección de transcritos de IDN de <i>IKZF1</i>	40
Figura 19. Frecuencia de alteración de <i>IKZF1</i> en los subgrupos de pacientes de la población.....	41
de estudio	
Figura 20. Frecuencia de transcritos de IDN en la población analizada.....	41
Figura 21. Identificación de pacientes Ph-like.....	43
Figura 22. Resultado parcial del microarreglo de aCGH (Agilent 1M, hg18) en los pacientes.....	45
LLA 035 y LLA 021	
Figura 23. Resultado parcial del microarreglo de aCGH (Agilent 1M, hg18) en el paciente.....	45
LLA 021	
Figura 24. Genes involucrados en las CNV's de pacientes Ph-like.....	46
Figura 25. Frecuencia de los subtipos moleculares de LLA pre-B en la población de estudio	48
Figura 26. Características clínicas de los pacientes del subtipo Ph-like y no Ph-like.....	50
Figura 27. Características clínicas de los pacientes con y sin alteración de <i>CRLF2</i>	51
Figura 28. Características clínicas de los pacientes con y sin alteración de <i>IKZF1</i> y/o <i>CRLF2</i>	53
Figura 29. Algoritmo diagnóstico para la identificación de pacientes Ph-like.....	68

TABLAS**PÁGINA.**

Tabla 1. Translocaciones cromosómicas recurrentes en LLA pre-B.....	8
Tabla 2. Características clínicas y alteraciones genéticas de los pacientes de la población..... de estudio	30
Tabla 3. Alteraciones de <i>CRLF2</i> en pacientes FGR positivos.....	33
Tabla 4. Frecuencia de rearrreglos de <i>CRLF2</i> en diferentes cohortes de LLA pre-B.....	56
Tabla 5. Coexistencia de las fusiones génicas recurrentes con alteraciones de <i>CRLF2</i>	58
Tabla 6. Posibles parejas génicas de <i>IGH</i> y <i>CRLF2</i>	62
Tabla 7. Frecuencia de deleciones de <i>IKZF1</i> en diferentes cohortes de LLA pre-B.....	64
Tabla 8. Genes involucrados en las CNV's de pacientes Ph-like de este trabajo y comparación..... con la literatura.	70
Tabla 9. Frecuencia del subtipo Ph-like en diferentes poblaciones.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH: microarreglo de hibridación genómica comparativa, por sus siglas en inglés.

ad-CRLF2: alteración desconocida de *CRLF2*

ADN: ácido desoxirribonucleico

ARN: ácido ribonucleico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ADNc: ADN complementario.

COALL: grupo de oncología pediátrica de leucemia linfoblástica aguda, por sus siglas en inglés

COG: grupo de oncología pediátrica, por sus siglas en inglés

CNVs: variaciones en el número de copias, por sus siglas en inglés

CRLF2-r: ruptura del gen *CRLF2*

DCOG: grupo holandés alemán de oncología, por sus siglas en inglés

DMSO: dimetil sulfóxido.

EDTA: ácido etilendiamino tetra acético.

EMR: enfermedad mínima residual..

EE.UU.: Estados Unidos de América.

FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia, por sus siglas en inglés.

FGR: fusiones génicas recurrentes.

G-CRLF2: ganancia de *CRLF2*.

iAMP21: Intra amplificación del cromosoma 21.

IDN: isoforma dominante negativa.

IGH-r: ruptura del gen *IGH*

INP: Instituto Nacional de Pediatría.

LLA: leucemia linfoblástica aguda.

LLA pre-B: leucemia linfoblástica aguda de precursores B.

LLA pre-T: leucemia linfoblástica aguda de precursores T.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PAR1: región pseudoautosómica 1, por sus siglas en inglés.

PBS: buffer de fosfatos, por sus siglas en inglés.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés.

PEG: perfil de expresión génica.

Ph+: Filadelfia positivo.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción, por sus siglas en inglés.

S-CRLF2: sobreexpresión de *CRLF2*.

SNP's: polimorfismos de nucleótido único, por sus siglas en inglés.

ns-CRLF2: no sobreexpresión de *CRLF2*.

ND: no disponible.

Δ IKZF1: delección de *IKZF1*

RESUMEN

Introducción: La leucemia linfoblástica aguda de precursores B (LLA pre-B) es el cáncer pediátrico más común en México, al menos el 30% de los casos presentan recaídas no asociadas a las fusiones génicas recurrentes (FGR) en esta enfermedad y el 37% de los pacientes con diagnóstico de LLA pre-B atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría tampoco muestran dichas alteraciones por lo que podrían pertenecer al subtipo molecular denominado similar a Filadelfia o Ph-like. Este subtipo constituye del 10 al 15% de la LLA pre-B pediátrica y se caracteriza por la ausencia de FGR; alteraciones en genes involucrados en la señalización de tipo tirosina cinasas como *CRLF2*, genes de diferenciación linfoide como *IKZF1*, etnicidad hispano latina, y mal pronóstico. El diagnóstico de este subtipo es importante debido a la posibilidad del uso de inhibidores de tirosina cinasas en estos pacientes, no obstante, hasta ahora no existen estudios que describan al subtipo Ph-like y estimen su frecuencia en pacientes mexicanos con LLA pre-B. **Objetivo general:** Detectar pacientes pediátricos con LLA pre-B del subtipo Ph-like a través de la búsqueda de las alteraciones genéticas más frecuentes del grupo. **Metodología:** Se estudiaron 118 pacientes pediátricos con LLA pre-B; 98 de ellos negativos para las FGR y 20 pacientes positivos a éstas. Se les realizó un perfil de expresión génica (PEG), por RT-PCR cuantitativa, que abarca seis genes recurrentes en firmas de expresión Ph-like, incluyendo a *CRLF2*. Se buscaron los rearrreglos más frecuentes de *CRLF2*, la delección *P2RY8-CRLF2*, por FISH y/o RT-PCR, la translocación *IGH-CRLF2*, por FISH, y detectaron transcritos de isoformas dominantes negativas de *IKZF1* (por RT-PCR anidada). Se consideró a un paciente como Ph-like cuando se observó: a) Sobreexpresión del 83 al 100% de genes del PEG; b) Sobreexpresión del 50 al 66% de genes del PEG en conjunto con la translocación *IGH-CRLF2* y/o un valor de sobreexpresión de *CRLF2* superior al cuartil 3 ($q_3=681.1$). Algunos pacientes identificados como Ph-like fueron seleccionados para la búsqueda de delecciones y/o duplicaciones asociadas al subtipo mediante microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH). Se comparó la frecuencia de características clínicas asociadas de pronóstico adverso y favorable entre pacientes Ph-like y no Ph-like utilizando la prueba exacta de Fisher. **Resultados:** La frecuencia del subtipo Ph-like en la población de estudio fue del 35% (41 de 118), la translocación *IGH-CRLF2* fue la única alteración genética exclusiva de este subtipo; el análisis mediante aCGH reveló delecciones en genes de desarrollo linfoide (p ej. *BTLA/CD200*, *EBF1*, *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* y *BTG1*) y regulación del ciclo celular (*CDKN2A/B* y *CDKN1B*) y la cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ fue significativamente mayor en pacientes Ph-like en comparación con los pacientes no Ph-like ($p = 0.015$). **Discusión:** La frecuencia del subtipo Ph-like encontrada en este trabajo es la más alta descrita hasta el momento, estos resultados sugieren que existe mayor susceptibilidad al subtipo Ph-like en la población de estudio. **Conclusiones:** El análisis del PEG y de las alteraciones de *CRLF2* y/o *IKZF1* permitieron la detección del subtipo Ph-like. En estos pacientes es necesario un diagnóstico oportuno debido a su elevada frecuencia observada y a la presencia de características clínicas de pronóstico adverso.

ABSTRACT

Introduction: Precursor-B acute lymphoblastic leukemia (pre-B ALL) is the most common pediatric cancer in Mexico, at least 30% of the cases present relapses not associated with recurrent gene fusions in this disease and 37% of patients diagnosed with pre-B ALL attended at the National Institute of Pediatrics do not show such alterations either. Based on this, these cases could belong to the molecular subtype called Ph-like, which represents 10-15% of the childhood pre-B ALL and is characterized by absence of the recurrent gene fusions. Besides, they present abnormalities in genes involved in tyrosine-kinase signaling pathway as *CRLF2*, in lymphoid differentiation as *IKZF1*, and frequently present Hispano-Latino ethnicity and poor prognosis. It is very important to diagnose this subtype since it is possible to use target-specific treatment with tyrosine-kinase inhibitors. Until now, there are no studies that describe the Ph-like subtype in Mexican patients and estimate their frequency. **Aim:** To detect pediatric patients with pre-B ALL of the Ph-like subtype by screening the most frequent subtype's genetic abnormalities. **Methods:** We studied 118 children patients with pre-B ALL, 98 negative and 20 positive to recurrent gene fusions. Their gene expression profile (GEP) was analyzed by quantitative RT-PCR, which estimates the overexpression of six genes including *CRLF2*. We screened the classic *CRLF2* rearrangements, the deletion *P2RY8-CRLF2* by FISH and/or RT-PCR, and the *IGH-CRLF2* translocation by FISH. Additionally, we detected the dominant negative isoforms of *IKZF1* (by nested RT-PCR). We considered the following criteria to define the patients of the Ph-like subtype: a) Patients who overexpressed 83-100% of the GEP; b) Patients who overexpressed 50-66% of the GEP with the *IGH-CRLF2* translocation and/or with *CRLF2* overexpression above the value of the quartile 3 (q3=681.1). Selected patients determined as Ph-like were analyzed by comparative genomic hybridization microarray (aCGH) for detecting deletions or duplications associated to the Ph-like subtype. The frequency of clinical characteristics associated to adverse and favorable prognosis between Ph-like and non-Ph-like patients was compared using Fisher's exact test. **Results:** The frequency of the Ph-like subtype in the analyzed population was 35% (41/118); the *IGH-CRLF2* rearrangement was the unique abnormality exclusive in the Ph-like patients. The aCGH analysis revealed deletions involving lymphoid development genes (*BTLA / CD200*, *EBF1*, *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* and *BTG1*) and cell cycle regulation genes (*CDKN2A/ B* and *CDKN1B*). Regarding to the clinical features, the white blood cell count $\geq 50 \times 10^9/L$ was significantly higher in Ph-like compared to non-Ph-like patients (p 0.015). **Discussion:** The frequency of the Ph-like subtype observed in this study represents the highest reported to date. These results suggest that the studied population are particularly susceptible to be diagnosed with the ALL Ph-like subtype. **Conclusions:** The analysis of GEP, and the screening of *CRLF2* and/or *IKZF1* abnormalities, allowed the detection of the Ph-like subtype. The diagnosis of Ph-like patients is mandatory since they high frequency observed and due to they presents clinical characteristics of adverse prognosis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer pediátrico en México

El cáncer representa la principal causa de muerte por enfermedad en población pediátrica, de 0 a 18 años, de países en vías de desarrollo. Hasta el año 2015, aproximadamente el 50% de la población mexicana recibió atención médica por el programa de seguridad social denominado Seguro Popular, el cual registró en ese año 3,433 casos nuevos de cáncer pediátrico de los cuales el 59.4% (2038) fueron diagnosticados como leucemia (Figura 1 y Anexo 1-Tabla 1) ⁽¹⁾.

De acuerdo con información de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en México se registraron 5,169 casos de cáncer en niños y adolescentes, de 0 a 14 años, durante el año 2018 ^(2,3). La leucemia es el tipo de cáncer más frecuente en niños, las estadísticas del Seguro Popular en México mencionan que hasta el año 2015 la leucemia linfoblástica aguda (LLA) fue el tipo de cáncer más frecuente en niños, ya que representó el 83% del total de casos de leucemia (49.3% de 59.4%) (Figura 1).

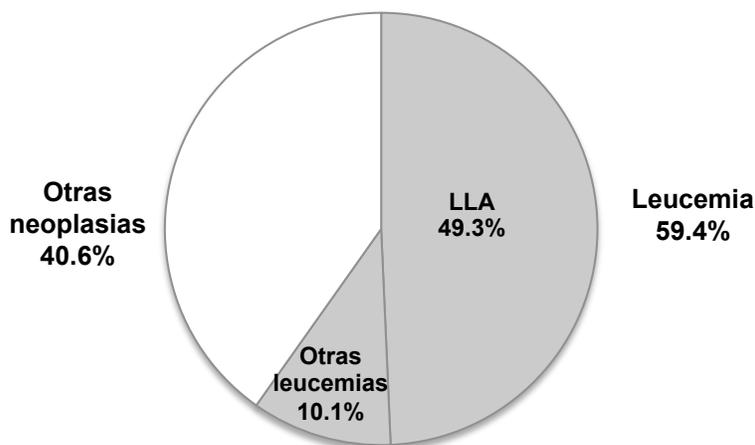


Figura 1: Prevalencia de leucemia en 2038 pacientes pediátricos registrados en el Seguro Popular entre el 2007 y 2015. La leucemia representa el 59.4% de los casos de cáncer infantil, la más común es la leucemia linfoblástica aguda (LLA) Modificado de Rivera-Luna *et al.*, (2017) ⁽¹⁾.

En 2015 se refirió una incidencia de LLA de 79.8 nuevos casos por millón de habitantes, la cual es alta en comparación con lo descrito en otras poblaciones; por ejemplo, Quiroz *et al.*, (2018) ⁽⁴⁾ reportaron una incidencia de 40 nuevos casos de LLA por millón por año en población pediátrica hispana residente en Estados Unidos de América (EE.UU.), 35.6 en caucásicos no hispanos de EE.UU., 52.2 en población de Costa Rica y 34.16 en población Argentina. Debido a lo anterior, la LLA

se considera un grave problema de salud pública en diferentes regiones del continente americano incluyendo nuestro país ^(3, 4).

1.2 Leucemia Linfoblástica Aguda

1.2.1 Definición

La LLA es una neoplasia hematológica caracterizada por la proliferación descontrolada de células linfoides inmaduras en la médula ósea y la sangre. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad están relacionadas con la proliferación de las células leucémicas y su infiltración a los tejidos normales, lo cual perturba la homeostasis del organismo ⁽⁵⁾.

1.2.2 Etiología

La LLA es generada por la interacción entre factores exógenos como la exposición a campos magnéticos, radiación ionizante, compuestos químicos (p. ej: benceno, etopósido) , algunos tipos de agentes infecciosos (p. ej: virus linfotrópico de células T tipo 1) y factores endógenos de origen genético como la presencia de variantes alélicas en genes asociados con el desarrollo de la enfermedad (p. ej: polimorfismos de nucleótido único en los genes *ARID5B*, *IKZF1*, *CDKN2A* y *CEBPE*), susceptibilidad asociada a síndromes genéticos como el síndrome de Down, Bloom, ataxia telangiectasia, entre otros (Figura 2A) ⁽⁵⁻⁷⁾. De acuerdo con la hipótesis de Greaves se necesitan al menos dos lesiones genéticas para promover el desarrollo de la LLA, primero ocurre la formación de rearrreglos cromosómicos capaces de inducir el proceso de leucemogénesis (Figura 2B), y posteriormente se adquieren alteraciones secundarias en genes que controlan los procesos normales de diferenciación, proliferación y supresión del crecimiento (Figura 2C) ⁽⁵⁻⁷⁾. Las alteraciones genéticas provocan que las células adquieran un fenotipo leucémico caracterizado por la auto renovación, arresto de la diferenciación y proliferación aumentada ^(6, 8-10).

1.3 Clasificación de la LLA y estratificación en grupos de riesgo

La LLA es la neoplasia maligna más común en etapa pediátrica y tiene una mayor incidencia entre los 2 y 5 años de edad. El diagnóstico de la LLA se integra por la observación de un incremento anormal de linfoblastos mediante análisis citomorfológico, la determinación de la expresión citoplasmática o en superficie celular de marcadores de linaje (inmunofenotipo), y la detección de alteraciones genéticas cromosómicas y sub microscópicas con valor pronóstico ^(5, 7).

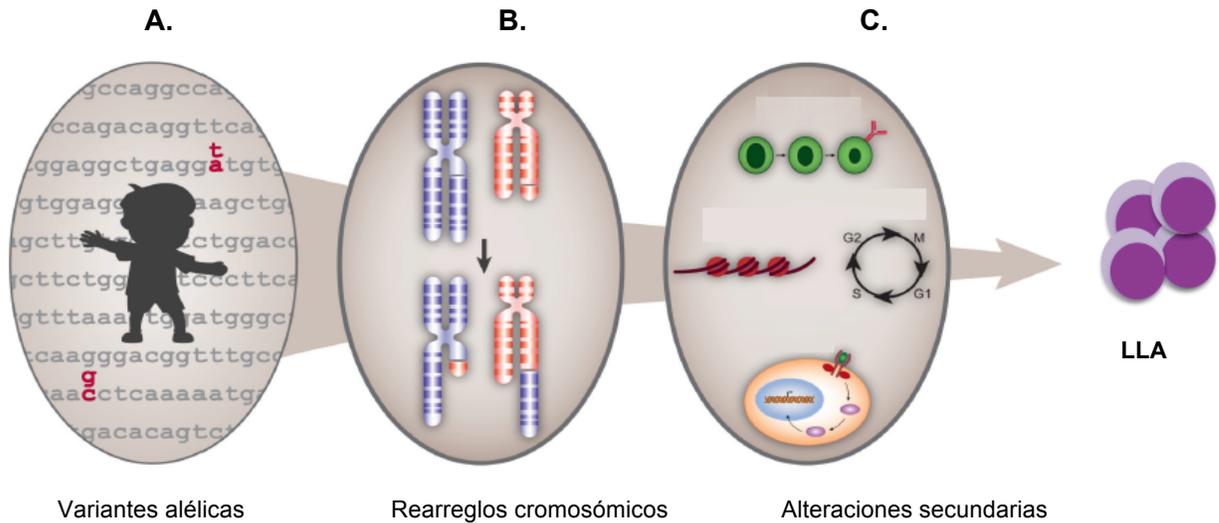


Figura 2. Origen genético de la LLA. **A.** Variantes alélicas: polimorfismos de nucleótido único (SNP's, por sus siglas en ingles) en los genes específicos **B.** rearrreglos cromosómicos que forman genes y proteínas de fusión, por ejemplo *BCR-ABL1*. **C.** alteraciones secundarias que permiten la auto renovación, proliferación y arresto en la diferenciación de las células leucémicas. Modificado de Mullighan *et al.*, (2013) ⁽⁹⁾.

Es esencial conocer el inmunofenotipo de las células leucémicas por citometría de flujo para definir el tipo de LLA de acuerdo al linaje celular afectado. La LLA se clasifica con base en el inmunofenotipo en LLA de precursores T (LLA pre-T) y de precursores B (LLA pre-B), siendo este último el más frecuente (83% de los casos de LLA). Los marcadores más importantes para el diagnóstico diferencial y clasificación de la LLA pre-B son:

- A.** LLA pre pro -B: CD10⁺, CD19⁻, CD34⁺, CD38⁺
- B.** LLA pro -B: CD10⁺, CD19⁺, CD34⁺, CD20⁺, CD24⁺, CD38⁺, CD22⁺, TdT⁺
- C.** LLA pre- B: CD10⁺, CD19⁺, CD34⁻, CD20⁺, CD24⁺, CD38⁺, CD22⁺, CD79α, cadena μ citoplasmática⁺

Los tres subtipos mencionados corresponden a etapas tempranas de la diferenciación porque no muestran un receptor BCR completo en la superficie celular, y son definidos en conjunto como LLA pre-B ⁽⁶⁾.

Uno de los sucesos más importantes en la oncología clínica pediátrica es la mejoría de las tasas de curación de la LLA, de 10% en los años 1960 a cerca del 90% en la actualidad. El principal factor responsable de esta mejoría es la aplicación de un tratamiento personalizado de acuerdo a la estratificación en grupos de riesgo estándar y alto, tomando en cuenta las características clínicas que están presentes al momento del diagnóstico y las características biológicas de la enfermedad ^(7, 9, 11).

Los pacientes con LLA pre-B son estratificados en grupos de riesgo alto y estándar con base en las siguientes características clínicas:

A. Edad. Se consideran de alto riesgo los pacientes con edad menor o igual a 1 año o mayor o igual a 10 años al momento del diagnóstico, y de riesgo estándar a los que tienen una edad entre 1 año y son menores a 10 años ^(7,12).

B. Cuenta de leucocitos. Los pacientes con una cuenta inicial de leucocitos $\geq 50,000/\text{mm}^3$ son considerados de alto riesgo, debido a que esto favorece las alteraciones vasculares oclusivas en la circulación del sistema nervioso central, pulmones, zona mesentérica y renal; además favorece la infiltración de las células leucémicas a “sitios santuario”, a diferencia de los pacientes con cuenta de leucocitos $\leq 50,000/\text{mm}^3$ los cuales son clasificados como de riesgo estándar ^(7,12).

C. Género. Los varones tienen una desventaja en la supervivencia con respecto a las mujeres, debido a que los testículos representan un sitio de difícil acceso para la respuesta inmune y la quimioterapia, en consecuencia es un sitio frecuente de recaída. En el protocolo rutinario del grupo de oncología pediátrica (COG por sus siglas en inglés) los varones son tratados por un año completo adicional, a diferencia de las mujeres, para compensar la desventaja de género en el pronóstico ^(7,12).

D. Respuesta temprana al tratamiento. Este es un factor importante para determinar una terapia subsecuente a la inicial, y es determinado por la morfología de la médula ósea después de una o dos semanas de iniciada la terapia de inducción, o por la medición de los niveles de enfermedad mínima residual (EMR) por citometría de flujo o reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) ^(7,12).

E. Origen étnico-racial: Las diferencias étnico raciales tienen un impacto en el pronóstico, no sólo por factores socioeconómicos, sino porque entre grupos poblacionales existen diferencias en la frecuencia de características moleculares de alto riesgo. Por ejemplo, los individuos con ascendencia hispano-latina tienen una menor frecuencia de la alteración de buen pronóstico $t(12;21)$, y una mayor frecuencia de alteraciones de mal pronóstico como los rearrreglos somáticos de *CRLF2* con respecto a individuos caucásicos no hispanos ^(4,7,12).

1.4 Alteraciones genéticas de la LLA pre-B

La LLA pre-B es el tipo de LLA más común, y es caracterizada por la adquisición secuencial de alteraciones genéticas que dirigen la iniciación y el mantenimiento de las clonas leucémicas; éstas pueden ser lesiones genéticas somáticas macroscópicas como alteraciones cromosómicas numéricas

y estructurales, o alteraciones genéticas submicroscópicas como microdeleciones, duplicaciones o mutaciones puntuales ^(7,11). Las alteraciones cromosómicas son la principal característica en la patogénesis de la LLA pre-B y son consideradas eventos primarios responsables de la iniciación de la clona pre-leucémica, la cual subsecuentemente adquiere cambios genéticos secundarios que la convierten en una clona leucémica. De esta forma, las alteraciones primarias están presentes en todas las células leucémicas a diferencia de las alteraciones secundarias, las cuales solo están presentes en subclonas leucémicas y pueden ganarse o perderse durante la evolución de la enfermedad ^(7,11).

1.4.1 Subtipos moleculares de LLA pre-B

La identificación de las alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales permite definir subtipos moleculares de LLA pre-B, dichos subtipos están asociados a una estratificación de riesgo específica. Como subtipos con alteraciones cromosómicas numéricas podemos encontrar a la hiperdiploidía y la hipodiploidía. En la primera, el cariotipo de las células leucémicas presenta al menos 8 cromosomas (X,4,6,10,14,17,18 y 21) que se ganan en el 75% de los casos, está asociada con un pronóstico favorable y puede detectarse mediante cariotipo con bandas GTG, FISH (Hibridación *in situ* con fluorescencia, por su siglas en inglés) con sondas centroméricas para los cromosomas más frecuentemente ganados, o midiendo el contenido de ADN por citometría de flujo ^(5,13). En la hipodiploidía, el cariotipo de las células leucémicas se caracteriza por un número de cromosomas menor a 46 y se clasifica en alta (40-43 cromosomas), baja (31-39 cromosomas) y cercana a la haploidía (24-29 cromosomas), ésta puede detectarse por cariotipo o índice de ADN, se asocia a mal pronóstico que empeora de acuerdo a la mayor pérdida de cromosomas ^(7,11).

Los subtipos con alteraciones cromosómicas estructurales se caracterizan por la presencia de translocaciones que pueden detectarse mediante cariotipo o FISH, estas translocaciones forman fusiones génicas recurrentes (FGR) en la LLA pre-B que pueden detectarse por PCR con retrotranscripción (RT-PCR, por su siglas en inglés) (Tabla 1). Las translocaciones cromosómicas forman genes de fusión que alteran la regulación de la hematopoyesis normal y el desarrollo linfoide, provocan la sobreexpresión de oncogenes, o activan de forma constitutiva la señalización mediada por proteínas tirosina cinasas ^(7,11).

Tabla 1. Translocaciones cromosómicas recurrentes en LLA pre-B.

Translocación	Fusión génica	Pronóstico
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6-RUNX1</i>	Favorable
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3-PBX1</i>	Desfavorable
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	Desfavorable
t(v;11)(v;q23)*	<i>var-KMT2A*</i>	Desfavorable

* Los rearrreglos del gen *KMT2A* involucran a 11q23 con una amplia variedad de parejas posibles

1.4.2 LLA pre-B del subtipo Philadelphia positivo

El cariotipo de los blastos en este subtipo de LLA pre-B muestra al cromosoma Philadelphia, que corresponde al der(22) de la translocación t(9;22)(q34;q11). Esta alteración une al extremo 5' del gen *BCR* en 22q11.2 a la porción 3' del gen *ABL1* en 9q34, formando la fusión oncogénica *BCR-ABL1* que codifica a una proteína quimérica con una actividad exacerbada de tirosina cinasa. La cinasa anormal provoca la desregulación de las vías de señalización Abl, PI3K/Akt/mTOR, Jak2-Stat5 y MAPK cinasas, permitiendo la proliferación y la resistencia a la muerte celular ⁽¹⁴⁾. El 75-90% de los casos de LLA pre-B Ph+ se acompañan de deleciones en el gen *IKZF1*, la haploinsuficiencia de este gen coopera con la expresión de *BCR-ABL1* empeorando el pronóstico ⁽¹⁴⁾.

La fusión *BCR-ABL1* es poco frecuente en la LLA pre-B pediátrica (del 1 al 3% de los casos), cuando estos pacientes son tratados con un esquema de quimioterapia estándar tienen un pronóstico desfavorable; en cambio, la combinación de la quimioterapia con imatinib (un inhibidor de tirosina cinasa) ha mejorado las tasas de supervivencia de los pacientes con LLA pre-B Ph+, el 95% de los casos logran una remisión completa y la tasa de supervivencia a 3 años es del 55% ^(11,14).

1.4.3 LLA pre-B negativa a las alteraciones genéticas recurrentes.

Aproximadamente 75% de la LLA pre-B pediátrica porta alteraciones genéticas recurrentes asociadas a un pronóstico específico, sin embargo, existe un subgrupo denominado "Otros B" que no presenta ninguna de las alteraciones cromosómicas recurrentes con valor pronóstico (Figura 3A) ⁽¹⁵⁾.

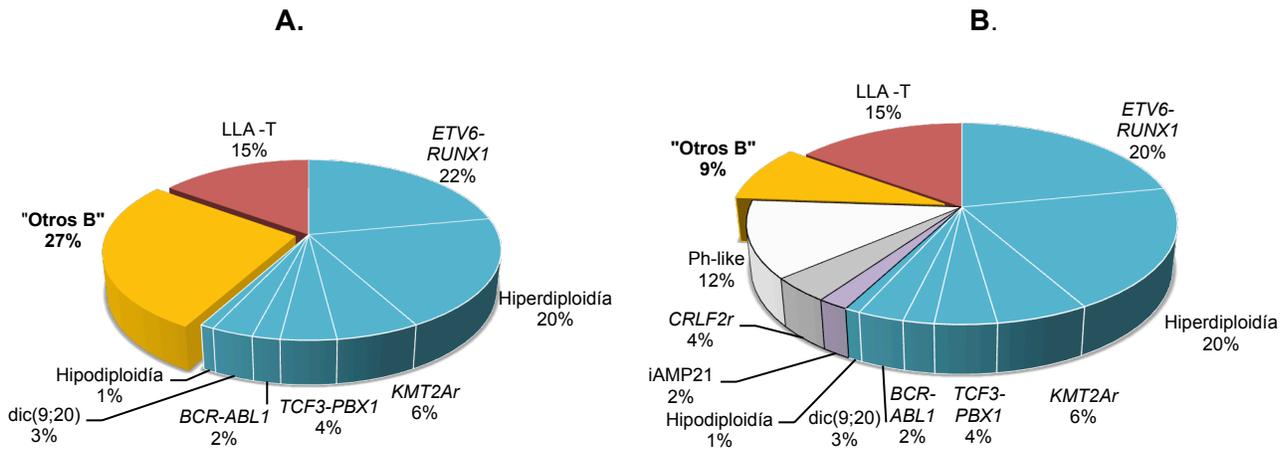


Figura 3. Subtipos moleculares de LLA pre-B. A. La mayoría de los casos presentan alteraciones cromosómicas con valor pronóstico (azul), excepto el subtipo "Otros B" (amarillo) en el cual no se observan alteraciones genéticas que permitan la estratificación en grupos de riesgo. **B.** La caracterización genómica del subgrupo "Otros B" ha permitido el descubrimiento de nuevos subtipos con valor pronóstico (morado, gris y blanco). Modificado de Inaba *et al.*, (2013) ⁽⁵⁾.

En la última década, los avances en la genómica del cáncer han permitido definir biomarcadores para el subtipo "Otros B" (Figura 3B), en este subtipo los estudios genómicos ha revelado variaciones en el número de copias en genes de diferenciación linfocítica (p. ej. *PAX5*, *IKZF1*, *RUNX1*), regulación del ciclo celular (p. ej. *TP53*, *EBF1*) y proliferación (p. ej. *CRLF2*, *ABL1*, *JAK2*) y existe evidencia que permite asociar estas alteraciones a un pronóstico desfavorable. Por otra parte, los estudios mediante microarreglos de expresión en los subtipos moleculares de LLA pre-B han permitido la detección de un subtipo cuya firma de expresión génica es similar a la del subtipo Philadelphia positivo, pero éste no posee la fusión oncogénica *BCR-ABL1*; a este nuevo subtipo se le denominó similar a Philadelphia positivo o Ph-like ⁽¹⁵⁾.

1.5 Subtipo Ph-like.

El subtipo Ph-like es reconocido como una entidad provisional por la OMS, desde el 2016. Las publicaciones de distintos grupos identifican a este subtipo como de alto riesgo, y estiman que representa aproximadamente del 10 al 15% en niños y del 15 al 20% de los casos de adolescentes con LLA pre-B; la frecuencia de este subtipo incrementa con la edad y también varía entre distintas poblaciones ⁽¹⁶⁾. Entre las principales características referidas para el subtipo Ph-like se encuentran: 1) un perfil de expresión génica similar al del subtipo Ph+; 2) ausencia de la fusión *BCR-ABL1* y del resto de los genes de fusión generados por las translocaciones cromosómicas recurrentes en LLA pre-B; 3) una amplia variedad de alteraciones genéticas que desregulan la señalización de receptores de citocinas y proteínas tirosina cinasas, principalmente la señalización de Jak2-Stat5, Abl y Ras; 4) rearreglos del gen *CRLF2* en aproximadamente 50% de los casos; 5) alteraciones en genes

que regulan el proceso de diferenciación de linfocitos B, principalmente en el gen *IKZF1* que se altera en el 70 al 80% de los casos Ph-like; 5) pronóstico adverso y alto riesgo de recaída ^(8, 16-19).

El subtipo Ph-like fue originalmente reportado por dos grupos de investigación independientes en 2009. El Grupo Holandés/Alemán de Oncología Pediátrica (DCOG, por sus siglas en ingles), utilizó un microarreglo de Affymetrix con 110 sondas agrupadas en un clúster jerárquico para la identificación del perfil de expresión génica (PEG) de los principales subtipos de LLA. Ellos encontraron dentro de los casos “Otros B” a un grupo de pacientes con un PEG similar al de los casos *BCR-ABL1* positivos, pero que no portaban la fusión *BCR-ABL1*. Este grupo fue denominado *BCR-ABL1* like y se encontró en 19% de la cohorte del Grupo de Oncología Pediátrica de la Leucemia Linfoblástica Aguda (COALL, por sus siglas en inglés) y en el 15% de una cohorte de validación del DCOG. Los casos *BCR-ABL1* like definidos por el clasificador del grupo DCOG están caracterizados por deleciones frecuentes en genes de desarrollo linfoide, principalmente *IKZF1*, la presencia del dicéntrico dic(9;20) y la amplificación *iAMP21* (Figura 4) ^(17, 20, 21).

El grupo estadounidense conformado por el COG y el St. Jude Children’s Research Hospital, utilizó un microarreglo de Affymetrix de 255 sondas para analizar el PEG de los subtipos moleculares de LLA, en una cohorte de 207 pacientes pediátricos de alto riesgo. Utilizando tres diferentes algoritmos bioinformáticos identificaron ocho diferentes perfiles, uno de los cuales se caracterizó por presentar una similitud altamente significativa con el PEG Ph+, por lo cual fue denominado Ph-like y representó el 12% de la cohorte analizada. Este subtipo mostró sobreexpresión de *CRLF2*, deleciones del gen *IKZF1* y de otros genes de factores de transcripción de desarrollo linfoide; fue altamente frecuente en población de origen hispano-latino y mostró mal pronóstico (Figura 4) ^(16,17,20).

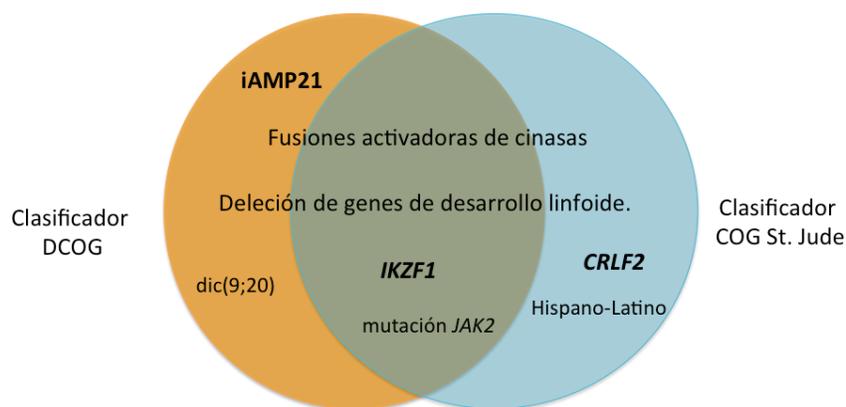


Figura 4. Características del subtipo Ph-like de acuerdo a dos tipos de clasificadores. Clasificador DCOG (naranja), Clasificador COG-St Jude (azul) y ambos clasificadores (verde). Modificado de Roberts *et al.*, (2017) ⁽¹⁷⁾.

Existen diferencias entre los clasificadores DCOG y COG-St Jude, por ejemplo, *CRLF2* no está incluido en la firma *BCR-ABL1*-like holandesa, pero sí en la firma Ph-like estadounidense, sin embargo, esto puede explicarse por los diferentes orígenes étnicos de las cohortes para las que fue diseñado cada clasificador (Figura 4) ^(16,20).

1.5.1 Alteraciones genéticas del subtipo Ph-like

En contraste con el resto de los subtipos genéticos de LLA pre-B que poseen una sola alteración genética inicial, los pacientes Ph-like tienen un complejo panorama genético (Anexo 1-Tabla 2). Han sido identificados aproximadamente 60 rearrreglos en 15 genes que codifican para cinasas o receptores de citocinas; éstas incluyen rearrreglos de *CRLF2*, fusiones de genes de la clase *ABL*, rearrreglos de los genes *JAK2*, *EPOR*, mutaciones activadoras de la vía Jak2-Stat5 o de la señalización de Ras, entre otras fusiones menos comunes. Además, la frecuencia de estas alteraciones varía entre distintas poblaciones y grupos de edad (Figura 5) ^(17,18).

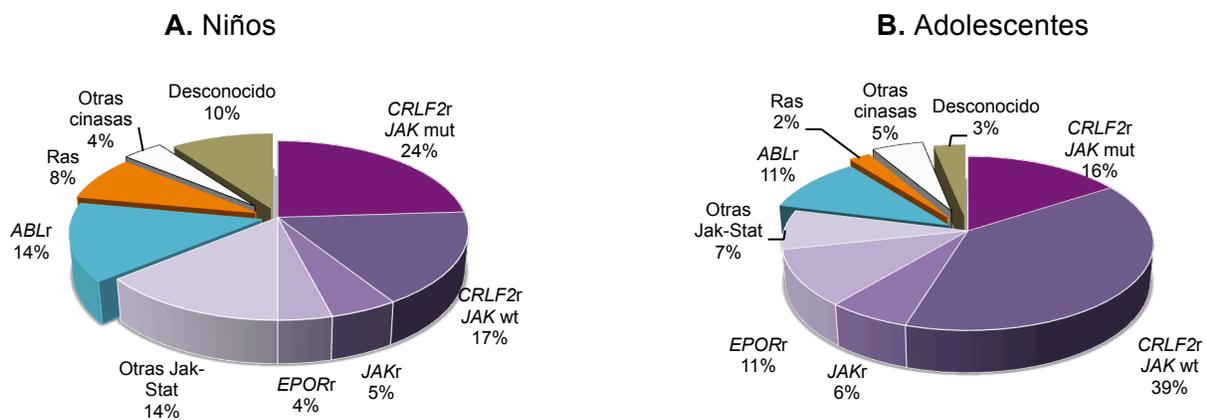


Figura 5. Alteraciones genéticas del subtipo Ph-like. Alteraciones que involucran a la vía Jak2-Stat5 (morado), Abl (azul) y Ras (naranja) mut: mutación. Modificado de Roberts *et al.*, (2015) ⁽¹⁹⁾.

1.5.2 Alteraciones del gen *CRLF2*

El gen *CRLF2* (Receptor de citocinas similar al factor 2, por sus siglas en inglés) está ubicado en la región pseudoautosómica 1 (PAR1, por sus siglas en inglés) en Xp22.3/Yp11.3. Codifica el receptor de linfopoyetina estromal tímica, el cual forma un heterodímero con el receptor alfa de la interleucina 7 para facilitar la unión del ligando, y permitir la señalización río abajo que dirige procesos de linfopoyesis ⁽²¹⁾.

El gen *CRLF2* se encuentra alterado en aproximadamente 50% de los casos Ph-like y en 30-50% de los casos de LLA pre-B asociados al síndrome de Down. Los principales mecanismos de desregulación de *CRLF2* son: 1) la translocación *IGH-CRLF2*, que yuxtapone a la región codificante de *CRLF2* con los elementos potenciadores de la transcripción del locus de genes de cadenas pesadas de inmunoglobulinas *IGH* en 14q32.3 (Figura 6A y 6B); 2) la fusión *P2RY8-CRLF2*, que ocurre debido a una microdelección en PAR1 que yuxtapone al promotor del gen *P2RY8* (muy activo en linfocitos pre/pro-B) con el marco de lectura completo del gen *CRLF2* (Figura 6A y C); 3) la mutación puntual Phe232Cys, que provoca la homodimerización de la proteína *CRLF2* a nivel de membrana mediante puentes disulfuro. Debido a estos tres mecanismos la leucemia Ph-like, con alteraciones de *CRLF2*, muestra hiperactividad de las vías de señalización Jak2-Stat5, PI3K-Akt-mTOR y Bcl2 aún en ausencia del ligando de *CRLF2*. En particular, la activación de Jak2-Stat5 se puede evaluar por la cuantificación de los niveles de pSTAT5; en estos casos se ha observado una disminución de los niveles de pSTAT5 con el inhibidor ruxolitinib a nivel experimental^(8, 16, 22).

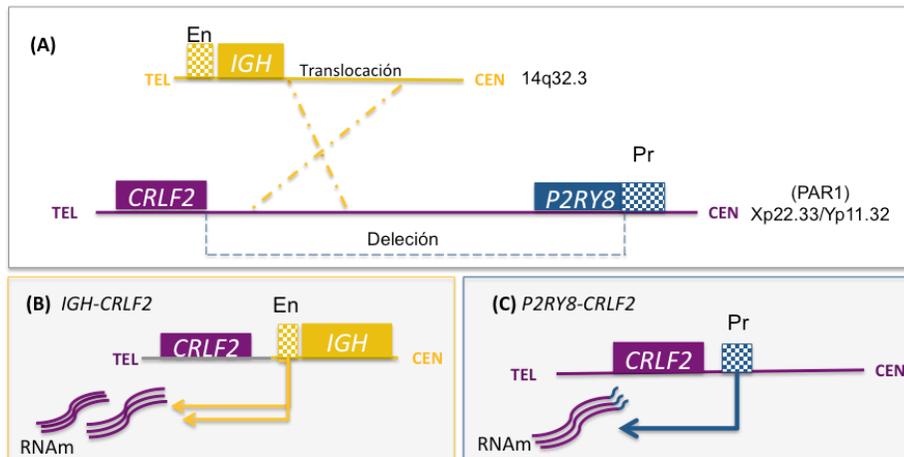


Figura 6. Rearreglos de *CRLF2*. (A) El gen *CRLF2* ubicado en la región PAR1 se yuxtapone con el promotor (Pr) del gen *P2RY8* a causa de una deleción intersticial, y con el potenciador (En) del locus *IGH* a causa de una translocación. (B) La translocación *IGH-CRLF2*: en el cromosoma derivativo 14, los elementos En del locus de *IGH* se colocan adyacentes al gen *CRLF2* produciendo la sobreexpresión de la proteína completa. (C) La fusión *P2RY8-CRLF2*: la deleción de aproximadamente 320Kb en PAR1 provoca la sobreexpresión de un transcrito de aproximadamente 1342pb compuesto de la región 5'UTR de *P2RY8* unida al exón 1 del gen *CRLF2*, el cual se traduce en una proteína *CRLF2* completa. CEN. centrómero, TEL. telómero, Modificado de Tasian y Loh (2011)⁽²²⁾.

La frecuencia de alteraciones de *CRLF2* es dependiente de la edad, *P2RY8-CRLF2* es más común en niños con una edad media de 4 años, mientras que la frecuencia de *IGH-CRLF2* incrementa en adolescentes con una edad media de 14 años. El origen étnico también influye en la frecuencia de alteraciones de *CRLF2*, específicamente *IGH-CRLF2* es más frecuente en pacientes de origen hispano^(16, 22). En pacientes pediátricos, aproximadamente la mitad de los casos con rearreglos de

CRLF2 tienen mutaciones activadoras en *JAK1* y *JAK2* (Figura 5A); la más frecuente es la mutación no sinónima R683G en el dominio pseudocinasa de *JAK2* ⁽²¹⁾.

Los rearrreglos del gen *CRLF2* producen su sobreexpresión a nivel de transcrito y de proteína, lo cual puede cuantificarse mediante RT-PCR en tiempo real y citometría de flujo, respectivamente; en todos los casos positivos a la translocación *IGH-CRLF2* se detecta la sobreexpresión del ARN mensajero (ARNm) de *CRLF2*, en cambio, algunos casos positivos a la delección *P2RY8-CRLF2* no sobreexpresan *CRLF2* debido a que esta alteración puede estar presente en clonas minoritarias ⁽²²⁻²⁵⁾. La translocación *IGH-CRLF2* es reconocida como una alteración inicial en el proceso de leucemogénesis, a diferencia de la fusión *P2RY8-CRLF2*, la cual generalmente es adquirida como un evento secundario y se encuentra presente en subclonas leucémicas acompañando a una alteración inicial como la intra-amplificación del cromosoma 21 (iAMP21). La amplificación iAMP21 constituye un subtipo definido de LLA pre-B de mal pronóstico que se presenta en aproximadamente 2% de los casos de LLA pre-B en población general. En particular, Rand *et al.*, (2011) ⁽²⁶⁾ reporta la presencia de la delección *P2RY8-CRLF2* en el 24% de los pacientes de una cohorte seleccionada por poseer la iAMP21, en contraste, Harrison (2015) ⁽²⁷⁾ refiere que 14% de los casos *P2RY8-CRLF2* coexisten con la iAMP21 ⁽²⁴⁾. Cabe mencionar que esa alteración se encontró en 14% de los pacientes Ph-like caracterizados por el Grupo Holandés/Alemán DCOG ⁽²⁰⁾.

1.5.3 Otras alteraciones Ph-like que afectan la señalización Jak2-Stat5

Además de la alteración de *CRLF2*, la activación constitutiva de la vía Jak2-Stat5 se asocia a otros dos rearrreglos recurrentes en Ph-like, translocaciones y deleciones intersticiales que involucran al gen *JAK2* y al gen *EPOR* (Anexo 1-Tabla 2) ⁽²⁴⁾. *JAK2* es el gen más promiscuo del subtipo Ph-like, ya que forma fusiones génicas con al menos 20 genes diferentes. La mayoría de estas fusiones interrumpen el marco de lectura de *JAK2* dejando intacta la secuencia del dominio tirosina cinasa y uniéndola a la secuencia de su pareja génica en 5', que usualmente provee un dominio de dimerización para la autofosforilación y activación de la vía Jak2-Stat5 en ausencia del ligando ⁽²⁴⁾. Los rearrreglos del gen *EPOR* involucran a cuatro parejas génicas *IGH*, *IGK*, *LAIR1* y *THADA* (Anexo 1-Tabla 2) ⁽²⁴⁾; el más común es la inserción del gen *EPOR* en el locus de *IGH*. Los cuatro posibles rearrreglos del gen *EPOR* producen la sobreexpresión del receptor de eritropoyetina con el extremo C terminal trunco, esto provoca la pérdida del dominio de autoregulación y la activación constitutiva de la señalización Jak2-Stat5 en las células leucémicas ⁽²⁸⁾.

Otras alteraciones que activan a la vía Jak2-Stat5 en Ph-like incluyen mutaciones en la secuencia de los miembros de la familia JAK (*JAK1-3*), mutaciones homodimerizantes del receptor alfa de interleucina (*IL7R α*), y deleciones focales en el gen *SH2B3* que codifica a Lnk, que es un regulador

negativo de la vía de Jak. En menor frecuencia se presentan los rearrreglos en *TYK2* e *IL2RB*, los cuales pueden activar la señalización de Jak2 y Jak3 (Anexo 1-Tabla 2) ⁽²⁴⁾.

1.5.4 Alteraciones que desregulan la señalización de Abl y Ras

Aproximadamente 10% de los casos Ph-like poseen genes de fusión que involucran a cinasas capaces de activar la vía de señalización de Abl. Los genes involucrados incluyen a *ABL1*, *ABL2*, *CSF1R*, *PDGFRA* y *PDGFRB*; todas las fusiones dejan intacto el dominio carboxilo terminal de clase Abl y lo yuxtaponen con el dominio amino terminal de la pareja génica (Anexo 1-Tabla 2) ⁽²⁴⁾. Los pacientes con fusiones génicas de este tipo se comportan como una fenocopia del subtipo *BCR-ABL1* positivo, por lo tanto, son potencialmente tratables con el inhibidor de Abl imatinib o con el inhibidor dual de Abl/Src dasatinib. La hiperactivación de la vía de Abl puede medirse por la cuantificación de los niveles de pCRKL ⁽²⁴⁾.

Algunos pacientes Ph-like poseen mutaciones activadoras de la vía de Ras, los genes involucrados son *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PTPN11* y *BRAF*. La hiperactivación de la vía de Ras puede medirse por la cuantificación de los niveles de pERK ⁽²⁴⁾.

1.5.5 Alteraciones en *IKZF1*

Aproximadamente 85% de los casos Ph-like presentan alteraciones en genes que codifican para factores de transcripción de desarrollo linfoide, como son *IKZF1*, *ETV6*, *EBF1*, *ERG*, *PAX5* y *TCF3*; de éstos, *IKZF1* es el gen que se altera con mayor frecuencia ⁽⁸⁾. *IKZF1* se ubica en 7p12.2 y abarca 6.2Kb, pertenece a la familia de factores de transcripción con dominios dedos de zinc (*IKZF1* al 5), codifica una proteína llamada Ikaros de 519 aminoácidos que está implicada en la regulación transcripcional de procesos de diferenciación del linaje linfoide. El gen *IKZF1* contiene 8 exones, del 4 al 6 codifican cuatro dominios de dedos de zinc N-terminales que son requeridos para la unión a la secuencia A/GGGAA del ADN, mientras que el exón 8 codifica dos dominios de dedos de zinc C-terminales que permiten la formación de homo o heterodímeros entre diferentes proteínas de la familia de *IKZF1* al 5 ^(29, 30).

Existen al menos nueve isoformas de *IKZF1* generadas por empalme alternativo de los exones 3 al 8, las isoformas largas incluyen de Ik1 a Ik3 y conservan al menos dos dominios de unión a ADN y son encontradas desde etapas tempranas de la linfopoyesis; en cambio, las isoformas cortas incluyen a Ik4 a Ik10 y carecen de los dominios amino terminales de unión al ADN, pero retienen sus dominios de dimerización permitiendo su unión a isoformas largas o proteínas de la familia de *IKZF1-5*.

Particularmente las isoformas cortas Ik6 e Ik8 tienen un efecto dominante negativo, provocando que las proteínas normales de la familia *IKZF1-5* queden secuestradas en el citoplasma de las células leucémicas impidiendo su internalización en el núcleo y su función de factor de transcripción. En raras ocasiones las isoformas Ik6 e Ik8 se generan por empalme alternativo de los exones 4 al 7 y 4 al 6 de *IKZF1* respectivamente, generalmente son el producto de deleciones a nivel del ADN (Figura 7) ⁽²⁹⁻³¹⁾.

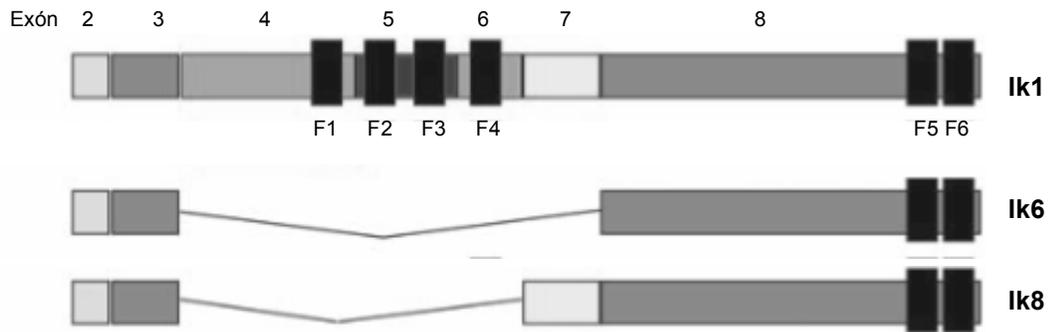


Figura 7. Isoformas dominante negativas de *IKZF1*. Las isoformas dominante negativas como Ik6 e Ik8 pierden sus dominios de unión a ADN (F1-F4) pero conservan sus dominios de dimerización (F5 y F6). Modificado de Marke *et al.*, (2018) ⁽³¹⁾.

Las alteraciones de *IKZF1* incluyen mutaciones puntuales y deleciones, estas últimas son las más frecuentes. Los subtipos Ph+ y Ph-like tienen la mayor frecuencia de alteraciones de *IKZF1*, 80% y 32% al 68% respectivamente, el resto de los subtipos moleculares de LLA pre-B tienen una frecuencia aproximada de alteraciones de *IKZF1* del 16%. De hecho, se sugiere que la similitud entre el transcriptoma Ph+ y Ph-like se debe a la alta frecuencia de alteraciones en *IKZF1* y otros genes que codifican factores de transcripción. Con respecto a los subtipos de LLA pre-B Ph-like, las alteraciones de *IKZF1* son más frecuentes en los casos que portan genes de fusión de cinasas, en contraste con los casos con mutaciones puntuales (78% y 33% respectivamente) ^(8,24).

1.6 Características clínicas del subtipo Ph-like

El subtipo Ph-like ha sido asociado a características clínicas de alto riesgo como cuentas elevadas de leucocitos, valores altos de enfermedad mínima residual (EMR) después de la terapia de inducción a la remisión (por lo cual estos pacientes reciben una terapia intensiva post-remisión), y un riesgo incrementado de falla al tratamiento y recaída ⁽²¹⁾. Debido al pronóstico adverso, la OMS en el 2016 incorporó a este subtipo como provisional dentro de la clasificación de la LLA pre-B, confirmando su importancia clínica ⁽¹⁶⁾.

La incidencia del subtipo Ph-like difiere con base en diversos aspectos como: 1) la edad, ya que se presenta en el 10% al 15% de los pacientes pediátricos con LLA y hasta en el 25% de los adultos jóvenes; 2) el género, porque se presenta dos veces más en varones; 3) el origen étnico, porque los pacientes clasificados como hispano-latinos de EE. UU. tienen una alta prevalencia del subtipo Ph-like debido a la alta frecuencia de alteraciones de *CRLF2*; 4) el grupo de riesgo, ya que representa 10% de los casos clasificados como de riesgo estándar y del 13 al 14% de los clasificados como de alto riesgo, de acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer ⁽²¹⁾.

Con respecto a la respuesta al tratamiento, los casos Ph-like con lesiones activadoras de cinasas responden pobremente a la quimioterapia de inducción, tienen tasas bajas de remisión y mala respuesta al tratamiento con el corticoesteroide prednisona; la supervivencia libre de evento a cinco años está reportada entre 50% y 89% para los casos con fusiones de *ABL1*, y menos del 67% para los casos con alteraciones en *JAK2*, *EPOR* y *CRLF2*. Aunque existen diferencias en el pronóstico entre las distintas alteraciones del subtipo, la supervivencia inferior de los pacientes Ph-like con respecto a casos no Ph-like ocurre independientemente de la lesión genómica. De acuerdo a datos del COG, el 15% de los pacientes Ph-like reciben trasplante de células progenitoras hematopoyéticas debido a una elevada EMR después de la terapia de inducción ^(8,18,21).

Existe un gran interés en el uso de terapias dirigidas para el subtipo Ph-like, la mayoría de las alteraciones en cinasas convergen en un número limitado de vías de señalización que pueden ser efectivamente tratadas *in vivo* usando quimioterapia combinada con la inhibición de las cinasas de Jak, Abl y Ras ⁽²⁴⁾. Para la LLA pre-B Ph-like con rearrreglos de *CRLF2* existe un estudio clínico de fase 2 (COG ALL1521) que investiga la seguridad y eficacia de la molécula ruxolitinib en combinación con la quimioterapia post inducción en niños, adolescentes y adultos jóvenes. Tasian *et al.*, (2017) ⁽³²⁾ demostró que la activación constitutiva de la vía PI3K/Akt/mTOR en los pacientes Ph-like con rearrreglos de *CRLF2* puede ser inhibida con la molécula gedatolisib ⁽³²⁾. Por otra parte, el imatinib y dasatinib inducen remisiones y valores bajos de EMR en pacientes Ph-like con fusiones de clase *ABL1*, que responden pobremente a la quimioterapia; la experiencia clínica en los pacientes Ph+ ha establecido que estas moléculas pueden ser añadidas sin complicaciones, en combinación con los regímenes convencionales de quimioterapia. Con respecto a los pacientes con alteraciones en la señalización de Ras, las moléculas río abajo como MEK, son blancos potenciales de inhibidores como trametinib, selumetinib o cobimetinib, los cuales se han probado para los casos de leucemia mielomonocítica juvenil con alteraciones de la vía ⁽²⁶⁾. Por último, los estudios preclínicos han demostrado el potencial terapéutico del ácido retinoico y los inhibidores de la cinasa de adhesión focal FAK en casos con alteraciones de *IKZF1* ⁽¹⁹⁾.

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

En la literatura existen diferentes enfoques para diagnosticar a los pacientes Ph-like de manera oportuna, el análisis del PEG Ph-like se considera el estándar de oro para la detección del subtipo. Las dos principales plataformas de alta densidad de Affymetrix para el análisis de genoma completo utilizadas por el COG y el DCOG permiten la identificación de la firma Ph-like y *BCR-ABL1* like, respectivamente ⁽²⁴⁾, sin embargo, el grupo COG desarrolló un microarreglo de baja densidad que muestra alta concordancia con las plataformas de Affymetrix y se basa en la cuantificación de la expresión de 8 a 15 genes sobreexpresados en pacientes Ph-like, un algoritmo estadístico convierte una expresión génica sin procesar, en un solo valor numérico predictivo del subtipo denominado Coeficiente Ph-like ^(17,21,26). Los protocolos clínicos del COG utilizan el microarreglo de baja densidad para la identificación de los pacientes Ph-like aunque es importante considerar que el clasificador más robusto es obtenido cuando es puesto a prueba sobre la población para la cual se diseñó, ya que el origen étnico impide que un clasificador se aplique eficazmente a cualquier población. Además, otro aspecto importante es que este tipo de análisis representa costos elevados ^(17,21,26).

Adicionalmente al análisis del PEG, la caracterización genética de los pacientes Ph-like es la que cobra mayor relevancia clínica ya que brinda información con valor pronóstico y terapéutico. Considerando la heterogeneidad genética del subtipo, la implementación de algoritmos de diagnóstico pragmáticos puede ser desafiante. En este contexto, algunos grupos de investigación y centros de atención pediátrica han adoptado diferentes algoritmos para diagnosticar y caracterizar al subtipo Ph-like basados en las características geográficas de la población, y en la disponibilidad de los estudios genómicos ⁽³³⁾, dichos algoritmos son:

A. El análisis mediante secuenciación de nueva generación: esta herramienta se aplica a los pacientes diagnosticados con LLA pre-B de alto riesgo, permite el análisis del genoma completo, exoma y transcriptoma para la detección de alteraciones como sustitución de bases, inserciones, eliminaciones, variaciones en el número de copias y reordenamientos reportados en el subtipo Ph-like. Esta información está disponible en los días 28-42 de inducción a la remisión, los informes son procesados por bioinformáticos y científicos, y aprobados por patólogos certificados. El clínico que los recibe no requiere de análisis adicionales, no obstante, la metodología no está ampliamente disponible como prueba diagnóstica y requiere de mucho trabajo respecto al uso de diversas metodologías, almacenamiento de datos y el análisis bioinformático ⁽³⁴⁾.

B. El uso de análisis escalonados: esta estrategia se basa en el análisis del PEG Ph-like y la búsqueda de los rearrreglos genéticos frecuentes del subtipo. Todos los pacientes recién diagnosticados con LLA pre-B de alto riesgo son analizados para el PEG Ph-like usando el

microarreglo de baja densidad, para calcular un coeficiente Ph-like que va de 0 a 1 y se basa en la sobreexpresión de 8 a 15 genes específicos, (se excluyen los casos Ph+ y *ETV6-RUNX1* que pueden sobre-expresar algunos genes del PEG). Los pacientes con coeficiente mayor a 0.5 son categorizados como Ph-like y posteriormente estratificados por el nivel de expresión de *CRLF2*; los que tienen alta expresión de *CRLF2* son probados para rearrreglos del gen mediante FISH y para mutaciones en *JAK1*, *JAK2* e *IL7R* por secuenciación Sanger, mientras que los pacientes con baja expresión de *CRLF2* son probados para otras alteraciones en cinasas por RT-PCR; en caso de ser negativos son subsecuentemente analizados por secuenciación de transcriptoma. Los resultados de este algoritmo se entregan dentro de las primeras cuatro semanas de tratamiento de modo que cualquier modificación en el manejo puede iniciarse después de la terapia de inducción. Esta estrategia requiere la coordinación de múltiples laboratorios clínicos, es rentable y práctica para ensayos que acumulan una gran cantidad de pacientes de varias instituciones⁽³⁴⁾.

C. La búsqueda de rearrreglos genéticos frecuentes en el subtipo Ph-like: con esta estrategia se busca detectar la sobreexpresión de *CRLF2* en la superficie celular mediante citometría de flujo o a nivel de ARNm por RT-PCR en tiempo real, utilizando métodos de cuantificación relativa con valores de corte aritméticos o arbitrarios⁽³⁵⁾. Los rearrreglos en *CRLF2*, al igual que el resto de los reordenamientos en cinasas, pueden detectarse por FISH utilizando sondas de segregación; también se puede utilizar RT-PCR para detectar fusiones génicas conocidas. Esta estrategia es útil ya que es rápida y rentable, pero no detecta todas las alteraciones consideradas dentro del subtipo Ph-like⁽³³⁾.

Las alteraciones de *CRLF2* han sido estudiadas en pacientes con LLA pre-B por distintos grupos de investigación, y se conoce que juegan un papel importante en la patogénesis del subtipo Ph-like. De acuerdo con los estudios de Harvey *et al.*, (2010)⁽³⁶⁾ realizados en pacientes con LLA pre-B de alto riesgo residentes en California EE.UU, las alteraciones de *CRLF2* fueron encontradas en el 25% de los pacientes identificados como hispano-latinos, mientras que en pacientes de otras razas este hallazgo se presentó en el 7.1%. Estos hallazgos señalan que el subtipo Ph-like es particularmente frecuente en individuos con origen étnico hispano-latino a causa de la alta frecuencia de rearrreglos de *CRLF2*, cabe mencionar que en los pacientes hispano-latinos también se refiere una alta frecuencia de alteraciones en otros genes asociados al subtipo Ph-like como *IKZF1* o *JAK2*⁽³³⁾. Por otro lado, Jain *et al.*, (2017)⁽³⁷⁾ reporta cuatro casos con ancestría hispano-latina en los cuales las alteraciones de *CRLF2* coexisten con la fusión génica *BCR-ABL1*, no obstante, el significado biológico y clínico de la coexistencia de las alteraciones de *CRLF2* con las fusiones génicas recurrentes en LLA pre-B aún es controvertido, por lo que debe ser estudiado.

3. JUSTIFICACIÓN

En México, al menos el 30% de los casos de LLA pre-B presentan recaídas que no se asocian con alteraciones citogenéticas y moleculares recurrentes. De acuerdo con datos del Instituto Nacional de Pediatría (INP), el 37% de los pacientes con LLA pre-B atendidos en esta institución tampoco muestran dichas alteraciones, por lo tanto son candidatos a presentar alteraciones en *CRLF2* y/o pertenecer al subtipo Ph-like. La alta frecuencia de estas alteraciones encontrada en los pacientes con origen étnico hispano-latino confirma la importancia de estudiarlas en pacientes mexicanos, especialmente si se considera la complejidad del origen étnico de este grupo residente en E.E. U.U., lo cual impide la extrapolación de los datos a los pacientes mexicanos con LLA pre-B, quienes podrían tener una frecuencia distinta de alteraciones en *CRLF2* y/o del subtipo Ph-like.

En México el acceso a las metodologías de análisis genómico es limitado, por lo que es necesario implementar un algoritmo diagnóstico pragmático para la detección del subtipo Ph-like. En este contexto el laboratorio de Genética y Cáncer del INP, cuenta con una línea de investigación cuyo objetivo principal es la detección del subtipo Ph-like en pacientes mexicanos mediante el análisis de una firma de expresión diseñada en el laboratorio. Hasta ahora, esta investigación ha permitido detectar pacientes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like, sin embargo, aún es necesario llevar a cabo una caracterización genética que apoye su pertenencia a dicho subtipo. Este análisis permitiría conocer la frecuencia del subtipo Ph-like en una cohorte de pacientes mexicanos con LLA pre-B, proponer un algoritmo diagnóstico basado en la caracterización genética del subtipo, y reconocer posibles blancos terapéuticos.

3.1 Preguntas de Investigación

- A. ¿En la población de estudio se encuentran pacientes que pertenecen al subtipo Ph-like?
- B. ¿Los pacientes de la población de estudio identificados como Ph-like son portadores de alteraciones en los genes *CRLF2* y/o *IKZF1*?
- C. ¿La frecuencia del subtipo Ph-like y/o de alteraciones en el gen *CRLF2* es mayor en la población de estudio en comparación con la reportada en cohortes con un origen étnico distinto al amerindio?
- D. ¿Los pacientes de la población de estudio que son positivos a las fusiones génicas recurrentes presentan alteraciones en los genes *CRLF2* y/o *IKZF1*?

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Detectar pacientes pediátricos con LLA pre-B del subtipo Ph-like a través de la búsqueda de las alteraciones genéticas más frecuentes de esta entidad.

4.2 Objetivo particular

Detectar alteraciones en *CRLF2* y/o *IKZF1* en pacientes pediátricos con LLA pre-B.

5. HIPÓTESIS

Se encontrará una elevada frecuencia del subtipo Ph-like y/o de alteraciones en el gen *CRLF2* debido a que los pacientes de la población de estudio tienen una mayor proporción de origen étnico amerindio en comparación con otras cohortes de la literatura.

6. METODOLOGÍA

6.1 Clasificación del estudio.

Este es un estudio de tipo descriptivo observacional, en el que se busca conocer las características genéticas del subtipo Ph-like y su frecuencia en una cohorte de pacientes pediátricos mexicanos con LLA pre-B. También es un estudio prospectivo ya que los datos obtenidos fueron analizados en conjunto después de finalizar los respectivos análisis de cada paciente captado durante tres años y es de tipo transversal ya que para la mayoría de los pacientes únicamente se captaron muestras al momento del diagnóstico.

6.2 Selección de pacientes

Se captó un total de 188 pacientes con diagnóstico de LLA, atendidos en el periodo del 2015-2018 en los Servicios de Hematología y Oncología del INP (CDMX), el Hospital Infantil de México Federico Gómez (CDMX) y el Hospital Infantil Teletón de Oncología (Qro). El protocolo de investigación del cual se deriva este trabajo de tesis, fue aprobado por los Comités de Investigación y de Ética de las tres instituciones que participaron.

6.2.1 Criterios de inclusión

Se incluyeron pacientes de 0 a 18 años de edad con diagnóstico confirmado de LLA de inmunofenotipo pre/pro-B, captados al momento del diagnóstico o en recaída, que aceptaron participar en este estudio mediante la firma de una carta de asentimiento/consentimiento informado. Los pacientes con resultado negativo para las fusiones génicas recurrentes fueron incluidos si contaron con el análisis de expresión génica de los genes: *TSPAN7*, *IGJ*, *SEMA6A*, *PON2*, *BMPR1B* y *CRLF2*. Los pacientes con resultado positivo para las fusiones génicas recurrentes se incluyeron si contaron con el análisis de expresión relativa del gen *CRLF2*.

6.2.2 Criterios de exclusión

Se excluyeron a aquellos pacientes sin resultado del diagnóstico de las fusiones génicas recurrentes *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* y *var-KMT2A*.

6.3 Estrategia de análisis

Este trabajo de tesis profundizó en la caracterización genética de los pacientes negativos a fusiones génicas recurrentes, que fueron previamente identificados como candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like con base en el análisis de un perfil de expresión génica (PEG) integrado por los genes *TSPAN7*, *IGJ*, *SEMA6A*, *PON2*, *BMPR1B* y *CRLF2*, los cuales son frecuentes en las firmas de expresión referidas para el subtipo Ph-like (Figura 8).

A partir de los resultados de expresión de *CRLF2* se determinó el valor de corte de sobreexpresión de este gen, y se realizó la estratificación de los pacientes con o sin sobreexpresión del transcrito (Figura 8). Se buscaron los rearrreglos más frecuentes de los genes *CRLF2* e *IKZF1*. Se detectaron la delección *P2RY8-CRLF2* y los transcritos correspondientes a isoformas dominante negativas de *IKZF1*, Ik6 e Ik8, en todos los pacientes. La translocación *IGH-CRLF2* se buscó únicamente en aquellos pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* y negativos a la delección *P2RY8-CRLF2*. En algunos casos con la delección *P2RY8-CRLF2* positiva, pero sin sobreexpresión de *CRLF2*, se buscó la presencia de subclonas minoritarias portadoras de la delección. La búsqueda de la amplificación *iAMP21* se realizó únicamente en los pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos (Figura 8). Posteriormente se realizó un análisis integrativo de las alteraciones genéticas identificadas para definir la presencia del subtipo Ph-like. Una vez que se identificaron los pacientes pertenecientes a este grupo, se seleccionaron algunos casos para complementar su caracterización genética mediante la búsqueda de variaciones en el número de copias (CNV's, por sus siglas en ingles) de genes de desarrollo linfóide, receptores de citocinas o proteínas tirosina cinasa reportadas en el subtipo Ph-like (Figura 8).

En los pacientes positivos a fusiones génicas recurrentes que contaron con el análisis de expresión de *CRLF2*, se determinó la presencia de rearrreglos de dicho gen y las alteraciones en *IKZF1*, con la finalidad de detectar a un subgrupo de pacientes positivos a FGR que mostraran la coexistencia con alteraciones de *CRLF2* y/o *IKZF1*.

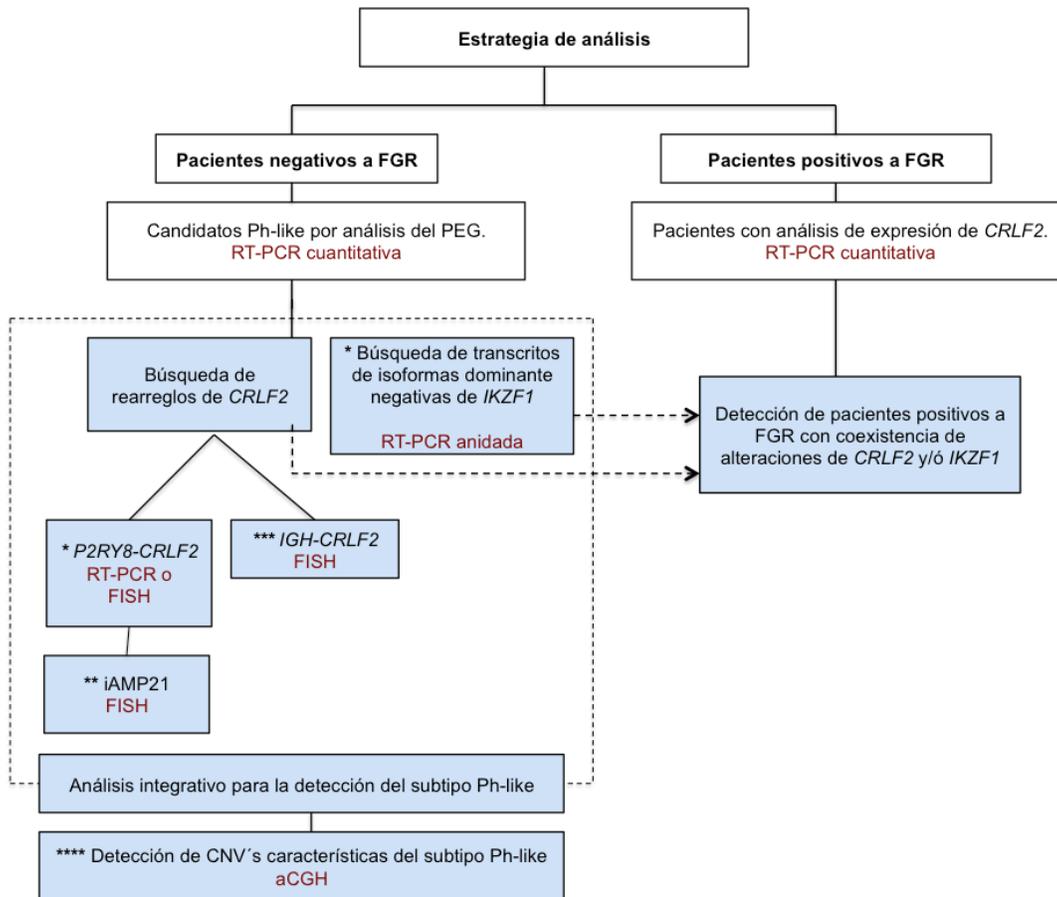


Figura 8. Estrategia de análisis. La población de estudio fue analizada de acuerdo con esta estrategia de análisis. En este trabajo de tesis se desarrollaron los procesos marcados en azul. Estos análisis se realizaron en: * todos los pacientes. ** pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos. *** pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* y negativos a la delección *P2RY8-CRLF2*. **** algunos pacientes clasificados como Ph-like. Las metodologías utilizadas para cada análisis se distinguen con letras rojas. PEG, perfil de expresión génica. aCGH, microarreglo de hibridación genómica comparativa. FISH, hibridación *in situ* con fluorescencia. RT-PCR, reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción.

6.4 Técnicas de laboratorio

6.4.1 Aislamiento de células mononucleares

Se obtuvieron de 2 a 5mL de muestras de aspirado de médula ósea con EDTA y/o heparina como anticoagulantes. A partir de cada muestra se aislaron células mononucleares utilizando un gradiente de densidad para obtener una fracción enriquecida en blastos leucémicos. Las células se cuantificaron en un hemocitómetro, se distribuyeron en alícuotas de solución RLT, solución amortiguadora de fosfatos (PBS por sus siglas en inglés) y medio de congelación con Dimetilsulfóxido (DMSO); posteriormente fueron preservadas a -70°C en nitrógeno líquido hasta su uso (ver Anexo 2.1).

6.4.2 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se obtuvo ARN a partir de células mononucleares almacenadas en buffer RLT utilizando el estuche de extracción RNeasy Mini (Qiagen), de acuerdo a las instrucciones del fabricante; posteriormente se cuantificó mediante espectrofotometría UV/Vis a 260 nm, la pureza se valoró mediante el coeficiente de absorbancia 260/280 nm, y la integridad se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa (ver Anexo 2.2).

Se sintetizó ADN complementario (ADNc) partiendo de $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de ARN mediante una reacción de retro-transcripción. Para verificar la eficacia de la síntesis del ADNc se amplificó el gen constitutivo *GAPDH* mediante RT-PCR (ver Anexo 2.3 y 2.3.1).

6.4.3 Cuantificación de la expresión relativa de *CRLF2* por RT-PCR en tiempo real

Se determinó el nivel de expresión relativa del ARNm de *CRLF2* y del resto de los genes planteados para la firma de expresión Ph-like (*TSPAN7*, *SEMA6A*, *IGJ*, *PON2* y *BMPR1B*) mediante PCR en tiempo real utilizando el método $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Figura 8). La reacción se llevó a cabo en un termociclador LightCycler 2.0 Instrument (Roche Applied Science). Para la amplificación de cada gen se utilizaron oligonucleótidos específicos y se eligió una sonda de ADN tipo TaqMan obtenida a partir de la *Universal Probe Library System* (Roche Applied Science). Cada reacción se hizo por duplicado y en cada ciclo de reacciones se incluyó un control negativo (ver Anexo 2.4). Los valores normalizados de expresión relativa del total de las muestras analizadas fueron divididos en cuartiles. Para *CRLF2* los cuartiles de los niveles de expresión (q) fueron: $q_1=23$, $q_2=143.2$ (mediana) y $q_3=681.1$. Diferentes grupos de investigación han determinado la sobreexpresión de *CRLF2* mediante RT-PCR en tiempo real utilizando métodos de cuantificación relativa con valores de corte aritméticos, la mayoría de estos

considera como sobreexpresión a valores superiores a la mediana de la cohorte analizada ya que es un parámetro con mayor estabilidad en comparación con la media, y es menos variable comparado con los criterios basados en características biológicas ⁽³⁵⁾. En este trabajo se consideraron con sobreexpresión aquellas muestras cuyo valor de expresión relativa se encontró por arriba del valor de la mediana.

6.4.4 Detección de la delección *P2RY8-CRLF2* por RT-PCR punto final

La delección *P2RY8-CRLF2* se identificó mediante RT-PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el transcrito que produce el rearreglo (Figura 8). El oligonucleótido sentido 5'-GGACAGATGGAAGG-3 de esta reacción es complementario con el primer exón de *P2RY8*, el cual está conservado en el transcrito quimérico; el oligonucleótido antisentido (5'-GTCCATTCCTGATGGAGAA-3) es complementario con el tercer exón de *CRLF2*. El transcrito quimérico genera un producto de amplificación de ~511pb (Palmi *et al.*, 2012) ⁽²⁵⁾, el cual fue verificado en una electroforesis en gel de agarosa; cuando la delección no está presente no se forma el transcrito quimérico, por lo tanto no se observa un producto de amplificación. Después de esta reacción, cada muestra fue sometida a un segundo ciclo de amplificación bajo las mismas condiciones, esto con la finalidad de detectar el rearreglo *P2RY8-CRLF2* aún si se presentara en baja proporción. Las especificaciones de la reacción se muestran en el Anexo 2.5.

6.4.5 Detección de la delección *P2RY8-CRLF2* por FISH

Con la finalidad de asociar la presencia del rearreglo *P2RY8-CRLF2* con el nivel de expresión de *CRLF2*, se determinó el porcentaje de clonas portadoras de la delección mediante FISH en interfase en 6 pacientes seleccionados por presentar la delección *P2RY8-CRLF2* positiva por RT-PCR, y que mostraron diferentes valores de nivel de expresión de *CRLF2* (Figura 8).

Las células de médula ósea criopreservadas en DMSO fueron procesadas para obtener núcleos y con este material se hicieron preparaciones. Se realizó FISH con una sonda de delección de doble color para la región PAR1 (Cytocell) utilizando las recomendaciones del fabricante (ver Anexo 2.5.1). La sonda marca la región que se pierde por delección en color rojo; el patrón clásico de delección se observa como 1 señal íntegra (amarilla) y 1 o más señales con delección (señal verde con pérdida de la roja) (ver Anexo 3.5.1). Se analizaron entre 200 y 500 núcleos por muestra, incluyendo el análisis de células de médula ósea provenientes de un individuo sano. Se consideró como resultado positivo el encontrar al menos una clona con el patrón clásico de delección, en mayor proporción que la encontrada en la médula ósea normal.

6.4.6 Detección de transcritos de isoformas con efecto dominante negativo de *IKZF1* por RT-PCR anidada punto final.

Se realizó la detección de transcritos correspondientes a las isoformas dominante negativas de *IKZF1* mediante RT-PCR anidada, utilizando ADNc de cada muestra y dos pares de oligonucleótidos en dos reacciones por separado (Figura 8): En la reacción 1, los oligonucleótidos sentido 5'-CACATAACCTGAGGACCATG-3' y antisentido 5'-AGGGCTTTAGCTCATGTGGA-3' son complementarios a la secuencia del ARNm de *IKZF1*, hibridando en el exón 2 y 8 respectivamente; los tamaños de amplicón esperados para las isoformas Ik1, Ik6 e Ik8 en esta reacción fueron de ~1583 pb, 1028 pb y 892 pb respectivamente (Lin *et al.*, 2016)⁽³⁸⁾ y se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con Gel Red (Biotium) (ver Anexo 3.6). La reacción 2 es una PCR anidada, los oligonucleótidos sentido 5'-ATGGATGCTGATGAGGGTCAAGAC-3' y anti-sentido 5'-GATGGCTGGGTCCATCACGTGG-3' hibridan dentro de la región flanqueada por los oligonucleótidos de la primer reacción, por lo tanto los oligonucleótidos de la reacción anidada hibridan con el transcrito original de *IKZF1* y con el amplicon producido en la primera reacción. En la reacción anidada los tamaños de amplicon esperados para las isoformas Ik1, Ik6 e Ik8 fueron de ~945 pb, 390 pb y 255 pb respectivamente (Lin *et al.*, 2016)⁽³⁸⁾, y se visualizaron en un gel de agarosa al 3% teñido con Gel Red (Biotium) (ver Anexo 2.6).

6.4.7 Detección de la translocación *IGH-CRLF2* por FISH

La translocación *IGH-CRLF2* se detectó mediante FISH en interfase, y sólo en pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* que fueron negativos a la delección *P2RY8-CRLF2* (Figura 8). Se llevó a cabo en dos ensayos por separado utilizando sondas de segregación con doble color para los genes *IGH* y *CRLF2* (Vysis y Cytocell, respectivamente) de acuerdo con las recomendaciones de cada fabricante (ver Anexo 2.7). La estandarización de los dos ensayos se realizó con la línea celular MHH-CALL4 positiva a la translocación *IGH-CRLF2*, y sobre células de médula ósea provenientes de un individuo sano. Cada ensayo se hizo por separado analizando un mínimo de 200 núcleos por tipo de sonda, el patrón clásico de ruptura esperado para *IGH* y *CRLF2* fue una fusión, que equivale a una señal amarilla, y una ruptura, que equivale a una señal verde y una roja separadas. Se consideró un resultado de fusión positiva cuando se observó una clona (minoritaria o mayoritaria) con el patrón clásico de ruptura del locus de *IGH* y el gen *CRLF2* en proporciones similares, y en mayor proporción que en la médula ósea normal. Se consideró la presencia de hiperdiploidía cuando se encontraron clonas celulares con ganancia de señales íntegras observadas como señales amarillas o roja y verde juntas, tanto para el locus de *IGH* (cromosoma 14) como para *CRLF2* (cromosoma X y Y), en proporciones similares.

6.4.8 Detección de la amplificación iAMP21 por FISH

La amplificación iAMP21 se detectó mediante FISH en interfase en células de médula ósea criopreservadas, de pacientes positivos a la delección *P2RY8-CRLF2* (Figura 8). Se utilizó la sonda de doble color, doble fusión LSI *ETV6-RUNX1* (Vysis) siguiendo las recomendaciones del fabricante (Anexo 2.8). La sonda en color verde hibridó con el gen *ETV6* ubicado en el cromosoma 12, y con *RUNX1* en rojo ubicado en el cromosoma 21. El patrón correspondiente a la amplificación iAMP21 se reconoció por el aumento en el número de copias, tres o más señales, producido por la duplicación en tándem de *RUNX1*.

6.4.9 Extracción de ADN de células mononucleares

Se obtuvo ADN a partir de células mononucleares utilizando el estuche de extracción *DNeasy Mini Blood & Tissue* (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrofotometría UV/Vis a 260nm, la pureza se valoró mediante el coeficiente de absorbancia 260nm/280nm y 230nm/260nm. La integridad se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa (ver Anexo 2.9).

6.4.10 Búsqueda de CNV's asociadas al subtipo Ph-like por microarreglos tipo aCGH

Este análisis se llevó a cabo mediante microarreglos de hibridación genómica comparativa (aCGH) en cuatro pacientes seleccionados por tener alta probabilidad de pertenecer al subtipo Ph-like, con base en el análisis integrativo de las alteraciones genéticas buscadas en este trabajo (Figura 8).

Se obtuvieron de 5.1 µg a 20.7 µg totales de ADN genómico de células leucémicas, y se realizaron microarreglos tipo aCGH utilizando un ADN genómico de referencia. El ADN se marcó con fluorescencia y se hibridó en un microarreglo genómico humano de un millón de sondas (Agilent 1M). La intensidad de fluorescencia se considera proporcional al número de copias de una secuencia determinada y es reportada como $\text{Log}_2 R$ (Figura 9), el cual representa el logaritmo base dos del cociente que se indica a continuación ^(39, 40):

$$\text{Log}_2 R = R_{\text{ADN de células leucémicas}} / R_{\text{ADN de referencia}}$$

En donde R significa intensidad de fluorescencia.

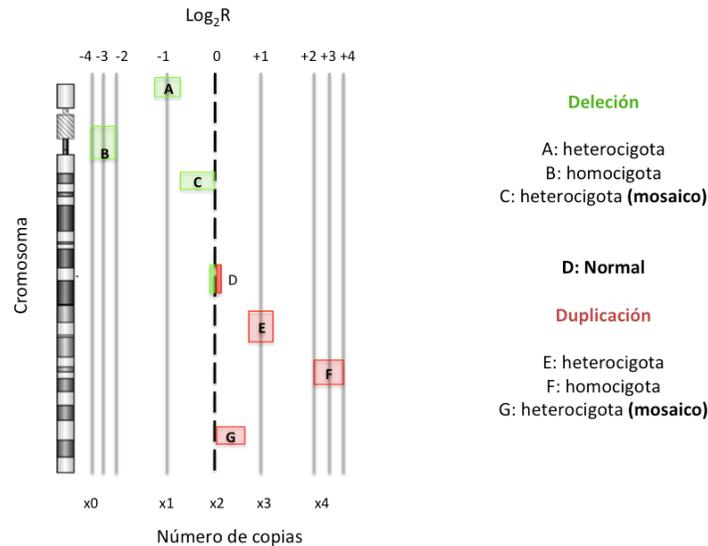


Figura 9. Interpretación del microarreglo de aCGH. El gráfico de Log_2R representa las diferencias entre la intensidad de fluorescencia del ADN de referencia y el ADN de interés, y se grafica sobre cada locus cromosómico representado en el microarreglo. Esto permite observar los tipos de CNV's presentes en la muestra. Modificado de Kishawi (2008) ⁽³⁹⁾.

Los resultados de cada microarreglo fueron analizados mediante técnicas bioinformáticas utilizando la versión hg18 del genoma humano y mediante análisis estadístico especializado. A partir de las alteraciones caracterizadas por el microarreglo se buscó información en la base de datos del navegador del genoma de la Universidad de California en Santa Cruz (*UCSC Genome Browser*, por sus siglas en inglés) para obtener una lista de genes de desarrollo linfocitario, receptores de citocinas o proteínas tirosina cinasa que se hayan reportado alterados en el subtipo Ph-like.

6.5 Interpretación de Resultados

Se consideró como sobreexpresión cuando se obtuvo un valor de expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) superior al valor de la mediana para cada gen que integró la firma de expresión, incluyendo *CRLF2*, de acuerdo con este criterio, un perfil de expresión génica (PEG) con positividad del 50% al 66% mostró sobreexpresión de 3 a 4 de los genes de la firma, en cambio, un PEG con positividad del 83% al 100% mostró sobreexpresión de 5 o 6 genes.

Como alteración de *CRLF2* se consideraron las siguientes posibilidades: presencia de la translocación *IGH-CRLF2* ⁽⁴¹⁾ o de la delección *P2RY8-CRLF2* ⁽²⁷⁾, casos con ganancia del número de copias de *CRLF2* a causa de hiperdiploidía, denominados *G-CRLF2* ⁽⁴¹⁾, casos con sobreexpresión de *CRLF2* en donde la alteración genética asociada fue desconocida (*ad-CRLF2*) ⁽⁴¹⁾ y casos con sobreexpresión de *CRLF2* en los que se obtuvo un resultado negativo para los rearrreglos *P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2*. Los pacientes sin sobreexpresión de *CRLF2* y negativos a la delección *P2RY8-CRLF2* fueron considerados como pacientes sin alteración de *CRLF2* ⁽⁴¹⁾.

Los pacientes con alteración del gen *IKZF1* fueron aquellos que mostraron transcritos correspondientes a las isoformas dominantes negativas de *IKZF1*, Ik6 y/o Ik8, o aquellos en los que no se detectó ninguna isoforma, después de haber verificado la calidad del ADNc y realizado un análisis por triplicado. Los pacientes que presentaron transcritos correspondientes a isoformas no dominante negativas (Ika1: 945pb, Ika2: 884pb, Ika3: 684pb, Ika3A: 684pb, Ika4: 458pb, Ika4A: 423pb, Ik5: 516pb, Ik7: 516pb) fueron considerados como pacientes sin alteración de *IKZF1* ⁽³¹⁾.

Los criterios mencionados para definir a *CRLF2* e *IKZF1* fueron considerados para seleccionar a los pacientes positivos a FGR con alteración en dichos genes.

El análisis integrativo del perfil de expresión génica (PEG) y las alteraciones en *CRLF2* e *IKZF1* permitió dividir a los pacientes en las siguientes categorías: Ph-like, Ph-like no *CRLF2*, alteración de *CRLF2* (Probable Ph-like) y no Ph-like. Los parámetros utilizados para clasificar a cada paciente en una de las cuatro categorías mencionadas fueron los siguientes:

A. Ph-like. Con sobreexpresión del 83-100% de los genes del PEG ^(20,21,37), sobreexpresión del 50-66% de los genes del PEG en conjunto con la presencia de la translocación *IGH-CRLF2* ^(42, 43), y/o sobreexpresión de *CRLF2* superior al valor del cuartil 3 (q3=681.1), presencia de la amplificación *iAMP21* ⁽²⁰⁾ o de la *G-CRLF2* ⁽⁴⁴⁾ en conjunto con la sobreexpresión del 83-100% genes del PEG, presencia o ausencia de alteración en *IKZF1*.

B. Ph-like no *CRLF2*. Con sobreexpresión del 50-66% de los genes del PEG ^(20,21,37) y ausencia de alteraciones de *CRLF2*, con o sin alteración en *IKZF1*.

C. Alteración de *CRLF2* (probable Ph-like). Se consideraron dos posibilidades:

1. Pacientes positivos a la sobreexpresión del 50-66% de los genes del PEG en conjunto con alguna característica 1, 2 o 3, y como opcional 4 :

1. Deleción *P2RY8-CRLF2* con o sin sobreexpresión de *CRLF2* , en presencia o ausencia de la amplificación *iAMP21*.
2. Sobreexpresión de *CRLF2* asociada a *G-CRLF2*.
3. Sobreexpresión de *CRLF2* por debajo del valor del cuartil 3 (q3=681.1) en ausencia de la deleción *P2RY8-CRLF2* (pacientes candidatos a presentar la translocación *IGH-CRLF2*).
4. Con o sin alteración en *IKZF1*.

2. Pacientes negativos al PEG en conjunto con 1, o 2, y como opcional 3:

1. Sobreexpresión de *CRLF2* asociada a G-*CRLF2* o a la delección *P2RY8-CRLF2* con o sin presencia de la amplificación *iAMP21*.
2. Sobreexpresión de *CRLF2* en ausencia de la delección *P2RY8-CRLF2* (pacientes candidatos a presentar la translocación *IGH-CRLF2*).
3. Con o sin alteración en *IKZF1*.

D. No Ph-like. Pacientes negativos al PEG con ausencia de alteraciones de *CRLF2*, o la presencia de la delección *P2RY8-CRLF2* sin sobreexpresión de *CRLF2*, con o sin la amplificación *iAMP21* y/o alteración en *IKZF1*.

6.5.1 Análisis estadístico

A partir de una base de datos se obtuvieron las características clínicas (edad al diagnóstico, género, cuenta de leucocitos al diagnóstico y estratificación de riesgo) de los pacientes analizados en este trabajo. Utilizando la prueba exacta de Fisher se analizaron las diferencias en las frecuencias de las características clínicas de riesgo adverso y favorable entre los pacientes clasificados como Ph-like, Ph-like no *CRLF2* y no Ph-like y los pacientes con y sin alteraciones en *CRLF2* y/o *IKZF1*. Se construyeron tablas de contingencia con las frecuencias de las características clínicas de cada uno de los grupos evaluados utilizando el software OpenEpi versión 3.01 (versión en línea www.OpenEpi.com). Las diferencias encontradas se consideraron estadísticamente significativas cuando presentaron un valor de $p < 0.05$, con un intervalo de confianza de 95%. Se consideró como tendencia a la significancia a los valores de p dentro del rango 0.05 a 0.1 y como no significativo con valores de p mayores a 0.1.

7. RESULTADOS

7.1 Población de estudio.

Se estudiaron a 118 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión, el 83% (98 de 118) fueron negativos para las fusiones génicas recurrentes (FGR) *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* y *KMT2A-r* mientras que el 17% (20 de 118) fueron positivos a dichas alteraciones. Las características clínicas y las alteraciones genéticas de los pacientes que conforman la población de estudio se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Características clínicas y alteraciones genéticas de los pacientes de la población de estudio.

Características	% (n)
Población total	100% (118)
Negativos a FGR	83% (98)
Positivos a FGR	17% (20)
<i>BCR-ABL1</i>	3% (3)
<i>ETV6-RUNX1</i>	5% (6)
<i>TCF3-PBX1</i>	9% (11)
Género	
Masculino	56% (66)
Femenino	43% (51)
DND	1% (1)
Edad al diagnóstico	
Mayor a 10 años	31% (37)
Entre 1 y 9 años	55% (65)
DND	14% (16)
Cuenta de leucocitos al diagnóstico	
Mayor a $50 \times 10^9/L$	22% (26)
Menor a $50 \times 10^9/L$	65% (77)
DND	13% (15)
Expresión de <i>CRLF2</i>	
Sobreexpresión	52% (61)
No sobreexpresión	48% (57)
Alteración de <i>CRLF2</i>	
Positivo	65% (75)
Negativo	35% (43)

Tabla 2. Características clínicas y alteraciones genéticas de los pacientes de la población de estudio (Continuación).

Delección <i>P2RY8-CRLF2</i>	
Positivo	31% (36)
Negativo	70% (82)
Translocación <i>IGH-CRLF2</i> *	
Positivo	8% (10)
Negativo (<i>P2RY8</i> & <i>IGH</i> negativos)	2% (3)
Sin material disponible (<i>ad-CRLF2</i>)	20% (4)
G- <i>CRLF2</i>	4% (5)
Alteración de <i>IKZF1</i>	
Positivo	69% (74)
Negativo	31% (34)
Sin material disponible	8% (10)

FGR, Fusiones génicas recurrentes. DND, Dato no disponible. G-*CRLF2*, ganancia de *CRLF2*. *ad-CRLF2*, alteración desconocida de *CRLF2*. * Determinado únicamente en pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* y negativos a *P2RY8-CRLF2*.

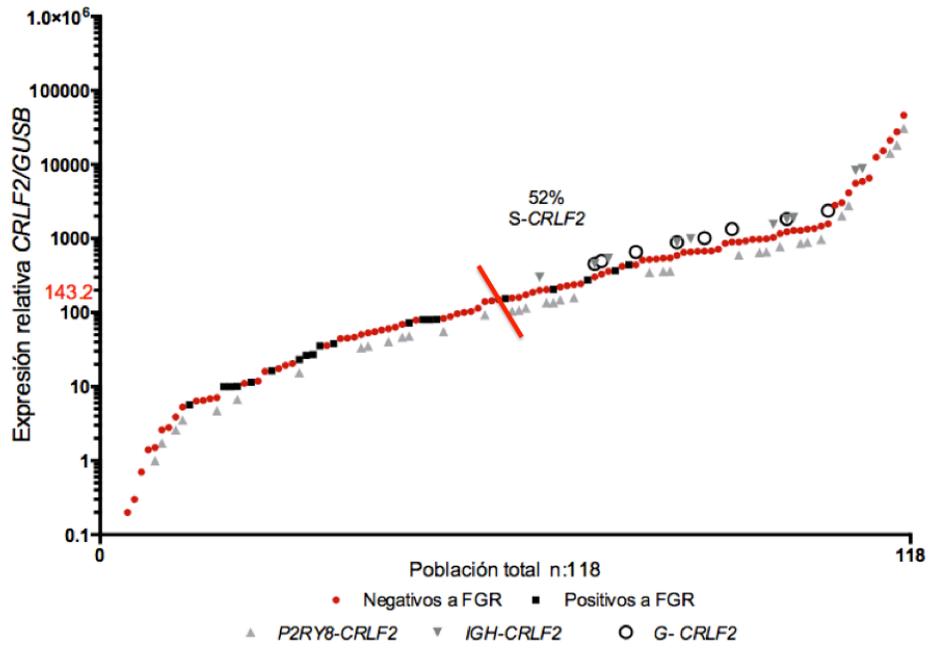
7.2 Alteraciones de *CRLF2*

7.2.1 Análisis de la expresión de *CRLF2*

El 100% de los pacientes contó con el estudio de expresión relativa del transcrito de *CRLF2*, se obtuvieron valores de expresión que van de 0 a 210276.4 (Figura 10 A). De la población total, el 52% (61 de 118) de los pacientes fueron positivos a la sobreexpresión de *CRLF2* (Tabla 2); todos los casos positivos a la translocación *IGH-CRLF2* y/o con G-*CRLF2* se ubicaron por encima del valor de la mediana (143.2), a diferencia de los casos positivos a la delección *P2RY8-CRLF2*, los cuales quedaron dispersos en toda la distribución (Figura 10).

El 57% (56 de 98) de los pacientes negativos a FGR mostraron sobreexpresión de *CRLF2*, al igual que el 25% (5 de 20) de los pacientes con FGR (Figura 10), de los cuales uno fue positivo para la fusión *BCR-ABL1*, otro fue positivo a *ETV6-RUNX1* y tres casos mostraron la fusión *TCF3-PBX1*.

A.



B.

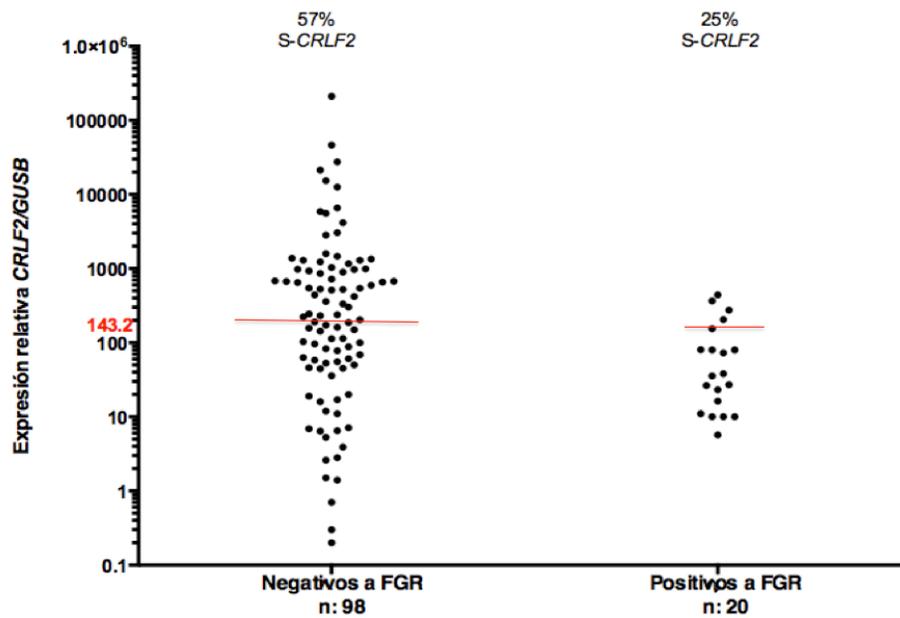


Figura 10. Expresión relativa de *CRLF2* en la población de estudio. Se muestra el valor de la mediana que es 143.2 “Línea roja”, los pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* están ubicados por encima de la mediana. S-CRLF2, sobreexpresión de *CRLF2*. G-CRLF2, Ganancia de *CRLF2*.

7.2.2 Presencia de rearrreglos en *CRLF2*

En la población total, el 65% (75 de 118) de los pacientes fueron positivos a alguna alteración de *CRLF2*, rearrreglo y/o sobreexpresión (Tabla 2 y Figura 11), en los pacientes negativos a FGR las alteraciones de *CRLF2* se encontraron en el 68% (67 de 98) de los casos (Figura 11), mientras que en los pacientes positivos a FGR estas alteraciones se encontraron en el 40% (8 de 20) (Figura 11 y Tabla 3).

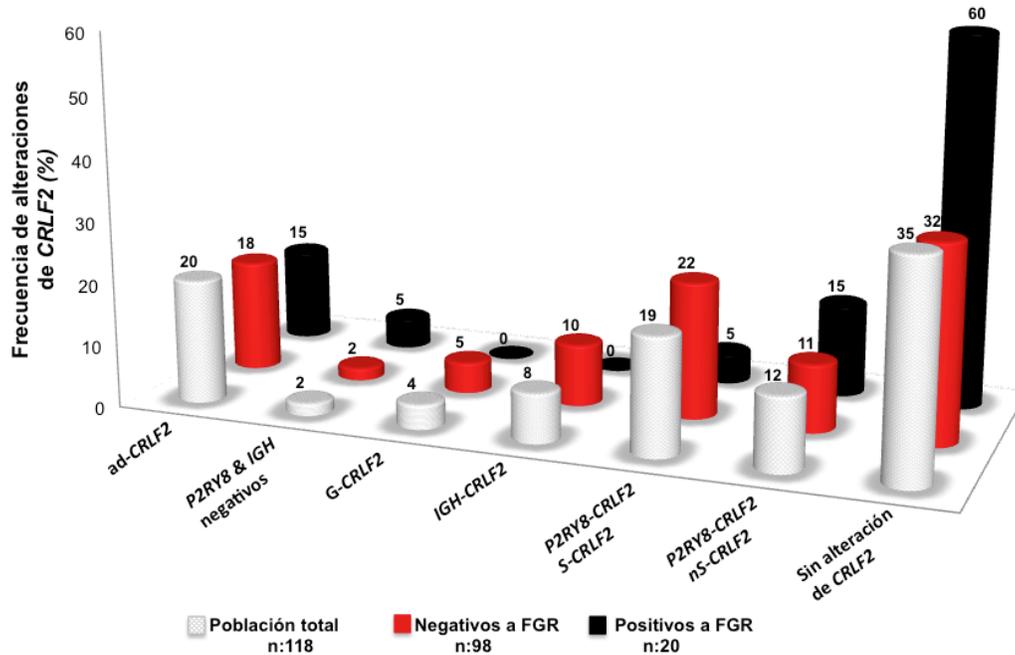


Figura 11. Frecuencia de las alteraciones de *CRLF2* en la población de estudio ad-*CRLF2*, alteración desconocida de *CRLF2*. G-*CRLF2*, Ganancia de *CRLF2*. S-*CRLF2*, casos con sobreexpresión. nS-*CRLF2*, casos sin sobreexpresión.

Tabla 3. Alteraciones de *CRLF2* en pacientes positivos a FGR.

Pacientes	FGR	Alteración de <i>CRLF2</i>	
		Rearreglo	Sobreexpresión
LLA 117	<i>BCR-ABL1</i>	ad- <i>CRLF2</i>	+
LLA 111	<i>ETV6-RUNX1</i>	ad- <i>CRLF2</i>	+
LLA 114		<i>P2RY8-CRLF2</i>	-
LLA 115	<i>TCF3-PBX1</i>	<i>P2RY8-CRLF2</i>	+
LLA 107		<i>P2RY8-CRLF2</i>	-
LLA 099		<i>P2RY8-CRLF2</i>	-
LLA 102		ad- <i>CRLF2</i>	+
LLA 118		ad- <i>CRLF2</i>	+

FGR, fusiones génicas recurrentes. ad-*CRLF2*, alteración desconocida de *CRLF2*.

7.2.2.1 Pacientes con la delección *P2RY8-CRLF2*

La delección *P2RY8-CRLF2* se encontró en el 31% (36 de 118) del total de pacientes (Tabla 2 y Figura 11 y 12 A), en el 33% (32 de 98) de los pacientes negativos a FGR, y en el 20% (4 de 20) de los pacientes positivos a FGR (Figura 11 y 12 A); en estos últimos se observó la coexistencia de la delección con las fusiones *ETV6-RUNX1* y *TCF3-PBX1* (Tabla 3). En la población total, el 61% (22 de 36) de los pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos presentaron además la sobreexpresión de *CRLF2*, mientras que el 39% (14 de 36) restante fue positivo a la delección sin mostrar sobreexpresión de *CRLF2* (Figuras 10 y 11).

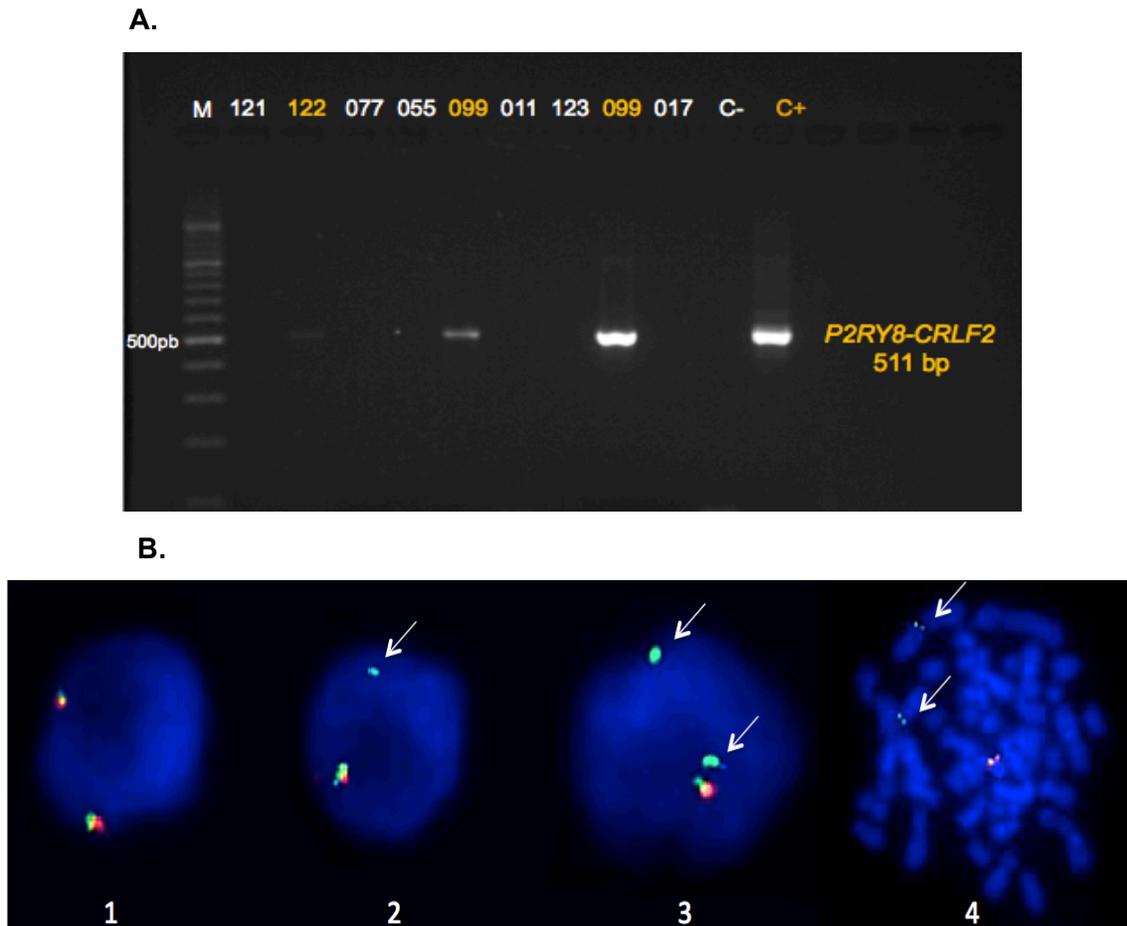
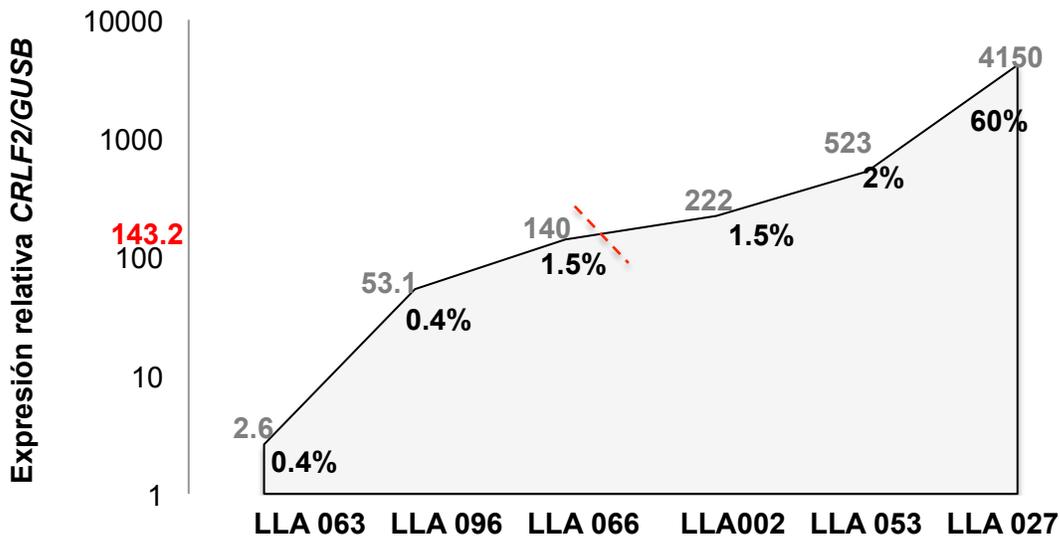


Figura 12. Detección de la delección *P2RY8-CRLF2*. A. se muestra el corrimiento electroforético de los productos de amplificación que resultan de la delección de PAR1. Las muestras positivas están marcadas con amarillo y presentan una banda de 511pb, las muestras negativas se indican en blanco. C-, control negativo. C+, control positivo). M, marcador de peso molecular de 100pb). B. se muestran núcleos en interfase en los cuales las flechas blancas indican la delección en la región PAR1, equivalente al rearreglo *P2RY8-CRLF2*. 1. Célula normal, 2. Célula con delección mono alélica, 3 y 4. Núcleo y metafase con delección bialélica .

En seis pacientes positivos a la delección por RT-PCR (Figura 12A) y con diferentes valores de expresión de *CRLF2*, se cuantificó el porcentaje de clonas positivas mediante FISH (Figura 10B). Se encontraron valores de 0.4% a 1.5% de clonas positivas en casos sin sobreexpresión de *CRLF2*, mientras que en los positivos a la sobreexpresión se encontró hasta un 60% de clonas portadoras de la delección (Figura 13).



Expresión de *CRLF2* / % Clonas *P2RY8-CRLF2* positivas

Figura 13. Frecuencia de clonas *P2RY8-CRLF2* positivas (negro) con respecto al nivel de expresión de *CRLF2* (gris) en 6 pacientes. Los pacientes con nivel de expresión por debajo de la mediana (142.3 “línea roja”) no sobre-expresan *CRLF2* y tienen 0.4% a 1.5% de clonas *P2RY8-CRLF2* positivas. Los pacientes con nivel de expresión superior a la mediana sobre-expresan *CRLF2* y tienen hasta un 60% de clonas *P2RY8-CRLF2* positivas.

7.2.2.2 Búsqueda de la amplificación *iAMP21* en pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos.

Los pacientes positivos a la delección *P2RY8-CRLF2* fueron candidatos a presentar la amplificación *iAMP21*. Esta alteración se buscó en el 42% (15 de 36) de los pacientes candidatos, el resto no contó con material disponible para el ensayo de FISH.

Se detectó la amplificación *iAMP21* en el 73% (11 de 15) de los pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos analizados (Figura 14), el resto fue negativo para esta alteración. En 5 de 11 pacientes positivos a la amplificación *iAMP21* y la delección *P2RY8-CRLF2* fue posible cuantificar el porcentaje de clonas portadoras de estas alteraciones, y se encontró que en todos los casos las clonas *iAMP21* positivas fueron mayoritarias con respecto a las clonas *P2RY8-CRLF2* positivas (Figura 15), cabe mencionar

que en el paciente LLA 043 fue positivo a la delección por RT-PCR, en cambio, mediante FISH no fue posible encontrar a la clona portadora de esta alteración.

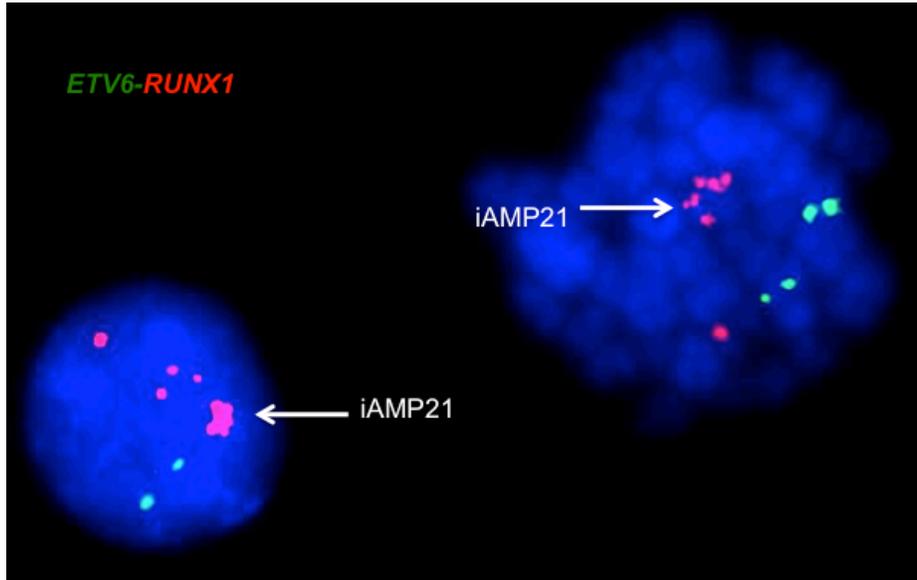


Figura 14. Detección de la iAMP21 en pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos. A la izquierda se observa la iAMP21 (flecha blanca) en un núcleo en interfase y a la derecha sobre una metafase. Las señales verdes equivalen al gen *ETV6* y las rojas al gen *RUNX1*.

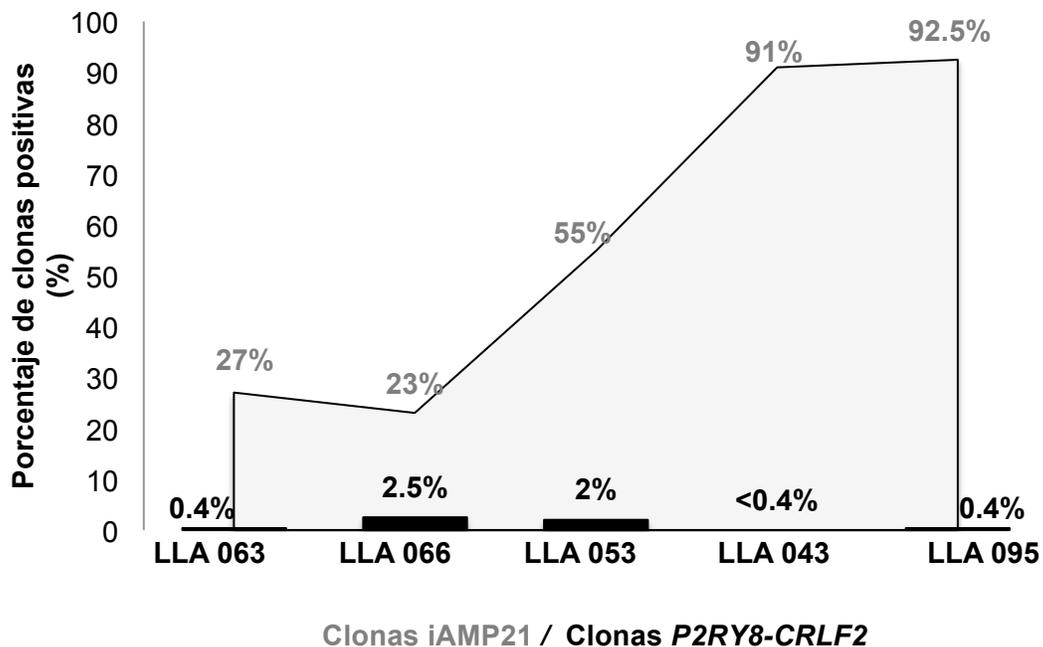


Figura 15. Porcentaje de clonas *P2RY8-CRLF2* (gráfica negra) e *iAMP21* (gráfica gris) positivas en 5 pacientes. Todos los pacientes poseen ambas alteraciones, pero la amplificación *iAMP21* se presenta en clonas mayoritarias. La delección se presentó hasta en 2.5% de las células analizadas, en contraste, la amplificación se detectó en el 27% al 92.5% de las células. El paciente LLA 043 es positivo por RT-PCR pero no se encontró la clona positiva en el análisis de 500 núcleos por FISH, se asume que el valor es menor al mínimo encontrado en el resto de los pacientes.

La amplificación *iAMP21* se buscó únicamente en uno de los pacientes positivos a FGR y a la delección *P2RY8-CRLF2*, sin embargo, el resultado fue negativo.

7.2.2.3 Pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos al diagnóstico, pero negativos a la delección en recaída

Para los pacientes LLA 119 y LLA 120 se analizaron muestras captadas al momento del diagnóstico y en recaída, ambos pacientes fueron positivos a la delección *P2RY8-CRLF2* en la muestra de diagnóstico (Figura 12A), la búsqueda de la amplificación *iAMP21* se pudo realizar únicamente en el paciente LLA 120 y el resultado fue negativo. El análisis de las muestras de recaída reveló la pérdida de la delección *P2RY8-CRLF2*, la búsqueda de la amplificación *iAMP21* se llevó a cabo en ambos pacientes, en el paciente LLA 120 el resultado fue negativo, mientras que en el paciente LLA119 se detectó la delección (Figura 14).

7.2.2.4 Pacientes con la translocación *IGH-CRLF2*

El 35% (42 de 118) del total de pacientes fueron candidatos a presentar la translocación *IGH-CRLF2* por tener sobreexpresión de *CRLF2* y ser negativos a la delección *P2RY8-CRLF2*, no obstante, la búsqueda de esta alteración se realizó en 42% (18 de 42) de los pacientes candidatos ya que estos contaron con material disponible para el análisis por FISH; el 58% (24 de 42) restante fueron identificados como *ad-CRLF2* (Tabla 2 y Figura 11).

En los pacientes en los que se determinó la presencia de la translocación se obtuvieron los siguientes resultados: se encontró la translocación *IGH-CRLF2* en el 55% (10 de 18) de los pacientes en los que se buscó esta alteración (Figura 16 1-4), esto es equivalente al 8% (10 de 118) de la población total (Tabla 2 y Figura 11) y al 10% (10 de 98) de los pacientes negativos a FGR (Figura 11). En los pacientes *IGH-CRLF2* positivos se encontraron diversos resultados:

A. *IGH-CRLF2*: El 50% (5/10) de los pacientes tuvieron el resultado positivo esperado, es decir, se detectó la presencia de clonas con la ruptura de *IGH* y *CRLF2* en proporciones similares (Figura 16 3-4 y Figura 17).

B. *IGH-CRLF2* & *IGH-r* o *CRLF2-r*: En el 20% (2 de 10) de los pacientes se encontró la translocación *IGH-CRLF2* en clonas minoritarias, con respecto a clonas mayoritarias con ruptura de los genes *IGH* (*IGH-r*) o *CRLF2* (*CRLF2-r*) en proporciones desbalanceadas (Figura 17 , pacientes LLA 011 y LLA 021).

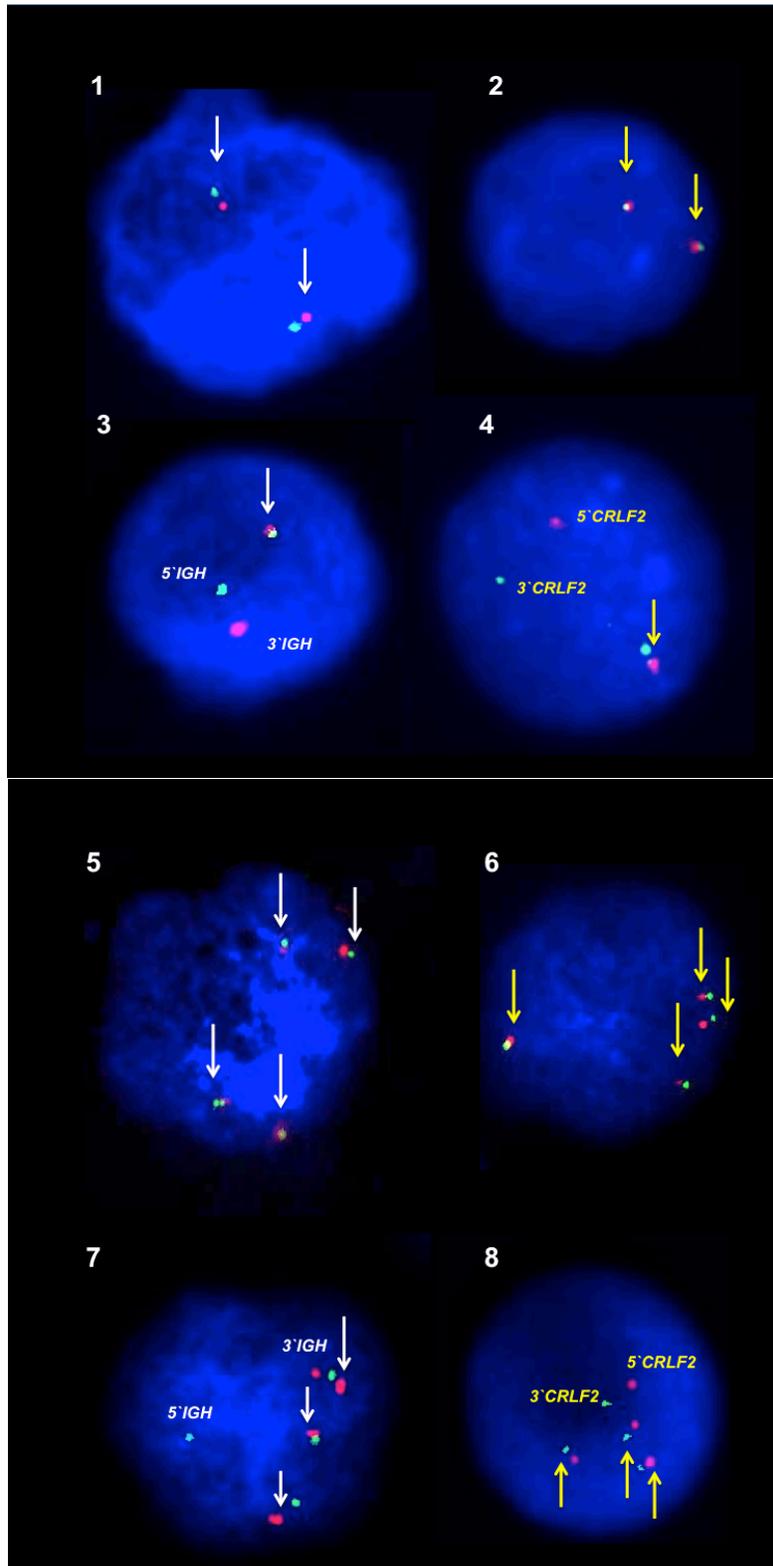


Figura 16. Detección de la translocación *IGH-CRLF2*. Se muestran núcleos en interfase en los cuales las flechas blancas indican los alelos del gen *IGH* y las flechas amarillas los alelos del gen *CRLF2*. **1 y 2** células normales **3 y 4** células *IGH-CRLF2* positivas que muestran el patrón de la ruptura mono alélica clásica de ambos genes. **5 y 6** células con ganancia del número de copias de *IGH* y *CRLF2*. **7 y 8** células con ganancia del número de copias de ambos genes y ruptura de uno de los alelos extra de cada gen.

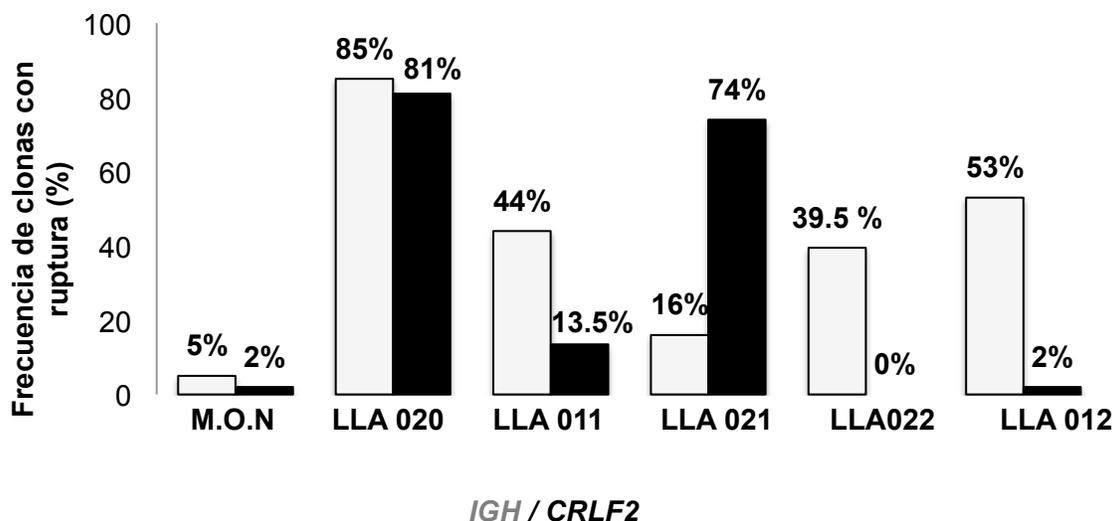


Figura 17. Proporción de clonas con la ruptura de los genes *IGH* (en gris) y *CRLF2* (en negro). Análisis en M.O.N, médula ósea normal. LLA 020, paciente *IGH-CRLF2* positivo. LLA 011, paciente con una clona *IGH-CRLF2* positiva y con una clona con ruptura de *IGH*. LLA 021, paciente con una clona *IGH-CRLF2* positiva y con una clona con ruptura de *CRLF2*. LLA 022 y LLA 012, pacientes *IGH-CRLF2* negativos con una clona con ruptura de *IGH*.

C. *IGH-CRLF2* & hiperdiploidía: En el 30% (3 de 10) de los pacientes se detectó la translocación *IGH-CRLF2* en clonas minoritarias con respecto a dos tipos de clonas mayoritarias, una con hiperdiploidía y otra en donde la translocación y la hiperdiploidía están en la misma célula (Figura 16 5-8).

Se obtuvo un resultado negativo, en cuanto a la presencia de *IGH-CRLF2*, en 45% (8 de 18) de los pacientes analizados; éstos fueron clasificados como se muestra a continuación:

A. G-*CRLF2*: En 5 de 8 pacientes en donde se detectaron clonas con la ganancia de copias de *IGH* y de *CRLF2* en proporciones similares y no se detectaron clonas con la ruptura de ambos genes (Tabla 2, Figura 11 y Figura 12 5 y 6).

B. ad-*CRLF2* y *P2RY8* & *IGH* negativos: En 3 de 8 pacientes no se encontraron células con la ruptura de ambos genes, uno de estos pacientes presentó sólo células normales (con ambos genes íntegros) (Figura 16 1 y 2) y se agrupó con el resto de los pacientes candidatos a presentar *IGH-CRLF2* en los que no se pudo buscar la translocación, es decir, fue identificado como ad-*CRLF2* (Figura 11). Los dos pacientes restantes mostraron clonas con la ruptura de *IGH* (células positivas a rearrreglo de *IGH*, pero con una pareja distinta a *CRLF2*) (Figura 17 pacientes LLA 022 y 012). Estos tres pacientes fueron clasificados como *P2RY8* & *IGH* negativos (Figura 11).

Cabe mencionar que los hallazgos que fueron diferentes al resultado esperado fueron corroborados por una persona capacitada en el análisis de FISH en médula ósea.

7.3 Presencia de transcritos de isoformas con efecto dominante negativo de *IKZF1*.

La presencia de transcritos correspondientes a isoformas con efecto dominante negativo (IDN) de *IKZF1*, o la ausencia total de transcritos del gen, se consideraron como alteración de *IKZF1*; las IDN corresponden a Ik6 (255 pb) e Ik8 (390 pb) (Figura 18). La búsqueda de alteraciones en este gen se llevó a cabo en el 92% (108/118) del total de pacientes, el 90% (88/98) de los pacientes negativos a FGR, y en el 100% (20/20) de los pacientes positivos a FGR.

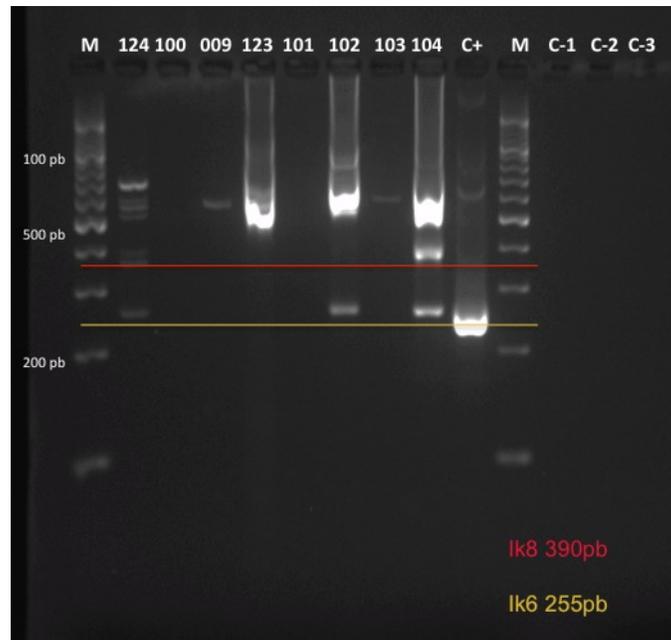


Figura 18. Detección de transcritos de IDN de *IKZF1*. Se muestra el corrimiento electroforético de los productos de amplificación que resultan de los transcritos de isoformas de *IKZF1*. Se distingue a las IDN Ik6 de 255pb (línea amarilla) e Ik8 de 390 pb (línea roja). C-1, control negativo de la primera reacción. C2, reacción anidada de C-1. C3, control negativo de la reacción anidada. C+, control positivo. M, marcador de peso molecular de 100pb.

Se encontró una frecuencia de alteraciones de *IKZF1* muy similar entre el total de pacientes, los pacientes negativos a FGR y los pacientes positivos a las mismas, esta fue del 69% (74 de 108) , 67% (59 de 88) y el 70% (14 de 20) respectivamente (Figura 19 y Anexo 3-Tabla 1).

La mayoría de los pacientes con alteraciones de *CRLF2* también mostraron alteraciones en *IKZF1*, principalmente el grupo con sobreexpresión de *CRLF2* y *P2RY8* & *IGH* negativos, los casos *IGH-CRLF2* positivos y *P2RY8* & *iAMP21* positivos, en cambio, los casos con G-*CRLF2* y ad-*CRLF2* presentaron frecuencias similares de pacientes con y sin alteración de *IKZF1* (Figura 19 y Anexo 3-Tabla 1).

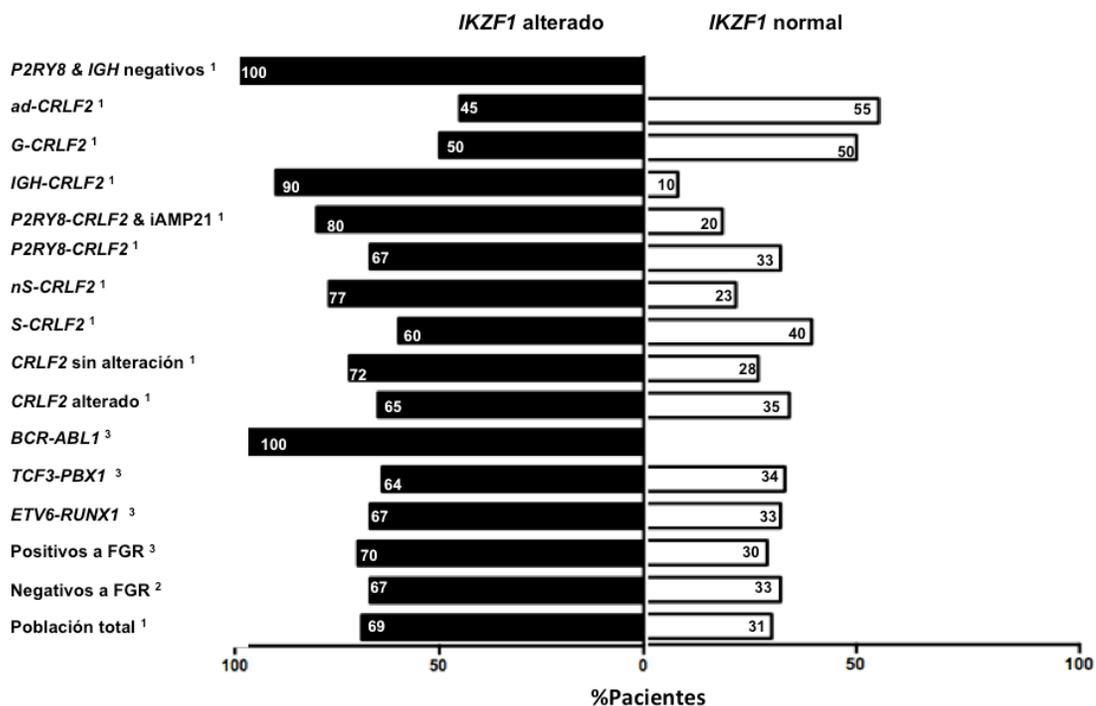


Figura 19. Frecuencia de alteración de *IKZF1* en los subgrupos de pacientes de la población de estudio. Frecuencias reportadas en la población total de 118 pacientes ¹, en 98 casos negativos a FGR ² y en 20 casos positivos a FGR ³. FGR, fusiones génicas recurrentes. S-CRLF2, casos con sobreexpresión. nS-CRLF2, casos sin sobreexpresión. G-CRLF2, ganancia de CRLF2. ad-CRLF2, alteración desconocida de CRLF2.

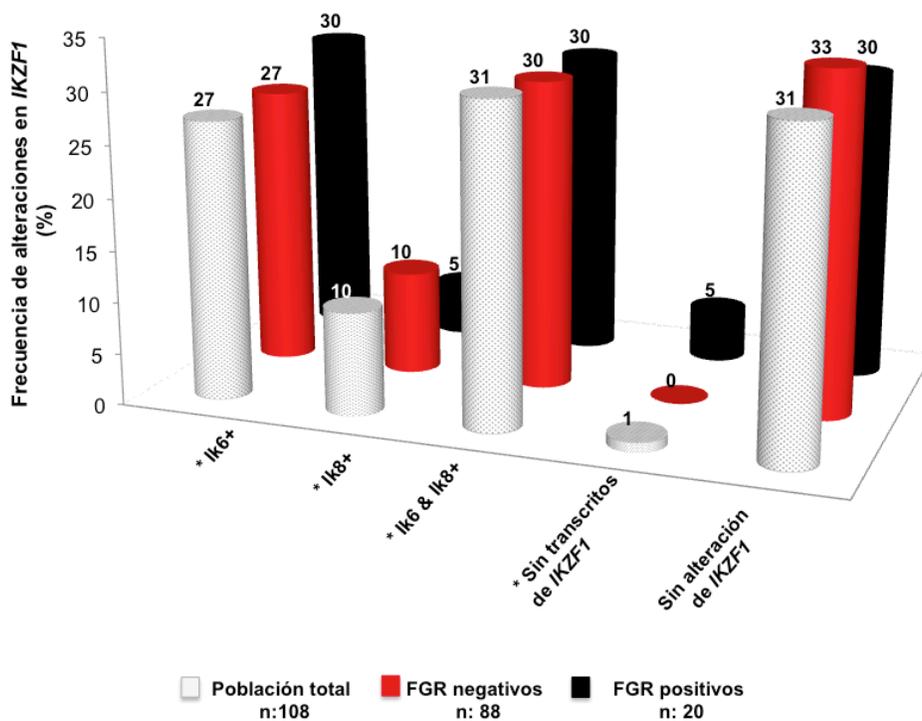


Figura 20. Frecuencia de transcritos de IDN de *IKZF1* en la población analizada. * el conjunto de estas alteraciones representa el total de pacientes con alteración de *IKZF1*.

Con respecto a la frecuencia de cada tipo de transcrito de IDN de *IKZF1*, los hallazgos más frecuentes fueron la coexistencia las isoformas Ik6 e Ik8 y los casos que solo mostraron transcritos de la isoforma Ik6 (Figura 20). En un paciente positivo a FGR no se detectó ningún transcrito de *IKZF1*.

7.4 Identificación de pacientes Ph-like.

La identificación del subtipo Ph-like se llevó al cabo en los pacientes negativos a las FGR (n = 98). Se consideraron, la combinación de alteraciones genéticas previamente identificadas y la positividad para el perfil de expresión génica (PEG) propuesto en el laboratorio. Se obtuvieron cuatro categorías con base en los criterios definidos en la sección de interpretación de resultados (página 29) las cuales se describen a continuación:

A. Ph-like: Este grupo representó 34% (33 de 98) de los pacientes FGR negativos (Figura 21), el 56% (19 de 33) de estos pacientes fue positivo a un PEG \geq 83%, y el 44% (14/33) restante fue positivo para el 50% o 66% del PEG. El 94% (31 de 33) de los casos sobre-expresa *CRLF2*, de éstos el 65% (20 de 31) mostró valores de expresión superiores al cuartil 3, la delección *P2RY8-CRLF2* se presentó en el 33% (11 de 33) de los casos, con y sin coexistencia con la amplificación *iAMP21*, los casos positivos a ambas alteraciones mostraron un PEG \geq 83%. La translocación *IGH-CRLF2* se presentó en el 30% (10 de 33) de los casos, y todos los pacientes positivos a esta alteración se concentraron en este grupo, al igual que los pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* y negativos a los rearrreglos con *P2RY8* & *IGH* los cuales representaron el 6% (2 de 33) de los pacientes Ph-like; el 30% (10 de 33) de estos se clasificó como ad-*CRLF2*. Por último, el 67% (22 de 33) de los pacientes Ph-like fue positivo a las alteraciones de *IKZF1*, sin embargo, esta característica se compartió en el resto de los grupos.

B. Ph-like no *CRLF2*: Este grupo representó el 8% (8 de 98) de los pacientes FGR negativos (Figura 21). El 100% de estos pacientes fue positivo al PEG entre 50-66%, pero sin presentar alteraciones de *CRLF2*. Las alteraciones de *IKZF1* se presentaron en 86% (6 de 7) de los casos.

C. Alteración de *CRLF2* (Probable Ph-like): Este grupo se presentó en 28.5% (28 de 98) de los pacientes FGR negativos (Figura 21). En este grupo, 100% de los pacientes tienen alguna alteración de *CRLF2*. El 46% (13 de 28) de estos casos fue positivo para el 50% o 66% del PEG con o sin sobreexpresión de *CRLF2*, sin embargo, la sobreexpresión se observó en presencia de la delección *P2RY8-CRLF2*, con o sin la amplificación *iAMP21*, y con G-*CRLF2* (un caso mostró un valor de expresión superior al cuartil 3). Algunos de estos pacientes fueron candidatos a presentar la translocación *IGH-CRLF2*, sin embargo, no fue posible determinar la presencia de esta alteración.

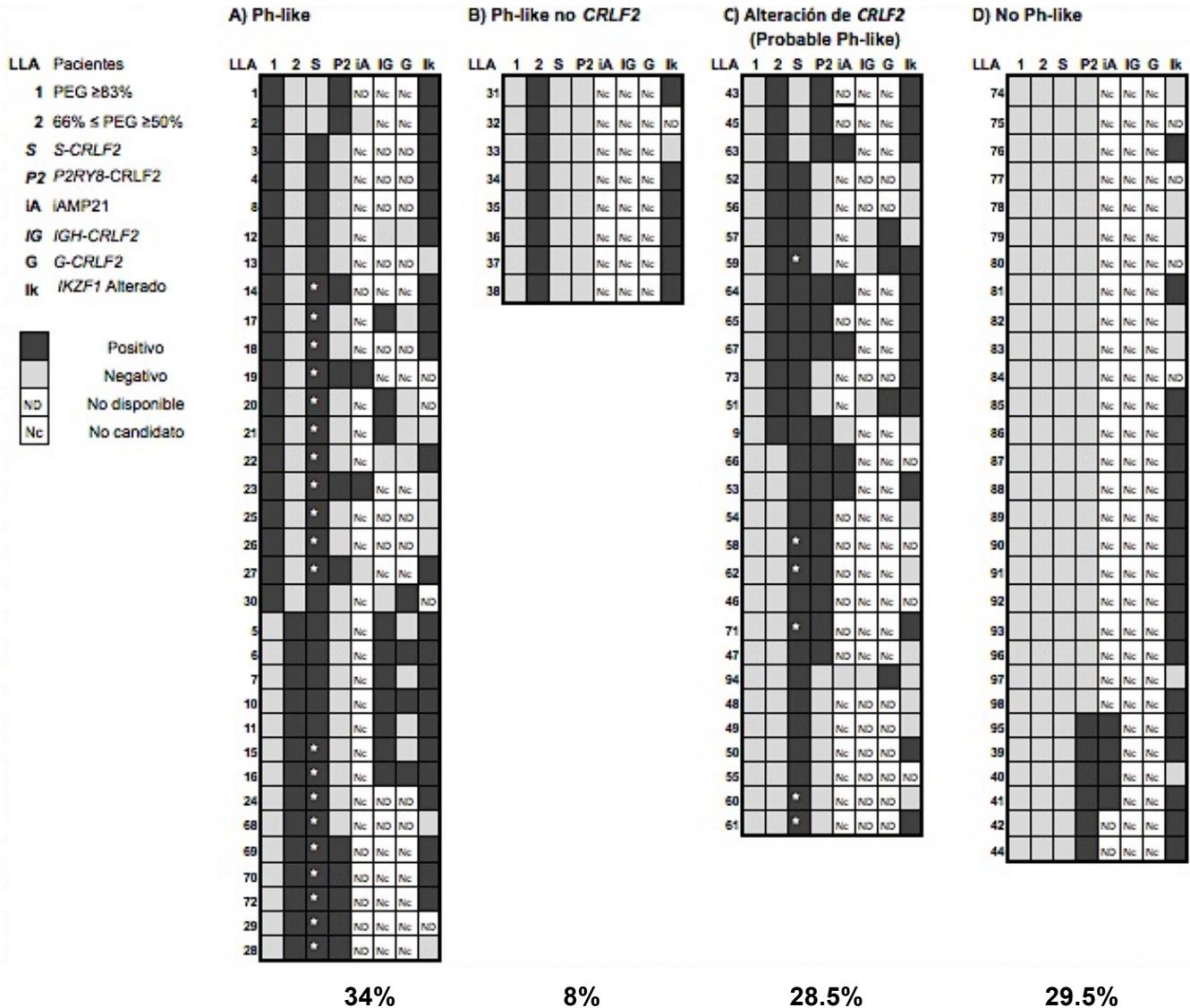


Figura 21 Identificación de pacientes Ph-like. Agrupación de pacientes en cuatro categorías con base en la combinación de alteraciones genéticas presentes en el subtipo Ph-like. PEG, perfil de expresión génica. S-CRLF2, sobreexpresión de CRLF2, * superior al cuartil 3. G-CRLF2, ganancia de CRLF2.

En 54% (15 de 28) de los casos no se obtuvo un resultado positivo al PEG, sin embargo, todos estos pacientes mostraron sobreexpresión de CRLF2 (algunos con valores de expresión superiores al cuartil 3), y en su mayoría asociada a la delección P2RY8-CRLF2, o bien fueron pacientes candidatos a presentar la translocación IGH-CRLF2.

La mayoría de los casos P2RY8-CRLF2 & iAMP21 positivos se concentraron en este grupo; cabe mencionar que en algunos casos la amplificación estuvo presente en clonas mayoritarias, al igual que los casos con G-CRLF2. Por último, las alteraciones de IKZF1 se encontraron en 54% (13 de 24) de los casos.

D. No Ph-like: Este grupo representó 29.5% (29/98) de los pacientes FGR negativos (Figura 21). Todos los pacientes de este grupo fueron negativos al PEG y a la sobreexpresión de *CRLF2*; se presentaron algunos casos *P2RY8-CRLF2* positivos; la mayoría mostraron la amplificación *iAMP21*, algunos casos en clonas mayoritarias. Las alteraciones de *IKZF1* se encontraron en 72% (18/25) de los casos.

En los pacientes positivos a FGR también se encontraron características genéticas que se comparten con las del subtipo Ph-like, sin embargo, estos pacientes ya tienen un subtipo molecular definido por la presencia de las FGR por lo cual no fueron clasificados dentro del subtipo Ph-like y únicamente fueron considerados como pacientes con alteraciones en *CRLF2* e/o *IKZF1*.

7.4.1 Búsqueda de CNV's asociadas al subtipo Ph-like.

Con la finalidad de complementar la caracterización genética de los pacientes Ph-like se seleccionaron cuatro pacientes de este subtipo para la búsqueda de CNV's en genes que se han reportado alterados en pacientes Ph-like mediante aCGH. Se estudiaron tres pacientes Ph like (LLA 017, LLA 021 y LLA 022) y un paciente Ph-like no *CRLF2* (LLA 035).

Se encontraron CNV's en los cromosomas 1,2,3,4,5,7,9,10,12,13,14,17,18 y 20; los cromosomas alterados en al menos 2 de 4 pacientes se encuentran subrayados. Se detectaron deleciones que van de 0.007 Mb hasta 22.09 Mb, se muestra un ejemplo representativo en la Gráfica 10. Estas alteraciones se encontraron en estado heterocigoto (Figura 22 A1-5), heterocigoto en mosaico (Figura 22 B) y homocigoto (Figura 22 C1-2). También se detectaron duplicaciones que van de 0.51 Mb hasta 18.92 Mb, se muestra un ejemplo representativo en la Gráfica 9; Estas alteraciones se encontraron en estado heterocigoto (Figura 23 A), heterocigoto en mosaico (Figura 23 B) y homocigoto (Figura 23 C).

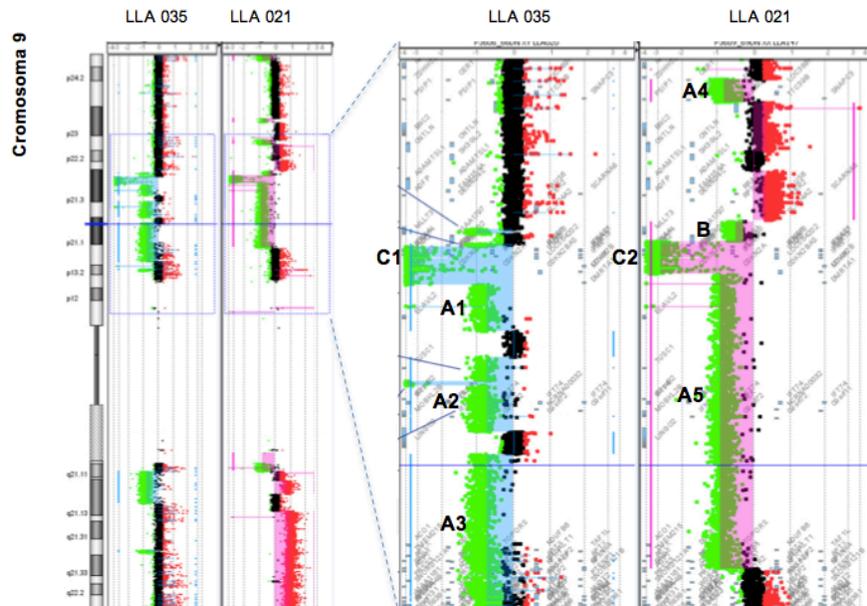


Figura 22. Resultado parcial del microarreglo de aCGH (Agilent 1M, hg18) en los pacientes LLA 035 y LLA 021 .Se señalan las deleciones encontradas en el brazo corto del cromosoma 9. A1-A5) Deleciones heterocigotas ($\text{Log}_2R < -1$); se muestra la fórmula de la deleción A1 $\text{arr } 9\text{p}21.3(22,537,465-24,300,535)\times 1$. B) Deleción heterocigota en mosaico ($-1 > \text{Log}_2R < 0$), $\text{arr } 9\text{p}21.3(20,130,048-20,875,427)\times \sim 1.3$. C1-C2) Deleciones homocigotas ($\text{Log}_2R < -2$); se presenta la fórmula de la deleción C1 $\text{arr } 9\text{p}21.3(20,875,427-22,126,899)\times 0$.

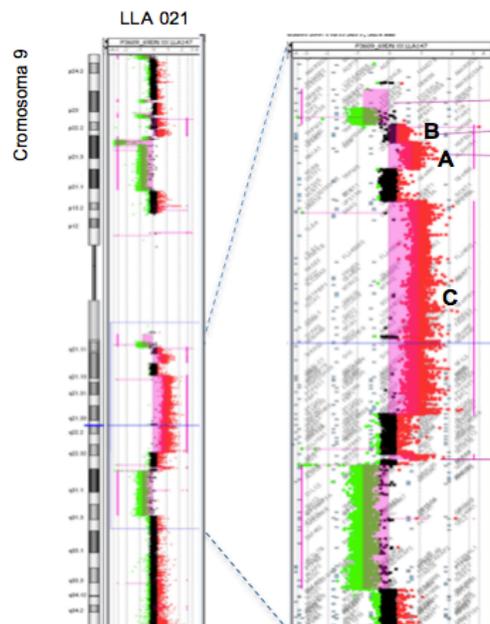


Figura 23 Resultado parcial del microarreglo de aCGH (Agilent 1M, hg18) en el paciente LLA 021 .Se señalan las duplicaciones encontradas en el brazo largo del cromosoma 9. A) Duplicación heterocigota ($\text{Log}_2R > 1$), $\text{arr } 9\text{q}21.13(73,118,082-75,544,128)\times 3$. B) Duplicación heterocigota en mosaico ($0 > \text{Log}_2R < 1$), $\text{arr } 9\text{q}21.11\text{q}21.13(71,603,886-73,118,427)\times \sim 1.3$. C) Duplicaciones homocigotas ($\text{Log}_2R > 2$), $\text{arr } 9\text{q}21.13\text{q}22.32(78,392,817-97,322,234)\times 4$.

A partir de las CNV's encontradas en los microarreglos se obtuvo una lista de genes supresores de tumor y oncogenes que se refieren alterados en el subtipo Ph-like (Figura 24).

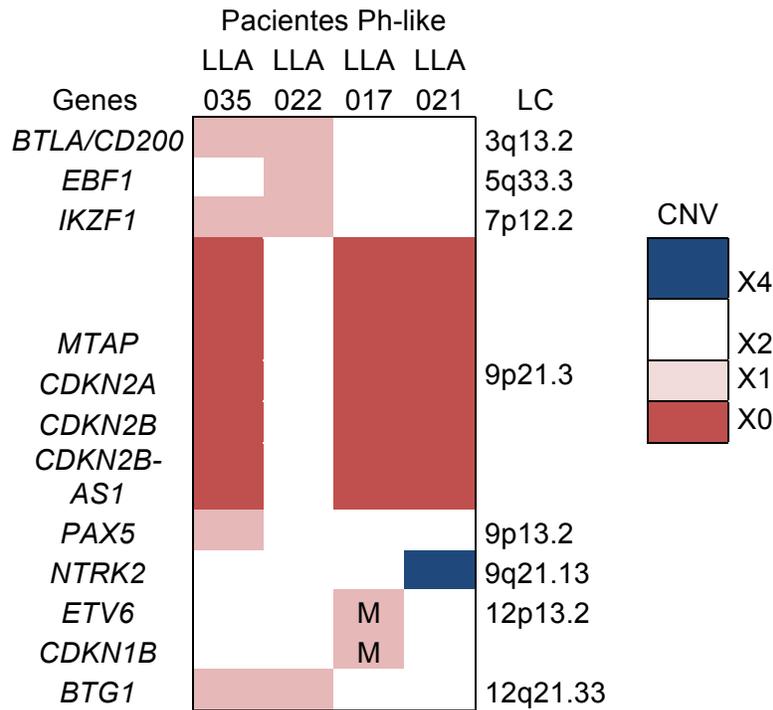


Figura 24. Genes involucrados en las CNV's de pacientes Ph-like . CNV, variaciones en el numero de copias por su siglas en ingles. LC, localización cromosómica. M, mosaico .

7.5 Frecuencia de los subtipos moleculares de LLA pre-B en la población de estudio.

Con base en los resultados se obtuvieron las siguientes frecuencias de cada subtipo molecular de LLA pre-B descrito en este trabajo, y se muestran las frecuencias reportadas en la literatura (Figura 25 A y B). Para esta clasificación se consideró a los pacientes FGR positivos, con y sin alteraciones de *CRLF2* y a los pacientes FGR negativos clasificados como Ph-like, Ph-like no *CRLF2*, alteración de *CRLF2* (probable alteración de *CRLF2*) y no Ph-like. Cabe mencionar que en esta clasificación las alteraciones del gen *IKZF1* no se mencionan ya que no representan una alteración primaria que define a un subtipo molecular de LLA pre-B, a diferencia de las alteraciones en *CRLF2* y el subtipo Ph-like. Los pacientes con amplificación *iAMP21* o con hiperdiploidía (*G-CRLF2*) que se presentaron en los grupos denominados alteración de *CRLF2* (Probable Ph-like) y no Ph-like fueron extraídos de estos grupos y considerados como subtipos particulares ya que éstas son alteraciones primarias que definen subtipos específicos de LLA pre-B, en cambio, los pacientes Ph-like con amplificación *iAMP21* o hiperdiploidía (*G-CRLF2*) si quedaron clasificados dentro de dicho subtipo (Figura 25 A).

Ph-like: La frecuencia en la cohorte de pacientes mexicanos con LLA pre-B analizada fue de 35% (41 de 118) , considerando a los casos Ph-like con y sin alteración de *CRLF2* (Figura 25 A).

Alteración de *CRLF2*: la frecuencia fue de 16% (19 de 118) , pero incrementa a un 58% (69 de 118) si se considera a los pacientes Ph-like con alteración de *CRLF2*, a los casos *P2RY8-CRLF2* & *iAMP21* positivos y a los pacientes FGR positivos con alteraciones de *CRLF2* (Figura 25 A).

Hiperdiploidía y amplificación *iAMP21*: se obtuvo una frecuencia de 8% (9 de 118) y 3% (4 de 118) respectivamente, aunque, se debe considerar que estas alteraciones no fueron determinadas en todos los pacientes por lo cual su frecuencia puede ser diferente (Figura 25 A).

Otros B: este grupo representó el 21% (25 de 118) de la población de estudio y está compuesto de los pacientes No Ph-like en los cuales no se detectaron alteraciones genéticas asociadas a un subtipo específico. Cabe mencionar que dentro de este grupo hay dos pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos que no muestran sobreexpresión de *CRLF2*, y tampoco positividad al perfil de expresión génica Ph-like; por lo que no se consideró que tengan una alteración primaria que permita clasificarlos en otro subtipo.

Positivos a FGR y con alteración de *CRLF2*: la coexistencia de las FGR con las alteraciones de *CRLF2* se presentó con una frecuencia del 7% (8 de 118) en la población total.

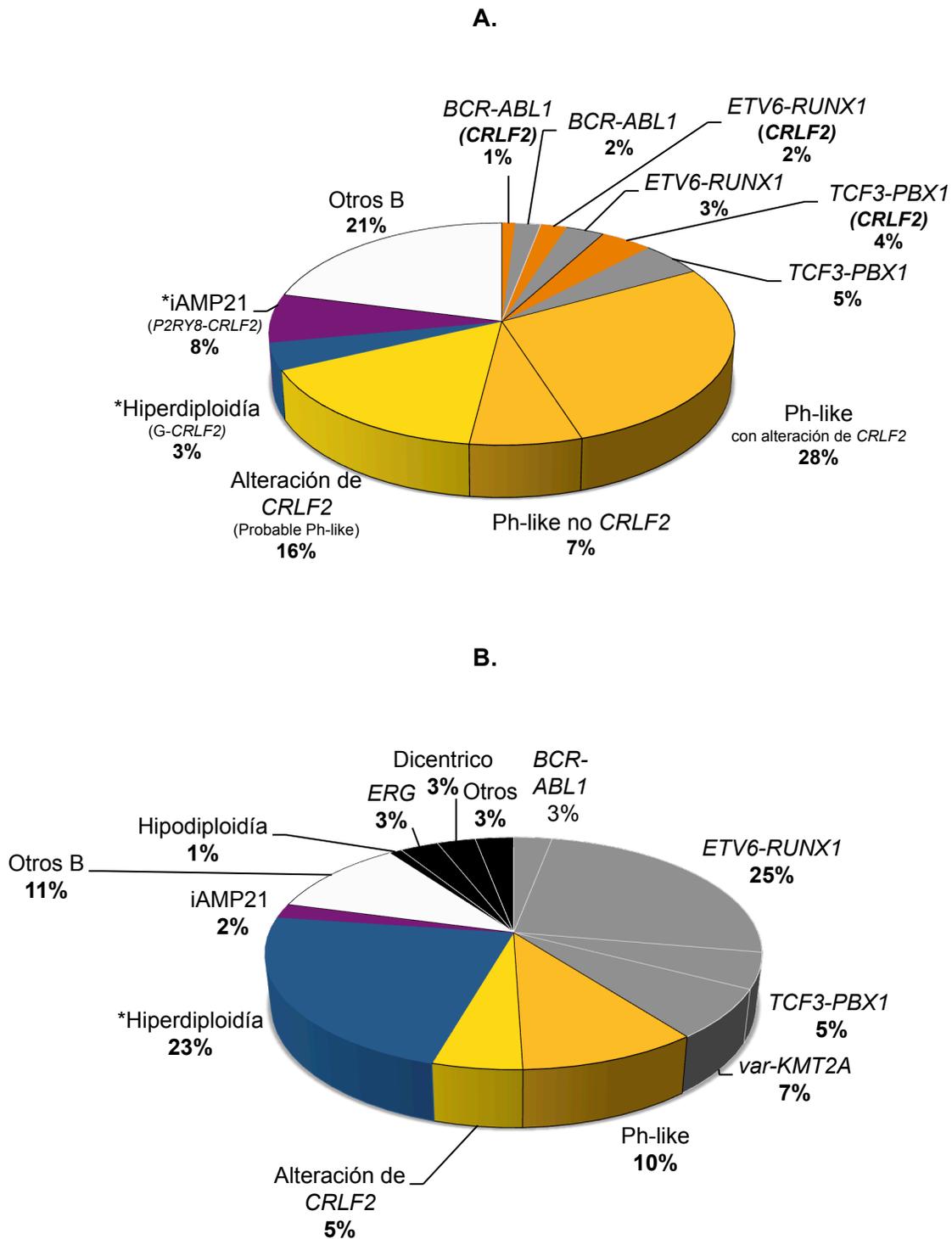


Figura 25. Frecuencia de los subtipos moleculares de LLA pre-B en la población de estudio. A. Frecuencias observadas en la población de estudio. Los pacientes positivos a FGR están representados por las secciones en color gris y naranja, el resto de las secciones representan a los pacientes FGR negativos. **B.** Frecuencias reportadas en la literatura en pacientes pediátricos con LLA pre-B. Tomado y modificado de Bhojwani *et al.*, (2015)⁽¹⁴⁾ y Zhang *et al.*, (2017)⁽⁴³⁾.

7.6 Comparación de las características clínicas del subtipo Ph-like y No Ph-like y de pacientes con y sin alteraciones de *CRLF2* y/o *IKZF1*.

Se evaluaron las diferencias en las características clínicas de pronóstico adverso y favorable entre los pacientes Ph-like y Ph-like no *CRLF2* en comparación con los pacientes No Ph-like:

Ph-like contra No Ph-like: La cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ fue significativamente mayor en pacientes Ph-like ($p = 0.015$) y el género masculino fue significativamente mayor en pacientes No Ph-like ($p < 7.4 \times 10^{-4}$), el resto de las características no mostraron diferencias significativas (Figura 26 A).

Ph-like no *CRLF2* contra No Ph-like: En los pacientes Ph-like no *CRLF2* la edad ≥ 10 años y la cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ fueron significativamente mayores ($p = 1 \times 10^{-7}$ para ambas características) y nuevamente el género masculino fue significativamente mayor en pacientes No Ph-like ($p = 0.0005$), el resto de las características no mostraron diferencias significativas (Figura 26 B).

Se evaluaron las diferencias en la frecuencia de las características clínicas de pronóstico adverso y favorable entre los pacientes con y sin alteraciones de *CRLF2*. Para este análisis, se excluyeron los pacientes positivos a FGR y a pacientes que fueron posteriormente clasificados como Ph-like no *CRLF2*, debido a que poseen características clínicas de pronóstico adverso asociadas a la presencia de las FGR o a alteraciones en genes implicados en el subtipo Ph-like no *CRLF2*.

Pacientes con sobreexpresión contra pacientes sin sobreexpresión de *CRLF2*: La cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ fue más frecuente en pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* (con tendencia a la significancia $p = 0.05$) y se observó mayor frecuencia del género masculino en pacientes sin sobreexpresión de *CRLF2* (con tendencia a la significancia $p = 0.08$), el resto de las características no mostraron diferencias significativas (Figura 27 A).

Pacientes *P2RY8-CRLF2* con sobreexpresión contra *P2RY8-CRLF2* sin sobreexpresión: Se encontró una frecuencia significativamente mayor de la edad ≥ 10 años ($p < 2.5 \times 10^{-6}$), el género masculino ($p = 0.03$) y la estratificación de riesgo alto ($p < 1 \times 10^{-7}$) en el grupo de pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos sin sobreexpresión de *CRLF2* (Figura 27 B). La cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ fue significativamente mayor en pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos con sobreexpresión de *CRLF2*.

Pacientes *IGH-CRLF2* positivos contra pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos: Los pacientes positivos a la translocación *IGH-CRLF2* mostraron una frecuencia significativamente mayor de cuentas de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ ($p < 6.3 \times 10^{-5}$) y una mayor frecuencia de estratificación de alto riesgo (con tendencia a la significancia $p = 0.1$) en comparación con los pacientes positivos a la delección

P2RY8-CRLF2, en estos últimos el género masculino fue más frecuente (con tendencia a la significancia $p = 0.08$) (Figura 27 C).

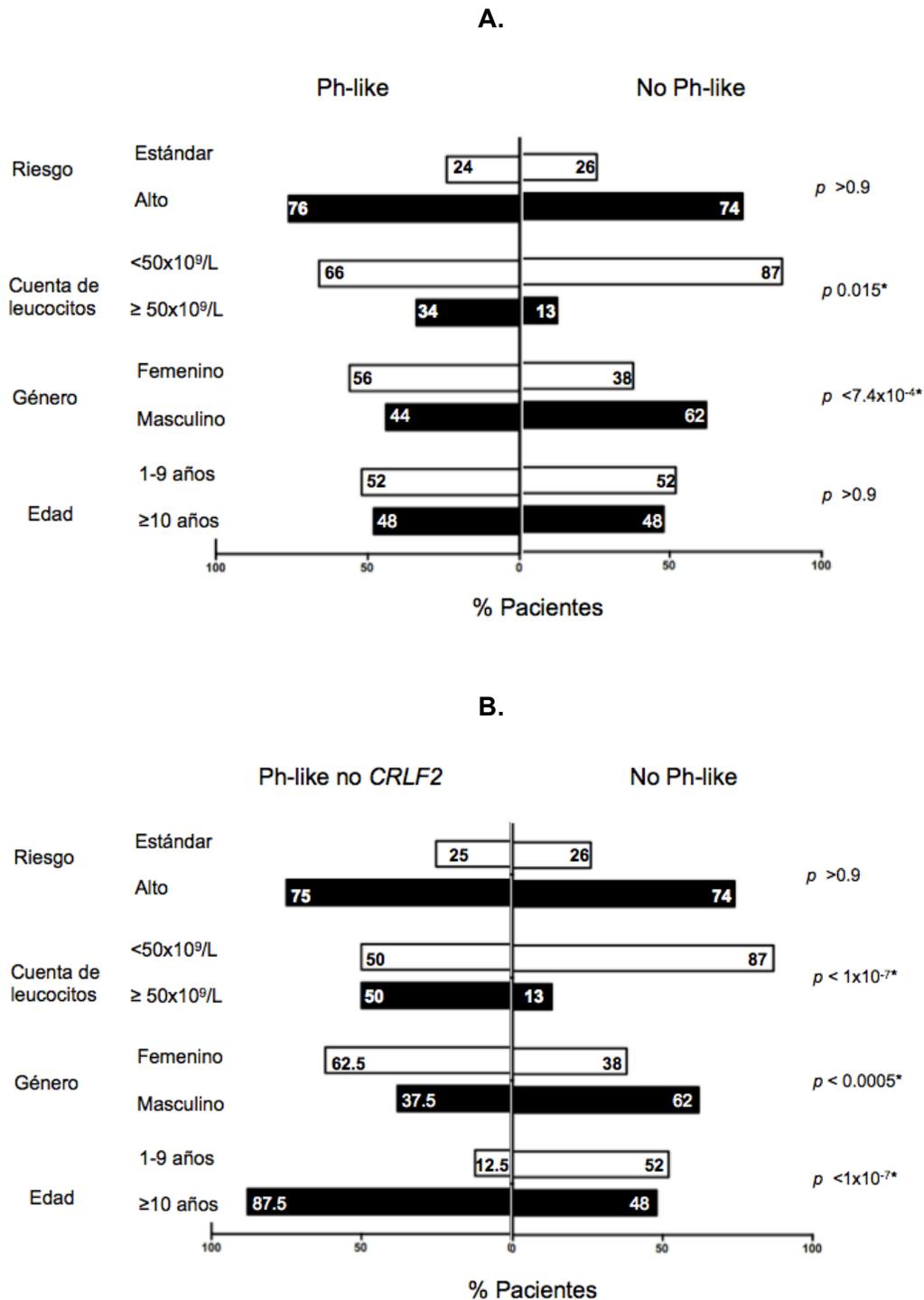


Figura 26. Características clínicas de los pacientes del subtipo Ph-like y no Ph-like. A. Comparación entre pacientes Ph-like y no Ph-like. **B.** Comparación entre pacientes Ph-like no *CRLF2* y no Ph-like. En negro se muestra la frecuencia de las características de pronóstico adverso y en blanco las de pronóstico favorable. * valores estadísticamente significativos.

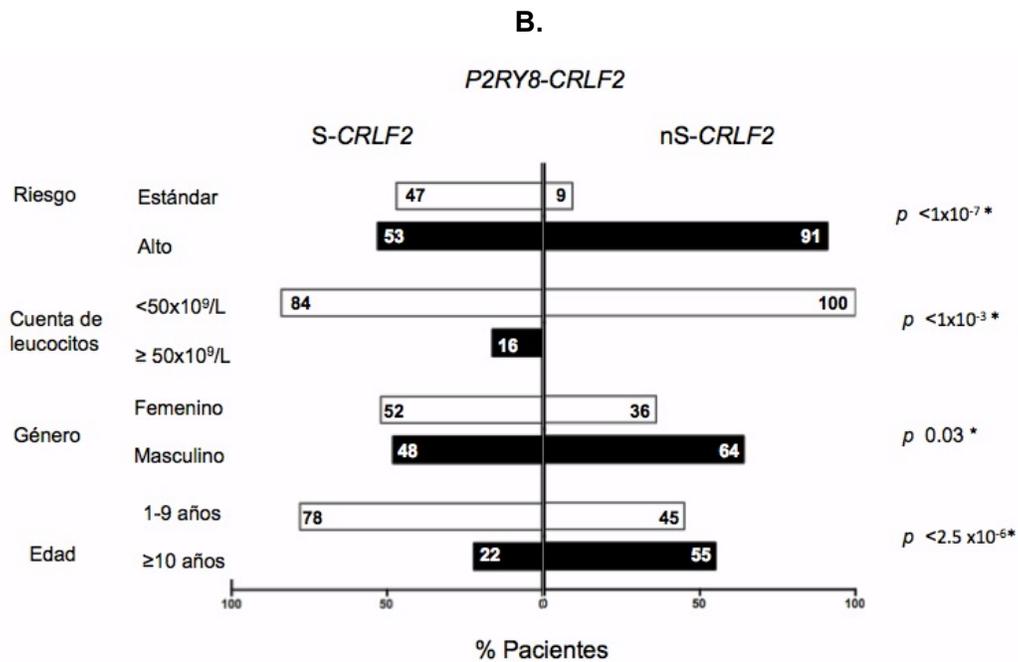
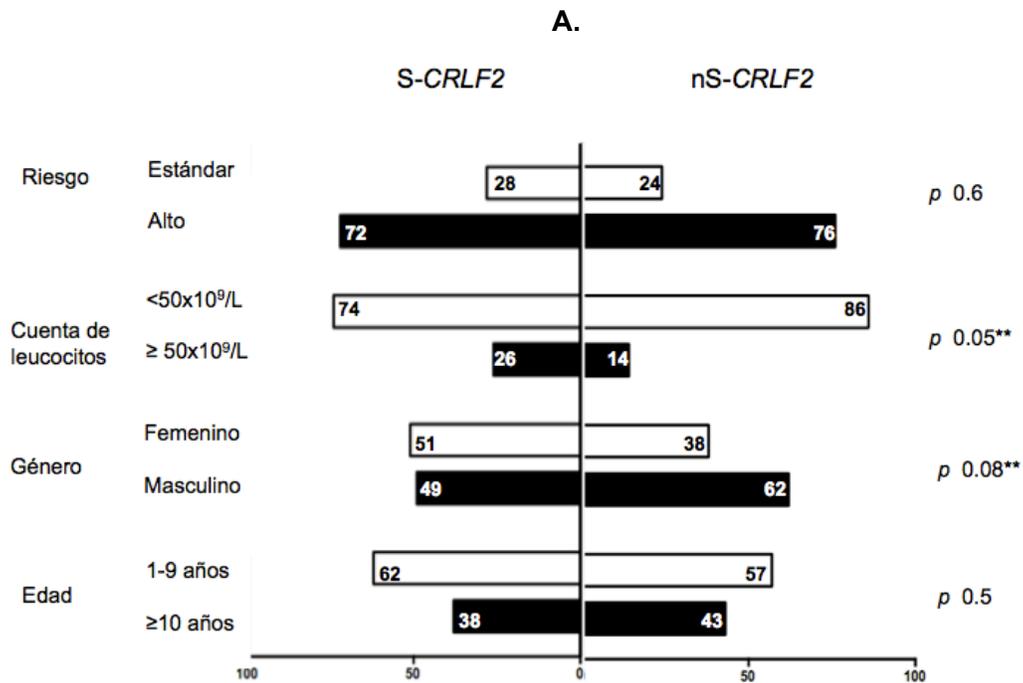


Figura 27. Características clínicas de los pacientes con y sin alteración de *CRLF2*. **A.** comparación entre pacientes con y sin sobreexpresión de *CRLF2*. **B.** comparación entre pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos con y sin sobreexpresión de *CRLF2*. **C.** comparación entre pacientes positivos a la delección *P2RY8-CRLF2* y pacientes con la translocación *IGH-CRLF2*. En negro se muestra la frecuencia de las características de pronóstico adverso y en blanco las de pronóstico favorable. * valores estadísticamente significativos. ** valores con tendencia a la significancia. S-CRLF2, con sobreexpresión de *CRLF2*. nS-CRLF2, sin sobreexpresión de *CRLF2*.

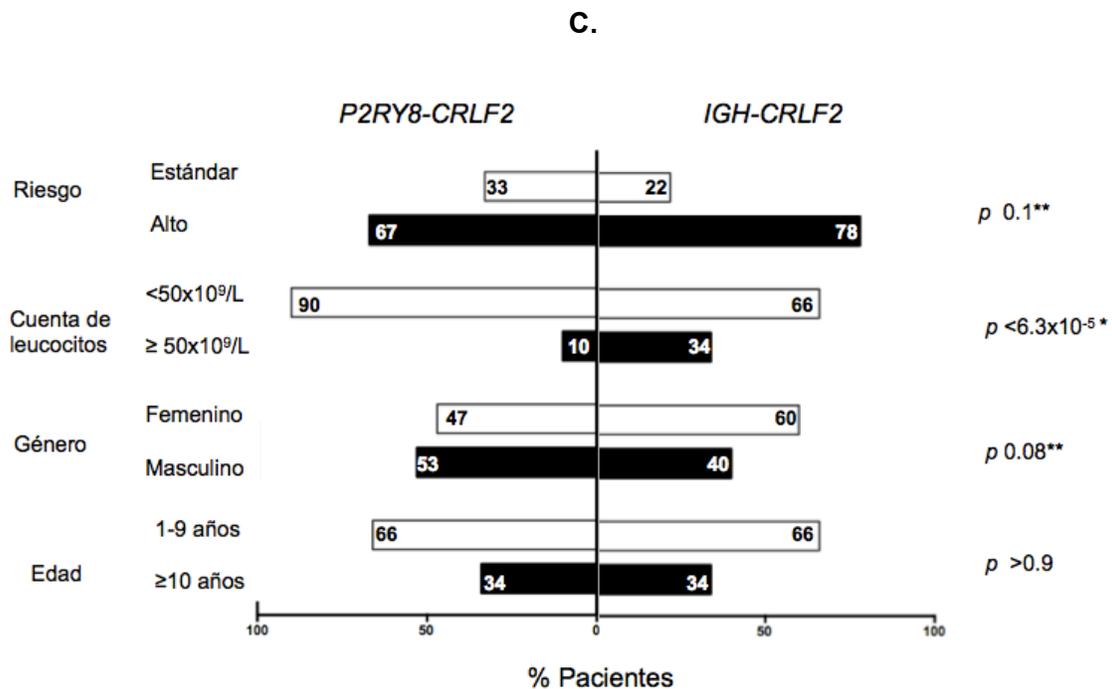


Figura 27. Características clínicas de los pacientes con y sin alteración de *CRLF2* (Continuación).

Pacientes con y sin amplificación *iAMP21*: Esta comparación no fue posible debido al bajo número de casos. La mayoría de los pacientes positivos a la amplificación *iAMP21* tuvieron una edad entre 1 y 9 años, género masculino, cuentas de leucocitos <50x10⁹/L y estratificación de alto riesgo (Anexo 3-Tabla 2).

Pacientes con Hiperdiploidía con y sin coexistencia de la translocación *IGH-CRLF2*: Esta comparación no fue posible debido al bajo número de casos, aunque todos los pacientes con coexistencia de la hiperdiploidía y la translocación *IGH-CRLF2* tuvieron cuentas de leucocitos, > 50x10⁹/L y estratificación de riesgo alto (Anexo 3-Tabla 3).

Pacientes positivos a FGR con alteración de *CRLF2* contra pacientes positivos a FGR sin alteración de *CRLF2*: éste análisis no reveló diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (Anexo 3-Tabla 4).

Por último, se evaluaron las diferencias en las frecuencias de las características clínicas de pronóstico adverso y favorable entre los pacientes con y sin alteración de *IKZF1*. Para este análisis, se excluyeron los pacientes FGR positivos debido a que poseen características clínicas de pronóstico adverso asociadas a la presencia de las fusiones.

Pacientes con alteraciones de *IKZF1* contra pacientes con *IKZF1* normal: La estratificación de riesgo alto fue la única característica significativamente mayor en pacientes con alteraciones de *IKZF1* ($p = 0.0003$) (Figura 28 A).

Pacientes con alteración de *CRLF2* e *IKZF1* contra pacientes con alteración en sólo uno de los dos genes: La estratificación de alto riesgo fue significativamente mayor en pacientes con alteración de ambos genes respecto a los que sólo mostraron alteración de *CRLF2* ($p < 2.1 \times 10^{-7}$) y fue más frecuente que en los pacientes que sólo mostraron alteración de *IKZF1* (con tendencia a la significancia) (Figura 28 B y C). La cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ fue menos frecuente en pacientes con alteración de ambos genes, que en aquellos que sólo tuvieron alteración de un gen (con diferencia significativa entre *CRLF2* e *IKZF1* alterado vs *CRLF2* normal, $p = 0.03$) (Figura 28 B y C), el resto de las características no mostraron diferencias significativas.

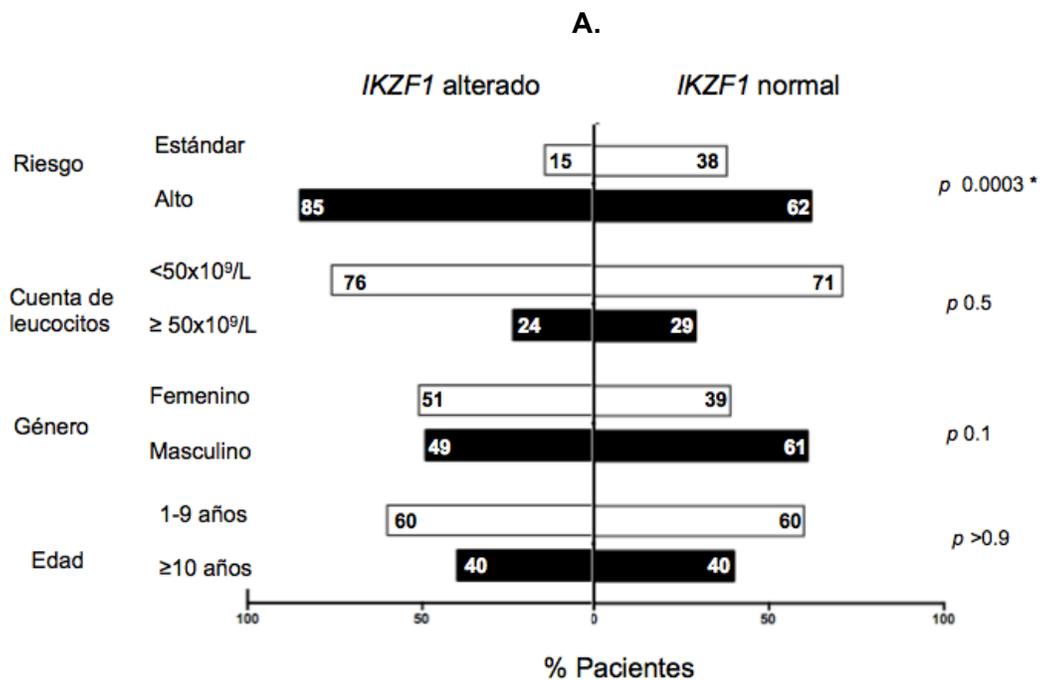
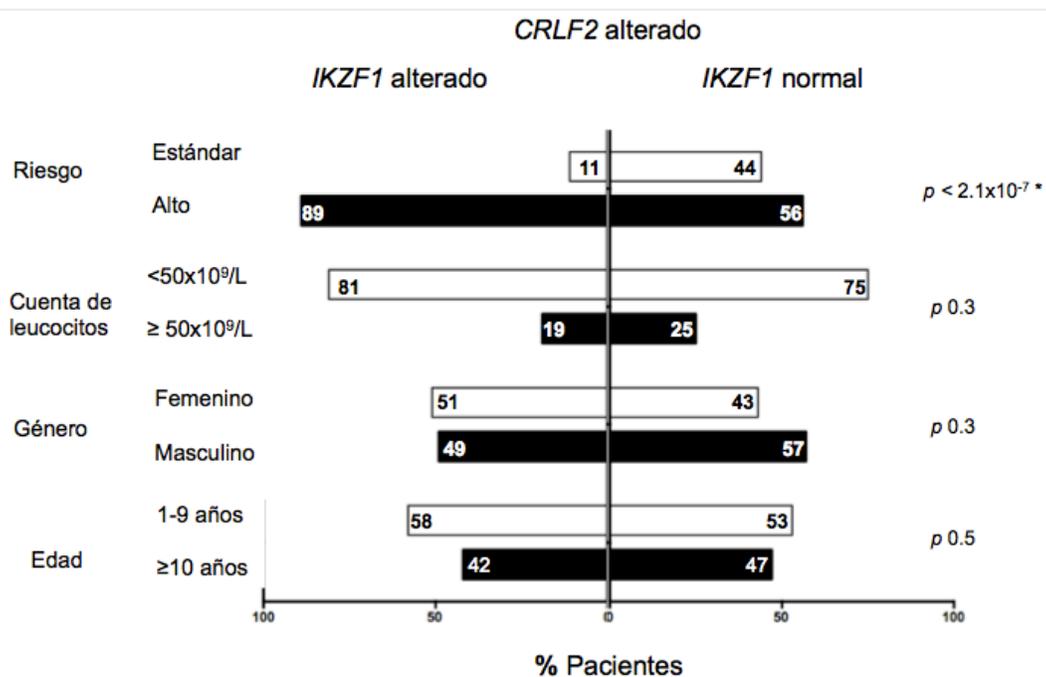


Figura 28. Características clínicas de los pacientes con y sin alteración de *IKZF1* y/o *CRLF2*. A. pacientes con y sin alteración de *IKZF1*. B. y C. comparación entre pacientes con alteración de ambos genes y con alteración sólo de *CRLF2* o sólo de *IKZF1*. En negro se muestra la frecuencia de las características de pronóstico adverso y en blanco las de pronóstico favorable. * valores estadísticamente significativos. ** valores con tendencia a la significancia.

B.



C.

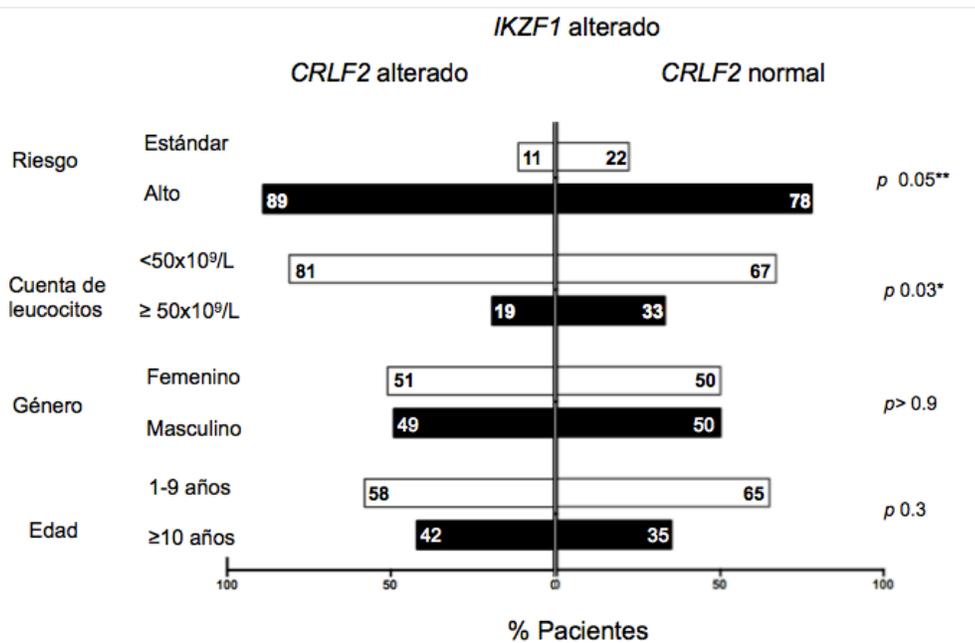


Figura 28. Características clínicas de los pacientes con y sin alteración de *IKZF1* y/o *CRLF2* (Continuación).

8. DISCUSIÓN

8.1 Alteraciones de *CRLF2*

Las alteraciones en el gen *CRLF2* son las más frecuentes en el subtipo Ph-like y se presentan hasta en el 50% de los casos, éstas incluyen la sobreexpresión del gen y/o la presencia de rearrreglos⁽⁴⁵⁾.

En este trabajo se encontró una frecuencia de sobreexpresión de *CRLF2* del 52% y 57% en el total de pacientes de la población y los pacientes negativos a FGR respectivamente (Figura 10 A y B). Se estima que la frecuencia de sobreexpresión de *CRLF2* en LLA pre-B pediátrica es del 9 al 16%⁽²⁴⁾. Es difícil conocer con certeza cuál es la frecuencia de esta alteración, ya que se ha buscado por diversas metodologías (RT-PCR en tiempo real y microarreglos de expresión), y el valor de corte se ha estimado de diferentes formas, ya sea utilizando métodos aritméticos, media y mediana como se hizo en este estudio, o mediante una asociación biológica como la recaída, o por criterios arbitrarios⁽³⁵⁾. Una alternativa para definir un valor de corte menos arbitrario para la sobreexpresión sería determinar la sobreexpresión de *CRLF2* utilizando un método de cuantificación absoluta.

Los rearrreglos de *CRLF2* son la causa más común de la sobreexpresión de este gen; en particular, el valor de corte utilizado en este trabajo (mediana: 143.2) ha permitido distinguir a los pacientes con sobreexpresión entre aquéllos que portan los rearrreglos *IGH-CRLF2* y *P2RY8-CRLF2* en clonas mayoritarias. En contraste, los pacientes con rearrreglos en clonas minoritarias han quedado ubicados en los valores menores o limítrofes de la sobreexpresión, lo cual tiene sentido en el contexto de la presencia de alteraciones y en el tamaño de las clonas alteradas (Figura 10 A).

La frecuencia de rearrreglos de *CRLF2* es variable ya que depende de las características del grupo estudiado, por ejemplo la edad, la estratificación de riesgo, el origen étnico de los pacientes y la presencia de síndrome de Down⁽¹⁶⁾. Se refiere que se presentan en aproximadamente el 6% de los niños con LLA pre-B y en más del 25% de los adultos jóvenes⁽²⁴⁾. En la Tabla 4 se puede apreciar la variabilidad en la frecuencia de rearrreglos de *CRLF2* en estudios de distintas cohortes que incluyen pacientes negativos a FGR y estratificados clínicamente como de riesgo estándar y alto. En este trabajo se obtuvo un 65% de alteraciones de *CRLF2* en la población total de pacientes con LLA pre-B considerando la sobreexpresión y/o los rearrreglos del gen y un 68% en pacientes negativos a FGR (Figura 11). Aún si se consideran sólo los rearrreglos *P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2* la frecuencia es de 39% y de 43% al tomar en cuenta la población total y a los pacientes negativos a FGR respectivamente (Figura 11). Estas frecuencias son las más altas descritas hasta el momento, incluso si se comparan con los estudios referidos en población de niños hispano latinos residentes en EE.UU. con estratificación de riesgo alto, o con los estudios en los que analizan a pacientes con LLA pre-B y síndrome de Down (Tabla 4)^(25,46).

Tabla 4. Frecuencia de rearrreglos de *CRLF2* en diferentes cohortes de LLA pre-B.

País	Número de pacientes	Etnicidad	Rearreglos en <i>CRLF2</i>	Autor
EE.UU.	51	H-L	35%**	Harvey <i>et al.</i> ; (2010) ⁽⁴⁶⁾ (Pacientes con estratificación de riesgo alto)
Alemania	70	C	4.5% *	Cario <i>et a.</i> , (2010) ⁽⁴⁷⁾
Inglaterra	865	C	6% **	Ensor <i>et al.</i> ,(2011) ⁽⁴⁸⁾
Italia/ Alemania	464	C	5.1% *	Palmi <i>et al.</i> ,(2012) ⁽²³⁾
Alemania	694	C	3.8%*	Dörge <i>et al.</i> , (2013) ⁽⁴⁹⁾
Austria	268	C	25%*	Morak <i>et al.</i> , (2017) ⁽²⁵⁾ (Incluidos pacientes con Síndrome de Down)
México	98	M	43%**	Este trabajo (Negativos a FGR)

**P2RY8-CRLF2*. ** rearrreglo de *CRLF2*. C, caucásico. H-L, hispano-latino. M, mexicano. FGR, fusiones génicas recurrentes.

La alta frecuencia de rearrreglos de *CRLF2* encontrada en este trabajo podría estar asociada con el componente étnico de la población mexicana, ya que se ha descrito la asociación entre las alteraciones en *CRLF2* y el origen amerindio. Como se refiere en el estudio de Harvey *et al.*; (2010) ⁽³⁶⁾ realizado en pacientes con LLA pre-B de alto riesgo residentes de California, EE.UU., en el que encontró que 35% de los pacientes identificados como hispano-latinos fueron portadores de rearrreglos de *CRLF2*, en contraste con pacientes de otras etnias en las que este hallazgo se presentó en solo el 7.1%.

Aunque en la cohorte de pacientes analizada en este trabajo se tamizaron las principales alteraciones del gen, del 20 al 22% de los casos fueron clasificados como ad-*CRLF2* (Figura 11), es decir, aún queda por definir la causa genética de la sobreexpresión de *CRLF2*.

Existen otras alteraciones genéticas que pueden provocar la sobreexpresión de *CRLF2*, éstas son:

A. La delección *CSF2RA-CRLF2*, abarca aproximadamente 32Kb en la región pseudoautosómica 1 y yuxtapone al promotor del gen *CSF2RA* con la región codificante de *CRLF2*, provocando su sobreexpresión ⁽⁵⁰⁾.

B. La mutación puntual c.695T>G (Phe232Cys) en la secuencia de *CRLF2*, resulta en la homodimerización de la proteína en la membrana y en consecuencia la hiperactivación de la señalización Jak2-Stat5 y la sobreexpresión de *CRLF2* ⁽⁶⁾.

C. La mutación concomitante R683G en la secuencia de *JAK1* y *JAK2* se ha reportado en la mitad de los pacientes con rearrreglo de *CRLF2* y contribuye a la sobreexpresión del gen ⁽⁶⁾.

D. La presencia del alelo de riesgo A del SNP rs3824662 en el gen *GATA3* produce un incremento en la expresión de este factor de transcripción; esto hiperactiva la transcripción de genes involucrados en la vía de señalización Jak-Stat incluyendo a *CRLF2*; de hecho, se ha descrito que la región 5' de *CRLF2* presenta cinco motivos de unión para *GATA3* ⁽⁵¹⁾.

E. La presencia de isoformas dominante negativas de *IKZF1* provocan el aumento en la expresión de *CRLF2* debido a que *IKZF1* es incapaz de unirse al promotor de *CRLF2* para regular su expresión ⁽⁵²⁾.

A pesar de todas las posibilidades que permiten explicar la sobreexpresión de *CRLF2*, se han descrito casos en los que no se detectan alteraciones genéticas asociadas, por lo que este fenómeno puede ser resultado de eventos de regulación transcripcional ⁽⁶⁾.

Recientemente se ha descrito que las alteraciones en *CRLF2* pueden coexistir con los rearrreglos genéticos recurrentes en LLA pre-B, en este trabajo se encontraron alteraciones en *CRLF2* (sobreexpresión y/o rearrreglo) en el 40% de los pacientes positivos a las FGR, la mitad de estos casos fue positiva a la delección *P2RY8-CRLF2* y en el resto de los pacientes aún queda por definir la causa de la sobreexpresión del gen (Figura 11 y Tabla 3).

En la tabla 5 se muestran reportes de casos en los que las alteraciones de *CRLF2* coexisten con las FGR, las fusiones involucradas con mayor frecuencia son *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1* y *var-KMT2A*. ^(41,50,53-57). Cabe mencionar que la frecuencia de coexistencia de estas alteraciones encontrada en este trabajo representa la más alta descrita hasta el momento, y el hallazgo más frecuente fue la coexistencia de las alteraciones de *CRLF2* y la fusión *TCF3-PBX1*.

Con respecto a los aspectos biológicos y clínicos de la coexistencia de las FGR y alteraciones de *CRLF2*, recientemente se han descrito cuatro casos *BCR-ABL1* positivos de origen hispano, uno con ruptura de *CRLF2* detectada por FISH, dos con el rearrreglo *IGH-CRLF2* y uno con delección *P2RY8-CRLF2* en los que ocurrió recaída ⁽³⁶⁾. En dos de estos pacientes, se determinó que la alteración primaria era la del gen *CRLF2* y la secundaria era la fusión *BCR-ABL1*; los cuatro pacientes fueron sensibles a los inhibidores de la señalización Abl, aunque recayeron con la clona residual *CRLF2* positiva por lo que fueron tratados con ruxolitinib para inhibir a la señalización Jak2-Stat5 ⁽³⁷⁾.

Pastorczak *et al.*, (2018) ⁽⁵⁶⁾ describe a dos pacientes *ETV6-RUNX1* y con sobreexpresión de *CRLF2* a nivel de transcrito, uno de estos pacientes con subclonas que mostraron la sobreexpresión de la proteína *CRLF2* en superficie; esto podría sugerir la activación de la señalización de Jak2-Stat5 y por lo tanto un blanco terapéutico potencial.

Tabla 5 .Coexistencia de las fusiones génicas recurrentes con alteraciones de *CRLF2*.

País	Pacientes positivos a FGR y con alteraciones de <i>CRLF2</i>			Autor
	FGR (n)	Alteración de <i>CRLF2</i> (n)	Coexistencia de ambas alteraciones en población total de pacientes positivos a FGR %(n)	
Alemania	<i>BCR-ABL1</i> (1) <i>ETV6-RUNX1</i> (3) <i>TCF3-PBX1</i> (1)	<i>P2RY8</i> (5)	9%(5/56)	Schwab <i>et al.</i> , (2013) ⁽⁵³⁾
Holanda	var- <i>KMT2A</i> (1)	S- <i>CRLF2</i> (1)	0.4%(1/217)	Van der veer <i>et al.</i> , (2013) ⁽⁵⁴⁾
Holanda	var- <i>KMT2A</i> (3)	<i>P2RY8</i> (3)	4.9%(3/61)	Yano <i>et al.</i> , (2014) ⁽⁵⁰⁾
Alemania	<i>ETV6-RUNX1</i> (1)	S- <i>CRLF2</i> (1)	1% (1/91)	Schmah <i>et al.</i> , (2017) ⁽⁴¹⁾
EE.UU.	<i>BCR-ABL1</i> (1)	S- <i>CRLF2</i> (1)	3%(1/35)	Konoplev <i>et al.</i> ; (2017) ⁽⁵⁵⁾
EE.UU.	<i>BCR-ABL1</i> (4)	<i>P2RY8</i> (1), <i>IGH</i> (2) y <i>CRLF2</i> roto (1)	Reporte de 4 casos	Jain <i>et al.</i> , (2017) ⁽³⁶⁾
Polonia	<i>ETV6-RUNX1</i> (2) var- <i>KMT2A</i> (1)	S- <i>CRLF2</i> (3)	9%(3/29)	Pastorczyk <i>et al.</i> , (2018) ⁽⁵⁶⁾
California, EUA	<i>BCR-ABL1</i> (1)	<i>P2RY8</i> (1)	Reporte de 1 caso	Aldoss <i>et al.</i> , (2019) ⁽⁵⁷⁾
México	<i>BCR-ABL1</i> (1) <i>ETV6-RUNX1</i> (2) <i>TCF3-PBX1</i> (5)	S-<i>CRLF2</i> (4) <i>P2RY8</i> (4)	40%(8/20)	Este trabajo

FGR, fusiones génicas recurrentes. *P2RY8*, Delección. *IGH*, translocación. S, Sobreexpresión.

Hasta ahora no se tienen reportes que describan el significado biológico y clínico de la coexistencia de alteraciones de *CRLF2* y la fusión *TCF3-PBX1* en pacientes con LLA pre-B, no obstante, como parte de este proyecto se ha demostrado la activación de la señalización de Jak2-Stat5 en los pacientes con estas alteraciones mediante la medición de los niveles de pSTAT5 por citometría de flujo (Anexo 4). En el modelo murino de LLA pre-B con la fusión *TCF3-PBX1*, se determinó que las mutaciones en genes ortólogos de la vía Jak-Stat participan en el proceso de inicio de la leucemia,

considerando estos hallazgos, existe la posibilidad de que esto también ocurra en los pacientes de este trabajo que tienen alteraciones de *CRLF2* y fusión *TCF3-PBX1*. En estos pacientes los miembros de la vía Jak2-Stat5 podría ser un blanco terapéutico ⁽⁵⁸⁾.

El significado clínico de la coexistencia de las alteraciones de *CRLF2* y FGR aún no es claro, por lo cual es importante seguir la evolución de estos pacientes. La alta frecuencia de alteraciones de *CRLF2* encontrada en los pacientes con y sin FGR de este trabajo sugiere la necesidad de realizar el tamizaje de dichas alteraciones en todos los pacientes con LLA pre-B.

8.1.1 Presencia de la delección *P2RY8-CRLF2* y la amplificación *iAMP21*

La delección *P2RY8-CRLF2* se encontró en 31% del total de pacientes de la población de estudio, en 33% y el 20% de los pacientes negativos y positivos a las FGR respectivamente (Figura 11 y 12 A). Como se mencionó, la frecuencia de este rearrreglo puede ser variable entre grupos de estudio ya que depende de las características de la población analizada. En un estudio de una cohorte no seleccionada del MRC (consejo de investigación médica, por sus siglas en inglés) predominó la delección *PR2Y8-CRLF2* (5%) comparativamente con el rearrreglo *IGH-CRLF2* (1%); en contraste, el grupo COG observó que *IGH-CRLF2* es dos veces más prevalente que *PR2Y8-CRLF2* ⁽⁴⁸⁾. En la población total de pacientes analizados en este trabajo, la delección *PR2Y8-CRLF2* fue más frecuente que la translocación *IGH-CRLF2* (31% y 8%, respectivamente), aunque la frecuencia de la translocación podría ser mayor ya que su búsqueda no fue posible en 58% de los pacientes candidatos a presentarla.

En este trabajo, el estudio de la delección *P2RY8-CRLF2* por medio de FISH reveló la presencia de subclonas minoritarias, que van del 0.4 al 1.5% de las células analizadas de pacientes sin sobreexpresión de *CRLF2*, y fue posible observar una mayor proporción de clonas positivas en los pacientes con sobreexpresión de *CRLF2*, en comparación con los pacientes que no sobreexpresaron el gen (Figura 12 B y Figura 13). Desafortunadamente, no se pudo cuantificar el porcentaje de clonas *P2RY8-CRLF2* positivas en todos los pacientes, aunque por los resultados obtenidos, se espera que la mayoría de los pacientes con altos niveles de sobreexpresión porten el rearrreglo en clonas mayoritarias, y aquéllos con bajos niveles de expresión tengan la alteración en clonas minoritarias.

Schmäh *et al.*, (2017) ⁽⁴¹⁾ reportan que la mayoría de sus pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* fueron portadores de la delección en clonas mayoritarias. En otro estudio de Morak *et al.*, (2012) ⁽²⁵⁾ refieren pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos por RT-PCR en los que cuantifica el porcentaje de clonas portadoras de la delección utilizando la técnica de MLPA (amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples); encontraron que 27% de los casos mostró clonas mayoritarias con la delección y

73% clonas minoritarias, al comparar esto con el valor de corte de la sobreexpresión se observó que un valor de expresión relativa de 50 delimita los casos con clonas mayores de los casos negativos a la delección, pero del 20% al 30% de los casos con clonas minoritarias tienen valores de expresión por encima de 50, indicando que en estos casos la sobreexpresión de *CRLF2* no se debe por completo a la delección.

Es importante considerar que en los pacientes con la delección *P2RY8-CRLF2* pueden existir factores adicionales que produzcan la sobreexpresión de *CRLF2* (p ej. mutaciones en *JAK2*, *IL7RA*, polimorfismos en el gen *GATA3* entre otros) ^(21,22,51). En los pacientes de este trabajo, el análisis de FISH permitió observar clonas *P2RY8-CRLF2* positivas con más de un alelo afectado (Figura 12 B 3 y 4), el cual podría ser un factor adicional que contribuye a la sobreexpresión de *CRLF2* ⁽⁵⁹⁾.

La delección *P2RY8-CRLF2* fue analizada en dos pacientes en muestras de diagnóstico y recaída, ambos pacientes fueron positivos en la muestra de diagnóstico, en contraste, en la muestra de recaída no se encontró esta alteración. La evolución de las clonas *P2RY8-CRLF2* positivas es impredecible, al parecer depende de cada caso específico. En la mayoría de los pacientes las subclonas *P2RY8-CRLF2* no progresan a clonas con mayor número de células en la recaída, aunque algunas desaparecen, otras persisten y algunas se reemplazan por clonas con nuevos puntos de ruptura ⁽²⁵⁾; esto conlleva a la necesidad de cuantificar el número de células con la alteración para conocer el tamaño de las clonas y analizar su participación en diferentes etapas de la enfermedad.

La delección *P2RY8-CRLF2* se ha considerado una alteración secundaria que se encuentra en subclonas acompañando a una alteración primaria, esta alteración contribuye al establecimiento de la leucemia sin ser crítica para este proceso, aunque en ocasiones sí puede sustituir a una alteración conductora ⁽⁵⁹⁾. Harrison *et al.*, (2015) ⁽²⁷⁾ refiere que un 14% de los casos *P2RY8-CRLF2* coexisten con la amplificación *iAMP21*, la cual es reconocida como una alteración primaria y tiene una frecuencia del 2% en LLA pre-B. En este trabajo se buscó la presencia de la amplificación *iAMP21* en los pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos y se encontró en el 73% de éstos (Figura 14). En cinco pacientes positivos a la delección y a la amplificación se cuantificó el porcentaje de clonas de cada alteración y en todos los casos se encontró a la amplificación en una clona mayor (Figura 15); en la literatura se refiere que la amplificación *iAMP21* es un evento primario que puede presentar a la delección *P2RY8-CRLF2* como alteración secundaria.

En el paciente LLA 119 se encontró la amplificación en la muestra de recaída, sin embargo, se desconoce si la amplificación *iAMP21* estaba presente desde el diagnóstico; con respecto a la delección *P2RY8-CRLF2* se detectó en la muestra de diagnóstico pero no en la muestra de recaída. Rand *et al.*, (2016) ⁽²⁶⁾ y Morak *et al.*, (2012) ⁽²⁵⁾ reportan estudios donde se analiza la arquitectura

clonal de las células leucémicas con la delección *P2RY8-CRLF2* y la amplificación *iAMP21*, en muestras pareadas de diagnóstico y recaída, observaron que cuando la amplificación *iAMP21* está presente desde el diagnóstico se conserva en la recaída, a diferencia de la delección la cual se comporta como una alteración secundaria que puede permanecer, disminuir o perderse, en comparación con la amplificación que puede mantenerse desde el diagnóstico hasta la recaída.

8.1.2 Presencia de la translocación *IGH-CRLF2*

A diferencia de la delección *P2RY8-CRLF2*, la translocación *IGH-CRLF2* únicamente se presentó en pacientes con sobreexpresión de *CRLF2* (Figura 10 A); como se mencionó, la frecuencia de los rearrreglos de *CRLF2* es variable y depende de varios factores. En este trabajo, la translocación *IGH-CRLF2* se encontró en el 8% de la población total y en el 10% de los pacientes FGR negativos (Figura 11 y 16).

Aunque la mayoría de los pacientes *IGH-CRLF2* positivos tuvieron un resultado clásico, con una proporción de clonas con ruptura de los genes *IGH* y *CRLF2* similar (Figura 16 3 y 4 y Figura 17 paciente LLA 020), algunos casos mostraron resultados atípicos, con clonas con ruptura de los genes *IGH* y *CRLF2* en proporciones desbalanceadas (Figura 17 pacientes LLA 011 y LLA 021), o pacientes en los que solo se detectó una clona con ruptura de *IGH* (Figura 16 3 y Figura 17 pacientes LLA 012 y LLA 022). En estos casos se sospecha que existe una clona celular con un rearrreglo de *IGH* que involucra una pareja distinta de *CRLF2* y viceversa.

Se ha identificado un gran número de oncogenes con los cuales *IGH* puede tener rearrreglos, en todos estos ocurre sobreexpresión del oncogén por la proximidad con sus elementos potenciadores de la transcripción ubicados en el cromosoma derivativo 14. De acuerdo con datos de un estudio de Russell *et al.* (2014)⁽⁶⁰⁾ en el cual caracteriza a 103 pacientes con rearrreglo de *IGH*, la pareja génica involucrada en el rearrreglo con *IGH* puede variar de acuerdo a la edad. En pacientes pediátricos la pareja más frecuente es *CRLF2* (22% de los casos) seguida de los factores de transcripción *CEBP* (11% de los casos) e *ID4* (7% de los casos), aunque en la mayoría de los pacientes se desconoce la pareja génica de *IGH* (60%); a pesar de esto existen diversas posibilidades descritas en LLA pre-B (Tabla 6).

Se ha descrito poco con respecto a la posibilidad de un rearrreglo que involucre la ruptura de *CRLF2* y unión con una pareja distinta a *IGH*, sin embargo, se han identificado cuatro fusiones para *CRLF2* detectadas mediante secuenciación del transcriptoma, aunque se desconoce su significado biológico (Tabla 6). Schmah *et al.*, (2017)⁽⁴¹⁾ reporta dos casos con sobreexpresión de *CRLF2* en donde se desconoce la alteración genética asociada, no obstante, ambos presentaron ruptura de *CRLF2*,

aunque no involucran a los genes que codifican para las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas *IGH* *IGK* o *IGL*.

Tabla 6. Posibles parejas génicas de *IGH* y *CRLF2*.

Gen	Pareja génica	Localización cromosómica	Referencia
<i>IGH</i>	<i>CRLF2</i>	Xp22.33/Yp11.2	Russell <i>et al.</i> , (2014) ⁽⁶⁰⁾
	<i>CEPBP A,B,D,E y G</i>	A (19q13.11) B (20q13.3) D (8q11.21) E (14q11.2) G (19q13.11)	
	<i>ID4</i>	6p22.3	
	<i>EPOR</i>	19p13.2	
	<i>IGF2BP1</i>	17q21.32	
	<i>IGK</i>	2p11.2	
	<i>MIR125B1</i>	11q24.1	
<i>CRLF2</i>	<i>IGH</i>	14q32.33	Kim P y Zhou (2018) ⁽⁶¹⁾
	<i>CHRFAM7A</i>	15q13.2	
	<i>U2AF1</i>	21q22.3	
	<i>GOLGA8A</i>	15q14	
	<i>WDR27</i>	6q27	

En los casos descritos, se requiere identificar al gen que se encuentra rearrreglado con *IGH* o con *CRLF2*, ya que estas alteraciones en coexistencia o en ausencia de una población de células *IGH-CRLF2* positivas, podrían influir en el pronóstico del paciente. Para esto, metodologías como la secuenciación de próxima generación dirigida o la PCR “panhandle”, que permite identificar la pareja génica desconocida cuando se cuenta con una secuencia conocida, podrían ayudar a conocer la pareja génica involucrada.

Además de estos casos, se encontraron tres pacientes en los que se detectó la coexistencia de la hiperdiploidía y la translocación *IGH-CRLF2*, con tres tipos de clonas, una con la translocación *IGH-CRLF2* minoritaria con respecto a dos clonas mayoritarias, una con hiperdiploidía y otra en donde la translocación y la hiperdiploidía coexisten en la misma célula (Figura 16 5-8). Schmäh *et al.*, (2017) ⁽⁴¹⁾ refieren que el 6% de los casos *IGH-CRLF2* positivos mostraron además ganancia de copias de *CRLF2* a causa de la hiperdiploidía. Jeffries *et al.*, (2014) ⁽⁶²⁾ estudia a 28 pacientes con coexistencia de rearrreglo de *IGH* y alteraciones citogenéticas recurrentes en LLA pre-B y encuentra hiperdiploidía

con más de 50 cromosomas en el 32% de estos casos, incluso reporta un caso en el cual el rearrreglo de *IGH* y la hiperdiploidía están en la misma célula y sugiere que el rearrreglo de *IGH* es un evento secundario a la hiperdiploidía al encontrar a ésta en menor proporción.

Con base en la literatura, la hiperdiploidía está asociada a características clínicas de pronóstico favorable, en cambio, en los pacientes de este trabajo en los que se encontró esta alteración en conjunto con la translocación *IGH-CRLF2* se observaron características clínicas de pronóstico adverso, tales como cuentas de leucocitos altas y estratificación de riesgo alto. Es importante realizar un seguimiento clínico de los pacientes con hiperdiploidía y translocación *IGH-CRLF2* porque podrían presentar eventos adversos como falla al tratamiento o recaída, asociados a la presencia de la translocación *IGH-CRLF2*, además; la hiperactivación de la vía de Jak2-Stat5 como resultado de la translocación podría ser un blanco terapéutico para el tratamiento de estos pacientes.

8.2 Presencia de alteraciones de *IKZF1*

Generalmente las alteraciones del gen *IKZF1* son deleciones, raramente son mutaciones puntuales, y las más frecuentes son las que generan isoformas dominante negativas, como la deleción de los exones 4 al 7 del gen y la deleción de los exones 4 al 6, las cuales producen a las isoformas Ik6 e Ik8 respectivamente (Figura 18) ⁽⁶³⁾. En este trabajo, las alteraciones del gen *IKZF1* se encontraron en el 69% (74 de 108) de la población total analizada (Figura 19). En LLA pre-B la frecuencia de alteración de *IKZF1* es del 15%, sin embargo, la estratificación de riesgo y el subtipo molecular de LLA pre-B de la población analizada pueden influir en la frecuencia.

Existe una gran variabilidad con respecto a la frecuencia de las alteraciones de *IKZF1* en las cohortes reportadas en la literatura (Tabla 7). Dupuis *et al.*, (2013) ⁽⁶⁵⁾ reportan una frecuencia alteraciones de *IKZF1* de 27% en pacientes pediátricos Ph+ y Ph-, sin embargo, la frecuencia descrita en este trabajo para la población total es mayor (Tabla 7). Si consideramos solo la frecuencia de deleciones de *IKZF1* en nuestra población negativa a FGR sigue siendo mayor, incluso si se compara con la frecuencia de las cohortes de pacientes pediátricos Ph- de alto riesgo reportada por Harvey *et al.*, (2010) ⁽³⁶⁾ y Mullighan *et al.*, (2009) ⁽⁶⁴⁾ que son del 30% y 28.6% respectivamente (Tabla 7).

Una población similar a la analizada en este trabajo es la cohorte de pacientes pediátricos mexicanos con LLA pre-B de riesgo estándar y alto, descrita por Reyes León *et al.*, (2015) ⁽⁶⁸⁾, en la cual la frecuencia de transcritos correspondientes a isoformas dominante negativas de *IKZF1* fue de 23%, sin embargo, la frecuencia encontrada en este trabajo fue mayor (tabla 7), y la diferencia podría atribuirse a la frecuencia mayor de pacientes con edad ≥ 10 años y cuentas de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$, (31% y 22% respectivamente) respecto a la referida en el estudio de Reyes León *et al.*, (2015) ⁽⁶⁸⁾.

Tabla 7. Frecuencia de deleciones de *IKZF1* en diferentes cohortes de LLA pre-B

País	Numero de pacientes	Características de la población	Deleción de <i>IKZF1</i>	Referencia
EE.UU.	43	N y A Ph+	84%	Mullighan <i>et al.</i> , (2008) ⁽⁶³⁾
EE.UU.	221	N y A Ph- de alto riesgo	28.6%	Mullighan <i>et al.</i> , (2009) ⁽⁶⁴⁾
EE.UU.	207	N y A Ph- de alto riesgo	30%	Harvey <i>et al.</i> , (2010) ⁽³⁶⁾
Francia	93	N y A Ph+ y Ph-	27%	Dupuis <i>et al.</i> , (2012) ⁽⁶⁵⁾
Francia	60	N y A Ph+	75%	Caye <i>et al.</i> , (2013) ⁽⁶⁶⁾
	512	N y A Ph-	16%	
India	101	N y A y Adultos Ph+ y Ph-	28.7%	Gupta <i>et al.</i> , (2014) ⁽⁶⁷⁾
México	99	N y A de riesgo alto y estándar	23%	Reyes León <i>et al.</i> , (2015) ⁽⁶⁸⁾
			Ik6 16%	
			Ik8 5%	
			Ik6 e Ik8 1%	
			Otras 1%	
	77	FGR negativos	23%	
	22	FGR positivos		
China	42	Adultos Ph+	48%	Lin <i>et al.</i> , (2016) ⁽³⁸⁾
México		N y A de riesgo alto y estándar	69%	Este trabajo
			Ik6 27%	
			Ik8 10%	
			Ik6 e Ik8 31%	
			Otras 1%	
	88	Negativos a FGR	67%	
	20	Positivos a FGR	70%	

NyA, Niños y adolescentes. FGR, Fusiones génicas recurrentes.

La presencia del transcrito de Ik6 fue el hallazgo más frecuente (69.6%) en el estudio de Reyes León *et al.*, (2015)⁽⁶⁸⁾, mientras que la coexistencia de los transcritos de Ik6 e Ik8 fue poco frecuente (1%); en este trabajo la coexistencia de los transcritos de Ik6 e Ik8 fue el hallazgo más frecuente (Figura 20), en este contexto, Boer *et al.*, (2017)⁽²¹⁾ mencionan que la diferencia entre la patogenicidad de las

IDN de *IKZF1* es desconocida, pero todos los tipos de delección en este gen se asocian con un mal pronóstico.

Las isoformas dominante negativas (IDN) de *IKZF1* pueden derivarse de dos tipos de eventos, delecciones a nivel del gen o empalme alternativo del ARNm de *IKZF1* sobre los exones involucrados en la generación de las isoformas Ik6 e Ik8. De acuerdo con datos de Mullighan *et al.*, (2009)⁽⁶⁴⁾, en LLA pre-B Ph+ y Ph-, la presencia de niveles altos de IDN de *IKZF1* a nivel de proteína tiene una asociación significativa únicamente con la presencia de delecciones a nivel del ADN, lo que sugiere que la expresión de las IDN de *IKZF1* se debe a eventos de delección genómica más que a eventos de corte y empalme alternativo del ARNm. Cabe mencionar que en algunos pacientes de este trabajo que tuvieron un resultado positivo a la isoforma Ik6 por RT-PCR anidada también mostraron la delección de los exones correspondientes a la isoforma Ik6 a nivel de ADN en el análisis por microarreglos de aCGH (Figura 24 pacientes LLA 035 y 022).

Además de las delecciones que generan IDN, también pueden ocurrir delecciones heterocigotas, generalmente asociadas a la monosomía 7, delección 7p o delecciones del locus 7p12.2 que involucran al gen completo, o incluso delecciones homocigotas del gen, aunque son menos frecuentes (13.5% y 4% de los casos Ph+ y Ph- con delección de *IKZF1* respectivamente). Este tipo de delección pudo haber ocurrido en uno de los pacientes de este trabajo en el cual no se detectó ninguna isoforma de *IKZF1* (Figura 20); esta posibilidad debe confirmarse con una técnica que permita detectar la delección a nivel de ADN^(43, 69).

Las alteraciones de *IKZF1* se encontraron en conjunto con las alteraciones de *CRLF2*, Schmah *et al.*, (2017)⁽⁴¹⁾ estudió a pacientes pediátricos de LLA pre-B y encontró delección de *IKZF1* en el 25% de los casos positivos a *P2RY8-CRLF2* y en el 75% de los casos positivos a *IGH-CRLF2*, en este trabajo las frecuencias de los transcritos generados por delecciones de *IKZF1* fue de 67% y 90% para los pacientes con los rearrreglos *P2RY8-CRLF2* e *IGH-CRLF2* respectivamente (Figura 19). Con respecto a la coexistencia de las alteraciones de *IKZF1* y las FGR, estas se encontraron en el 67%, 64% y 100% de los pacientes *ETV6-RUNX1*, *TCF3-PBX1* y *BCR-ABL1* respectivamente (Figura 19). De acuerdo con la literatura, las delecciones de *IKZF1* son poco frecuentes en los subtipos distintos a Ph+ y Ph-like (16%), sin embargo, la frecuencia encontrada en este trabajo es mayor a la referida en la literatura⁽¹⁷⁾. Las IDN de *IKZF1* producen un fenotipo caracterizado por el arresto en la diferenciación, auto-renovación y adhesión anormal al estroma de la médula ósea; mientras que las alteraciones de *CRLF2* provocan un fenotipo caracterizado por el aumento en la proliferación celular. El conjunto de estas alteraciones podría tener consecuencias biológicas y clínicas que favorezcan la aparición de eventos adversos^(43, 69).

La alta frecuencia de deleciones de *IKZF1* encontrada en este trabajo y su significado clínico controvertido, lleva a la necesidad de considerar incluir a todos los pacientes con LLA pre-B en el tamizaje de dichas alteraciones y evaluar su impacto en el pronóstico.

8.3 Identificación de pacientes Ph-like.

Las alteraciones de los genes *CRLF2* e *IKZF1* son el tipo de lesión más frecuente en el subtipo Ph-like, sin embargo, no todos los pacientes Ph-like presentan alteraciones en estos genes, por lo tanto, es necesario integrar el análisis del perfil de expresión génica para la detección del subtipo ^(33,34) (Figura 21). El perfil de expresión génica (PEG) propuesto en el laboratorio está compuesto por la sobreexpresión de los genes: *CRLF2*, *IGJ*, *PON2*, *TSPAN7*, *SEMA6A* y *BMPR1B*, los cuales aparecen frecuentemente en distintas firmas de expresión génica utilizadas por distintos grupos para la identificación del subtipo Ph-like ^(8, 37).

En este trabajo, el 56% de los pacientes clasificados como Ph-like mostró del 83% al 100% del PEG, mientras que el 44% restante mostró del 50% al 66% del PEG. En el subtipo Ph-like no *CRLF2*, el 100% de los pacientes mostró del 50 al 66% del PEG (Figura 21). El estudio del PEG Ph-like es una herramienta útil para detectar al subtipo, incluso los protocolos clínicos del Grupo de Oncología Pediátrica (COG, por sus siglas en inglés) utilizan un microarreglo de baja densidad basado en la sobreexpresión de ocho genes los cuales se mencionan a continuación: *IGJ*, *SPATS2L*, *CA6*, *NRXN3*, *MUC4*, *CRLF2*, *ADGFR1* y *BMPR1B* ⁽⁷⁰⁾. El PEG propuesto en el laboratorio comparte el 37.5% de los genes incluidos en el microarreglo de baja densidad utilizado por el grupo COG, no obstante, al utilizar el PEG para la detección del subtipo Ph-like es necesario considerar los siguientes aspectos:

A. Los diferentes PEG utilizados por diversos grupos de investigación no son totalmente aplicables a cualquier población, Boer *et al.*, (2015) ⁽⁷¹⁾ reportan un estudio en el que comparan la capacidad de los PEG de los grupos COG y DCOG para identificar a los pacientes Ph-like en una cohorte distinta para la que fueron diseñados. El estudio mostró que no todos los pacientes Ph-like se identifican por ambos clasificadores, debido a las diferencias genéticas inherentes de cada cohorte, lo cual impide que un clasificador se aplique eficazmente a cualquier población.

B. Existen reportes que describen la coexistencia de clonas con un PEG Ph-like en conjunto con células que portan alteraciones genéticas de otro subtipo molecular de LLA pre-B (p ej. *BCR-ABL1*) ⁽³⁷⁾, esto significa que si la proporción de clonas con PEG Ph-like es baja, existe la posibilidad de no obtener un 100% de positividad.

C. Aunque el PEG es útil en la detección del subtipo, no señala un posible blanco terapéutico, por lo cual la caracterización de las alteraciones genéticas activadoras de cinasas es necesaria en estos pacientes.

De acuerdo con la literatura, la frecuencia de alteraciones en *CRLF2* dentro del subtipo Ph-like es de 47% en niños y 55% en adolescentes ^(21,22,24), en este trabajo, el 80% (33 de 41) de los pacientes clasificados como Ph-like mostró alteraciones de *CRLF2*, sobreexpresión y/o rearrreglo (Figura 21). La translocación *IGH-CRLF2* se detectó en el 30% de los pacientes Ph-like y es el único rearrreglo 100% específico del subtipo Ph-like en la población de estudio. Herold *et al.*, (2017) ⁽⁴²⁾ reporta un resultado similar, al estudiar a una cohorte de pacientes de 15 a 65 años de riesgo alto y estándar, determina que todos los pacientes *IGH-CRLF2* positivos deben ser incluidos dentro del subtipo Ph-like a diferencia de otras alteraciones de *CRLF2*. Además de esta alteración, la mutación R638 ubicada en la secuencia del dominio de pseudocinasa del gen *JAK2* mostró el mismo comportamiento que la translocación; en estos pacientes, la detección de la translocación *IGH-CRLF2* por FISH y la secuenciación de *JAK2* son suficientes para detectar al subtipo Ph-like con una sensibilidad del 63% y una especificidad del 100%.

A diferencia de la translocación *IGH-CRLF2*, la delección *P2RY8-CRLF2* no fue específica del subtipo Ph-like, ésta fue encontrada en 33% (11 de 33) de los pacientes de dicho subtipo (Figura 21); comparativamente Harvey *et al.* (2010) ⁽³⁶⁾ encontraron esta delección en 29% de los pacientes de alto riesgo clasificados como Ph-like, En este trabajo, los pacientes Ph-like *P2RY8-CRLF2* positivos mostraron la sobreexpresión del 50% al 66% o del 83% al 100% del PEG, por lo cual es altamente probable que esta alteración se encuentre en un contexto Ph-like; incluso en los casos en que esta delección coexiste con la amplificación *iAMP21*. En el Anexo 4 se muestra un caso representativo del subtipo Ph-like positivo a la delección *P2RY8-CRLF2* y a la activación de la señalización de Jak2-Stat5.

Las alteraciones de *IKZF1* fueron encontradas en 67% (22 de 33) de los pacientes Ph-like y en 86% (6 de 7) de los casos Ph-like no *CRLF2* (Figura 21), pero éstas no fueron exclusivas del subtipo ya que también fueron encontradas en 72% (18 de 25) de los pacientes no Ph-like y en 70% (14 de 20) de los pacientes con FGR. Aunque las alteraciones de *IKZF1* no determinan que los pacientes pertenezcan o no al subtipo Ph-like, es importante detectarlas ya que se han asociado con un pronóstico adverso ⁽¹⁷⁾.

Cabe mencionar que como parte del proyecto de investigación del cual se deriva este trabajo, se llevó a cabo el análisis de activación de dichas vías de señalización mediante la cuantificación de las moléculas en las que se induce fosforilación (pStat5, pCrkl y pErk). Este análisis reveló niveles

elevados de pStat5 en algunos pacientes clasificados como Ph-like, lo que demuestra la hiperactivación de la señalización de Jak2-Stat5. También se encontraron niveles elevados de pCrkl en pacientes clasificados como Ph-like no *CRLF2*, lo cual demuestra la hiperactivación de la señalización de la vía Abl y confirma su pertenencia al subtipo; en estos pacientes existe la posibilidad de encontrar alteraciones en *ABL1* u otros genes involucrados en la señalización de Abl (Anexo 1-Tabla 2 y Anexo 4). De acuerdo con la literatura, el análisis de la activación de las vías de señalización es una herramienta útil para la detección del subtipo Ph-like, en conjunto con la caracterización genética. Con base en lo anterior, se propone un algoritmo diagnóstico pragmático para la detección del subtipo Ph-like, que considera la sobreexpresión de *CRLF2* y la translocación *IGH-CRLF2* y la detección de alteraciones bioquímicas (Figura 29).

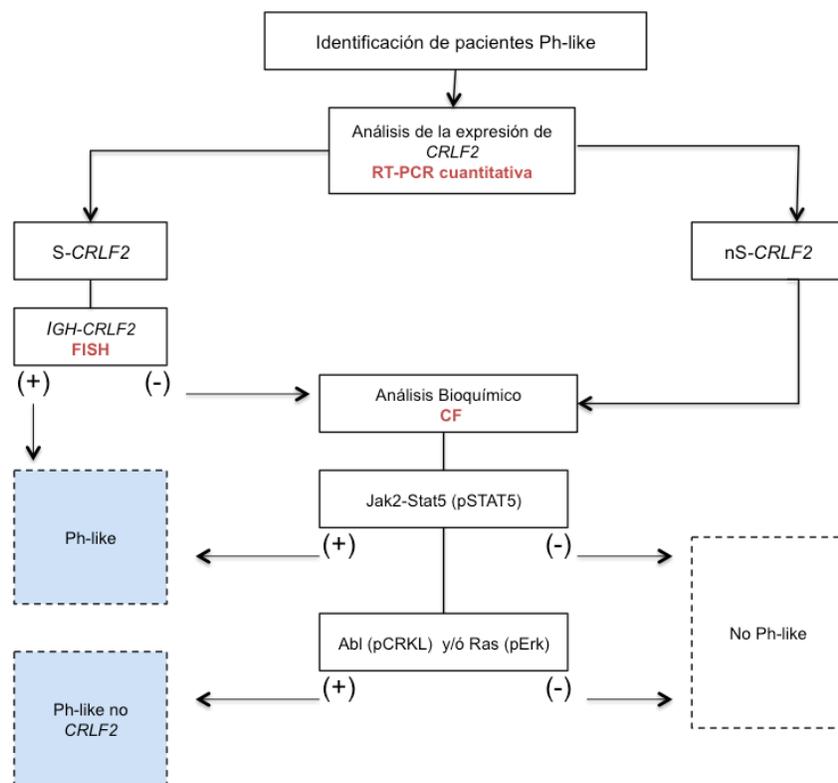


Figura 29. Algoritmo diagnóstico para la identificación de pacientes Ph-like. Los pacientes Ph-like serán identificados por la sobreexpresión de *CRLF2*, la presencia de la translocación *IGH-CRLF2* y/o la activación de la señalización Jak2-Stat5. Los pacientes Ph-like no *CRLF2* serán identificados por la activación de la señalización Abl y/o Ras. Las metodologías utilizadas para cada análisis se distinguen con letras rojas. CF, citometría de flujo, FISH, hibridación *in situ* con fluorescencia. *S-CRLF2*, sobreexpresión de *CRLF2*, *nS-CRLF2*, no sobreexpresión de *CRLF2*.

8.3.1 Búsqueda de CNV's en pacientes Ph-like.

Para complementar la caracterización genética de los pacientes Ph-like se seleccionaron tres casos de este subtipo (LLA 017, LLA 021 y LLA 022) y un paciente Ph-like no *CRLF2* (LLA 035) para la búsqueda de variaciones en el número de copias (CNV's, por sus siglas en inglés) en genes que se refieren alterados en el subtipo Ph-like utilizando aCGH. Los estudios de Den Boer *et al.*, (2009) ⁽²⁰⁾ y Harvey *et al.*, (2010) ⁽³⁶⁾ en donde analizó el perfil de CNV's de pacientes Ph-like), encontraron que los cromosomas con mayor frecuencia de CNV's fueron: 7,9,11,13,19,22, X y amplificaciones en el cromosoma 21, en comparación, los pacientes de este trabajo mostraron CNV's con mayor frecuencia en los cromosomas 3,4,5,7,9,10 y 12. También se determinó que algunos pacientes poseen amplificaciones en el cromosoma 21 por los resultados obtenidos con FISH.

Similar a lo referido por Den Boer *et al.* (2009) ⁽²⁰⁾ y Harvey *et al.* (2010) ⁽³⁶⁾, en este trabajo se encontraron deleciones que involucran a genes supresores de tumor implicados en la regulación del desarrollo linfóide (*BTLA/CD200*, *EBF1*, *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* y *BTG1*), regulación del ciclo celular (*MTAP*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *CDKN2B-AS1* y *CDKN1B*), también se detectó una duplicación que involucra al oncogén *NTRK2* implicado en la señalización mediada por cinasas de tirosina (Figura 24 y Tabla 8).

Los loci 9p21.3 y 9p13.2 se afectaron en los pacientes Ph-like LLA 017, LLA 021 y el paciente Ph-like no *CRLF2* LLA 035, estos pacientes mostraron deleción bialélica del grupo de genes de *CDKN2A/B* (Figura 22 C1 y C2, Figura 24 y Tabla 8). Den Boer *et al.*, (2009) ⁽²⁰⁾ y Harvey *et al.*, (2010) ⁽³⁶⁾ encontraron deleciones de este gen en 34% y 62% de los pacientes Ph-like. Las deleciones de este gen están asociadas a un pronóstico desfavorable ⁽⁵³⁾.

En el paciente LLA 021 se encontró una duplicación homocigota de la región 9q21.13-q22.32 la cual contiene al oncogén *NTRK2* que pertenece a la familia de genes de receptores neutrofilicos de tirosina cinasa (Figura 23-C y Figura 24). Las alteraciones (mutaciones y genes de fusión) en genes de esta familia han sido reportados en LLA pre-B, LLA pre-T y otras neoplasias no hematológicas. La sobreexpresión de estos genes puede activar la señalización de Jak2-Stat3, PI3K-Akt-mTOR y Ras, particularmente, en LLA pre-B Ph-like. En particular, el gen *NTRK3* ha sido reportado en una fusión con el gen *ETV6*, estos hallazgos podrían sugerir que la duplicación de *NTRK2* en el paciente LLA 021 forma parte del genotipo Ph-like e incluso del fenotipo de activación de la señalización mediada por cinasas de tirosina ^(72, 73).

Tabla 8 .Genes involucrados en las CNV's de pacientes Ph-like de este trabajo y comparación con la literatura

Localización cromosómica	Genes	Harvey <i>et al.</i> , (2010) (36)	Den Boer <i>et al.</i> , (2009) (20)	Este trabajo
3q13.2 ^{Del}	<i>BTLA/CD200</i>	-	-	+
5q33.3 ^{Del}	<i>EBF1</i>	+	+	+
7p12.2 ^{Del}	<i>IKZF1</i>	+	+	+
9p21.3 ^{Del}	<i>MTAP</i>			
	<i>CDKN2A</i>	+	+	+
	<i>CDKN2B</i>			
	<i>CDKN2B-AS1</i>			
9p13.2 ^{Del}	<i>PAX5</i>	+	+	+
9q21.13 ^{Dup}	<i>NTRK2</i>	-	-	+
12p13.2 ^{Del}	<i>ETV6</i>	+	-	+
	<i>CDKN1B</i>	-	-	+
12q21.33 ^{Del}	<i>BTG1</i>	+	-	+

CNV's, variaciones del número de copias. Del, delección. Dup, duplicación. +, presente. -, ausente.

8.3.2 Pacientes candidatos a pertenecer al subtipo Ph-like (Probable Ph-like).

El 100% de los pacientes clasificados como probable Ph-like tuvieron alteración en *CRLF2*, por lo cual se clasificaron principalmente como pacientes con alteración de este gen ya que no cumplían con todos los criterios del subtipo (ver sección de interpretación de resultados, pág 29) (Figura 21). Este grupo se compuso por pacientes candidatos a presentar la translocación *IGH-CRLF2*, pacientes con hiperdiploidía, detectada en este trabajo por la ganancia de copias de los genes *CRLF2* (*G-CRLF2*) e *IGH*, y la amplificación *iAMP21* en casos con baja positividad al PEG, por lo cual puede que estas alteraciones no estén ocurriendo en un contexto Ph-like, sino en subtipos moleculares distintos.

En estos pacientes es necesario sumar evidencia que permita reconsiderar o confirmar su clasificación El análisis de la sobreexpresión de más genes de las firmas Ph-like y/o la detección de la translocación *IGH-CRLF2*, o bien, el análisis de características bioquímicas podría definir el subtipo molecular de LLA pre-B que presentan estos pacientes (Figura 29).

8.3.3 Pacientes No Ph-like.

Estos pacientes no mostraron positividad al PEG y la única alteración de *CRLF2* fue la delección *P2RY8-CRLF2* (en la mayoría de los casos acompañada de la amplificación *iAMP21*). En estos pacientes se requiere profundizar en la búsqueda de alteraciones genéticas más allá de los estudios genéticos convencionales, ya que existe la posibilidad de encontrar subtipos moleculares de LLA pre-B que han sido descritos recientemente, tales como: rearreglo de los genes *DUX4*, *ZN384*, *MEF2D* o *ETV6-RUNX1* like ⁽⁷⁴⁾.

8.4 Frecuencia de los subtipos moleculares de LLA pre-B en la población de estudio.

En la población de estudio, la frecuencia de los subtipos genéticos asociados a un pronóstico desfavorable (Ph-like, alteración de *CRLF2*, amplificación *iAMP21*, *BCR-ABL1* y *TCF3-PBX1*) es mayor comparada con la frecuencia en población de pacientes pediátricos con LLA pre-B reportada en la literatura (Figura 25). El objetivo principal de este trabajo fue la detección del subtipo Ph-like y la estimación de su frecuencia en una cohorte de pacientes mexicanos con LLA pre-B. En la población de estudio se obtuvo una frecuencia del subtipo Ph-like 35% (41 de 118) tomando en cuenta a los pacientes Ph-like con y sin alteración de *CRLF2* (Figura 25 A).

De acuerdo con la literatura la frecuencia del subtipo Ph-like difiere con la edad, la etnicidad y el grupo de riesgo, por lo cual es variable entre distintas cohortes como se puede observar en la tabla 9. En comparación con otras cohortes, la frecuencia del subtipo Ph-like encontrada representa la más alta descrita hasta el momento, incluso es mayor a la reportada en cohortes de pacientes pediátricos de alto riesgo y en pacientes adultos de riesgo alto y estándar, en los cuales se describe que está incrementada (Tabla 9). El mismo comportamiento se observa para la frecuencia de alteraciones en *CRLF2* ya que si se considera a los grupos Ph-like con alteración de *CRLF2*, *P2RY8-CRLF2* & *iAMP21* positivos y FGR positivos con alteraciones de *CRLF2* la frecuencia de alteraciones en este gen es del 58% (69 de 118), mucho mayor que la frecuencia reportada en población general (Figura 25 A) y en las diferentes cohortes mostradas en la tabla 4.

Se sabe que el subtipo Ph-like y las alteraciones de *CRLF2* ocurren con frecuencia en los pacientes con ascendencia amerindia e hispanos de EE.UU, debido a la alta frecuencia del alelo de riesgo A del polimorfismo rs3824662 del gen *GATA3*, la cual es de 50% y 40% en individuos con ascendencia amerindia e hispanos de EE.UU, en comparación con individuos con ascendencia europea la cual es del 14%. La presencia del alelo de riesgo A del polimorfismo rs3824662 produce un incremento en la expresión de *GATA3*, esto hiperactiva la transcripción de genes involucrados en la vía de señalización Jak-Stat incluyendo a *CRLF2*. Este polimorfismo ha sido identificado como un locus de

susceptibilidad para la LLA Ph-like con alteración de *CRLF2*, con una significancia de 1.05×10^{-8} y un valor de razón de momios de 3.25 en comparación con individuos No Ph-like. ⁽⁵¹⁾ .

Tabla 9. Frecuencia del subtipo Ph-like en diferentes cohortes.

Cohorte	Edad de los pacientes (años)	Grupo de riesgo	Prevalencia del subtipo Ph-like (%)	Referencia
COALL 92/97	0-18	A y E	19	Den Boer <i>et al.</i> ,(2009) ⁽²⁰⁾
DCOG-ALL-8/9	0-18	A y E	15	
P9906	1-18	A	29	Harvey <i>et al.</i> ,(2010) ⁽³⁶⁾
AALL0232	1-18	A	14	Loh <i>et al.</i> ,(2013) ⁽⁷⁵⁾
DCOG-ALL-8//9/10	1-18	A y E	16	van der Ver <i>et al.</i> ,(2013) ⁽⁵⁴⁾
Múltiples cohortes	1-15	E	10	Roberts <i>et al.</i> ,(2014) ⁽⁸⁾
	1-15	A	12.7	
	16-20	A y E	20.6	
	21-39	A y E	27.4	
HOVON	16-71	A y E	17	Boer <i>et al.</i> ,(2015) ⁽⁷⁶⁾
GMALL	15-65	A y E	13	Herold <i>et al.</i> ,(2017) ⁽⁴²⁾
Universidad de Pensilvania	18-39	A y E	25.9	Tasian <i>et al.</i> ,(2017) ⁽⁷⁷⁾
	40-88	A y E	18.3	
MD Anderson	15-84	A y E	33.1	Jain <i>et al.</i> ,(2017) ⁽⁷⁸⁾
St Jude Total XV	1-18	A y E	11.6	Roberts <i>et al.</i> ,(2017) ⁽⁷⁹⁾
Pacientes mexicanos con LLA pre-B	1-18	A y E	35	Este trabajo

A: Alto E: Estándar, HOVON, Fundación de Hemato-Oncología para adultos de Reino Unido, por sus siglas en ingles. GMALL, Grupo de estudio Multicéntrico Alemán para adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda, por sus siglas en ingles.

Es posible que la alta frecuencia del subtipo Ph-like encontrada en este trabajo esté asociada a una elevada frecuencia del alelo de riesgo A del polimorfismo rs4824662 del gen *GATA3* en los pacientes de la población de estudio, ya que también se ha descrito que este polimorfismo está asociado con alta frecuencia de alteraciones del subtipo Ph-like como los rearrreglos de *CRLF2* y las alteraciones de *IKZF1*; sin embargo, para probar esta hipótesis es necesario conocer la frecuencia alélica y

genotípica del alelo de riesgo A del polimorfismo rs4824662 del gen *GATA3* en los pacientes Ph-like de este estudio y compararla con los pacientes no Ph-like ⁽⁵¹⁾.

De acuerdo con la literatura, en población general las alteraciones genéticas clásicas en LLA pre-B, como las FGR y la hiperdiploidía representan más de la mitad de los casos, en cambio, en los pacientes de la población de estudio la frecuencia de estas alteraciones es menor; aunque la frecuencia de la hiperdiploidía podría ser mayor si se busca intencionadamente, Quiroz *et al.*, (2019) ⁽⁴⁾ menciona una menor proporción de alteraciones genéticas de buen pronóstico como la hiperdiploidía y la fusión *ETV6-RUNX1* (15% y 13%, respectivamente) en pacientes pediátricos pertenecientes a la población latina de California EE.UU.

Como se mencionó, la amplificación *iAMP21* se determinó sólo en los pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos de este trabajo y la frecuencia obtenida equivale al 8% de la población total, la cual es mucho mayor que la reportada en LLA pre-B en general (2%) (Figura 25), estos hallazgos sugieren que la amplificación *iAMP21* podría estar presente con una frecuencia mayor a la referida en la literatura internacional. El estudio de Pérez Vera *et al.*, (2005) ⁽⁸⁰⁾ apoya esta hipótesis, ya que refieren una frecuencia de amplificación *iAMP21* de 9.8% en 71 pacientes mexicanos con LLA pre-B atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría; la población referida en este estudio es similar a la población total de 118 pacientes de este trabajo.

Con respecto a los estudios que asocian una alta frecuencia de alteraciones de mal pronóstico y ascendencia hispano latina, la complejidad de esta etnia hace que la extrapolación de los datos para aplicarlos a las poblaciones mestizas de origen amerindio sea inexacta ⁽⁴⁾. En este contexto, los resultados de este trabajo sugieren que los subtipos moleculares de alto riesgo podrían tener una alta frecuencia en los pacientes mexicanos con LLA pre-B, y en particular, la LLA pre-B del subtipo Ph-like y las alteraciones de *CRLF2*.

8.5 Comparación de las características clínicas del subtipo Ph-like y no Ph-like y de pacientes con y sin alteraciones de *CRLF2* y/o *IKZF1*

La frecuencia del subtipo Ph-like incrementa con la edad, está presente en 10% al 15% de los pacientes pediátricos, 21% de los pacientes entre 16 y 20 años y en el 27% de los adultos jóvenes ⁽³³⁾. En este trabajo no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la edad ≥ 10 años entre pacientes Ph-like y no Ph-like, sin embargo, la frecuencia sí fue significativamente mayor en pacientes Ph-like no *CRLF2* comparados con los pacientes no Ph-like (Figura 26 A y B).

Con respecto al género, Pui *et al.* (2017) ⁽³³⁾ reportaron que una alta proporción de pacientes Ph-like son del género masculino comparado con los pacientes no Ph-like en niños y adultos con una proporción femenino: masculino de 2:0 y 1:0, respectivamente. En este trabajo, no se detectaron diferencias significativas en el género masculino entre pacientes Ph-like y no Ph-like, no obstante, los pacientes Ph-like no *CRLF2* sí mostraron una frecuencia significativamente mayor en comparación con los pacientes no Ph-like (Figura 26 A y B).

Los pacientes Ph-like y Ph-like no *CRLF2* mostraron una frecuencia significativamente mayor de cuentas de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ a diferencia de los pacientes no Ph-like (Figura 26 A y B). Estos resultados coinciden con Pui *et al.*, (2017) ⁽³³⁾, quienes reportaron que los pacientes Ph-like tienen una frecuencia mayor de altas cuentas de leucocitos con una media de $56.6 \times 10^9/L$.

Los pacientes del subtipo Ph-like generalmente son estratificados como de riesgo alto por presentar características clínicas de mal pronóstico, de hecho, representa el subtipo de alto riesgo más frecuente. De acuerdo a los criterios del Instituto Nacional del Cáncer de E.E. U.U., la frecuencia del subtipo Ph-like es mayor en pacientes clasificados como de alto riesgo (del 13% al 14%) en comparación con los pacientes clasificados como de riesgo estándar (aproximadamente 10%) bajo los mismos criterios. En los pacientes Ph-like y Ph-like no *CRLF2* de este trabajo, no se observó diferencia estadísticamente significativa en la estratificación de alto riesgo al compararla con la frecuencia encontrada en pacientes no Ph-like (Figura 26 A y B), esto podría deberse a la presencia de alteraciones genéticas de alto riesgo aún no identificadas en los pacientes no Ph-like, o bien, a la presencia de otras características clínicas de pronóstico adverso.

Se compararon las características clínicas de los pacientes con alteraciones del gen *CRLF2*. En algunos estudios se ha descrito que los pacientes con alta expresión de *CRLF2* tienen características clínicas de pronóstico adverso y una tasa de supervivencia inferior a la observada en otros subtipos ⁽¹⁸⁾. En los pacientes de este trabajo que mostraron la sobreexpresión de *CRLF2* se observó una frecuencia mayor con tendencia a la significancia de cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$, en comparación con los pacientes que no mostraron sobreexpresión del gen (Figura 27 A). La cuenta de leucocitos elevada es una característica de mal pronóstico, ya que puede favorecer la infiltración de las células leucémicas a sitios de difícil acceso para la respuesta inmune y para el tratamiento farmacológico, promoviendo la falla al tratamiento y el proceso de recaída ^(12, 18).

Con respecto a los rearrreglos de *CRLF2* y la sobreexpresión del gen, en este trabajo se detectaron pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos con y sin sobreexpresión de *CRLF2*; este último grupo presentó una frecuencia significativamente mayor de características de pronóstico adverso, en comparación con los pacientes positivos a la delección y a la sobreexpresión, excepto la cuenta de leucocitos

$\geq 50 \times 10^9/L$ la cual fue mayor en estos últimos (Figura 27 B). Aunque la cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ no fue tan frecuente en los pacientes con delección y sin sobreexpresión, la estratificación de alto riesgo si lo fue, lo cual indica que estos pacientes podrían presentar otras características que los hagan ser estratificados como de alto riesgo (p ej. otra alteración genética de mal pronóstico, falla a la terapia de inducción a la remisión, altos niveles de enfermedad mínima residual etc.). Estos hallazgos muestran la necesidad de evaluar la presencia de la delección de forma independiente al nivel de expresión de *CRLF2*, especialmente considerando que su relevancia biológica y clínica de *P2RY8-CRLF2* aún es controvertida, y que esta alteración frecuentemente se acompaña de otras más agresivas como la amplificación *iAMP21* o las alteraciones de *IKZF1* ⁽⁵⁹⁾.

De los dos rearrreglos más comunes de *CRLF2*, la translocación *IGH-CRLF2* ha sido asociada a características de clínicas de mal pronóstico de forma más clara que la delección *P2RY8-CRLF2*. Generalmente, la presencia de la translocación tiene mayor incidencia en adolescentes y adultos jóvenes, en cambio, la delección tiene mayor incidencia en pacientes pediátricos. Las cuentas de leucocitos mayores a $\geq 50 \times 10^9/L$ y la estratificación de riesgo alto se presentan con mayor frecuencia en los casos con la translocación ⁽²²⁾. En este trabajo, la comparación de las características clínicas de los pacientes positivos a la delección *P2RY8-CRLF2* y a la translocación *IGH-CRLF2* reveló una frecuencia de cuenta de leucocitos $\geq 50 \times 10^9/L$ significativamente mayor a la de los pacientes con la translocación, sin embargo, no se observaron diferencias en la edad entre ambos grupos, aunque la estratificación de riesgo alto fue más frecuente en pacientes *IGH-CRLF2* positivos (Figura 27 C).

En este trabajo, se buscó la presencia de la amplificación *iAMP21* en los pacientes *P2RY8-CRLF2* positivos de la población de estudio. La mayoría de los pacientes *iAMP21* positivos fueron del género masculino, aunque en la literatura no se describe una asociación entre la frecuencia de esta alteración y un género determinado (Anexo 3-tabla 2). La edad entre 1 y 9 años fue la más común entre los pacientes *iAMP21* positivos, esto coincide con la literatura ya que la delección *P2RY8-CRLF2* es la más frecuente en pacientes con este intervalo de edad (Anexo 3-tabla 2). La cuenta de leucocitos fue $< 50 \times 10^9/L$ en la mayoría de los pacientes (Anexo 3-tabla 2), esto es una característica común en los pacientes con amplificación *iAMP21*, de hecho, debido a esto usualmente se les asigna una estratificación de riesgo estándar, no obstante, éstos pacientes muestran un pronóstico desfavorable con baja supervivencia global cuando son tratados con quimioterapia de riesgo estándar, aunque mejora cuando son tratados con quimioterapia de alto riesgo, lo que enfatiza la importancia de los hallazgos encontrados en la población de estudio ^(26,27).

Por último, se evaluaron las diferencias en las frecuencias de las características clínicas de pronóstico adverso y favorable entre los pacientes con y sin alteración de *IKZF1*. La estratificación de alto riesgo fue la única característica significativamente mayor en pacientes con alteraciones de *IKZF1*, a pesar de no haber obtenido mayor frecuencia del resto de las características clínicas de mal

pronóstico evaluadas (Figura 28 A). En estos pacientes, la estratificación de riesgo alto podría estar dada por otras características clínicas como la mala respuesta a la terapia con glucocorticoides, falla al tratamiento u otros eventos adversos. De acuerdo con datos de Roberts *et al.*,(2017) ⁽¹⁷⁾ la presencia de alteraciones de *IKZF1* disminuye la eficacia de los inhibidores de tirosina cinasa, por lo cual, estos pacientes son candidatos a terapias más agresivas ⁽¹⁷⁾.

Al comparar las diferencias en las frecuencias de las características clínicas de pronóstico adverso y favorable de pacientes con y sin alteraciones de *IKZF1* y/o *CRLF2*, se observó que la estratificación de alto riesgo fue significativamente mayor en pacientes con alteración de ambos genes respecto a la los que presentaron alteración de *CRLF2*, y fue más frecuente que en los pacientes que sólo mostraron alteración de *IKZF1* (con tendencia a la significancia) (Figura 28 B y C). La cuenta de leucocitos menor de $50 \times 10^9/L$ fue más frecuente en pacientes con alteración de ambos genes que en aquéllos que solo tuvieron alteración de un gen, con diferencia significativa entre *CRLF2* e *IKZF1* alterado contra *CRLF2* normal. Churchman *et al.*, (2015) ⁽⁶⁹⁾ demuestra un fenotipo adherente anormal en linfocitos pre-B en modelos murinos el cual se debe a que la pérdida de la actividad transcripcional normal de *IKZF1* provoca la desregulación de la expresión de moléculas de adhesión ⁽⁶⁹⁾, ellos observan que los blastos leucémicos quedan adheridos al estroma de la médula ósea y no se encuentran en el torrente sanguíneo; este fenómeno podría ser una posible explicación de las cuentas de leucocitos más bajas en pacientes con alteración de *CRLF2* e *IKZF1* en comparación con los pacientes que sólo muestran alteración de un gen.

9. PERSPECTIVAS

En este trabajo, se identificaron pacientes Ph-like a través de la búsqueda de las alteraciones genéticas más frecuentes del subtipo y se propuso un algoritmo para su diagnóstico, sin embargo, aún es necesario complementar la caracterización genética con la finalidad de:

- A.** Determinar la alteración genética asociada a la sobreexpresión de *CRLF2* en los pacientes en los que aún se desconoce la causa de este comportamiento.
- B.** Conocer la pareja génica involucrada en los rearrreglos con los genes *IGH* y *CRLF2*.
- C.** Reconsiderar o confirmar la clasificación de los pacientes Probable Ph-like.
- D.** Conocer si la alta frecuencia del subtipo Ph-like encontrada en nuestra población está asociada a los polimorfismos del gen *GATA3*.
- E.** Detectar alteraciones genéticas que apoyen a la estratificación de riesgo en los pacientes en lo que no se detectaron marcadores con valor pronóstico (Figura 26).

10. CONCLUSIONES

La estrategia de análisis utilizada en este trabajo, permitió la detección de pacientes con LLA pre-B del subtipo Ph-like, estos pacientes mostraron una alta frecuencia de alteraciones en los genes *CRLF2* e *IKZF1*. La frecuencia del subtipo Ph-like y de alteraciones de *CRLF2* e *IKZF1* encontrada en la población de estudio fue mayor en comparación con otras cohortes de la literatura.

Se detectó la presencia de alteraciones en *CRLF2* e *IKZF1* en los pacientes positivos a fusiones génicas recurrentes, *TCF3-PBX1* fue la fusión involucrada con mayor frecuencia. La coexistencia de estas alteraciones fue mayor a la reportada en distintas cohortes y no había sido descrita previamente en pacientes mexicanos con LLA pre-B.

La frecuencia del subtipo Ph-like y las alteraciones de *CRLF2* encontrada en la población de estudio fue mayor a la reportada en cohortes de pacientes con un origen étnico distinto al amerindio, esto sugiere que el componente amerindio podría influir en la elevada frecuencia del subtipo Ph-like y las alteraciones de *CRLF2*; es necesario llevar a cabo más estudios para poder afirmar dicha asociación.

Las frecuencias estimadas en la población de estudio permiten sospechar que el subtipo Ph-like y las alteraciones de *CRLF2* e *IKZF1* representan un alto porcentaje de los casos de LLA pre-B en la población. Adicionalmente, la presencia de características clínicas de mal pronóstico en estos pacientes enfatiza la necesidad de llevar a cabo el diagnóstico oportuno de estas alteraciones

11. LITERATURA CITADA

1. Rivera-Luna R, Velasco-Hidalgo L, Zapata-Tarrés M, Cárdenas-Cardos R, Aguilar-Ortiz MR. Current outlook of childhood cancer epidemiology in a middle-income country under a public health insurance program. *Pediatr Hematol Oncol*. 2017;34(1):43-50.
2. Gupta S, Rivera-Luna R, Ribeiro RC, Howard SC. Pediatric oncology as the next global child health priority: the need for national childhood cancer strategies in low- and middle-income countries. *PLoS Med*. 2014;11(6):e1001656.
3. GLOBOCAN Bdd. https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=484&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=2&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmsc=1&include_nmsc_other=1&half_pie=0&donut=0&population_group_globocan_id=. Ultima fecha de Consulta: 06/02/2019.
4. Quiroz E, Aldoss I, Pullarkat V, Rego E, Marcucci G, Douer D. The emerging story of acute lymphoblastic leukemia among the Latin American population - biological and clinical implications. *Blood Rev*. 2019; 33:98-105
5. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013;381(9881):1943-55.
6. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2008;371(9617):1030-43.
7. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*. 2015;373(16):1541-52.
8. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang YL, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2014;371(11):1005-15.
9. Mullighan CG. Genomic characterization of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. 2013;50(4):314-24.
10. Roberts KG, Yang YL, Payne-Turner D, Lin W, Files JK, Dickerson K, et al. Oncogenic role and therapeutic targeting of ABL-class and JAK-STAT activating kinase alterations in Ph-like ALL. *Blood Adv*. 2017;1(20):1657-71.
11. Rabin K, Man TK, Lau CC. Personalized care of pediatric cancer patients. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2008;62:173-85; discussion 85-8.
12. R. RL. Leucemia linfoblástica aguda de alto riesgo. In: ETM, editor. *Hematología-oncología Pediátrica*. México D.F2006; 216-228.
13. Zhou Y, Kanagal-Shamanna R, Zuo Z, Tang G, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Advances in B-lymphoblastic leukemia: cytogenetic and genomic lesions. *Ann Diagn Pathol*. 2016;23:43-50.
14. Kang ZJ, Liu YF, Xu LZ, Long ZJ, Huang D, Yang Y, et al. The Philadelphia chromosome in leukemogenesis. *Chin J Cancer*. 2016;35:48.
15. Bhojwani D, Yang JJ, Pui CH. Biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am*. 2015;62(1):47-60.
16. Iacobucci I, Mullighan CG. Genetic basis of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):975-83.
17. Roberts KG. The biology of Philadelphia chromosome-like ALL. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2017;30(3):212-21.
18. Tran TH, Loh ML. Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2016;2016(1):561-6.
19. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015;12(6):344-57.
20. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheek MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. 2009;10(2):125-34.
21. Boer JM, den Boer ML. BCR-ABL1-like acute lymphoblastic leukaemia: From bench to bedside. *Eur J Cancer*. 2017;82:203-18.

22. Tasian SK, Loh ML. Understanding the biology of CRLF2-overexpressing acute lymphoblastic leukemia. *Crit Rev Oncog.* 2011;16(1-2):13-24.
23. Palmi C, Vendramini E, Silvestri D, Longinotti G, Frison D, Cario G, et al. Poor prognosis for P2RY8-CRLF2 fusion but not for CRLF2 over-expression in children with intermediate risk B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2012;26(10):2245-53.
24. Tasian SK, Loh ML, Hunger SP. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017;130(19):2064-72.
25. Morak M, Attarbaschi A, Fischer S, Nassimbeni C, Grausenburger R, Bastelberger S, et al. Small sizes and indolent evolutionary dynamics challenge the potential role of P2RY8-CRLF2-harboring clones as main relapse-driving force in childhood ALL. *Blood.* 2012;120(26):5134-42.
26. Rand V, Parker H, Russell LJ, Schwab C, Ensor H, Irving J, et al. Genomic characterization implicates iAMP21 as a likely primary genetic event in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2011;117(25):6848-55.
27. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood.* 2015;125(9):1383-6.
28. Iacobucci I, Li Y, Roberts KG, Dobson SM, Kim JC, Payne-Turner D, et al. Truncating Erythropoietin Receptor Rearrangements in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2016;29(2):186-200.
29. Olsson L, Johansson B. Ikaros and leukaemia. *Br J Haematol.* 2015;169(4):479-91.
30. Yoshida T, Georgopoulos K. Ikaros fingers on lymphocyte differentiation. *Int J Hematol.* 2014;100(3):220-9.
31. Marke R, van Leeuwen FN, Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 2018;103(4):565-74.
32. Tasian SK, Teachey DT, Li Y, Shen F, Harvey RC, Chen IM, et al. Potent efficacy of combined PI3K/mTOR and JAK or ABL inhibition in murine xenograft models of Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2017;129(2):177-87.
33. Pui CH, Roberts KG, Yang JJ, Mullighan CG. Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 2017;17(8):464-70.
34. Roberts KG. Why and how to treat Ph-like ALL? *Best Pract Res Clin Haematol.* 2018;31(4):351-6.
35. Jia M, Wang ZJ, Zhao HZ, Shen HP, Cheng YP, Luo ZB, et al. Prognostic significance of cytokine receptor-like factor 2 alterations in acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *World J Pediatr.* 2015;11(2):126-33.
36. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood.* 2010;116(23):4874-84.
37. Jain N, Lu X, Daver N, Thakral B, Wang SA, Konoplev S, et al. Co-occurrence of CRLF2-rearranged and Ph+ acute lymphoblastic leukemia: a report of four patients. *Haematologica.* 2017;102(12):e514-e7.
38. Lin X, Zou X, Wang Z, Fang Q, Chen S, Huang J, et al. Targeting of heme oxygenase-1 attenuates the negative impact of Ikaros isoform 6 in adult BCR-ABL1-positive B-ALL. *Oncotarget.* 2016;7(33):53679-701.
39. Kishawi I. Agilent array technology and custom capabilities.; 2008.
40. Conlin LK, Thiel BD, Bonnemann CG, Medne L, Ernst LM, Zackai EH, et al. Mechanisms of mosaicism, chimerism and uniparental disomy identified by single nucleotide polymorphism array analysis. *Hum Mol Genet.* 2010;19(7):1263-75.
41. Schmäh J, Fedders B, Panzer-Grümayer R, Fischer S, Zimmermann M, Dagdan E, et al. Molecular characterization of acute lymphoblastic leukemia with high CRLF2 gene expression in childhood. *Pediatr Blood Cancer.* 2017;64(10).
42. Herold T, Schneider S, Metzeler KH, Neumann M, Hartmann L, Roberts KG, et al. Adults with Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia frequently have IGH-CRLF2 and JAK2 mutations, persistence of minimal residual disease and poor prognosis. *Haematologica.* 2017;102(1):130-8.

43. Zhang X, Rastogi P, Shah B, Zhang L. B lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy. *Oncotarget*. 2017;8(39):66728-41.
44. Roberts KG, Reshmi SC, Harvey RC, Chen IM, Patel K, Stonerock E, et al. Genomic and outcome analyses of Ph-like ALL in NCI standard-risk patients: a report from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2018;132(8):815-24.
45. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389-96.
46. Harvey RC, Mullighan CG, Chen IM, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2010;115(26):5312-21.
47. Cario G, Zimmermann M, Romey R, Gesk S, Vater I, Harbott J, et al. Presence of the P2RY8-CRLF2 rearrangement is associated with a poor prognosis in non-high-risk precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia in children treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Blood*. 2010;115(26):5393-7.
48. Ensor HM, Schwab C, Russell LJ, Richards SM, Morrison H, Masic D, et al. Demographic, clinical, and outcome features of children with acute lymphoblastic leukemia and CRLF2 deregulation: results from the MRC ALL97 clinical trial. *Blood*. 2011;117(7):2129-36.
49. Dörge P, Meissner B, Zimmermann M, Mörlicke A, Schrauder A, Bouquin JP, et al. IKZF1 deletion is an independent predictor of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia treated according to the ALL-BFM 2000 protocol. *Haematologica*. 2013;98(3):428-32.
50. Yano M, Imamura T, Asai D, Moriya-Saito A, Suenobu S, Hasegawa D, et al. An overall characterization of pediatric acute lymphoblastic leukemia with CRLF2 overexpression. *Genes Chromosomes Cancer*. 2014;53(10):815-23.
51. Perez-Andreu V, Roberts KG, Harvey RC, Yang W, Cheng C, Pei D, et al. Inherited GATA3 variants are associated with Ph-like childhood acute lymphoblastic leukemia and risk of relapse. *Nat Genet*. 2013;45(12):1494-8.
52. Ge Z, Gu Y, Zhao G, Li J, Chen B, Han Q, et al. High CRLF2 expression associates with IKZF1 dysfunction in adult acute lymphoblastic leukemia without CRLF2 rearrangement. *Oncotarget*. 2016;7(31):49722-32.
53. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica*. 2013;98(7):1081-8.
54. van der Veer A, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal SV, Russell LJ, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*. 2013;122(15):2622-9.
55. Konoplev S, Lu X, Konopleva M, Jain N, Ouyang J, Goswami M, et al. CRLF2-Positive B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia in Adult Patients: A Single-Institution Experience. *Am J Clin Pathol*. 2017;147(4):357-63.
56. Pastorczak A, Sedek L, Braun M, Madzio J, Sonsala A, Twardoch M, et al. Surface expression of Cytokine Receptor-Like Factor 2 increases risk of relapse in pediatric acute lymphoblastic leukemia patients harboring. *Oncotarget*. 2018;9(40):25971-82.
57. Aldoss I, Kamal MO, Forman SJ, Pullarkat V. Adults with Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia: Considerations for Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in First Complete Remission. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(2):e41-e5.
58. Duque-Afonso J, Feng J, Scherer F, Lin CH, Wong SH, Wang Z, et al. Comparative genomics reveals multistep pathogenesis of E2A-PBX1 acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 2015;125(9):3667-80.
59. Vesely C, Frech C, Eckert C, Cario G, Mecklenbräuker A, Zur Stadt U, et al. Genomic and transcriptional landscape of P2RY8-CRLF2-positive childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1491-501.
60. Russell LJ, Enshaei A, Jones L, Erhorn A, Masic D, Bentley H, et al. IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. *J Clin Oncol*. 2014;32(14):1453-62.

61. X KPaZ. FusionGDB: Fusion Gene annotation DataBase 2018 [Available from: <https://ccsm.uth.edu/FusionGDB/index.html>].
62. Jeffries SJ, Jones L, Harrison CJ, Russell LJ. IGH@ translocations co-exist with other primary rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2014;99(8):1334-42.
63. Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, et al. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature*. 2008;453(7191):110-4.
64. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 2009;360(5):470-80.
65. Dupuis A, Gaub MP, Legrain M, Drenou B, Mauvieux L, Lutz P, et al. Biclonal and biallelic deletions occur in 20% of B-ALL cases with IKZF1 mutations. *Leukemia*. 2013;27(2):503-7.
66. Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, Drunat S, Soulier J, Gandemer V, et al. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2013;98(4):597-601.
67. Gupta SK, Bakhshi S, Kumar L, Seth R, Kumar R. IKZF1 (IKAROS) deletions in B-ALL and its clinical correlation: A prospective study from a tertiary care centre in Northern India. *Leuk Res*. 2016;41:7-11.
68. Reyes-León A, Juárez-Velázquez R, Medrano-Hernández A, Cuenca-Roldán T, Salas-Labadía C, Del Pilar Navarrete-Meneses M, et al. Expression of Ik6 and Ik8 Isoforms and Their Association with Relapse and Death in Mexican Children with Acute Lymphoblastic Leukemia. *PLoS One*. 2015;10(7):e0130756.
69. Churchman ML, Low J, Qu C, Paietta EM, Kasper LH, Chang Y, et al. Efficacy of Retinoids in IKZF1-Mutated BCR-ABL1 Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. 2015;28(3):343-56.
70. Reshmi SC, Harvey RC, Roberts KG, Stonerock E, Smith A, Jenkins H, et al. Targetable kinase gene fusions in high-risk B-ALL: a study from the Children's Oncology Group. *Blood*. 2017;129(25):3352-61.
71. Boer JM, Marchante JR, Evans WE, Horstmann MA, Escherich G, Pieters R, et al. BCR-ABL1-like cases in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a comparison between DCOG/Erasmus MC and COG/St. Jude signatures. *Haematologica*. 2015;100(9):e354-7.
72. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet*. 2014;46(5):444-50.
73. Roberts KG, Janke LJ, Zhao Y, Seth A, Ma J, Finkelstein D, et al. ETV6-NTRK3 induces aggressive acute lymphoblastic leukemia highly sensitive to selective TRK inhibition. *Blood*. 2018;132(8):861-5.
74. Lilljebjörn H, Fioretos T. New oncogenic subtypes in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2017;130(12):1395-401
75. Loh ML, Zhang J, Harvey RC, Roberts K, Payne-Turner D, Kang H, et al. Tyrosine kinome sequencing of pediatric acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group TARGET Project. *Blood*. 2013;121(3):485-8.
76. Boer JM, Koenders JE, van der Holt B, Exalto C, Sanders MA, Cornelissen JJ, et al. Expression profiling of adult acute lymphoblastic leukemia identifies a BCR-ABL1-like subgroup characterized by high non-response and relapse rates. *Haematologica*. 2015;100(7):e261-4.
77. Tasian SK, Hurtz C, Wertheim GB, Bailey NG, Lim MS, Harvey RC, et al. High incidence of Philadelphia chromosome-like acute lymphoblastic leukemia in older adults with B-ALL. *Leukemia*. 2017;31(4):981-4.
78. Jain N, Roberts KG, Jabbour E, Patel K, Eterovic AK, Chen K, et al. Ph-like acute lymphoblastic leukemia: a high-risk subtype in adults. *Blood*. 2017;129(5):572-81.
79. Roberts KG, Gu Z, Payne-Turner D, McCastlain K, Harvey RC, Chen IM, et al. High Frequency and Poor Outcome of Philadelphia Chromosome-Like Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults. *J Clin Oncol*. 2017;35(4):394-401.
80. Pérez-Vera P, Montero-Ruiz O, Frías S, Ulloa-Avilés V, Cárdenas-Cardós R, Paredes-Aguilera R, et al. Detection of ETV6 and RUNX1 gene rearrangements using fluorescence in situ hybridization in Mexican patients with acute lymphoblastic leukemia: experience at a single institution. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;162(2):140-5.

12. ANEXOS

Anexo 1. Información complementaria de introducción

Tabla 1 . Incidencia de cáncer pediátrico en 2015 dentro del programa del Seguro Popular

Diagnóstico	Casos n (%)	Incidencia/millón
Leucemia	2038 (59.4)	89.5
Linfomas	242 (7.0)	10.6
Neoplasias intracraneales	235 (6.8)	10.3
Tumor de células germinales	177 (5.2)	7.7
Osteosarcoma	140 (4.1)	4.2
Sarcoma de tejidos blandos	96 (2.8)	6.1
Retinoblastoma	121 (3.5)	5.3
Tumores renales	77 (2.2)	3.3
Neoplasias reticulares	100 (2.9)	4.3
Neuroblastomas	41 (1.2)	2.8
Tumores hepáticos	65 (1.9)	1.8
Tumor de Erwing y sarcomas de hueso	33 (1.0)	1.4
Otros tumores sólidos	68 (2.0)	2.9
Total de casos	3,433	150.1

Tabla 2. Alteraciones genéticas y vías de señalización involucradas en el subtipo Ph-like

Gen	Número de parejas génicas	Tipo de alteración	Vía de señalización	Potencial inhibidor de tirosina cinasa
<i>CRLF2</i>	3	Yuxtaposición /sobreexpresión	Jak-Stat	ruxolitinib
<i>JAK2</i>	20	Gen quimérico		
<i>EPOR</i>	4	Yuxtaposición-sobreexpresión de proteína trunca.		
<i>TYK2</i>	3	Gen quimérico		
<i>ILR2B</i>	1			
<i>JAK1</i>	0	Mutación puntual		
<i>JAK3</i>	0			
<i>IL7R</i>	0	Mutación Indel		
<i>SH2B3</i>	0	Deleción focal		
<i>ABL1</i>	12	Gen quimérico	Abl	imatinib dasatinib
<i>ABL2</i>	3			
<i>CSF1R</i>	3			
<i>LYN</i>	2			
<i>PDGFR A</i>	1			
<i>PDGFR B</i>	7			
<i>KRAS</i>	0	Mutación puntual	Ras	Inhibidores de MEK
<i>NRAS</i>	0			
<i>PTPN11</i>	0			
<i>BRAF</i>	0			
<i>NF1</i>	0			
<i>NTRK3</i>	1	Gen quimérico	Otras	Inhibidores de TRK
<i>FLT3</i>	1			Inhibidores de FLT3
<i>FGFR1</i>	1			Inhibidores de FGFR1
<i>BLNK</i>	1			Inhibidores de BLNK

Tomado y Modificado de Tasian *et al.*, (2017) ⁽²⁶⁾.

Anexo 2. Información complementaria de las metodologías

2.1. Aislamiento de células mononucleares.

Para cada muestra se realizó el siguiente proceso en condiciones de esterilidad:

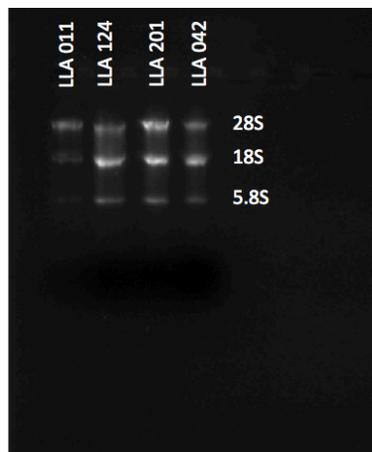
- 1) Se transfirió el aspirado de médula ósea (A.M.O) a un tubo estéril de 15mL.
- 2) Se agregó un volumen 1:1 de PBS estéril (Gibco, Grand Island, New York) al A.M.O y se homogenizó.
- 3) Para separar las células mononucleares (C.M.N) por gradiente de densidad a la muestra diluida se le añadió un volumen de Lymphoprep (Axis-Shield Poc AS, Oslo, Norway) a temperatura ambiente, evitando mezclar o generar burbujas.
- 4) Posteriormente se centrifugó a 1 500 rpm por 30 min.
- 5) Con una pipeta Pasteur se tomó el halo de C.M.N y se colocó en un nuevo tubo estéril de 15 mL, para lavar las células se agregó PBS estéril hasta obtener un volumen final de 10 mL.
- 6) Se centrifugó a 1 500 rpm por 10 min y se retiró el sobrenadante.
- 7) Se hicieron 2 lavados adicionales con PBS estéril.
- 8) Para cuantificar las células, previo al último lavado se tomaron 10 μ L de la suspensión celular y se mezclaron con 10 μ L de azul tripano (Gibco, Grand Island, New York) Si la muestra tenía eritrocitos se utilizó azul de metileno (Gibco, Grand Island, New York) (en caso de que el botón de C.M.N fuera de color rojo).
- 9) Se colocaron 10 μ L de la mezcla a cada lado de un hemocitómetro y se cuantificaron las C.M.N usando la siguiente fórmula:
Numero de C.M.N: (número de células / 4 cuadrantes) x 10 x 2 x 10,000.
- 10) Posteriormente se distribuyeron las células en alícuotas de buffer RLT (Quiagen,Hilden,Germany) PBS (Gibco, Grand Island, New York) y DMSO (Gibco, Grand Island, New York) para la obtención de RNA, DNA y células viables respectivamente.

2.2 Protocolo de extracción de RNA

Se utilizó el Kit de extracción RNAeasy Mini (Qiagen, Hilden, Germany). Para cada muestra se procedió como se indica a continuación:

- 1) Se homogeneizaron con vórtex, las células resuspendidas en buffer RLT
- 2) Se agregó un volumen de etanol al 70% en proporción 1:1 y se mezcló por pipeteo.
- 3) Se transfirió un volumen de hasta 700 μ L del lisado dentro de una columna *RNAeasy spin column*, la cual contiene una membrana para retener RNA total; la columna se colocó dentro de una camisa. Este punto se repitió hasta agotar el volumen del lisado homogeneizado.

- 4) Se agregaron 700 μL de buffer RW1 dentro de la columna y se centrifugó a 12 000 rpm, por 15 seg. Se desechó el líquido colectado en la camisa.
- 5) Se agregaron 500 μL de buffer RPE y se centrifugó a 12 000 rpm., por 15 segundos. Se desechó el líquido colectado. Se repitió este paso.
- 6) Para eluir el RNA, la columna se transfirió a un tubo de colecta nuevo de 1.5 mL. Se agregaron 40 μL agua libre de RNAsas al centro de la membrana de la columna y se centrifugó a 12 000 rpm durante 1 min.
- 7) La elución de RNA se conservó en congelación (-70°C) hasta su uso.
- 8) Se ocuparon 2 μL de RNA total para la cuantificación mediante espectrofotometría UV/Vis a 260nm en el equipo EPOCH (Biotek, Winooski, EE.UU.).
- 9) La pureza se determinó midiendo el coeficiente de absorbancia 260/280 nm y se consideró adecuado cuando se obtuvieron valores entre 1.8 y 2.
- 10) La integridad del RNA se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium,California, EE.UU.) a 80 volts por 30 min en donde se observaron bandas íntegras correspondientes al RNA ribosomal de 28S,18S y 5.8S (Anexo 2-Figura 1).



Anexo 2-Figura 1: Electroforesis para comprobar la Integridad del RNA

2.3 Síntesis de cDNA

Para cada muestra se procedió como se indica a continuación:

En la mayoría de las muestras se realizó la síntesis de cDNA por duplicado o triplicado. Se llevó a cabo en dos reacciones por separado; Los componentes de la primer fase de la reacción fueron 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA, 0.5 μL de random primers 100 mM y agua libre de RNAsas para obtener un volumen final de 20 μL de mezcla de reacción. Los componentes de la segunda fase de la reacción fueron 1 μL de enzima retro-transcriptasa MMLV-RT (Invitrogen, Carlsbad,USA), 6 μL del buffer 5X (Tris HCl 250 mM (pH 8.3), KCl 375 mM, MgCl_2 15 mM), 2 μL de ditiotreititol DTT 0.1M y 1 μL de desoxinucléotidos trifosfato (dNTP's) 10 mM para un volumen final de 10 μL .

Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Master Cycler (Eppendorf Nexus Gradient). La primera fase de la reacción consistió en una desnaturalización a 72°C por 3 min, inmediatamente se colocó el tubo de reacción a 4°C, posteriormente se inició un ciclo de retro transcripción a 37°C por 60 min y una desnaturalización final a 94°C por 6 min.

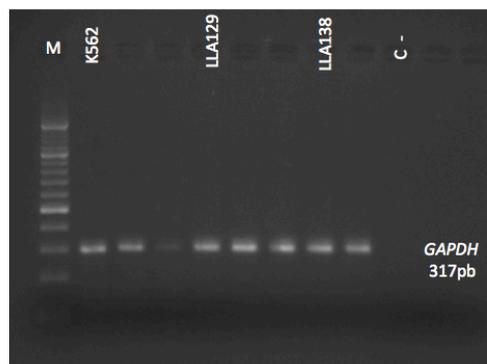
2.3.1 Amplificación de *GAPDH* por RT-PCR

Se verificó la eficacia de cada reacción de síntesis de cDNA, se verificó la eficacia mediante la amplificación del gen de expresión constitutiva *GAPDH*. Esta reacción se llevó al cabo de la siguiente manera:

Para cada reacción se utilizaron 0.1µL de Taq DNA Polimerasa (Invitrogen, Carlsbad,USA), 2.5 µL de Buffer 10X (HCl Tris 200 mM (pH 8.4), KCl 500 mM), 0.75 µL de MgCl₂ 50 mM, 0.5 µL de oligonucleótido sentido (5`-ATCCCATCACCATCTTCCAG-3`) y 0.5 µL de oligonucleótido anti sentido (5`-TGTGGTCATGAGTCCTTCCA-3`), 18.15 µl de agua grado PCR y 2 µl de cDNA para un volumen final de 25 µl. En todas las reacciones se incluyó un control negativo.

Esta reacción se llevó cabo en un termociclador Master Cycler (Eppendorf Nexus Gradient). Las condiciones de amplificación fueron: una desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, después siguieron 28 ciclos de amplificación, cada uno incluyó una desnaturalización a 94°C por 30 seg un alineamiento a 62°C por 30 seg y una elongación a 72°C por 1 min, por último se llevó al cabo una etapa final de elongación a 72°C por 5 min.

El amplicón de ~ 317pb se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Gel red (Biotium,California, EE.UU.) a 100 volts por 60 min (Anexo 2-Figura 2).



Anexo 2-Figura 2: Amplificación del transcrito de *GAPDH*.

2.4 Método de cuantificación relativa $\Delta\Delta Ct$

Los valores de expresión relativa se obtuvieron de la siguiente manera:

Gen blanco (*TSPAN7*, *IGJ*, *SEMA6A*, *PON2*, *BMPR1B* y *CRLF2*).

Gen endógeno (*GUS β*).

Muestra calibradora (cDNA de médula ósea normal).

Ct (ciclo de amplificación en el que se rebasa el umbral de detección).

1) Se obtienen los valores de ΔCt con las siguientes formulas:

ΔCt (muestra): Ct gen blanco- Ct gen endógeno

ΔCt (calibrador): Ct gen blanco- Ct gen endógeno

2) Se obtienen valores de $\Delta\Delta Ct$:

$\Delta\Delta Ct$: ΔCt (muestra)- ΔCt (calibrador)

3) Se calcula el valor de expresión normalizada: $2^{-\Delta\Delta Ct}$

2.5 Detección de la delección *P2RY8-CRLF2* por RT-PCR

Para cada muestra se procedió como se indica a continuación:

En cada reacción se utilizaron 0.1 μL de Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2.5 μL de buffer 10X, 0.75 μL de $MgCl_2$ 50mM, 0.5 μL de dNTP's 10mM, 0.5 μL de oligonucleótido sentido y 0.5 μL de oligonucleótido anti sentido en una concentración de 10mM cada uno, 18.15 μL de agua grado PCR y 2 μL de cDNA para obtener un volumen final de 25 μL . En cada reacción se incluyó un control negativo y un control positivo que consistió en cDNA de una muestra positiva para el rearreglo.

Para el segundo ciclo de amplificación se siguieron las mismas condiciones, excepto que en este caso se tomaron 2 μL del producto de la primera reacción. Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Master Cycler (Eppendorf Nexus Gradient); Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: Un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 2 min, 40 ciclos de amplificación, cada uno incluyó una desnaturalización a 94°C por 30 seg, un alineamiento a 63°C por 30 seg y una amplificación a 72°C por 1 min. Por último se llevó a cabo un ciclo de elongación final a 72°C por 10 min.

El producto de amplificación de ~511pb (Palmi *et al.*, 2012)⁽²⁵⁾ se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Gel red (Biotium, California, EE.UU.) a 72 volts durante 90min.

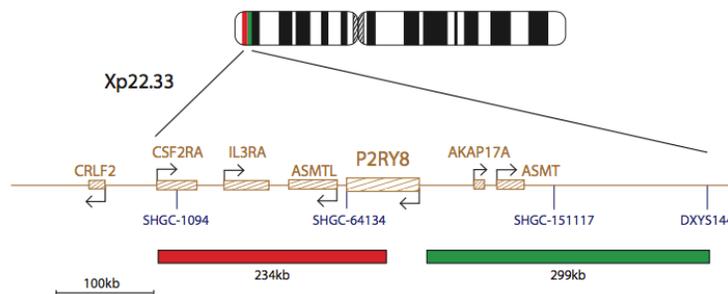
2.5.1 Detección de la deleción *P2RY8-CRLF2* por FISH

Para cada muestra se procedió como se indica a continuación:

Obtención de núcleos para FISH en interfase

1. Se descongeló una alícuota de células de médula ósea criopreservadas en DMSO. Las células se incubaron a 37°C en solución hipotónica de KCl 0.075 M durante 15 min.
2. Después se realizó una prefijación añadiendo lentamente 1 mL de solución de Carnoy (Metanol y Ácido acético en proporción 3:1) fría. Se centrifugó 15 min a 15 000 rpm y se decantó.
3. Se realizaron fijaciones con solución de Carnoy hasta obtener un paquete celular limpio.
4. Se prepararon laminillas por goteo.

FISH con sonda de deleción para la región PAR1 (Cytocell, Cambridge, Inglaterra) (Anexo 2-Figura 3).



Anexo 2-Figura 3. Diagrama de la sonda de deleción para la región PAR1. En rojo se muestra la región involucrada en la deleción que forma el rearrreglo *P2RY8-CRLF2* y en verde la región de hibridación de la sonda control.

1. Se incubó la laminilla en una solución de 2XSSC 37°C por 30 min.
2. Posteriormente se deshidrató en etanol al 70% 85% y 100% por 2 minutos en cada solución.
3. Se dejó secar y se tomaron 10 µL de sonda (que ya contiene la solución de hibridación) y se colocó sobre la región de la laminilla que contiene el material genético de interés.
4. Se realizó co-desnaturalización a 72°C por 2 min en el equipo ThermoBryte (Abbott Molecular, Illinois, EE.UU.).
5. Posteriormente se incubó a 37°C por 72 h.

6. Después se realizó un lavado en una solución de 0.4XSSC a 73°C por 2 min y un segundo lavado en solución 2xSSC/0.05% Tween 20 a temperatura ambiente por 30 seg. Se dejó secar.
7. Se tiñó con 8 µL de DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, C.A EE.UU.) (Solución 1:1 DAPI-Medio de montaje) y se observó en el microscopio de fluorescencia.

2.6 Detección de isoformas dominantes negativas de *IKZF1*

Para cada muestra se procedió como se indica a continuación:

Reacción 1: Se utilizaron 0.2µL de enzima Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2.5 µL de Buffer 10X, 0.75 µL de MgCl₂ 1.5mM, 0.5 µL de dNTP's 200 µM, 0.5 µL de oligonucleótido sentido y 0.5 µL de oligonucleótido antisentido a una concentración de 400µM cada uno, 17.05 µL de agua grado PCR y 2 µL de cDNA para obtener un volumen final de 25 µL.

Reacción 2 (PCR anidada): Se utilizaron 0.2µL de enzima Taq platinum DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA), 2.5 µL de Buffer 10X, 0.75 µL de MgCl₂ 1.5mM, 0.5 µL de dNTP's 200 µM, 0.5 µL de oligonucleótido sentido y 0.5 µL de oligonucleótido anti sentido en una concentración de 400µM cada uno, 18.05 µL de agua grado PCR y 1 µL del producto de la primer reacción para obtener un volumen final de 25 µL. En cada reacción se incluyó un control negativo y un control positivo que consistió en cDNA de una muestra positiva para la isoforma dominante negativa Ik6 que es la más frecuente en pacientes Ph-like.

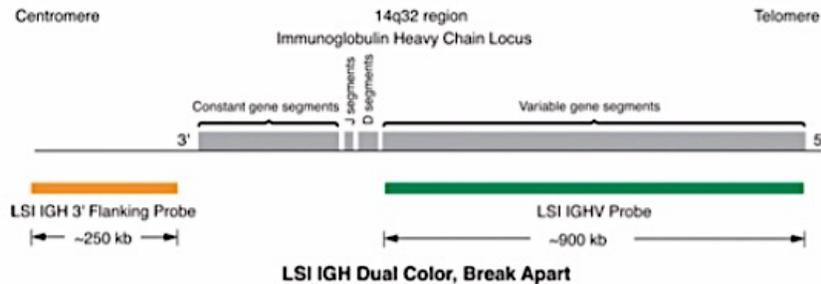
Estas reacciones se llevaron a cabo en un termociclador Master Cycler (Eppendorf Nexus Gradient); Las condiciones de amplificación fueron las siguientes, Reacción 1: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de amplificación, cada uno incluyó una desnaturalización a 95°C por 30 seg, un alineamiento a 57°C por 30 seg y una amplificación a 72°C por 90 seg. Por último se llevó al cabo un ciclo de elongación final a 72°C por 7 min. Reacción 2: Un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, 35 ciclos de amplificación, cada uno incluyó una desnaturalización a 95°C por 30 seg, un alineamiento a 62°C por 30 seg y una amplificación a 72°C por 30 seg. Por último se llevó acabo un ciclo de elongación final a 72°C por 7 min.

Los productos de amplificación se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% a 100V durante 60 min para la reacción 1; y para la reacción 2 se utilizó un gel de agarosa al 3% teñido con Gel red (Biotium, California, EE.UU.) a 74 volts durante 180-210 min.

2.7 Detección de la translocación *IGH-CRLF2*

Se realizó en dos ensayos por separado como se describe a continuación:

- 1) FISH con sonda de segregación para el locus de *IGH* (Vysis Abbott Illinois, EE.UU.) (Anexo 2-Figura 4).

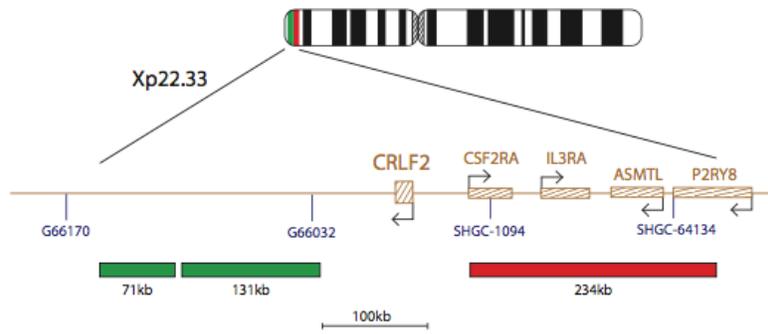


Anexo 2-Figura 4. Diagrama de la sonda LSI *IGH break apart*. La sonda naranja hibrida con la región centromérica del locus de *IGH* y la sonda verde hibrida con la región telomérica.

1. Se incubó la laminilla en una solución de 2XSSC 37°C por 30 min.
2. Posteriormente se deshidrató en etanol al 70% 85% y 100% durante 2 min por en cada solución.
3. Se dejó secar y se preparó una mezcla de 0.5 µL de sonda , 7.5 µL de solución de hibridación y 2.5 µL de agua inyectable. Esta mezcla se colocó sobre la región de la laminilla que contiene el material genético de interés.
4. Se realizó co-desnaturalización a 75°C por 5 min en ThermoBryte (Abbott Molecular, Illinois, EE.UU.).
5. Posteriormente se incubó a 37°C por 72 h.
6. Después se realizó un lavado en una solución de 0.4XSSC/0.3% NP-40 a 73°C por 40 seg y un segundo lavado en solución 2xSSC/0.1% NP-40 a temperatura ambiente por 1 min.
7. Se dejó secar y se realizó una tinción con 8 µL de DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, C.A EE.UU.) (Solución 1:1 DAPI-Medio de montaje). Se observó en el microscopio de fluorescencia.

- 2) FISH con sonda de segregación para el gen *CRLF2* (Cytocell, Cambridge, Inglaterra) (Anexo 2-Figura 5).

Este FISH se llevó Al cabo siguiendo los mismos pasos usados para la detección por FISH de la deleción *P2RY8-CRLF2*, pero utilizando la sonda correspondiente.

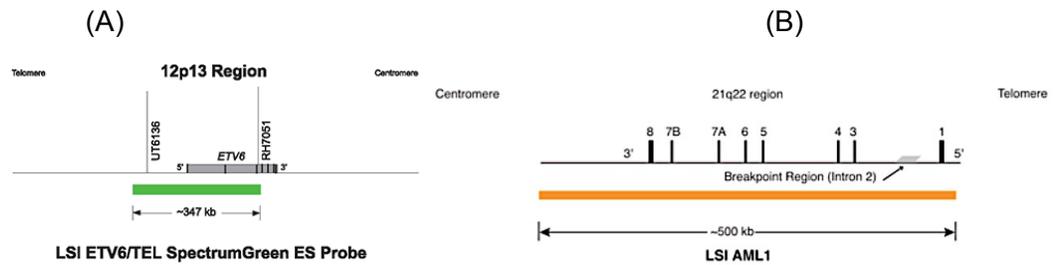


Anexo 2-Figura 5. Diagrama de la sonda *CRLF2 break apart*. La sonda verde hibrida con la región telomérica del *CRLF2* y la sonda roja hibrida con la región centromérica.

2.8 Detección de la amplificación *iAMP21*

Para cada muestra se procedió como se indica a continuación:

Para este FISH Se utilizó la sonda de doble color, doble fusión LSI *ETV6-RUNX1* (Vysis Abbott Illinois, EE.UU.) (Anexo 2-Figura 6).



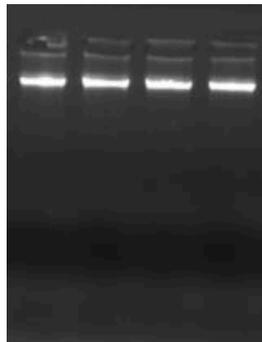
Anexo 2-Figura 6. Diagrama de la sonda LSI *ETV6-RUNX1* o *TEL/AML1*. (A) Sonda en color verde que hibrida en la región 12p13 donde se ubica gen *ETV6* (también conocido como *TEL*) (B) Sonda en color rojo que hibrida en la región 21q22 gen *RUNX1* (también conocido como *AML1*).

Este FISH se llevó al cabo siguiendo los mismos pasos enlistados previamente en el FISH para la detección de la ruptura de *IGH*, pero utilizando la sonda correspondiente.

2.9 Extracción de DNA de células mononucleares

Se utilizó el kit de extracción *DNAeasy Mini Blood&Tissue* (Quiagen, Hilden, Germany). Para cada muestra se procedió como se enlista a continuación:

- 1) Se obtuvieron C.M.N resuspendidas en PBS estéril (Gibco, Grand Island, New York). Se utilizó un máximo de 5×10^6 células/mL.
- 2) Se centrifugaron las células a 190 rpm 5 min y se decantó el sobrenadante.
- 3) Se resuspendieron las células en 200 μ L de PBS y se añadieron 20 μ L de proteinasa K.
- 4) Se añadieron 200 μ L de solución AL . Se mezcló en vórtex y se incubó a 56°C 10 min.
- 5) Se añadieron 200 μ L de etanol al 100% y se mezcló en vórtex.
- 6) Se transfirió a la columna *DNeasy mini spin column*, la cual contiene una membrana para retener RNA total; La columna se colocó en un tubo colector de 2mL y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante (este punto se repitió hasta agotar el volumen del lisado homogeneizado).
- 7) Se colocó la columna en un nuevo tubo colector y se añadieron 500 μ L de solución AW1; Se centrifugó a 8000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante
- 8) Se añadió solución AW2 y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se descartó el sobrenadante
- 9) Para eluir el DNA se transfirió la columna a un nuevo tubo colector y añadieron 200 μ L de solución AE en el centro de la columna. Se incubó a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 8 000 rpm por 1 min.
- 10) La elución de DNA se conservó a 4°C hasta su uso.
- 11) Se ocuparon 2 μ L de DNA para la cuantificación mediante espectrofotometría UV/Vis a 260nm en el equipo EPOCH (Biotek, Winooski, EE.UU.).
- 12) La pureza se determinó midiendo el coeficiente de absorbancia 260/280 nm y 230/260nm se consideraron adecuados cuando se obtuvieron valores entre 1.7 y 1.9.
- 13) La integridad del RNA se analizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con Gel red (Biotium, California, EE.UU.) a 80 volts por 30 min en donde se observaron bandas integras como se muestra en el Anexo 2-Figura 7.



Anexo 2-Figura 7: Electroforesis para comprobar Integridad del DNA

Anexo 3. Tablas complementarias de los resultados.

Tabla 1. Características clínicas de los pacientes con y sin alteraciones en *IKZF1* y *CRLF2*.

Pacientes	Analizados %(n)	<i>IKZF1</i> alterado %(n)	<i>IKZF1</i> normal %(n)
Población total (n: 118)	92% (108/118)	69% (74/108)	31% (34/108)
Sobreexpresión de <i>CRLF2</i> (n:61/118)	90% (55/61)	60% (33/55)	40% (22/55)
No sobreexpresión de <i>CRLF2</i> (n:57/118)	93% (53/57)	77%(41/53)	23% (12/53)
Alteración de <i>CRLF2</i> (n:75/118)	91% (68/75)	65% (45/69)	35% (23/69)
<i>P2RY8-CRLF2</i> (n:36/118)	92% (33/36)	67% (22/33)	33% (11/33)
<i>P2RY8-CRLF2</i> & <i>iAMP21</i> (n:11/36)	91% (10/11)	80% (8/10)	20% (2/0)
<i>IGH-CRLF2</i> (n: 10/118)	90% (9/10)	90% (8/9)	10% (1/9)
<i>G-CRLF2</i> (n: 5/118)	80% (4/5)	50% (2/4)	50% (2/4)
ad-<i>CRLF2</i> (n: 24/118)	92% (22/24)	45% (10/22)	55% (13/22)
<i>P2RY8</i> & <i>IGH</i> negativos (n: 3/118)	100% (3/3)	100% (3/3)	-
Sin alteración de <i>CRLF2</i> (n: 43/118)	91% (39/43)	72%(28/39)	28% (11/39)
FGR negativos (n:98/118)	90%(88/98)	67% (59/88)	33% (29/88)
FGR positivos (n:20/118)	100% (20/20)	70% (14/20)	30% (6/20)

G-*CRLF2*, ganancia de *CRLF2*. ad-*CRLF2*, alteración desconocida de *CRLF2*. FGR, Fusiones génicas recurrentes.

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes con amplificación iAMP21

Características clínicas	Pacientes% (n)
Edad	
<1 ≥10 años	45% (5 de 11)
1-9 años	55% (6 de 11)
DND	-
Género	
Masculino	64% (7 de 11)
Femenino	36% (4 de 11)
DND	-
Cuenta de leucocitos	
≥ 50x10 ⁹ /L	9% (1 de 11)
<50x10 ⁹ /L	91% (10 de 11)
DND	-
Riesgo	
Alto	82% (9 de 11)
Estándar	18% (2 de 11)
DND	-

DND, Dato no disponible.

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes con hiperdiploidía y translocación *IGH-CRLF2*

Características clínicas	Pacientes % (n)
Edad	
<1 ≥10 años	0% (0 de 3)
1-9 años	100% (3 de 3)
DND	-
Género	
Masculino	33% (1 de 3)
Femenino	66% (2 de 3)
DND	-
Cuenta de leucocitos	
≥ 50x10 ⁹ /L	66% (1 de 3)
<50x10 ⁹ /L	33% (2 de 3)
DND	-
Riesgo	
Alto	100% (3 de 3)
Estándar	0% (0 de 0)
DND	-

DND, Dato no disponible.

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes FGR positivos con y sin alteración de *CRLF2*.

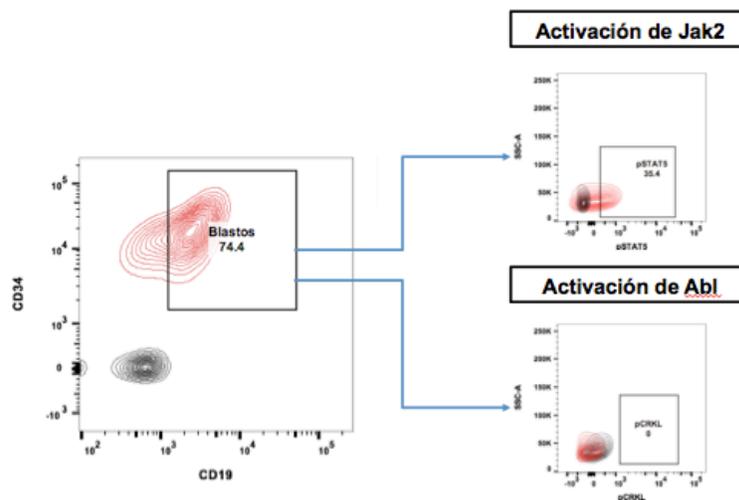
Características clínicas	<i>CRLF2</i> alterado % (n)	<i>CRLF2</i> normal % (n)	Valor <i>p</i>
Edad			
<1 ≥10 años	14% (1 de 7)	25% (3 de 12)	0.7
1-9 años	86% (6 de 7)	75% (9 de 12)	
DND	1 de 8		
Género			
Masculino	63% (5 de 8)	75% (9 de 12)	
Femenino	37% (5 de 8)	25% (3 de 12)	0.09
DND		-	
Cuenta de leucocitos			
≥ 50x10 ⁹ /L	29% (2 de 7)	33% (4 de 12)	
<50x10 ⁹ /L	71% (5 de 7)	67% (8 de 12)	0.6
DND	1 de 8	-	
Riesgo			
Alto	86% (6 de 7)	92% (11 de 12)	0.25
Estándar	14% (1 de 7)	8% (1 de 12)	
DND	1 de 8	-	

Valor de *p* < 0.05 por prueba exacta de Fisher: * valores estadísticamente significativos, Intervalo de confianza: 95%, DND (Dato no disponible)

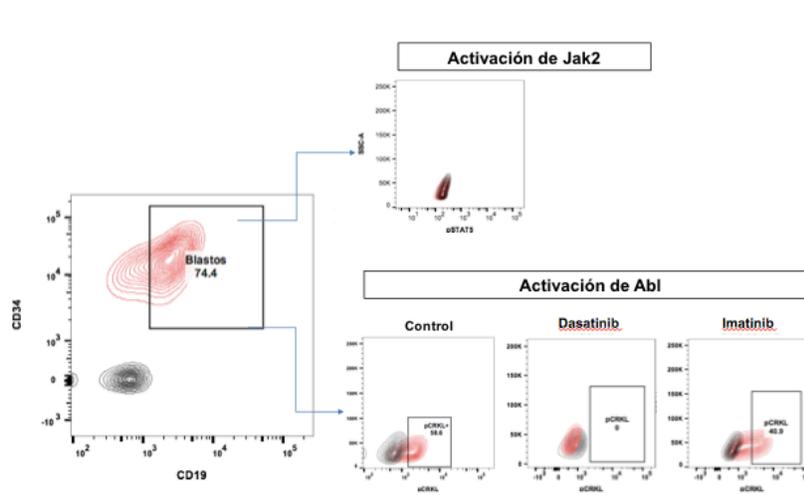
Anexo 4. Información complementaria de discusión.

A continuación se muestran ejemplos representativos de la activación de la señalización de Jak2-Stat5 mediante la cuantificación de los niveles de pStat5 (Anexo 4-Figura 1) y la activación de la señalización de Abl mediante la cuantificación de los niveles de pCrkl (Anexo 4-Figura 2). Esto se obtuvo mediante Citometría de Flujo Phosphlow.

Cabe mencionar que esta información fue obtenida por el equipo de trabajo del laboratorio y únicamente se muestra como información complementaria para la interpretación de los resultados de esta tesis y su discusión.



Anexo 4-Figura 1: Activación de la señalización de Jak2-Stat5 . . Este paciente es positivo a pStat5 lo que demuestra la activación de Jak2-Stat5, pero es negativo a pCrkl, la vía de Abl no está activa.



Anexo 4-Figura 2: Activación de la señalización de Abl . Este paciente es positivo a pCrkl lo que demuestra la activación de la vía de Abl, incluso revierte la fosforilación de Crkl con el inhibidor Dasatinib, pero no con imatinib. También se observa que este paciente es negativo a pStat5 y la vía de Jak2-Stat5 no está activa.