



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ISOFORMAS DEL GEN *IKZF1* PRESENTES EN PACIENTES  
PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA  
DEL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

## Tesis

Para obtener el título de  
**Especialista en Genética Médica**

Presenta:

**Alma María Medrano Hernández**

Tutor: Dra. Patricia Pérez Vera

Co-tutor de tesis: Dra. Adriana Reyes León



México D.F. enero 2013

**I N P**  
CENTRO DE INFORMACION  
Y DOCUMENTACIÓN

**C I D**  
NO CIRCULA

*Victoria del Castillo* Victoria del Castillo

Dra. Victoria del Castillo Ruiz  
Profesor Titular del curso de Especialidad en Genética Médica

*Rosaura Rosas Vargas*

Dra. Rosaura Rosas Vargas  
Directora de Enseñanza del Instituto Nacional de Pediatría

*Luis Martín Garrido García*

Dr. Luis Martín Garrido García  
Jefe del Departamento de Pre y Posgrado del Instituto Nacional de Pediatría

*Patricia Pérez Vera*

Dra. Patricia Pérez Vera  
Tutor de tesis

*Adriana Reyes León*

Dra. Adriana Reyes León  
Co-tutor de tesis



Este trabajo forma parte del proyecto "PREDICCIÓN DE RECAÍDA EN NIÑOS CON LEUCEMIA AGUDA LINFOBLÁSTICA UTILIZANDO LA EXPRESIÓN DEL GEN CASP8AP2 ASOCIADO A LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL" fue financiado con recursos del CONACYT (proyecto. Salud 2006-44402, registro en el Instituto Nacional de Pediatría 06/056)

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por haberme permitido culminar con la residencia en Genética Médica; a mi esposo José Luis por su amor y apoyo incondicional en todo momento; a mis padres (Miguel Ángel Medrano García y Rosa Alejandra Hernández Espejel) por su ejemplo diario de trabajo arduo, responsabilidad, pasión por lo que hacen, por su amor incondicional, vivir los buenos y malos momentos junto conmigo; a mi hermano por su presencia y buen ánimo; a mis maestros dentro y fuera del Instituto Nacional de Pediatría, por su ejemplo, tiempo y tolerancia; a mis tutoras de tesis por su tolerancia, paciencia y comprensión; a mis compañeros y amigos David, Rosa, Vianney, Liliana, Ximena que han estado conmigo en los buenos y malos momentos; a los pacientes y sus familias que aceptaron participar en esta investigación, y a aquellos pacientes con los que tuve la oportunidad de convivir en alguna consulta o interconsulta como médico residente de ésta institución.

## ÍNDICE

Tema	Página
1. Introducción	
1.1 Leucemia Aguda Linfoblástica (LAL)	6
1.1.1 Definición	6
1.1.2 Epidemiología	6
1.1.3 Etiología	7
1.1.4 Manifestaciones clínicas	10
1.1.5 Laboratorio y gabinete	11
1.1.6 Clasificación	12
1.1.7 Supervivencia	16
1.2 Ikaros	
1.2.1 Gen <i>IKZF1</i> y proteína Ikaros	16
1.2.2 Función de Ikaros	17
1.2.3 Ikaros y LAL	19
2. Justificación	20
3. Planteamiento del problema	21
4. Pregunta de investigación	22
5. Hipótesis	22
6. Objetivos	22
7. Material y métodos	
7.1 Población de estudio	23
7.2 Captura de datos clínicos y paraclínicos	23
7.3 Obtención de la muestra	23
7.3.1 Extracción del RNA total	24
7.3.2 Síntesis del Cdna	25
7.4 PCR para <i>IKZF1</i> y <i>ABL1</i>	26
7.5 PCR anidado para <i>IKZF1</i>	27
7.6 Análisis de resultados	29
8. Resultados	29
9. Discusión	35
10. Conclusiones	38
11. Bibliografía	39

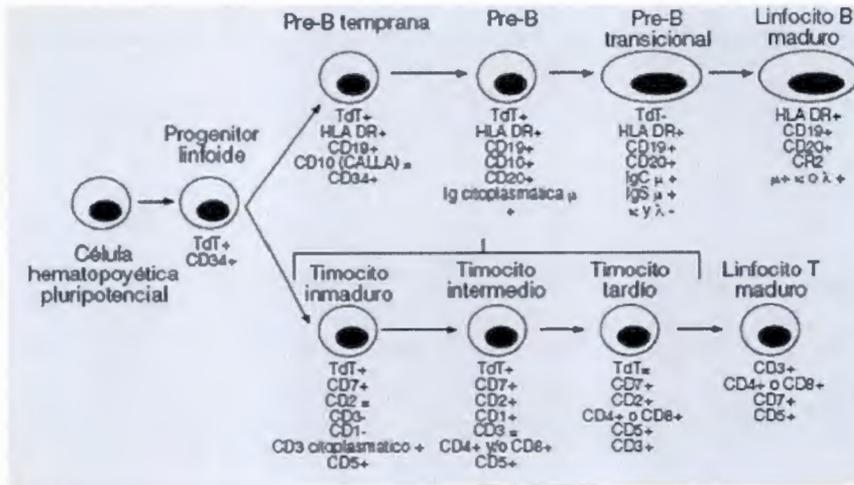
# 1. Introducción

## 1.1 Leucemia aguda linfoblástica (LAL)

### 1.1.1 Definición

La leucemia aguda linfoblástica (LAL) es una enfermedad maligna caracterizada por la proliferación clonal anormal de las células linfoides inmaduras<sup>1</sup>, la cual tiene su origen en cualquiera de los niveles de diferenciación de la estirpe linfóide. Puede involucrar a estadios inmaduros de los linfocitos B o T; desde la etapa pre B temprana, la más indiferenciada, hasta la B madura también conocida como tipo Burkitt<sup>2</sup>.

En la figura 1 se esquematiza el proceso de diferenciación linfóide junto con el inmunofenotipo característico de cada una de las etapas<sup>2</sup>.



**Figura 1.** Proceso de diferenciación de las células de la estirpe linfóide. Obtenida de Lassaletta A<sup>2</sup>.

### 1.1.2 Epidemiología

A nivel mundial, la LAL constituye el 25% de todos los tipos de neoplasias y el 75% de las leucemias diagnosticadas en menores de 6 años.

Del 80 al 85% de los casos muestran inmunofenotipo precursor de células B (pre-B) y del 15 al 20% son de células T. En Estados Unidos de Norteamérica se refiere que en niños y adolescentes hispanos, la LAL tiene una prevalencia de 5.8 casos por cada 100,000 habitantes, lo que la convierte en la neoplasia más frecuente en este grupo etario<sup>3</sup>. En la ciudad de México la LAL en menores de 15 años representa el 40% de todas las neoplasias, mientras que en otros países constituyen entre 30 y 34% de los casos<sup>4</sup>. La incidencia máxima se ubica entre los dos y los cinco años de edad. En cuanto al sexo, predomina ligeramente en varones, sobre todo en la pubertad<sup>4</sup>.

Existen diferencias geográficas ya que, en países en vías de desarrollo como los del Norte de África y Oriente Medio predomina la LAL-T, en comparación con los países industrializados en los que predomina la LAL-B<sup>2</sup>. En países con poblaciones heterogéneas, es decir aquellos con altas tasas de migración, se ha observado una mayor incidencia de LAL en la raza blanca<sup>2</sup>.

### **1.1.3 Etiología**

Se ha descrito que la LAL se origina por la acumulación de alteraciones genéticas que ocurren en el precursor linfoide. Es una enfermedad multifactorial, en donde se involucra al ambiente y a diversos genes implicados en distintos procesos celulares como señalización intra y extracelular, diferenciación y apoptosis. La interacción entre el ambiente y el DNA favorece la formación de translocaciones y mutaciones que, al no ser adecuadamente reparadas, llevan a la apoptosis o permiten la acumulación de mutaciones (fenotipo mutador) que es la base para la transformación leucémica<sup>5</sup>.

Los factores ambientales se han estudiado ampliamente y, aunque los resultados de diversos estudios han sido contradictorios, aquellos que muestran fuertes evidencias de esta asociación se refieren a continuación<sup>1</sup>:

**A) Radiaciones ionizantes:** El aumento de incidencia de leucemia entre los supervivientes de Hiroshima y Nagasaki demostró que existe una asociación entre la exposición a este agente físico y el desarrollo de la enfermedad<sup>2</sup>. En 1990, se documentó que los hijos de trabajadores de una planta nuclear tuvieron mayor riesgo de presentar leucemia y linfoma por la exposición a la radiación preconcepcional de las células germinales paternas<sup>1</sup>. Con base en este hallazgo surgió la hipótesis de Gardner, que asocia radiación de células germinales paternas con mayor riesgo de desarrollar leucemia y linfoma en la descendencia<sup>1,6</sup>; No obstante, otros estudios controvierten estos hallazgos<sup>7,8</sup>. El desarrollo de esta enfermedad también se ha asociado con la exposición a la radiación ionizante con fines diagnósticos, por lo que se sugiere que el 1% de las leucemias en el adulto son secundarias a pruebas radiológicas realizadas durante la vida<sup>1</sup>.

**B) Campos eléctricos y magnéticos:** Se ha reportado que los campos electromagnéticos (teléfonos móviles, torres de alta tensión, etc.) podrían causar el 3% de las leucemias, sin embargo, los resultados de diversos estudios han sido contradictorios y hasta el momento no se ha documentado una clara asociación<sup>9,10,11</sup>.

**C) Inhibidores de la DNA topoisomerasa II:** Se encuentran en la dieta diaria como flavonoides (rutina y quercetina) y en medicamentos como el iriotecan y el etopósido<sup>12</sup>. Las topoisomerasas II son enzimas que modifican transitoriamente la topología del DNA para permitir la replicación, transcripción,

recombinación y reparación. Su función consiste en realizar rupturas y realineamiento de doble cadena transitorias<sup>13</sup>. Se sugiere que si durante alguno de estos procesos la célula se expone a los inhibidores mencionados, la capacidad de la enzima para unir la cadena de DNA cortada es interrumpida. Esta situación genera la acumulación de rupturas de doble cadena que conllevan a la muerte celular o pueden promover alteraciones en la recombinación no homóloga del DNA, favoreciendo la formación de translocaciones, en especial involucrando a la banda 11q23 y consecuentemente al gen *MLL*. Estos rearrreglos resultan en la génesis de proteínas quiméricas que interrumpen la hematopoyesis causando así la leucemia<sup>14</sup>. En estudios de casos y controles, se ha reportado una asociación positiva entre el consumo de alimentos que contienen inhibidores de la topoisomerasa II y la presencia de leucemia aguda mieloide<sup>14</sup>.

**D) Agentes infecciosos:** Se ha sugerido que los virus juegan un papel importante en el desarrollo de las leucemias, debido a que la mayoría de las LAL se producen en un periodo de la vida en el cual el sistema inmune está en desarrollo y podría ser más susceptible a los efectos oncogénicos de los agentes virales. Sin embargo, hasta ahora sólo se ha reportado una asociación entre el desarrollo de linfoma de Burkitt y la presencia del virus de Epstein-Barr así como la presencia del virus HTLV I y II con la leucemia de células T<sup>2</sup>.

En cuanto a los factores genéticos, existen síndromes con una clara predisposición a desarrollar la LAL; en general todos estos factores están relacionados con alteraciones en la reparación del DNA o con algún grado de inmunodeficiencia<sup>15</sup>. Los síndromes asociados con inestabilidad cromosómica

como la anemia de Fanconi y la ataxia-telangiectasia, se asocian con un mayor riesgo de desarrollar leucemia o neoplasias sólidas. En el caso de la anemia de Fanconi se incrementa el riesgo de mielodisplasia, leucemia aguda mieloide y carcinomas escamosos de cabeza y cuello. Los pacientes con ataxia telangiectasia tienen un riesgo del 10 al 30% de desarrollar algún tipo de neoplasia, en especial linfomas y leucemias<sup>16</sup>. Los pacientes con síndrome de Down representan un grupo con alta predisposición genética para el desarrollo de leucemia, ya que tienen de 10 a 20 veces mayor riesgo de padecer esta enfermedad con respecto a la población en general; la LAL ocurre en el 2% de los pacientes y la leucemia aguda no linfoblástica tipo M7 se refiere hasta en el 50% de los casos. Cabe señalar que hasta el momento no se ha identificado un gen único implicado en la génesis de estas neoplasias<sup>1,16,17</sup>.

#### **1.1.4 Manifestaciones clínicas**

La presentación clínica refleja sustitución de los elementos celulares normales de la médula ósea por blastos leucémicos, así como la infiltración extramedular de la enfermedad. Los síntomas más frecuentes al diagnóstico son aquellos relacionados con la insuficiencia medular, como anemia (palidez, astenia), trombocitopenia (equimosis, petequias) y neutropenia (fiebre). Raras veces los pacientes cursan con pancitopenia severa, en esos casos se debe descartar aplasia de médula ósea. El 65% de los pacientes con LAL tienen algún grado de hepatoesplenomegalia, que suele ser asintomática. La duración de los síntomas puede ser del orden de días e incluso meses previos a realizar el diagnóstico definitivo. La anorexia es frecuente, pero sin pérdida significativa

de peso. Hasta el 25% de los pacientes presentan dolor óseo e incluso artralgiás como consecuencia de la infiltración de la médula ósea<sup>2</sup>.

La presentación clínica de las LAL de estirpe T posee rasgos característicos, ya que los pacientes son generalmente adultos, no es raro que debuten con un aumento de volumen a nivel del mediastino dado el origen tímico de los blastos, y tienen una mayor incidencia de afectación del sistema nervioso central al diagnóstico<sup>2,18</sup>.

### **1.1.5 Laboratorio y gabinete**

En el 50% de los pacientes la biometría hemática revela leucocitosis a expensas de linfocitos, que morfológicamente correlacionan con linfoblastos; se documenta anemia en el 80% de los casos y trombocitopenia en el 75%<sup>2</sup>.

El diagnóstico definitivo de una leucemia aguda siempre se realiza mediante el análisis morfológico de la médula ósea. La presencia de al menos un 25% de blastos en este tejido confirmará el diagnóstico<sup>2</sup>.

El subtipo de LAL se define determinando el inmunofenotipo y es indispensable realizar estudios de citogenética convencional y moleculares para complementar el resultado del diagnóstico<sup>2,18</sup>. Para evaluar la extensión de la enfermedad se debe de realizar punción lumbar para descartar afectación del sistema nervioso central, así como una radiografía de tórax para evaluar extensión mediastinal<sup>2,18,19</sup>.

Otros estudios que se realizan al diagnóstico son: ecografía abdominal, valoración cardiológica completa (previo al tratamiento ya que incluye fármacos cardiotóxicos), bioquímica sanguínea (incluyendo ácido úrico, calcio, fósforo,

transaminasas), estudio de coagulación, serologías (hepatitis viral, VIH, herpes, citomegalovirus) e inmunoglobulinas<sup>2,19</sup>.

Cuando el paciente presenta fiebre, es necesario realizar análisis microbiológicos de sangre, orina y de cualquier lesión sospechosa e iniciar el tratamiento adecuado con antibióticos<sup>2,19</sup>.

### 1.1.6 Clasificación

Existen distintas formas de clasificar a la LAL, sin embargo, las que se utilizan en la actualidad se basan en el estadio de maduración de los blastos y en los componentes genéticos que confieren implicaciones pronósticas<sup>2</sup>.

**A) Morfológica:** Fue realizada por el grupo de trabajo Francés-Americano-Británico (FAB), es de aceptación universal, aunque en la actualidad se utiliza poco. Todas las leucemias derivadas de precursor B o T pertenecen a FAB L1 o L2, mientras que FAB L3 involucra a la leucemia de tipo Burkitt o LAL de células B maduras<sup>2,18</sup>.

**B) Inmunológica:** Se basa en el estadio de maduración de los linfoblastos utilizando marcadores citoplasmáticos y de superficie que confieren un inmunofenotipo celular específico. En la actualidad es la más utilizada y tiene implicaciones pronósticas y para el tratamiento. De acuerdo a esta clasificación, las LAL se dividen en tres grupos: Linaje B temprano que corresponde del 70 al 80%; linaje B maduro, equivale a menos del 5% y linaje T que abarca del 10 al 15% de las LAL<sup>19</sup>. Las frecuencias de cada tipo de LAL son distintas dependiendo de la edad (Tabla 1).

**Tabla 1.** Clasificación inmunológica de las LAL<sup>19</sup>.

Subtipo	Marcadores característicos	Frecuencia	
		Niños (%)	Adultos (%)
<b>Estirpe de células B</b>	CD19+, CD22+, CD79a+, clg+, slg $\square$ +, HLA-DR+	80-85	
Pre pre B	CD10-	5	11
Pre B temprano	CD10+	63	52
Pre B	CD10+/-, clg+	16	9
Células B Maduras	CD19+, CD22+, CD79a+, clg+, slg $\square$ +, slg $\square$ + o slg $\square$ +	3	4
<b>Estirpe de células T</b>	CD7+, cCD3+	15	
Pre T	CD2-, CD1-, CD4-, CD8-, HLA-DR+, TdT+	1	6
Células T maduras	CD2+, CD1+/-, CD4+/-, CD8+/-, HLA-DR-, TdT+/-	12	18

clg = Inmunoglobulinas citoplasmáticas; slg = Inmunoglobulinas de superficie; cCD3 = CD3 citoplasmático

**C) Genética:** La aportación de la citogenética y de la biología molecular a la clasificación de las LAL va en relación a la presencia de translocaciones, inversiones, deleciones y alteraciones en la ploidía celular. Estas alteraciones son clave en la génesis de la enfermedad, sin embargo, se requiere de otros cambios genéticos dado que su única presencia no es suficiente para la transformación neoplásica<sup>20</sup>. Mediante estudios de citogenética convencional se ha determinado que al menos dos tercios de los pacientes con LAL tienen alteraciones cromosómicas estructurales; las alteraciones numéricas también se encuentran presentes, aunque en menor medida (hiperdiploidia en el 30% e hipodiploidia en el 10%<sup>21</sup>). Las alteraciones estructurales pueden generar fusiones génicas que modifican las funciones originales de los genes implicados<sup>22</sup>. Actualmente existe la teoría de que las alteraciones submicroscópicas, es decir menores de 3 Mb, también son requeridas para la transformación neoplásica<sup>20</sup>. Las translocaciones más importantes que se presentan en LAL-B son t(12;21)(p13;q22), t(1;19)(q23;p13), t(9;22)(q34;q11) y t(4;11)(q21;p23), cada una con frecuencia distinta y valor pronóstico específico

(Tabla 2). En el caso de las LAL-T, se involucran genes que codifican para los receptores de células T ubicados en los cromosomas 7 y 14<sup>20</sup>.

**Tabla 2.** Características clínicas y biológicas de las principales translocaciones que se presentan en LAL- B<sup>2,19,20,21,22</sup>.

Translocación	Frecuencia (%)	Genes involucrados	Características	Pronóstico
t(12;21)(p13;q22)	25	<i>TEL-AML1</i>	LAL Pre B	Bueno
t(1;19)(q23;p13)	5-6	<i>E2A-PBX1</i>	Leucocitosis Afección SNC* Tratamiento intensivo	Regular a malo (Supervivencia): A) Niños: 70-80% (5 años) B) Adultos: 20-40% (3 años)
t(9;22)(q34;q11)	3-5	<i>BCR-ABL1</i>	Cromosoma Filadelfia LAL pre B Leucocitosis	Malo (Supervivencia): A) Niños: 20-40% (5 años) B) Adultos: <10% (3 años)
t(4;11)(q21;p23)	2	<i>MLL-AF4</i>	Leucocitosis Afección SNC* Niños <1 año y >10 años; adultos	Malo (Supervivencia): A) Niños: 10-35% (5 años) B) Adultos: 10-20%(3 años)

\*SNC = Sistema nervioso central.

Con los resultados de diversos estudios clínicos fue posible clasificar a los pacientes en cuanto al pronóstico<sup>21,23</sup>. Las características de cada uno de estos grupos se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Clasificación de los pacientes con LAL de acuerdo al pronóstico<sup>15,21</sup>.

Factor	Favorable	No favorable
Citogenética	Hiperdiploidía	t(9;22)
	t(12;21)	t(4;11)
		t(8;14)
		t(8;22)
Edad al diagnóstico	1 a 9 años	<1 o >10 años
Leucocitos sanguíneos	<50,000/mm <sup>3</sup>	>50,000/mm <sup>3</sup>
Morfología	L1	L3
	L2	
Inmunofenotipo	Células B diferenciadas	Precursores B poco diferenciados
	Antígeno mielóide negativo	Antígeno mielóide positivo

Recientemente, a través de la aplicación de nuevas metodologías como el análisis ampliado del genoma, se han identificado copias de número variable o pérdida de heterocigocidad en genes relacionados con la génesis de la leucemia<sup>20</sup>. Su aplicación ha permitido identificar nuevas moléculas que esclarecen la biología de la enfermedad, posibles blancos terapéuticos o biomarcadores. En particular, se han detectado alteraciones en la expresión de genes implicados en la diferenciación linfoide (*PAX5*, *IKZF1*, *EBF1*, *VPREB1*), en la regulación del ciclo celular (*CDKN2A/2B*, *PTEN*, *RB1*), en la señalización linfoide (*BTLA*, *CD200*) y en la respuesta a fármacos (*NR3C1*)<sup>20</sup>. Adicionalmente, se ha determinado que algunas de estas alteraciones también están asociadas con el pronóstico del paciente. Por ejemplo, algunas isoformas de *IKZF1* conllevan un mal pronóstico independientemente de la aplicación de los parámetros mencionados en la Tabla 3<sup>15,21,24</sup>. En la Tabla 4 se resumen las principales características de los genes asociados con LAL-B detectados mediante estas tecnologías.

**Tabla 4.** Principales genes relacionados con LAL-B.

Gen	Alteraciones	Frecuencia	Función/Vía	Relevancia clínica
<i>PAX5</i> <sup>25</sup>	M,D,T	31.5%	Regulador de la diferenciación de linfocitos B. Controla la transcripción al reclutar proteínas remodeladoras de cromatina, modificadoras de histonas y factores de transcripción <sup>26</sup> .	No relacionado con el pronóstico <sup>27</sup>
<i>IKZF1</i> <sup>25</sup>	M,D	15%	Factor de transcripción requerido en la diferenciación hacia precursor linfoide <sup>15,20,21,24</sup> .	Mal pronóstico <sup>20,28</sup>
		80% de <i>BCR-ABL1</i> +		
		66% de fase blástica de LGC		
		33% LAL alto riesgo <i>BCR-ABL1</i> + Raramente con <i>ETV6-RUNX1</i> +		
<i>JAK1/2</i> <sup>25</sup>	M	15-35% LALSD	Cinasa activadora de la vía JAK-STAT <sup>20</sup> .	Mal pronóstico <sup>29</sup>
<i>CRLF2</i> <sup>25</sup>	T	5-16% LAL	Receptor del factor similar a la citosina 2, frecuentemente se acompaña de mutaciones en <i>IKZF1</i> , <i>JAK1</i> , <i>JAK2</i> e <i>IL7RA</i> <sup>30</sup> .	Mal pronóstico <sup>30</sup> .
		>50% LALSD		
		14% en LAL de alto riesgo		

M = Mutación; D = Delección; T = Translocación; LGC = Leucemia granulocítica crónica; LALSD = Leucemia aguda linfocítica asociada a síndrome de Down.

### 1.1.7 Supervivencia

La supervivencia libre de enfermedad a 5 años en LAL actualmente es superior al 80%<sup>2</sup>, gracias a los tratamientos actuales y a la estratificación de los pacientes basada en los factores con valor pronóstico ya mencionados; sin embargo, se espera que hasta un 20% recurra<sup>2</sup>.

Es por ello que diversos grupos de investigación se han dado a la tarea de identificar nuevos marcadores y correlacionarlos con la sobrevida. En este trabajo concentraremos la atención en el factor de transcripción Ikaros, que recientemente se ha propuesto como un marcador con valor en el pronóstico de los pacientes con LAL.

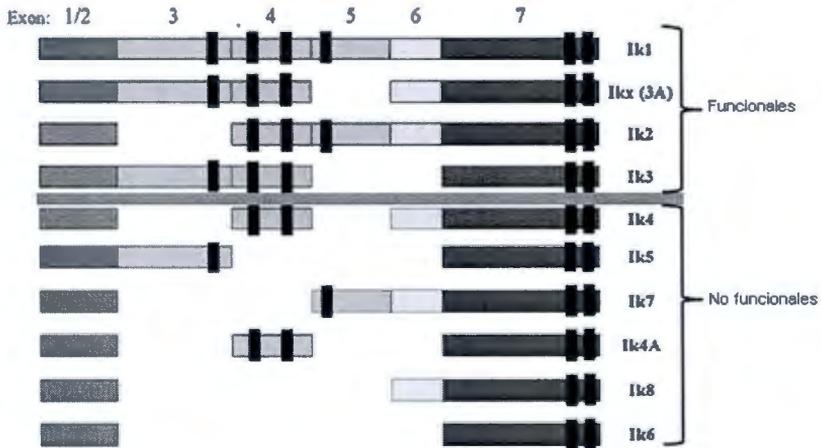
## 1.2. Ikaros

### 1. 2.1 Gen *IKZF1* y proteína Ikaros.

El gen *IKZF1* se localiza en 7p12.2 y consta de 7 exones que por corte y empalme alternativo de intrones, genera 11 isoformas que se modifican a nivel de los exones 3 al 6. En los exones 3, 4, 5 y 7 se localizan los motivos de dedos de zinc; en los tres primeros exones se ubican los motivos de unión al DNA, mientras que en el exón 7 están presentes los implicados en la interacción proteína-proteína que permiten la homodimerización o heterodimerización de Ikaros con proteínas reguladoras de la transcripción (Figura 2)<sup>31,32,33,34</sup>.

El producto proteico de *IKZF1* se denomina Ikaros y pertenece a una super familia de factores de transcripción con motivos de dedos de zinc, la cual está conformada por Ikaros (*IKZF1*), Helios (*IKZF2*), Aiolos (*IKZF3*), Eos (*IKZF4*) y Pegasus (*IKZF5*)<sup>35,36,37,38</sup>. Los dominios de dedos de zinc en Ikaros,

Aiolos, Helios y Eos reconocen la secuencia canónica "GGAAA", mientras que Pegasus reconoce un sitio atípico "GNNNGNNG"<sup>35</sup>.



**Figura 2. Esquema del gen *IKZF1* y las isoformas descritas de Ikaros.** Los dedos de zinc están representados como rectángulos transversales de color negro. Las isoformas capaces de unirse al DNA son aquellas que expresan 3 o más dedos de zinc (Ik-1 a Ik-3), por lo que se consideran como isoformas largas funcionales; las isoformas cortas o no funcionales (Ik-4 a Ik-6), no son capaces de unirse al DNA porque poseen menos de 2 dedos de zinc. Ik-6 e Ik-8 son consideradas como isoformas dominantes negativas, ya que no tienen la capacidad de unirse al DNA y de actuar como factores de transcripción<sup>31,32,33</sup>. Figura obtenida y modificada de Meleshko A., y cols<sup>33</sup>.

### 1.2.2 Función de Ikaros

Ikaros actúa como un factor de transcripción implicado en las etapas tempranas de la linfopoyesis. Es expresado de forma abundante en la célula madre hematopoyética y en los precursores linfoides, eritroides y mieloides, principalmente en mielocitos y metamielocitos. Su presencia confiere plasticidad y potencial de diferenciación a los linfocitos a través de una regulación génica compleja mediante la activación o represión de genes, por lo que se considera un gen supresor de tumores. Dentro de los genes regulados

por la familia Ikaros, están factores de transcripción y de represión con acción en la vía de Notch como Hes1, Deltex1, pTa, Gata3 y Runx1<sup>35,39,40,41</sup>. La vía de señalización de Notch es de suma importancia en la regulación de la proliferación, diferenciación y apoptosis<sup>40</sup>. En el caso de las leucemias, existe activación constitutiva de esta vía que resulta en la proliferación celular excesiva<sup>42</sup>. Ikaros produce modificaciones epigenéticas al promover la formación de heterocromatina a través de su asociación con complejos que contienen desacetilasas de histonas, o por remodelado de nucleosomas (NuRD). El complejo SWI/SNF<sup>31,43</sup> permite el establecimiento de programas de transcripción linfóide en los progenitores tempranos, al activar un conjunto de genes específicos como *Fit3*, *IL7* y *Rag1*; también regula la expresión de la L-selectina, IL-10 y el interferón gamma en las células T<sup>35,39,40,41</sup>.

En embriones de ratón, Ikaros se expresa inicialmente en la esplancopleura en un número limitado de precursores mesodérmicos que posiblemente darán lugar a los precursores hematopoyéticos, al mismo tiempo permite la autorrenovación de células progenitoras. También se ha observado que las isoformas Ik-1 e Ik-2 son las más expresadas durante el desarrollo hematopoyético murino. Sin embargo, la expresión de Ikaros disminuye a lo largo de la diferenciación de todas las líneas excepto la granulocítica. En la etapa adulta de los ratones, su expresión se restringe a tejidos linfoides que incluye el bazo y el timo, así como leucocitos de sangre periférica<sup>31,32,35,39</sup>.

Se ha demostrado que la presencia de los SNPs rs4132601(G) o rs10272724(C) en el *IKZF1* son factores protectores para el desarrollo de diabetes mellitus<sup>144</sup>, lo que demuestra que el papel que juega Ikaros como factor de transcripción va más allá de su participación en linfopoyesis.

### 1.2.3 Ikaros y LAL

Se refiere que una disminución modesta de la actividad de Ikaros es suficiente para contribuir al desarrollo de leucemia<sup>45</sup>, aunque no se ha determinado si la sobre-expresión de isoformas dominantes negativas ocurren como un evento inicial, o bien se presentan en el proceso de transformación<sup>33,46</sup>.

Aproximadamente el 84%<sup>28,47</sup> de los pacientes que son positivos a la fusión génica *BCR-ABL1* tienen deleciones en *IKZF1*; el 28%<sup>45</sup> de todos los pacientes pediátricos con LAL pre B tienen alguna alteración *IKZF1* en estado heterocigoto<sup>28,47,48</sup>. Se han identificado deleciones o mutaciones en este gen, así como la expresión preferencial de isoformas no funcionales<sup>33</sup>. En estudios realizados en pacientes pediátricos con LAL de alto riesgo, se han observado alteraciones en *IKZF1* hasta en el 30% de los casos, lo que incrementa tres veces la falla al tratamiento debido a que se asocia con resistencia a la quimioterapia y recaídas, independientemente de la presencia de la fusión *BCR-ABL1* y de otros factores de mal pronóstico conocidos<sup>20,45,49,50</sup>. Mediante microarreglos de expresión, se determinó que los pacientes con mutaciones en *IKZF1*, sin la presencia de la fusión génica *BCR-ABL1*, presentaron perfiles de expresión similares, por lo que este grupo de pacientes fue clasificado como de alto riesgo de sufrir recaída y se denominó subtipo *BCR-ABL1* "like"<sup>18,19,20,43,45,51,52</sup>.

La expresión de *BCR-ABL1* en pacientes con LAL-B induce alteraciones en la remoción alternativa de intrones en *IKZF1*, y esto provoca la sobreexpresión de Ik-6<sup>50</sup>. En algunos trabajos, se ha documentado que la expresión de Ik-6 es un factor de riesgo independiente para el desarrollo de

leucemia en pacientes pediátricos, debido a que promueve el crecimiento y la supervivencia celular durante el proceso de origen de la leucemia<sup>45,52,53</sup>. Se ha informado que Ik-6 está expresado en niños con LAL-B, LAL-T<sup>32,54</sup>, leucemia aguda mieloide y LGC<sup>55,56</sup>, así como en tumores pituitarios<sup>57</sup>.

Se ha observado sobreexpresión de Ik-4, 6, 7 y 8 en población pediátrica y en adultos con LAL, sin embargo, no existen estudios en población mexicana; por lo que en el presente trabajo, se analizarán las isoformas de *IKZF1* para determinar la frecuencia de Ik-6 e Ik-8, en un grupo de pacientes pediátricos con LAL atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría<sup>32,33</sup>.

## 2. Justificación

La LAL es una enfermedad con alta prevalencia en población pediátrica. A pesar de los avances terapéuticos y de la elevada tasa de remisión, existe un grupo de pacientes que recae, sin presentar factores convencionales clínicos y de laboratorio de alto riesgo. Por lo que, es imprescindible incluir en la estratificación de los pacientes nuevos marcadores moleculares con valor pronóstico.

Los estudios del genoma y transcriptoma en células leucémicas, y su asociación con la presencia de eventos adversos, han revelado que el gen *IKZF1* podría ser un marcador genético para la identificación temprana de pacientes con alto riesgo a sufrir recaída. Por lo que consideramos, que Ikaros debe ser explorado en nuestra población, con la finalidad de determinar su aplicabilidad como factor pronóstico en los pacientes que se atienden en el Instituto Nacional de Pediatría.

Esta información será de utilidad, ya que permitirá modificar el esquema terapéutico del paciente y repercutirá en la disminución de efectos adversos y costos del tratamiento.

### **3. Planteamiento del problema**

Se ha determinado que la expresión de las isoformas no funcionales del gen *IKZF1*, y en particular las isoformas dominantes negativas Ik-6 e Ik-8, podrían actuar como marcadores de mal pronóstico, independientes a los convencionales.

En el presente trabajo, se determinó la expresión de las diversas isoformas de Ikaros presentes en células de médula ósea obtenidas de pacientes pediátricos con LAL al momento del diagnóstico. También se incluyeron en el análisis los parámetros convencionales de riesgo, y se describió si las isoformas no funcionales del gen se presentaron junto con factores de mal pronóstico.

Cabe señalar que este trabajo forma parte de un proyecto que se realizará a largo plazo, en el cual se evaluará la supervivencia a 5 años posterior a la remisión, y la expresión de otros genes como *CASP8AP2* y *H2AFZ*. Los resultados que se obtengan, permitirán conocer el comportamiento de factores de riesgo identificados en otras poblaciones con LAL, que podrían ser aplicados en la población atendida en nuestro Instituto para la estratificación de los pacientes.

#### 4. Pregunta de investigación

- ¿La expresión de las isoformas no funcionales del gen *IKZF1* se asocia con la presencia de factores convencionales de mal pronóstico o con deceso temprano?

#### 5. Hipótesis

- Los pacientes expresarán diversos patrones de isoformas del gen *IKZF1*, incluyendo a sus isoformas no funcionales (Ik-6 y/o Ik-8).
- Algunos de los pacientes con factores convencionales de alto riesgo al momento del diagnóstico (edad <1 o >10 años, cuenta leucocitaria >50,000/mm<sup>3</sup>, presencia de la fusión *BCR-ABL1*), presentarán expresión de las isoformas no funcionales.
- Los pacientes con deceso temprano asociado a la enfermedad, expresarán con mayor frecuencia isoformas no funcionales.

#### 6. Objetivos

##### Objetivo General:

- Determinar las isoformas del gen *IKZF1* presentes en un grupo de pacientes con LAL atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría.

##### Objetivos Particulares:

- Identificar las isoformas de *IKZF1* en pacientes pediátricos con LAL pre B presentes al momento del diagnóstico.

- Determinar los patrones de expresión de las isoformas de *IKZF1* en los pacientes estudiados.
- Describir la posible asociación entre la presencia de isoformas no funcionales con los factores convencionales de riesgo y la defunción temprana asociada a la enfermedad.

## **7. Material y Métodos**

### **7.1. Población de estudio.**

Se captaron 29 pacientes pediátricos con diagnóstico de LAL pre-B, sin tratamiento previo, que acudieron al servicio de "AQUA" del Instituto Nacional de Pediatría. Se invitó a los padres/tutores de los pacientes a participar en este proyecto, se les proporcionó la información referente al estudio, una vez que los padres/tutores aceptaron que sus hijos participaran se les solicitó firmar una carta de consentimiento informado.

### **7.2 Captura de datos clínicos y paraclínicos**

- Ambos se obtuvieron de los expedientes clínicos.

### **7.3 Obtención y procesamiento de muestras**

- Se obtuvo de cada paciente una muestra de 2-3ml de médula ósea en una jeringa previamente heparinizada, mediante punción de cresta iliaca realizada por personal capacitado del servicio de "AQUA". Cabe señalar que en ningún caso se tomaron muestras exclusivas para llevar a cabo

este protocolo de investigación, dado que todas se obtuvieron a través de la punción diagnóstica.

- Las células mononucleadas de la médula ósea fueron separadas mediante centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Hypaque).
- Una fracción de las células se almacenó con RLT (Qiagen)/ $\beta$ -Mercaptoetanol (Sigma) en nitrógeno líquido, para realizar extracción de RNA.

### 7.3.1 Extracción de RNA total

Para analizar la expresión de los transcritos de las isoformas del gen *IKZF1*, se extrajo el RNA total de las células mononucleadas con el Kit RNeasy Mini (Qiagen) siguiendo el protocolo proporcionado por el proveedor; el cual se basa en la purificación del RNA mediante cromatografía de afinidad en columnas con membrana de sílica.

1.- La muestra se homogeneizó y las células fueron lisadas con isotiocianato de guanidina, para posteriormente precipitar el RNA con etanol y purificarlo por columna.

2.- La cantidad de RNA total, se cuantificó por espectrofotometría (absorbancia 260nm) y la pureza se calculó dividiendo la absorbancia obtenida a 260nm sobre 280nm. Se consideró como un RNA puro, cuando las muestras tuvieron valores entre 1.9 y 2.1.

3.- La integridad del RNA se verificó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% con 1  $\mu$ l de RNA, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (UV).

4.- El RNA total obtenido se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta su uso para la síntesis de cDNA.

### 7.3.2 Síntesis de cDNA

Se realizó mediante una reacción de retro-transcripción en 2 pasos:

1.- Se preparó una mezcla de reacción con la cantidad suficiente para alcanzar 1 $\mu$ g de RNA, más 0.5 $\mu$ l de "random primers", que fueron empleados como cebadores para la transcriptasa reversa (Invitrogen) y la cantidad suficiente de agua libre de RNAsas para alcanzar un volumen final de 20 $\mu$ l. La mezcla de reacción se desnaturalizó a  $72^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y posteriormente se mantuvo en hielo hasta que se adicionó la mezcla para la segunda reacción.

2.- La segunda reacción se preparó en un volumen final de 10 $\mu$ l, conteniendo 1 $\mu$ l de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Invitrogen), 6 $\mu$ l de buffer MMLV-RT [5x] (Invitrogen), 1 $\mu$ l de dNTPs [10mM] (Invitrogen) y 2 $\mu$ l de DTT (ditiotreitól, Invitrogen) que permite la ruptura de estructuras secundarias del RNA. El volumen de la segunda reacción se incorporó a la primera, y se amplificó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora (1 ciclo) y a  $94^{\circ}\text{C}$  por 6 minutos (1

ciclo) en un termociclador Master Cycler Gradient de Eppendorf. El producto fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

3.- La integridad del cDNA fue verificada mediante la amplificación del gen constitutivo *GAPDH*, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y oligonucleótidos específicos (Tabla 5). La mezcla de reacción se preparó con  $2\mu\text{l}$  de cDNA, buffer 10x de PCR [1x] (Promega),  $\text{MgCl}_2$  [3mM] (Promega), dNTPs [200mM] (Invitrogen), juego de oligonucleótidos [ $10\mu\text{M}$ ] cada uno (Promega), Taq DNA polimerasa [1U] (Promega), en un volumen final de reacción de  $25\mu\text{l}$ . Las reacciones de PCR fueron realizadas en el termociclador bajo condiciones específicas de reacción (Tabla 6).

#### **7.4 PCR *IKZF1* y *ABL1***

Para la identificación de las isoformas del gen *IKZF1* se realizó una PCR punto final (denominada ika-1) utilizando oligonucleótidos y condiciones específicas de amplificación (Tabla 5 y 6) y como control interno se realizó PCR para el gen *ABL1* (Tabla 5 y 6).

1.- La mezcla de reacción para las dos PCR's punto final (ika-1 y *ABL1*), se prepararon en un volumen final de  $25\mu\text{l}$  con  $2\mu\text{l}$  de cDNA, buffer 10x de PCR [1x] (Invitrogen),  $\text{MgSO}_4$  [1.5mM] (Invitrogen), dNTPs [ $200\mu\text{M}$ ] (Invitrogen), juego de oligonucleótidos [400nM] cada uno (Invitrogen), (Tabla 5) y Taq DNA polimerasa Platinum [1U] (Invitrogen)<sup>33</sup>. Las reacciones de PCR fueron realizadas en el

termociclador y los amplicones de los genes fueron detectados utilizando electroforesis horizontal a 100 volts en geles de agarosa al 1%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz UV. El tamaño del producto de PCR esperado para ABL1 fue de 931 pares de bases<sup>33</sup>.

### 7.5 PCR *IKZF1* anidado

El producto de PCR de la reacción de *ika-1* se utilizó como templado para la reacción de PCR anidado (*ika-2*) utilizando oligonucleótidos y condiciones específicas de amplificación (Tablas 5 y 6).

1. La mezcla de reacción para *ika-2* se preparó en un volumen final de 25µl con 1µl de producto de *ika-1*, buffer 10x de PCR [1x] (Invitrogen), MgSO<sub>4</sub> [1.5mM] (Invitrogen), dNTPs [200mM] (Invitrogen), juego de oligonucleótidos [400nM] cada uno (Invitrogen), Taq DNA polimerasa Platinum [1U] (Invitrogen)<sup>33</sup>. Las reacciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Eppendorf. Las isoformas del gen *IKZF1* fueron detectadas con base al peso molecular en pares de bases, utilizando electroforesis horizontal a 80 volts en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y visualizados con luz UV.
2. Como controles externos para los patrones de las isoformas de *IKZF1*, se incluyeron dos líneas celulares linfoblastoides, una de origen leucémico (K562) y otra proveniente de un individuo sano. La extracción de RNA, síntesis de cDNA, PCR punto final y anidado se realizaron como se mencionó anteriormente.

**Tabla 5.** Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo<sup>33</sup>.

Gen	Oligonucleotido	Secuencia (5' – 3')
<i>GAPDH</i>	GAPDH-Fw	ATCCCATCACCATCTTCCAG
	GAPDH-Rv	TGTGGTCATGAGTCCTTCCA
<i>IKZF1</i>	F1 (ika-1)	ATGGATGCTGACGAGGGTCAAGAC
	R1 (ika-1)	TTAGCTCATGTGGAAGCGGTGCTC
	F2 (ika-2)	CCCCTGTAAGCGATACTCCAGATG
	R2 (ika-2)	GATGGCTTGGTCCATCACGTGGGA
<i>ABL1</i>	L-abl_F	AAGGGGCTGTCCTCGTCCTC
	L-abl_R	CCAGGAGGTTCCCGTAGGTCA

**Tabla 6.** Condiciones de amplificación por PCR de cada producto<sup>33</sup>.

Fase	<i>GAPDH</i>			ika-1/ <i>ABL</i>			ika-2		
	Temp (°C)	Tiempo	Ciclos	Temp (°C)	Tiempo	Ciclos	Temp(°C)	Tiempo	Ciclos
Inicio	94	5 min	1						
Desnaturalización	94	30 seg	28	94	30 seg	35	94	30 seg	40
Alineación	62	30 seg		62	30 seg		68	90 seg	
Extensión	72	1 min		72	60 seg		72	2 min	
Extensión final	72	5 min	1	72	7 min	1	72	7min	1
Hold	4	∞		4	∞		4	∞	

seg = segundos; min = minutos; ∞ = infinito; Temp=temperatura

## 7.6 Análisis de resultados

1. El análisis de los patrones de las isoformas de *IKZF1* expresadas en cada uno de los pacientes se realizó de manera cualitativa, identificando las isoformas con base al tamaño en pares de bases referido por Meleshko y cols. (Tabla 7)<sup>33</sup>.

**Tabla 7.** Tamaños de las isoformas de *IKZF1*<sup>33</sup>.

Isoforma	Peso (pb)
Ik-1	893
Ik-3A	758
Ik-2/3	632
Ik-4	505
Ik-5/7	464
Ik-4A	370
Ik-8	337
Ik-6	202

pb=pares de bases

## 8. Resultados

Se analizaron 29 pacientes pediátricos del Instituto Nacional de Pediatría, todos con diagnóstico de LAL pre-B. De estos, 17 fueron mujeres y 12 hombres con un intervalo de edad entre 18 y 206 meses (de 1 año 6 meses hasta 17 años 2 meses). Siete pacientes mostraron factores convencionales de riesgo con la siguiente distribución: 4 con edad mayor a 120 meses y 3 con cuenta de leucocitos  $>50,000/\text{mm}^3$ . En los pacientes estudiados no se

encontraron translocaciones de mal pronóstico, aunque 2 mostraron la fusión *E2A-PBX1* y 3 la *TEL-AML1*; ninguno tuvo enfermedad extramedular (Tabla 8).

De los 29 pacientes, 5 fallecieron de manera temprana (dentro de los primeros 5 años posteriores al diagnóstico). Dos eran hombres y 3 mujeres con un rango de edad entre 18 y 120 meses; dos de ellos cursaron con características de riesgo convencional, uno con edad >120 meses y otro con cuenta de leucocitos >50,000/mm<sup>3</sup> (Tabla 8).

En cuanto a las isoformas del gen *IKZF1* identificadas en cada paciente al momento del diagnóstico, estas se agruparon en funcionales y no funcionales. En 15 pacientes se identificaron de manera exclusiva isoformas funcionales, y en un caso solamente isoformas no funcionales; en 10 pacientes se identificó una mezcla de isoformas funcionales y no funcionales, y en 3 pacientes (1, 9 y 20) sólo se detectaron bandas de amplificación que no corresponden a las isoformas documentadas por Meleshko<sup>33</sup>. Debido a que estas bandas no han sido caracterizadas, se desconoce si son isoformas y cuál es su función. Estos productos de amplificación también se detectaron en pacientes con isoformas conocidas, lo referente a estos resultados se describirá posteriormente.

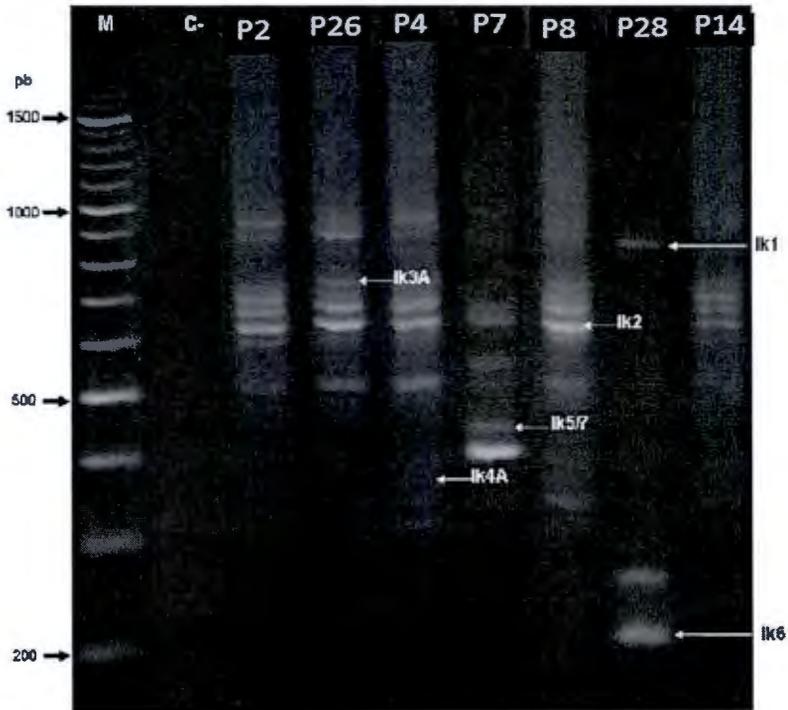
La isoforma Ik-6, considerada *per se* como marcador de mal pronóstico, se detectó en 4 de los 29 pacientes (Tabla 8, Figura 3 y Tabla 9); 2 de ellos se encuentran en seguimiento (pacientes 4 y 6), cabe señalar que el paciente 4 presenta una característica de riesgo alto. Los otros 2 pacientes tuvieron deceso temprano (pacientes 27 y 28), uno de ellos presentó cuenta leucocitaria alta al diagnóstico (paciente 28). La isoforma Ik-8, que también ha sido

considerada como dominante negativa, no fue encontrada en esta población (Tabla 8).

**Tabla 8.** Características clínicas y paraclínicas de los pacientes estudiados, y las isoformas de *IKZF1* encontradas al momento del diagnóstico.

Paciente	Género	Edad (meses)	Cuenta de leucocitos (/mm <sup>3</sup> )	Fusión génica	Isoformas de <i>IKZF1</i>	
					Funcionales	No funcionales
1	F	107	8.2	N	BANI	
2	F	74	1.7	N	Ik-1, Ik-2	Ik-4A, Ik-5/7
3	M	65	4.5	N	Ik-1, Ik-2	Ik-4A, Ik-5/7
4	F	<b>206</b>	8.4	N	Ik-3A	Ik-4A, Ik-6
5	F	106	21.9	<i>TEL-AML1</i>	Ik-2	Ik-4
6	F	46	7.4	N	Ik-1, Ik-2	Ik-6
7	F	46	26.1	N		Ik-5/7
8	M	36	5.6	N	Ik-1, Ik-2, Ik-3A	Ik-4A
9	F	48	24.2	<i>E2A-PBX1</i>	BANI	
10	M	<b>192</b>	18.8	N	Ik-2	Ik-4, Ik-5/7
11	M	<b>143</b>	13.9	N	Ik-1	
12	M	68	7.2	N	Ik-1	
13	F	96	<b>65.8</b>	N	Ik-1	
14	F	27	4.5	N	Ik-1, Ik-3A	
15	F	96	<b>476</b>	<i>E2A-PBX1</i>	Ik-1	
16	F	42	16.5	<i>TEL-AML1</i>	Ik-1	
17	F	20	5.1	N	Ik-1, Ik-2	
18	M	48	7.6	<i>TEL-AML1</i>	Ik-1	Ik-4A
19	M	63	7.5	N	Ik-1	
20	M	92	47.2	N	BANI	
21	F	36	3.6	N	Ik-1	
22	F	39	34	N	Ik-1	
23	M	86	1.9	N	Ik-1, Ik-3A	
24	M	46	5.1	N	Ik-2, Ik-3A	
25*	M	107	0.5	N	Ik-2	
26*	F	<b>120</b>	4.5	N	Ik-3A	
27*	F	69	6	N	Ik-3A	Ik-4A, Ik-6
28*	F	105	<b>152.7</b>	N	Ik-1	Ik-6
29*	M	18	1.2	N	Ik-1, Ik-3A	

\* = Defunciones tempranas; Negritas = Pacientes con factores convencional de riesgo (Edad > 120 meses y cuenta de leucocitos > 50,000/mm<sup>3</sup>) o con Ik-6; F = Femenino; M = Masculino; N = Negativo para fusiones génicas; BANI = Bandas de amplificación no identificadas.



**Figura 3.** Imagen de un gel de agarosa al 2% con amplicones de *IKZF1*. Gel teñido con bromuro de etidio. M= marcador de peso de 100 pb (O'Range ruler, Fermentas) C- = control negativo; P= número de paciente; Las flechas blancas indican las isoformas

Al analizar la combinación de las isoformas de *IKZF1* presentes en los pacientes, se identificaron 17 patrones de las isoformas conocidas y reportadas. En 3 de los 29 pacientes se identificaron bandas de amplificación no caracterizadas, cuyos tamaños variaron entre 280 y 940 pb (Figura 3 y Tabla 9). El patrón más frecuente (8 pacientes) está conformado por la presencia de Ik-1 exclusivamente, tres de estos pacientes cursaron con algún factor convencional de riesgo; el resto de los pacientes están distribuidos en diversos patrones de isoformas de *IKZF1* (Tabla 9).

En pacientes que mostraron alguna variable de mal pronóstico, se documentaron 7 patrones de expresión diferentes (Tabla 9). Los pacientes con defunción temprana se encuentran distribuidos en 5 patrones distintos, en 2 pacientes hay mezcla de isoformas funcionales y no funcionales e lk-6 está presente (Tabla 9). También se observó que 3 de los 7 pacientes con factores convencionales de riesgo al momento del diagnóstico, expresaron exclusivamente lk-1, y 2 casos presentaron mezcla de isoformas funcionales y no funcionales, uno de ellos fue positivo para lk-6.

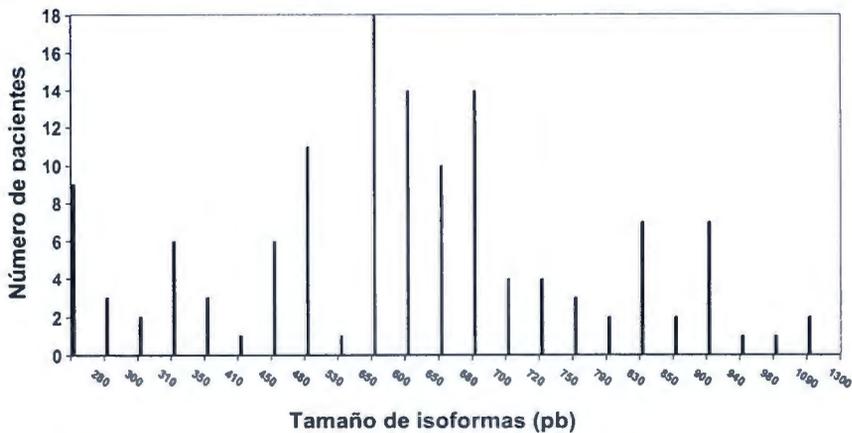
**Tabla 9.** Patrones de las isoformas de *IKZF1* identificadas en la población estudiada.

Patrón	Número de pacientes	Pacientes con factores de riesgo	Pacientes con Defunción
Productos de amplificación* (280 pb)	2	0	0
Productos de amplificación* (600 pb, 650 pb, 700 pb, 940 pb)	1	0	0
lk-1	8	3 <sup>1,2&amp;</sup>	0
lk-1+ lk-2+ lk-4A + lk5/7	2	0	0
lk-5/7	1	0	0
lk-1+ lk-4A	1	0	0
lk-2+ lk-3 <sup>a</sup>	1	0	0
lk-2 + lk-4	1	0	0
lk-1+ lk-2 + lk-6	1	0	0
lk-1 + lk-2 + lk-3A + lk-4A	1	0	0
lk-1 + lk-2	1	0	0
lk-2 + lk-4 + lk-5/7	1	1 <sup>Δ</sup>	0
lk-1 + lk-3A	3	0	1
lk-3 <sup>a</sup> + lk-4A + lk-6	2	1 <sup>Δ</sup>	1
lk-3 A	1	0	1 <sup>Δ</sup>
lk-1+ lk-6	1	0	1 <sup>&amp;</sup>
lk-2	1	0	1

\* = Pacientes que expresaron bandas de amplificación no referidas por Meleshko<sup>33</sup>; pb = Pares de bases; <sup>Δ</sup> = Número de pacientes con edad >120 meses; <sup>&</sup> = Número de pacientes con cuenta de leucocitos >50,000/mm<sup>3</sup>

De los productos de amplificación con diferentes tamaños, que no corresponden con los reportados para las isoformas descritas de *IKZF1* y que se encontraron en el resto de los pacientes, las bandas de amplificación variaron entre 280 y 1,300 pb; las más frecuentes fueron de 700, 650, 600, 530 y 280 pb, y se muestran en la Gráfica 1. Como se comentó, por el momento estos productos no se pueden considerar como isoformas, dado que se requiere de la secuenciación para identificar su procedencia y clasificarlos por su funcionalidad.

**Gráfica 1.** Número de pacientes que presentaron los diversos productos de amplificación detectados.



Se buscaron patrones similares de isoformas y de productos amplificados entre los pacientes con factores de riesgo convencionales (7 casos, de los cuales 2 fallecieron) y los pacientes con deceso temprano aunque no tuvieran factores de riesgo (3 casos); sólo se encontró un patrón en común en 2 pacientes, el cual estuvo conformado por  $Ik-1$  y 5 bandas no caracterizadas (Tabla 10). En el resto de los pacientes se encontraron patrones

distintos tanto en isoformas de Ikaros como en productos de amplificación; sin embargo, cabe mencionar que en 3 de estos 10 pacientes se detectó la isoforma Ik-6.

**Tabla 10.** Patrones de las isoformas y amplicones de *IKZF1* identificadas en los pacientes con factores convencionales de mal pronóstico y/o deceso temprano.

Pacientes	Patrón	
	Isoformas	Producto amplificación (pb)
2	Ik-1	850, 750, 650, 600, 480
1	Ik-2	790
1	Ik-3A, Ik-4A, Ik-6	720, 700, 680, 650, 600, 530, 280
1	Ik-3A	900, 700, 650, 600, 530
1	Ik-3A, Ik-4A, Ik-6	900, 700, 650, 530, 350, 310
1	Ik-1, Ik-6	830, 280
1	Ik-2, Ik-4, Ik-5/7	280
1	Ik-1	1090, 850, 280
1	Ik-1, Ik-3A	940, 700, 680, 650, 600, 530

## 9. Discusión

Las deleciones e isoformas que conllevan a la pérdida de la mayoría de los dominios de unión al DNA de *IKZF1* han sido reportadas en diversas poblaciones, y se consideran un factor de riesgo independiente a presentar recaída. Por esta razón, es importante conocer la expresión de las isoformas de este gen en nuestra población, y detectar las isoformas no funcionales, ya que se ha demostrado que repercuten negativamente en la función como factor de transcripción de Ikaros durante la linfopoyesis, al actuar sobre la cinasa dependiente de ciclina  $2^{58,59}$ .

Los resultados del presente estudio muestran que existe una amplia variabilidad en la expresión de transcritos de *IKZF1*, ya que se identificaron varios patrones de expresión, a pesar de contar con un número limitado de

pacientes. En la literatura se refiere que aproximadamente del 10 al 28% de los pacientes pediátricos con LAL pre B tienen alguna alteración en el gen *IKZF1* en estado heterocigoto; estas alteraciones consisten principalmente en la pérdida de exones del gen, lo que da como resultado la expresión de la isoforma Ik-6, que ha sido ampliamente asociada a mal pronóstico<sup>29,50</sup>. En esta pequeña cohorte de pacientes, 4 de 29 casos expresaron Ik-6 (13.8%); este resultado es similar a lo reportado en otras poblaciones, y se cumple el objetivo de detectar con la metodología propuesta esta isoforma no funcional.

Es importante mencionar que se observaron amplicones que no corresponden a los tamaños de las isoformas conocidas, dichos productos generalmente suelen ser variantes de isoformas con deleciones o inserciones ocasionadas durante el corte y empalme alternativo. Es indispensable realizar el análisis por secuenciación para caracterizar las variantes detectadas y conocer su posible significado biológico<sup>33,58,59,60</sup>.

En la población analizada no se encontraron pacientes con isoforma Ik-6 que fueran positivos para la fusión *BCR-ABL1*, que es una característica frecuente referida en otras poblaciones. La coexistencia de estas alteraciones incrementa el riesgo de falla del tratamiento, ya que se asocian con resistencia a la quimioterapia y presencia de recaídas<sup>18,19,33,43,45,50,51,52</sup>. Es indispensable incrementar el número de pacientes estudiados, para evidenciar la relación entre la expresión de isoformas no funcionales de *IKZF1* y la presencia de la fusión *BCR-ABL1* en nuestros pacientes.

En los pacientes estudiados hasta el momento, la mayoría de las isoformas no funcionales de Ikaros se detectaron, excepto Ik-8, la cual ha sido identificada por otros investigadores en más del 10% de los pacientes. La

presencia de Ik-5/7 suele observarse escasamente (cerca del 2.3% de los casos), lo cual difiere de lo encontrado en nuestros pacientes ya que estuvo presente en el 13%. La Ik-4A fue la isoforma no funcional más frecuentemente detectada en nuestra población (20%), en otros estudios se refiere en el 14%. De este subgrupo de pacientes, el 75% cursaron con algún factor de mal pronóstico y/o tuvieron deceso temprano, sin embargo, estas frecuencias no son definitivas ya que se requiere incrementar el tamaño de muestra.

Con estos resultados preliminares es posible especular que Ik-6 podría ser un buen marcador de riesgo en nuestra población, sin embargo, es necesario ampliar el tiempo de seguimiento de los pacientes y evaluar las supervivencias libre de evento y global a 5 años a partir del inicio del tratamiento. Sólo a partir de estos análisis se podrá determinar el impacto en el pronóstico de esta isoforma de Ikaros<sup>33,52,53,61,62,63,64,65,66</sup>. También se requiere complementar el abordaje de biología molecular mediante secuenciación de los amplicones no conocidos, de tal forma que podamos darle un valor pronóstico a la presencia de estos productos. Lo anterior permitirá contar con marcadores de pronóstico temprano para los pacientes con LAL, que en conjunto con los ya existentes detecten con mayor sensibilidad a los casos en riesgo de recaer, permitiendo así la mejora en la calidad de vida del paciente, en algunos casos incrementar la sobrevida y disminuir costos asociados al tratamiento y sus complicaciones.

## 10. Conclusiones

La mayoría de los pacientes (90%) expresaron isoformas de *IKZF1*, excepto la isoforma Ik-8 que no fue encontrada en la población estudiada; asimismo se encontraron diferentes patrones de expresión, dentro de los cuales algunos pacientes expresaron exclusivamente isoformas funcionales o no funcionales, o bien una combinación de las mismas.

La isoforma Ik-6 se detectó en 2 de los 5 pacientes con defunción temprana, sin embargo no es factible establecer una asociación directa entre ambos eventos en este momento. Debe de ser ampliada la muestra a estudiar y llevar a cabo el seguimiento de los pacientes a largo plazo, así como realizar secuenciación de los amplicones identificados para poder contar con mayor información que nos permita determinar su funcionalidad y conocer si existe o no asociación con el pronóstico.

## 11. Bibliografía

- 1.- Castro MA, Orozco LC, Rueda E, et al. Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda en pediatría: incidencia, mortalidad y asociaciones causales. Salud UIS 2007;39(2):116-123.
- 2.- Lassaletta A. Leucemia linfoblástica aguda. Pediatr Integral 2008;12(6):551-558.
- 3.<http://www.cancer.org/acs/groups/content/@nho/documents/document/caff2006hisppwsecuredpdf.pdf>
- 4.- Mejía, JM. Epidemiología de las leucemias agudas en niños. Rev Med IMSS 2005;43(4): 323-333.
- 5.- Beckman RA. Efficiency of carcinogenesis: is mutator phenotype inevitable?. Semin Cancer Biol 2010;20(5):340-352.
- 6.- Gardner M, Snee MP, Hall A, et al. Result of case-control study of leukaemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. BMJ 1990; 300(6722):423-429.
- 7.- Dickinson HO, Hodgson T, Parker L. Comparison of Health and Safety Executive and Cumbrian birth cohort studies of risk of leukaemia/non-Hodgkin's lymphoma in relation to paternal preconceptional irradiation. Radiol Prot 2003; 23(4):385-403.
- 8.- Dickinson HO, Parker L. Leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in children of male Sellafield radiation workers. Int Cancer 2002;99(3):437-444.
- 9.- Infante-Rivard C, Deadman JE. Maternal occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields during pregnancy and childhood leukemia. Epidemiology 2003;14(4):437-441.

- 10.- Linet MS, Hatch E, Kleinerman RA, Robison L, et al. Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med* 1997;337(1):1-7.
- 11.- Greenland S, Sheppard A, Kaune W, et al. A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia. *Epidemiology* 2000;11(6):624-634.
12. da Silva HSM, Heuser VP, Possa MN, et al. Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Fppd Chem Toxicol* 2002;40(7):941-947.
- 13.- Luque J, Herráez A. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Editorial Harcourt. España. 2009.p:151.
- 14.-Lanoue L, Green KK, Kwik-Urbe C, et al. Dietary factors and the risk for acute infant leukemia: evaluating the effects of cocoa-derived flavonols on DNA topoisomerase activity. *Exp Biol Med* 2010; 235:77-89.
- 15.- Hodgson SV, Foulkes WD, Eng C, et al. A practical guide to Human Cancer Genetics. Editorial Cambridge. 3ra edición. United Kingdom.2007.p:120-130.
- 16.- Firth HV, Hurst JA. Oxford Desk Reference Clinical Genetics. Editorial Oxford. EUA. 2006.p:304-305.
- 17.- Cassidy SB, Allanson JE. Management of Genetic Syndromes. Editorial Wiley.2nda edición.EUA.2005.p:201.
- 18.- Vogelstein B, Kinzler KW. The genetic basis of human cancer. Editorial Mc Graw Hill. 2nda edición. EUA. 2002.p:796-797.
- 19.- Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Williams WJ. Williams manual of hematology. Editorial McGrawHill. 6ta edición. EUA.2003.p:237-249.

- 20.- Roberts KG, Mullighan CG. How new advances in genetic analysis are influencing the understanding and treatment of childhood acute leukemia. *Curr Opin Pediatr* 2011;23(1):34-40.
- 21.- Chen Z, Sandberg AA. Molecular cytogenetic aspects of hematological malignancies: clinical implications. *Am J Med Genet* 2002;115:130–141.
- 22.- Fröhling S, Döhner H. Chromosomal abnormalities in cancer. *N Engl J Med* 2008; 359:722-734.
- 23.- Pui CH., Robinson LL, Look T. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2008; 371:1030-1043.
- 24.- Winandy S, Wu P, Georgopoulos K. A dominant mutation in the Ikaros gene leads to rapid development of leukemia and lymphoma. *Cell* 1995;83(2):289-299.
- 25.- Bacher U. Molecular diagnosis in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med* 2009;47(11):1333-1341.
- 26.- Medvedovic J, Ebert A, Tagoh H, Busslinger M. *PAX5* a master regulator of B cell development and leukemogenesis. *Adv Immunol* 2011;111:179-206.
- 27.- Iacobucci I, Lonetti A, Paoloni F, et al. The *PAX5* gene is frequently rearranged in *BCR-ABL1*- positive acute lymphoblastic leukemia but is not associated with outcome. A report on behalf of the GIMEMA Acute Leukemia Working Party. *Haematologica* 2010; 95(10):1683-90.
- 28.- Medeiros, B. Deletion of *IKZF1* and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360:17.
- 29.- Mullighan CG, Zhang J, Harvey RC, et al. *JAK* mutations in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106(23):9414-9418.

- 30.- Tasian S, Loh ML. Understanding the Biology of *CRLF2*-Overexpressing Acute Lymphoblastic Leukemia. *Crit Rev Oncog*. 2011;16(1-2):13-24.
- 31.- Georgopoulos K. Haematopoietic cell fate decisions, chromatin regulation and IKAROS. *Nat Rev* 2002; 2:162-173.
- 32.- Ruiz A. The Ikaros splice isoform, Ikaros 6, immortalizes murine haematopoietic progenitor cells. *Int JCancer* 2008;123:1240-1254.
- 33.- Meleshko A, Movchan LV, Belevtsev MV, et al. Relative expression of different Ikaros isoforms in childhood acute leukemia. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2008; 41:278-283.
- 34.- Molnár A, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of functionally diverse zinc finger DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14(12):8292-8303.
- 35.- John LB, Ward AC. The Ikaros gene family: Transcriptional regulators of hematopoiesis and immunity. *Molecular Immunology* 2011; 48:1272-1278.
- 36.- Georgopoulos K, Moore DD, Derfler B. Ikaros an early T cell restricted transcription factor: a putative mediator for T cell commitment. *Science* 1992;258:808-812.
- 37.- Molnár A, Wu P, Largespada DA, Vortkamp A, Scherer S, Copeland NG, Jenkins NA, Bruns G, Georgopoulos K. The Ikaros gene encodes a family of lymphocyte-restricted zinc finger DNA binding proteins, highly conserved in human and mouse. *J Immunol* 1996;156(2):585-592.
- 38.- Hahm K, Cobb BS, McCarty AS, Brown KE, Klug CA, Lee R, Akashi K, Weissman IL, Fisher AG, Smale ST. Helios, a T cell-restricted Ikaros family member that quantitatively associates with Ikaros at centromeric heterochromatin. *Genes Dev* 1998;12(6):782-96.

- 39.- Cobb BS, Smale ST. Ikaros family proteins: in search of molecular functions during lymphocyte development. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;290:29-47.
40. Hari S, Winandy S. Ikaros regulates Notch target gene expression in developing thymocytes. *The Journal of Immunology* 2008;181:6265-6274.
41. Rebollo A, Schmitt C. Ikaros, Aiolos and Helios: transcription regulators and lymphoid malignancies. *Immunol. Cell Biol* 2003;81:171–175.
- 42.- Pancewicz J, Nicot C. Current views on the role of Notch signaling and the pathogenesis of human leukemia. *BMC Cancer* 2011;11(1):502-505.
- 43.- Yao-Ming. Ikaros and chromatin in early hematopoiesis. *Curr Opin Immunol* 2007. 19:116-122.
- 44.- Swafford AD, Howson JMM, Davison LJ, et al. An allele of *IKZF1* conferring susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia protect against type 1 Diabetes. *Diabetes* 2011;60:1041-1044.
- 45.- Mullighan, CG. Deletion of *IKZF1* and Prognosis in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med* 2009; 360:600
- 46.- Klein F, Feldhahn N, Herzog S, et al. *BCR-ABL1* induces aberrant splicing of IKAROS and lineage infidelity in pre-B lymphoblastic leukemia cells. *Oncogene* 2006; 25(7):1118-1124.
- 47.- Mullighan CG, Miller CB, Radtke I, Phillips LA, Dalton J, Ma J, White D, Hughes TP, Le Beau MM, Pui CH, Relling MV, Shurtleff SA, Downing JR. *BCR-ABL1* lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros. *Nature* 2008;453(7191):110-114.
- 48.- Georgopoulos K. Acute Lymphoblastic Leukemia-On the wings of IKAROS. *N Engl J Med* 2009; 360(5):524-526.

- 49.- Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, et al. *IKZF1* (Ikaros) deletions in *BCR-ABL1* positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol* 2009; 27:5202–5207.
- 50.- Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, et al. *IKZF1* deletions predict relapse. *Leukemia* 2010; 24:1258–1264.
- 51.- Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, et al. Genomewide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446(7137): 758–764.
- 52.- Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009; 10:125–134.
- 53.- Payne KJ, Dovat S. Ikaros and Tumor Suppression in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Crit Rev Oncog* 2011; 16(1-2): 3–12.
- 54.- Tonnelle C, Imbert MC, Sainty D, et al. Over-expression of dominant-negative Ikaros 6 protein is restricted to a subset of B common adult acute lymphoblastic leukemias that express high levels of the CD34 antigen. *Hematol J* 2003;4:104–109.
- 55.- Nakayama H, Ishimaru F, Avitahl N, et al. Decreases in Ikaros activity correlate with blast crisis in patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Res* 1999;59:3931–3934.
- 56.- Yagi T, Hibi S, Takanashi M, et al. High frequency of Ikaros isoform 6 expression in acute myelomonocytic and monocytic leukemias: implications for up-regulation of the antiapoptotic protein Bcl- XL in leukemogenesis. *Blood* 2002;99:1350–1355.

- 57.- Ezzat S, Yu S, Asa SL. Ikaros isoforms in human pituitary tumors: distinct localization, histone acetylation, and activation of the 5' fibroblast growth factor receptor-4 promoter. *Am J Pathol* 2003;163:1177–1184.
58. Sun L, Heerema N, Crotty L. Expression of dominant negative and mutant isoforms of the antileukemic transcription factor Ikaros in infant acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:680-685.
- 59 .Sun L, Goodman PA, Wood CM. Expression of aberrantly spliced oncogenic Ikaros isoforms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Oncol* 1999;17(12):3753-3766.
- 60.- Payne KJ, Nicolas JH, Zhu JY, Barsk LW, Crooks GM. Cutting edge: predominant expression of a novel Ikaros isoform in normal human hemopoiesis. *J Immunol* 2001;167(4):1867-1870
- 61.- Zhou F, Mei H, Jin R, et al. Expression of Ikaros isoform 6 in chinese children with acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33(6):429-32.
- 62.- Feng J, Tang Y. Prognostic significance of IKZF1 alteration status in pediatric B-lineage acute lymphoblastic leukemia: a meta-analysis. *Leuk Lymphoma*. 2012 . Early on line: 1-3
- 63.- Takanashi M, Yagi T, Imamura T, Tabata Y, et al. Expression of the Ikaros gene family in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;117:525–530.
- 64.- Kuiper RP, Waanders E, van der Velden VH, et al. *IKZF1* deletions predict relapse. *Leukemia* 2010; 24:1258–1264.
- 65.- Venn NC, van der Velden VH, de Bie M, Waanders E, Giles JE, Law T, Kuiper RP, de Haas V, Mullighan CG, Haber M, Marshall GM, Md N, van

Dongen JJ, Sutton R. Highly sensitive MRD tests for ALL based on the IKZF1  $\Delta$ 3-6 microdeletion. *Leukemia*. 2012;26(6):1414-6

66.- Volejnikova J, Mejstrikova E, Dörge P, Meissner B, Zimmermannova O, Svojgr K, Stanulla M, Cario G, Schrappe M, Stary J, Hrusak O, Trka J, Fronkova E. Ikaros (IKZF1) alterations and minimal residual disease at day 15 assessed by flow cytometry predict prognosis of childhood BCR/ABL-negative acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer*.2012. doi: 10.1002/pbc.24299.

**I N P**  
**CENTRO DE INFORMACION**  
**Y DOCUMENTACIÓN**