

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANALISIS PROTEOMICO DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE Y SU
ASOCIACIÓN CON SOBREVIDA EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA
AGUDA B.**

Por

DR. SERGIO ANTONIO RAMÍREZ CORTINAS

**Como requisito para obtener el Grado de:
ESPECIALISTA EN HEMATOLOGIA PEDIATRICA**

Marzo 2022

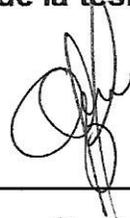
**ANALISIS PROTEOMICO DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE Y SU
ASOCIACIÓN CON SOBREVIDA EN NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA
AGUDA B.**

Aprobación de la tesis:



Dra. Laura Villarreal Martínez

Director de la tesis



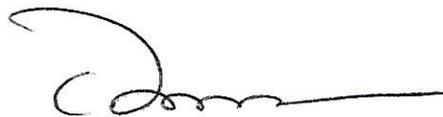
Dr. Oscar González Llano

Coordinador de Enseñanza de Hematología Pediátrica



Dr. med. Manuel Enrique de la O Cavazos

Jefe de Servicio o Departamento



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA Y/O AGRADECIMIENTOS

Este trabajo en especial lo dedico a las personas que me brindaron todo su apoyo durante mi formación profesional.

A mis padres María Guadalupe y Sergio Antonio, quienes son el vivo ejemplo de sacrificio y amor de un padre por sus hijos; siempre han estado apoyándome, y motivándome a seguir adelante en mis proyectos personales y profesionales, sin su apoyo incondicional no sería posible lo que he alcanzado hasta ahora.

A mi hermano Luis Emilio que me ha brindado su apoyo incondicional como amigo y hermano.

A mi novia Sandra, por la ayuda y apoyo que siempre me ha brindado, la paciencia, consejos y cariño constante que me ha arropado durante toda mi formación.

A mi directora de tesis, Dra. Laura Villarreal Martínez; gracias por el apoyo total, la paciencia y confianza que me brindo para realizar este proyecto de tesis.

A todos los profesores de hematología y hematología pediátrica quienes me brindaron sus conocimientos, consejos y experiencias para poder crecer de forma profesional, pero sobre todo crecer como mejor ser humano.

A mis compañeros de residencia que hicieron más amena la estancia durante esta etapa de formación y a quienes les deseo todo el éxito en sus metas.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo I

1. RESUMEN	1
------------------	---

Capítulo II

2. INTRODUCCIÓN	4
-----------------------	---

Capítulo III

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	8
-------------------------------------	---

Capítulo IV

4. JUSTIFICACIÓN	9
------------------------	---

Capítulo V

5. HIPÓTESIS ALTERNA Y NULA	10
-----------------------------------	----

Capítulo VI

6. OBJETIVOS	11
--------------------	----

Capítulo VII

7. MATERIAL Y METODOS	12
-----------------------------	----

Capítulo VIII

8. RESULTADOS	17
---------------------	----

Capítulo IX

9. DISCUSIÓN21

Capítulo X

10. CONCLUSIÓN25

Capítulo XI

11. ANEXOS27

Capítulo XII

12. BIBLIOGRAFÍA31

Capítulo XII

13. RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO34

CAPÍTULO I

RESUMEN

Antecedentes

La leucemia linfoblástica aguda es el cáncer más común en la infancia, con mayor incidencia en la edad de 3 a 5 años. La LLA es considerada la enfermedad pediátrica oncológica con mayor éxito en la historia; continuamente surgen nuevas terapias que han aumentado la sobrevida mayor a 95% en países desarrollados. Se ha logrado caracterizar a la enfermedad de acuerdo con su inmunofenotipo, citogenética, alteraciones moleculares y respuesta a tratamiento que son considerados como los más relevantes factores pronóstico. Recientemente ha crecido el interés de subclasificar la leucemia por su perfil proteómico que pueda contribuir a dar más información en una enfermedad muy heterogénea; y así poder establecer nuevas estrategias de tratamiento de acuerdo con factores pronóstico y el desarrollo de terapias blanco que beneficiarían a todos los pacientes con LLA.

Material y métodos

Se trata de un estudio prospectivo, observacional y descriptivo donde se incluyeron pacientes en edad de 0 a 16 años con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda células B. Como objetivo general determinar el patrón de expresión del proteoma de superficie celular en niños con diagnóstico de LLA y su relación con sobrevida. Se incluyeron pacientes de reciente diagnóstico de LLA-B en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González” que participaron en el

protocolo “Análisis proteómico de antígenos de superficie asociados con leucemia linfoblástica aguda tipo B para desarrollo de estrategias diagnósticas, pronóstica y/o terapéuticas de la enfermedad” (HE18-00012). Estudio de casos y controles, longitudinal y prospectivo donde se obtenían 3 muestras sanguíneas de médula ósea o sangre periférica (momento del diagnóstico, día 7 y al mes de iniciado el tratamiento); de las muestras sanguíneas se determinó inmunofenotipo, citogenética, panel molecular y el perfil proteómico mediante método MALDI-TOF-MS. Se incluyeron variables como edad, sexo, respuesta a esteroides, citogenética, panel molecular, inmunofenotipo, riesgo de clasificación, terapia empleada, enfermedad mínima residual, eventos secundarios y/o adversos, eventos de morbilidad durante el curso de enfermedad, recaída y caracterización de perfil proteómico. El seguimiento de los pacientes fue de 2 años desde el diagnóstico.

Resultados

La mayoría de los pacientes se catalogaban en riesgo intermedio o alto (87.4% total) se observa que el 87.5% de los sujetos incluidos tienen una EMRE negativa posterior a la inducción; el 73% de los casos presentó alteraciones moleculares. 43.7% con ETV6-RUNX1, el 43.8% con citogenética anormal, la mayoría presentaron buena respuesta a esteroides y con cuenta de linfocitos menor de 20 000 K/uL al diagnóstico

El 75% de los sujetos incluidos se encuentra vivo a 2 años de tratamiento, solo presentando 2 pacientes recaída o enfermedad refractaria quienes posteriormente fallecieron en cuidados paliativos por enfermedad de base.

Se observaron resultados heterogéneos en el perfil proteómico identificado diferentes grados de expresión proteica; en el mapa de calor de comparación de control vs casos de sangre periférica se encontró diferente expresión, comparado con el grupo control, de proteínas relevantes como inhibidor serpina peptidasa clase A miembro 5 (SERPINA5), profilina-1 (PFN1), Insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP3), cofilina-1 (CFL1), timosina Beta 4 (TMSB4X), peptidil-prolil isomerasa A (PPIA), tubulina alfa1 (TUBA1), beta 2 microglobulina (B2M) e inmunoglobulinas alfa, kappa, lambda y kappa además de complemento 4 (C4). En comparación de los controles vs casos de médula ósea se observaron proteínas similares a sangre periférica, agregándose haptoglobina, factor 13 alfa 1 (F13A1), componente amiloide P sérico (APCS), proteína pro-plaqueta básica (PPBP) y amiloide sérico A2 (SAA2); proteínas involucradas en patogénesis de LLA.

Se pudo observar que la mayoría de los sujetos presentaron muy buena respuesta a tratamiento, con buena respuesta a esteroides en 81.2% y EMRE negativa posterior a la inducción en 87.5%; con una sobrevida de 75% a 2 años, de los cuales el 50% de los pacientes se encuentran en vigilancia y sin tratamiento.

Conclusiones

Proteínas involucradas en oncogénesis, apoptosis y estabilidad del citoesqueleto se encontraron subexpresadas en un grupo de pacientes mexicanos con LLA de moderado a alto riesgo, los cuales tuvieron una sobrevida del 75% a dos años. Se requiere evaluar la relación que pudiera haber entre los factores de

pronóstico tradicionales presentes en nuestros pacientes y la respuesta al tratamiento y la sobrevida encontrada.

Es necesario continuar con este tipo de estudios prospectivos y controlados en nuestra población que ayuden a determinar la relación de proteínas de superficie y la sobrevida en estos pacientes quienes en un futuro pudieran beneficiarse protocolos y terapias individualizadas.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es una transformación maligna y proliferación de células progenitoras linfoides en la médula ósea, sangre periférica y sitios extramedulares. La incidencia de la LLA tiene una distribución bimodal, con un pico en la infancia y segundo pico alrededor de la edad de 50 años. [1]

La LLA es el cáncer más común en los niños y una de las causas más frecuentes de muerte por cáncer antes de los 20 años. Se estima en los Estados Unidos 30 casos por millón de personas menores de 20 años, con mayor incidencia entre la edad de 3 a 5 años, la incidencia varía dependiendo de la raza y grupo étnico, en población hispana la incidencia reportada es de 40.9 casos por millón; siendo más frecuente en varones que mujeres con una relación 55% a 45% respectivamente. [2,3]

Actualmente múltiples factores genéticos (ej. Síndrome de Down), variantes polimórficas de algunos genes, mutaciones germinales son asociados con un incremento en el riesgo de presentar LLA, pero la mayoría de los pacientes no se identifica algún factor desencadenante; muy pocos factores ambientales han sido asociados con LLA como la radiación, exposición a químicos e infecciones virales. [2]

La LLA se divide en 3 subtipos; B linfoblástica, T linfoblástica y leucemia Burkitt, en la actualidad la LLA se estratifica en riesgos dependiendo de la cuenta

de leucocitos al diagnóstico, inmunofenotipo, citogenética, involucro a sistema nervioso central (SNC), respuesta a tratamiento con esteroides y enfermedad mínima residual (EMRE) que son factores pronóstico de la enfermedad y además permite determinar el régimen de tratamiento a seguir además de considerar la opción terapéutica del trasplante de células hematopoyéticas. [2]

El tratamiento de quimioterapia combinada adaptada a riesgos, profilaxis efectiva de SNC, la introducción de nuevos fármacos como los anticuerpos monoclonales y el trasplante de células hematopoyéticas han aumentado la tasa de remisión y la sobrevida, reportándose en países industrializados la tasa de sobrevida entre 80-90%. En México la sobrevida y eventos libre de enfermedad a 5 años es reportada en 63% y 52% respectivamente. [1-5]

La LLA ha sido considerada la enfermedad pediátrica oncológica con mayor éxito en la historia, sin embargo, siguen surgiendo nuevas terapias prometedoras con toxicidad reducida. A causa de la gran diversidad de alteraciones genéticas y moleculares que ocurren en la LLA es poco probable que exista un agente que sea efectivo para todos los pacientes, ahora con la habilidad de caracterizar la enfermedad de acuerdo al inmunofenotipo y citogenética es posible el uso de terapias dirigidas, sin embargo, se anticipa que en los siguiente años con el estudio molecular, genómico y biológico de la LLA sea completamente descrito y pueda ser posible alcanzar tasas de curación cercanas al 100%. [1]

Recientemente ha crecido el interés de varios grupos de subclasificar la leucemia aguda de acuerdo con perfiles proteómicos que puedan contribuir a la

heterogeneidad de la enfermedad, factores pronósticos como determinar el comportamiento de diferentes tipos de leucemia y que pueda ser asociado a alteración en el proteoma. La determinación de proteoma ha sido aplicada en distintas enfermedades oncológicas como cáncer de colon, mama, estómago, hígado y vejiga. [6,7]

En 2004, Cui JW et al, se hace referencia a una definición molecular de la leucemia que pudiera desarrollar una mejor clasificación con el análisis proteómico de distintos perfiles de proteínas. En este estudio se realizó el análisis de médula ósea de pacientes con reciente diagnóstico de leucemia aguda identificando las proteínas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry). Observaron diferencia de proteínas entre células blancas normales y células leucémicas, además de la marcada expresión de proteínas que se correlacionan con algunos tipos y subtipos de leucemia entre linaje mieloide y linfoide. En posteriores estudios se confirma la diferencia entre la expresión de proteínas en niños sanos y con LLA [6, 10]

En otro estudio en 2005 mediante SELDI-TOF-MS (Surface-enhanced laser desorption/ionization-time-of-flight-mass spectrometry) se identifica en diferentes tipos de leucemia la expresión C-terminal de la ubiquitina, una proteína universal crucial en el proceso celular, siendo más pronunciada su expresión en LLA con translocación 12;21 y alta hiperdiploidía. [7]

Posteriormente al identificar proteínas asociadas a LLA se han realizado diversos estudios correlacionando el perfil proteómico con la respuesta a

tratamiento con esteroides, resistencia a diversos fármacos y recaídas. Se ha logrado identificar proteínas como PCNA que tiene relación con la resistencia a esteroides siendo un biomarcador prometedor para la estratificación de riesgo en pacientes con LLA. En 2013, Broudaki et al. identifican proteínas que pudieran ser reguladoras entre pacientes de bajo y alto riesgo; proteínas como CLUS, CERU, APOE, APOA4, APOA1, GELS, S10A9, AMBP, ACTB, CATA y AFAM, además de observar que no existe relación entre las señales proteicas en bajo y alto riesgo con las anomalías citogenéticas. [8, 9]

La oncoproteómica ha sido una importante innovación para el diagnóstico temprano y tratamiento dirigido en LLA. Se han observado en la literatura múltiples descubrimientos del perfil proteómico en LLA, sin embargo, no se ha identificado el total de biomarcadores proteómicos reales en LLA, en especial biomarcadores para recaídas y resistencia a tratamiento. La medicina individualizada es un concepto nuevo que se ha desarrollado durante la última década. El aporte de nueva información de proteómica podría ayudar a establecer protocolos homogéneos, el desarrollo de nuevas e innovadoras estrategias terapéuticas del cual se beneficiarían todos los pacientes con LLA. [11, 12].

CAPÍTULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La clasificación, tratamiento y monitoreo de la leucemia linfoblástica aguda de células B se realiza con la determinación de alteraciones genéticas, inmunofenotipo y la respuesta a tratamiento que actualmente son considerados marcadores aislado que predicen el curso de la enfermedad, pero no es suficiente para un fenotipo global de la enfermedad.

El análisis del proteoma de superficie celular pudiera ser una herramienta útil para el desarrollo de terapias y seguimiento, así como implicar un factor pronóstico en niños con LLA.

La población de nuestro hospital y en general la población mexicana no cuenta con un estudio relacionado con el patrón de expresión del proteoma de superficie celular en LLA.

CAPÍTULO IV

JUSTIFICACIÓN

La leucemia linfoblástica aguda de células B es la neoplasia más frecuente en la infancia siendo la tasa de supervivencia menor, en países en vías de desarrollo. Actualmente la clasificación de riesgo para respuesta a tratamiento y/o recaída de leucemia linfoblástica aguda se basa de acuerdo con el curso clínico, análisis citogenético y de antígenos de superficie que determinan el esquema terapéutico que pudiera impactar de forma positiva en la sobrevida de estos pacientes.

El identificar las bases patológicas en relación con el proteoma de superficie expresado por estas células sería de utilidad diagnóstica y pronóstica al adicionar nuevas herramientas para estratificar riesgos y uso de nuevas estrategias terapéuticas que resultaría en un beneficio disponible para los pacientes.

El determinar el patrón de expresión del proteoma de antígenos de superficie y su relación con sobrevida de nuestra población ayudaría a incrementar la información muy limitada que existe actualmente en niños con leucemia linfoblástica aguda de células B.

CAPÍTULO V

HIPÓTESIS ALTERNA

El proteoma de antígenos de superficie de leucemia linfoblástica aguda de células

B en niños tiene un valor pronóstico de sobrevida.

HIPÓTESIS NULA

El proteoma de antígenos de superficie de leucemia linfoblástica aguda de células

B en niños no tiene un valor pronóstico de sobrevida.

CAPÍTULO VI

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la relación del proteoma de superficie celular con sobrevida en niños con leucemia linfoblástica aguda de células B.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar variables de citogenética, inmunofenotipo y respuesta a tratamiento con relación al proteoma de superficie celular.
- Describir el patrón de expresión del proteoma de superficie celular en niños con leucemia linfoblástica aguda de células B.
- Analizar eventos secundarios o adversos durante el curso de la enfermedad en relación con el perfil proteómico.

CAPÍTULO VII

MATERIALES Y METODOS

Tipo de estudio

Estudio prospectivo, observacional y descriptivo.

Universo de trabajo

Pacientes pediátricos con diagnóstico reciente de leucemia linfoblástica aguda de células B del Servicio de Hematología Pediátrica del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”

Criterios de inclusión

- Pacientes en edad de 0 – 16 años, sexo indistinto.
- Pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B incluidos en el protocolo “Análisis proteómico de antígenos de superficie asociados con leucemia linfoblástica aguda tipo B para desarrollo de estrategias diagnósticas, pronóstica y/o terapéuticas de la enfermedad” (HE18-00012)
- Pacientes con registro de perfil proteómico realizado durante el estudio previo.
- No tratamiento previo
- No enfermedades genéticas que predispongan a leucemia.

Criterios de exclusión

- Enfermedad crónica concomitante al diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B

Criterios de eliminación

- Registros y expedientes incompletos.

Proceso de captura de sujetos

Se incluyeron los resultados del perfil proteómico, citogenética e inmunofenotipo de 16 pacientes con reciente diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda de células B que se incluyeron en el protocolo “Análisis proteómico de antígenos de superficie asociados con leucemia linfoblástica aguda tipo B para desarrollo de estrategias diagnósticas, pronóstica y/o terapéuticas de la enfermedad” (HE18-00012).

Variables principales por estudiar

- Edad
- Sexo
- Somatometría (Talla, peso, índice de masa corporal)
- Fecha de diagnóstico
- Respuesta a esteroides al día 7
- Citogenética, panel molecular, inmunofenotipo
- Riesgo de clasificación
- Terapia empleada

- Enfermedad mínima residual al día 36 (EMRE)
- Eventos secundarios y/o adversos a medicamentos
- Eventos de morbilidad durante el curso de enfermedad.
- Perfil proteómico

Se realizó la captura los resultados del perfil proteómico, inmunofenotipo, citogenética de 16 de 40 pacientes previstos en el protocolo con diagnóstico de LLA que se incluyeron en el proyecto “Análisis proteómico de antígenos de superficie asociados con leucemia linfoblástica aguda tipo B para desarrollo de estrategias diagnósticas, pronóstica y/o terapéuticas de la enfermedad” (HE18-00012). El estudio previamente mencionado consiste en un estudio de casos y controles, longitudinal y prospectivo, la población prevista a estudiar fue de 40 pacientes con reciente diagnóstico de LLA B, sin tratamiento y 40 sujetos sanos, con reclutamiento de pacientes en las instalaciones del servicio de Hematología, del Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”. Se obtuvieron 3 muestras sanguíneas de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) al momento del diagnóstico, día 7 y al mes de iniciado el tratamiento; de las muestras sanguíneas se determinó inmunofenotipo, citogenética, panel molecular y la determinación del perfil proteómico que se realizó por espectrometría de masas (MALDI-TOF-MS).

Durante la captura de los sujetos se utilizaron los datos que se registran de manera rutinaria en el servicio de hematología en una base de datos de Excel, se incluyeron las siguientes variables: edad, sexo, somatometría, fecha de diagnóstico, respuesta a esteroides al día 7 de inicio del tratamiento, citogenética, panel molecular e inmunofenotipo, clasificación de riesgo pronóstico, terapia empleada

como el uso de anticuerpos monoclonales, enfermedad mínima residual al día 36 de iniciar tratamiento, eventos secundarios y/o adversos a medicamentos, eventos de morbilidad durante el curso de enfermedad, recaída y la caracterización del perfil proteómico.

Los criterios utilizados para valorar respuesta a tratamiento fueron los siguientes: buena respuesta a esteroides que se define como la presencia de menos de 1000 blastos en frotis de sangre periférica (FSP) al día 7 de tratamiento de inducción a remisión; como enfermedad mínima residual (EMRE) negativa con presencia $<0.01\%$ de blastos y positiva con $>0.01\%$ de blastos en la muestra medida por citometría de flujo.

La clasificación de riesgo fue de acuerdo al protocolo institucional; riesgo bajo en pacientes con edad de 1 a 6 años, $<20\ 000$ K/uL leucocitos al diagnóstico y EMRE negativa al término de inducción; riesgo intermedio comprende edad >6 años, $>20\ 000$ K/uL leucocitos al diagnóstico y EMRE negativa al finalizar inducción y riesgo alto pacientes con mala respuesta a esteroides (>1000 blastos en FSP), hiperleucocitosis ($>100\ 000$ K/uL leucocitos al diagnóstico), citogenética o panel molecular de riesgo alto reportadas en la literatura, infiltración a sistema nervioso central (SNC3) y EMRE positiva al final de inducción a remisión.

El protocolo de tratamiento empleado fue el protocolo institucional adaptando el esquema de quimioterapia en base a clasificación de riesgo de enfermedad.

Se incluyeron 16 pacientes que completaron el estudio en el protocolo base y seguimiento en un tiempo de 2 años desde el diagnóstico. En relación con los

datos obtenidos se determinó la incidencia de perfil proteómico; se analizaron las variables de la base de datos y su asociación entre perfiles proteómicos de antígenos de superficie, así como los eventos secundarios o adversos en relación con el perfil proteómico como objetivos secundarios.

La información de los pacientes utilizada se reveló sólo para las actividades y operaciones que estuvieron relacionadas con el protocolo de investigación, así como en circunstancias limitadas, como cuando fuera requerido por ley. El uso y revelación de datos sobre los pacientes se limitó al estándar del "mínimo necesario" y fue utilizada solo por los investigadores relacionados con el protocolo de investigación. Otros usos y revelaciones de la información de los pacientes, no ocurrió a menos que los tutores haya dado su consentimiento.

Se realizó análisis descriptivo de las variables demográficas y clínicas. Se utilizaron medidas de tendencia central y dispersión según correspondía para variables numéricas y continuas. El análisis de grupos se realizó usando prueba de Chi cuadrada y T student para variables dicotómicas, prueba de Mann Whitney para variables paramétricas y prueba de T student para variables numéricas continuas. Las pruebas de normalidad se realizaron con una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Se consideró $p < 0.5$ como significativa, se utilizó SPSS 20.0 para el análisis estadístico. La asociación entre perfiles proteómicos y respuesta a tratamiento y sobrevida se pretendió realizar mediante curvas de sobrevivencia (Kaplan Meier).

CAPÍTULO VIII

RESULTADOS

Se incluyó un total de 40 pacientes de los cuales solo 16 completaron los criterios de inclusión. Diez (62.5%) de sexo masculino y seis (37.5%) femeninos.

[Tabla 1]

La edad media al momento del diagnóstico fue de 6.3 años con un rango de 1 a 11 años, el diagnóstico más común correspondió a LLA B con 14 pacientes (87.5%), el resto corresponde a LLA pro B y un paciente con LLA B Ph+. [Tabla 1]

A todos los pacientes se les realizó un panel agudo de leucemia por citometría de flujo; el estudio citogenético reportó normal en 9 pacientes (56.2%) al diagnóstico y el resto anormal (7, 43.7%) incluyendo alteraciones como hiperdiploidía en 2 pacientes, translocación 4;11 en 2 pacientes, citogenética compleja, translocación 17;19, translocación 4,12 y delección del cromosoma 9 se identificó en 1 paciente respectivamente; de los 7 pacientes con citogenética anormal, 5 presentaron citogenética normal al finalizar la inducción a remisión; 2 pacientes persistieron con la misma alteración detectada desde el diagnóstico.

[Tabla 1]

En el 75% de los casos se obtuvo un resultado molecular. La alteración más frecuente fue ETV6-RUNX1 en 7 pacientes (43.7%); en tres reportaron KMT2A/AFF1, TCF3-HLF y TCF3-PBX1, solo en uno se identificó la presencia de

BCR/ABL. En 4 (25%) no se detectó alteración molecular; uno no se puede analizar por ser muestra inadecuada. [Tabla 1]

El número de leucocitos al diagnóstico prevaleció en su mayoría menor a 20 000 K/uL (56.2%), el resto con más de 20 000 leucocitos K/uL, correspondiendo a solo 2 con hiperleucocitosis mayor a 100 000 K/uL, de los 16 pacientes analizados ninguno presentó síndrome de lisis tumoral; así como ninguno presentó infiltración a SNC. [Tabla 1]

La mayoría de los pacientes se clasificaron con riesgo intermedio y alto en 87.4%, el resto como riesgo bajo riesgo de acuerdo con los criterios del centro.

La respuesta a tratamiento se clasificó en base a la respuesta a esteroides y enfermedad mínima residual (EMRE) al terminar la inducción a remisión, se observó que la mayoría de los pacientes presentaron buena respuesta a esteroides en 81.2% y 87.5% con EMRE negativa, de los 2 pacientes que presentaron EMRE positiva al término de la inducción. Uno de los pacientes presentando desde el diagnóstico hiperleucocitosis, mala respuesta a esteroides y enfermedad refractaria a tratamiento quien posterior presentaría recaída aislada a médula ósea y SNC posterior a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) y fallecimiento secundario a enfermedad. Catorce pacientes no presentaron recaída durante el periodo de 2 años que se dio el seguimiento, solo 1 paciente presentó recaída mixta muy temprana a MO y SNC quien posterior falleciera en cuidados paliativos por enfermedad refractaria a 2da y 3er línea de tratamiento. [Tabla 2]

Los eventos adversos descritos en nuestra población fueron muy heterogéneos reportando trombosis secundaria a L-asparaginasa en 2 niños con localización en extremidades en uno de los sujetos y el otro presentando ataque isquémico transitorio; los efectos de pancreatitis aguda, convulsiones, neuropatía periférica y toxicidad hepática fueron de los otros reportados, aunque en solo se presentaron en 1 paciente cada uno. [Tabla 2]

Actualmente se encuentran en vigilancia la mitad de la población estudiada, seguido de 4 (25%) quienes se encuentran en etapa de mantenimiento; solo uno de los sujetos se realizó TPH haploidéntico y uno de riesgo alto por translocación 17;19 abandonó tratamiento durante la etapa de mantenimiento intermedio; 2 pacientes fallecieron quienes previamente se describió las causas. [Tabla 2]

La determinación del perfil proteómico identificado en los pacientes se tomaron solo resultados del diagnóstico en ambas muestras de sangre periférica (SP) o médula ósea (MO) y fueron comparados los resultados con grupo control de sujetos sanos incluidos en un protocolo previo; se determinó mediante normalización de los datos proyectándolos en mapas de calor con las proteínas de mayor relevancia con diferencia significativa de 10 “folds”. [Gráficos 1 y 2]

Se observaron resultados heterogéneos en el perfil proteómico identificado diferentes grados de expresión proteica; en el mapa de calor de comparación de muestras de sangre periférica de controles vs casos de sangre, se observó subexpresión de proteínas relevantes como inhibidor serpina peptidasa clase A miembro 5 (SERPINA5), profilina-1 (PFN1), Insulin-like growth factor-binding protein

3 (IGFBP3), cofilina-1 (CFL1), timosina Beta 4 (TMSB4X), peptidil-prolil isomerasa A (PPIA), tubulina alfa1 (TUBA1), beta 2 microglobulina (B2M) e inmunoglobulinas alfa, kappa, lambda y kappa además de complemento 4 (C4). [Gráfico 1]

La comparación de muestras de médula ósea entre los controles y los casos arrojó proteínas similares a sangre periférica, además de haptoglobina, factor 13 alfa 1 (F13A1), componente amiloide P sérico (APCS), proteína pro-plaqueta básica (PPBP) y amiloide sérico A2 (SAA2) [Gráfico 2]. La función de las proteínas, su gen y asociación con patologías se muestra en la tabla 3.

En la población estudiada se pudo observar que la mayoría de los sujetos (81.2%) presentaron muy buena respuesta al tratamiento con esteroides y EMRE negativa posterior a la inducción en 87.5%; con una sobrevida a 2 años de 75%, de los cuales el 50% de los pacientes se encuentran en vigilancia y sin tratamiento.

CAPÍTULO IX

DISCUSIÓN

En la actualidad la LLA al ser el cáncer infantil con mayor prevalencia en el mundo se ha beneficiado de grandes avances científicos relacionados con tratamiento e incremento en las tasas de sobrevida en las últimas décadas. Se reconoce que el clasificar a los pacientes en diferentes grados ayuda a identificar que niños requerirán tratamiento más intensivo o que presentarán un curso de enfermedad no favorable, realizándose diferentes protocolos estratificados de tratamiento en los diferentes centros hemato – oncológicos del mundo y de nuestro país.

En recientes años ha incrementado el interés de refinar la clasificación de riesgo de los niños con LLA a través de identificación de alteraciones moleculares, genéticas y del perfil proteómico. Diversos estudios han analizado el perfil proteómico de diferentes enfermedades malignas hematológicas con el fin de identificar la presencia de proteínas que pudieran indicar cambio en la clasificación de riesgo.

Diferentes grados de expresión de proteínas se han encontrado en LLA, sin embargo, en los diferentes estudios no han compartido resultados similares de expresión de ciertas proteínas, eso se explica por el método y sensibilidad de análisis de espectrometría de masas, la población estudiada e incluso variables como la etnia o raza.

En el presente estudio se encontraron 16 proteínas diferencialmente subexpresadas en los pacientes con LLA comparadas con el grupo control, 10 en ambas muestras de tejidos analizados y 6 solo en sangre periférica.

Las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas relevantes identificadas en nuestro estudio así como la sobre o subexpresión de las mismas han sido relacionadas con la arquitectura de citoesqueleto y con diversas funciones como regulación del sistema inmune, apoptosis, estabilización de filamentos del citoesqueleto, síntesis DNA e interacción con la mitosis, procesos que se han asociado a oncogénesis.

Esta descrito que las proteínas involucradas en las vías de citoesqueleto como la profilina-1, cofilina-1, tubulina alfa 1 y timosina beta 4 están alteradas en diferentes tipos de cáncer y tienen un rol importante en el control y proliferación de células neoplásicas; como ejemplos están los filamentos intermedios que son estructuras presentes en el núcleo y citoplasma que participan en sitios de unión celular como keratina, vimetina y neurofilamentos, los cuales pueden mostrar diferentes patrones de expresión en cáncer de origen epitelial; los microfilamentos como moléculas de actina están involucradas en proliferación, migración y diferenciación; se ha se ha observado que diferentes mutaciones en genes relacionados con la estabilidad de los microtúbulos durante la división celular permitiendo un crecimiento no controlado de células mitóticas [13].

Las proteínas como actina y tubulina alfa/beta tienen un rol importante pues las mutaciones presentes en su estructura puede traducirse en resistencia a

quimioterapéuticos dirigidos contra los microtúbulos tales como los alcaloides de la vinca (ej. Vincristina, vinblastina), ampliamente utilizados de primera línea para tratamiento de LLA; esto generando mayor énfasis en identificar la relación entre las vías metabólicas de las proteínas involucradas en microtúbulos y la resistencia a estos fármacos [14]. En nuestro estudio estas proteínas involucradas en el citoesqueleto y en procesos dinámicos de actina se encontraron subexpresadas, lo cual pudiera estar relacionado con la buena sobrevida y respuesta al tratamiento encontradas en nuestros pacientes, sin embargo, es necesario hacer otro tipo de estudios para corroborar dicha asociación.

La proteína timosina beta 4 se ha descrito desde 1987 en estudio realizado por Gondo et al, su relación con leucemia aguda aislándose en ADN citoplasmático de leucocitos de sangre periférica de un paciente con mencionado diagnóstico, en dicho estudio estudiaron la expresión de timosina beta 4 en células mieloides y linfoides malignas encontrando un patrón que sugiere puede estar involucrado en fases tempranas de mecanismos inmunes [15].

Las vías de señalización de proteínas de crecimiento como el factor de crecimiento tipo insulina (IGF) se han asociado a tener un rol en la proliferación de diferentes tipos de tumores. Los niveles séricos bajos de proteínas Insulin-like growth factor-binding protein 2 y 3 (IGFBP 2 -3) e IGF2 se encontró que están directamente relacionado con crecimiento celular alterado demostrando su implicación en la proliferación de blastos linfoides en niños con LLA [16].

Alteraciones en la expresión de IGF-I, IGF-II, IGFBP-5 se han observado en pacientes con LLA en estudios posteriores, se ha demostrado que los linfoblastos tipo B tienen más relación con proteína IGF-II e IGFBP3, en comparación con linfoblastos T de los cuales es más común diferente expresión proteica en IGFBP-2 e IGBP-5 [17]. Se ha estudiado este tipo de proteínas en pacientes con LLA con rearrreglos MLL (mixed lineage leukemia) que implica una enfermedad de alto riesgo y pobre pronóstico encontrando resultados que sugieren participan en puntos críticos en los diferentes mecanismos patogénicos con este rearrreglo de alto riesgo generando una potencial terapia dirigida a este tipo de proteínas [18]. En nuestra población se observaron en ambas muestras de MO y SP subexpresión en diferentes grados de IGBP3 que sugiere estar relacionado con la respuesta en nuestros pacientes.

Se ha identificado un desbalance en la acción de linfocitos T en su interacción con cambios de expresión proteica en pacientes con enfermedades linfoproliferativas tipo B. En estos pacientes se han descrito proteínas que se unen a actina como cofilina-1, profilina-1 y coronina-1A, complejos capaces de generar un desbalance en linfocitos T periféricos a través de reorganización del citoesqueleto, alterando la función efectora de estos en pacientes con enfermedades malignas linfoides tipo B [19]. Esta descrito en otros estudios la actividad inhibitoria de tumor de la proteína profilina-1 y que su alteración al unirse a otras proteínas como la exportina-6 (XPO6) generan una importante y frecuente desregulación en la proliferación de células cancerígenas [20].

Gang Xu, determinó en su estudio diferente expresión de proteínas en niños con LLA de alto riesgo en comparación con bajo o mediano riesgo, logró identificar 86 proteínas diferentes en niños con alto riesgo y 54 proteínas con mayor expresión en LLA que no se detectaron en los controles de niños sanos. De estas 54 proteínas en nuestro estudio se identificaron proteínas similares como SERPINA, tubulina y timosina alfa, sin embargo, en nuestros casos estaban subexpresadas. [21].

Los marcadores de riesgo tradicionales, que se utilizan para pronóstico y respuesta a tratamiento, en nuestra población de pacientes fueron controversiales. Mientras que el 87.4% de los pacientes se encontraban en las categorías de intermedio y alto riesgo, los parámetros moleculares y citogenéticos se asociaban a bajo riesgo, como la presencia del gen de fusión ETV6-RUNX1 en 43.7% y citogenética normal en el 56.2%. Por otro lado, el 87.5% de los pacientes tuvieron una EMRE negativa posterior a la inducción (buen pronóstico), lo que a la fecha es el marcador pronóstico con mayor valor, lo cual es coincidente con buena respuesta a esteroides y con una cuenta de linfocitos menor de 20 000 K/uL al diagnóstico, ambos factores de buen pronóstico.

A dos años del inicio del estudio, el 75% de los pacientes incluidos se encuentra vivo, solo dos pacientes presentaron recaída o enfermedad refractaria quienes posteriormente fallecieron con cuidados paliativos por enfermedad de base.

De demostrarse la relación de las proteínas subexpresadas con la buena respuesta a tratamiento y sobrevida de los pacientes, podrían ser utilizada como factores predictivos.

Una de las fortalezas del presente estudio es el poder contar con pruebas moleculares, citogenéticas, el proteoma de base y el seguimiento de los pacientes por dos años. Por otro lado, una debilidad de este es el número de pacientes. Es necesario ampliar a una mayor población para la reproducción de los resultados obtenidos.

CAPÍTULO X

CONCLUSIÓN

El estudio proteómico ha aumentado en los recientes años, en las enfermedades linfoproliferativas ha crecido el interés de tener biomarcadores más confiables y de mayor peso para establecer un diagnóstico, pronóstico y respuesta a tratamiento más específicos, agregando herramientas para un mejor entendimiento fisiopatológico desde la caracterización molecular y proteica generando información más detallada sobre la enfermedad, su pronóstico y terapias dirigidas potenciales.

El presente es el primer estudio del proteoma de pacientes con LLA mexicanos, en una cohorte con dos años de seguimiento, en donde se encontró la subexpresión de proteínas relacionadas con la proliferación celular, factores de crecimiento y de la respuesta inmune, reportados su asociación a neoplasias malignas sólidas y hematológicas.

Los parámetros de riesgo y sobrevida tradicionales fueron controversiales en esta población. El 87% de los pacientes tuvieron buena respuesta al tratamiento y están vivos actualmente. La asociación de las proteínas encontradas con la respuesta a tratamiento y sobrevida de los pacientes es motivo de una investigación posterior.

CAPÍTULO XI

ANEXOS

- Tabla 1

Tabla 1. Características demográficas (N=16)	
Variable	Resultado
Sexo, n, %	
Masculino	10 (62.5 %)
Femenino	6 (37.5 %)
Edad diagnóstico (años), m, rango	6.3 (1 – 11)
Diagnóstico, n, %	
LLA pro B	1 (6.2 %)
LLA B común	14 (87.5 %)
LLA B Ph+	1 (6.2 %)
Panel Agudo, n, %	16 (100%)
Citogenética, n, %	
Normal	9 (56.2 %)
Anormal	7 (43.7 %)
Panel molecular, n, %	
ETV6-RUNX1	7 (43.7 %)
TCF3-PBX1	1 (6.2 %)
KMT2A/AFF1	1 (6.2 %)
TCF3-HLF	1 (6.2 %)
BCR-ABL	1 (6.2 %)
RNA degradado	1 (6.2 %)
No detectado	4 (25 %)
Leucocitos (diagnóstico) K/uL, n, %	
20 000 – 100 000	5 (31.2 %)
>100 000	2 (12.5 %)
<20 000	9 (56.2 %)
Riesgo, n, %	
Alto	7 (43.7 %)
Intermedio	7 (43.7 %)
Bajo	2 (12.5 %)
Sistema Nervioso Central, %	
SNC1	12 (75 %)
SNC2	4 (25 %)
SNC3	0 (0 %)

- Tabla 2

Tabla 2. Respuesta a tratamiento	
Respuesta a esteroides, n, %	
Si	13 (81.2 %)
No	3 (18.7 %)
EMRE post inducción, n, %	
Positiva	2 (12.5 %)
Negativa	14 (87.5 %)
Población aberrante	0 (0 %)
Recaída, n, %	
SNC	0 (0 %)
Médula ósea	0 (0 %)
Testículo	0 (0 %)
Mixta	1 (6.2 %)
Refractario	1 (6.2 %)
Sin recaída	14 (81.2 %)
Tipo recaída, n, %	
Muy temprana	1 (6.2 %)
Temprana	0 (0 %)
Tardía	0 (0 %)
Postrasplante	1 (6.2 %)
Sin recaída	14 (87.5 %)
Seguimiento, n, %	
Muerto	2 (12.5 %)
Mantenimiento	4 (25 %)
Trasplante	1 (6.2 %)
Abandono de tratamiento	1 (6.2 %)
Vigilancia	8 (50 %)
Eventos, n, %	
Pancreatitis	1 (6.2 %)
Convulsiones / neurotoxicidad	1 (6.2 %)
Trombosis	2 (12.5 %)
Neuropatía	1 (6.2 %)
Alergia / Anafilaxia	0 (0 %)
Toxicidad hepática	1 (6.2 %)
Neumonía	1 (6.2 %)

Gráfico 1: Mapa de calor 1. Control vs Sangre periférica

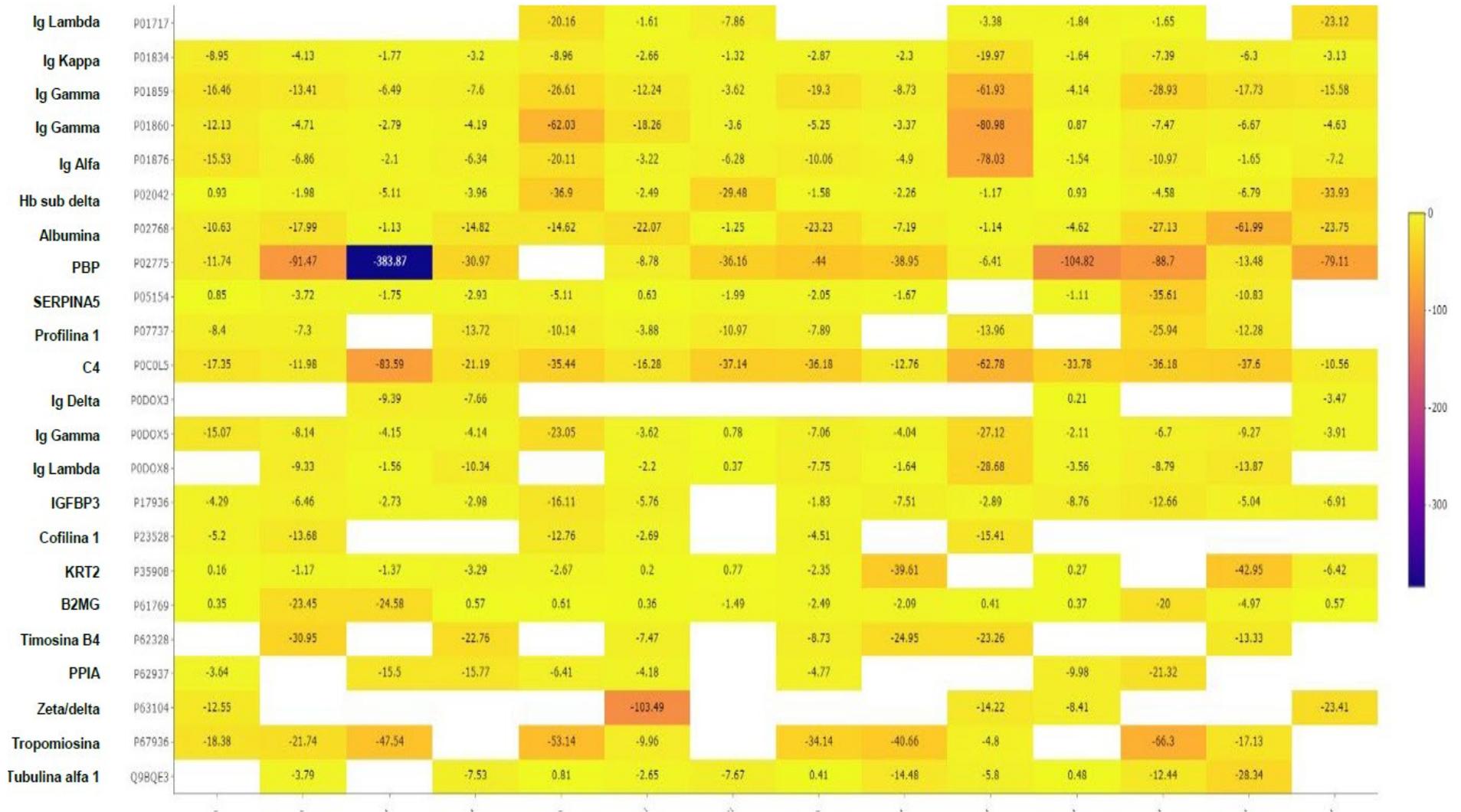


Gráfico 2: Mapa de calor 2. Control vs Médula ósea

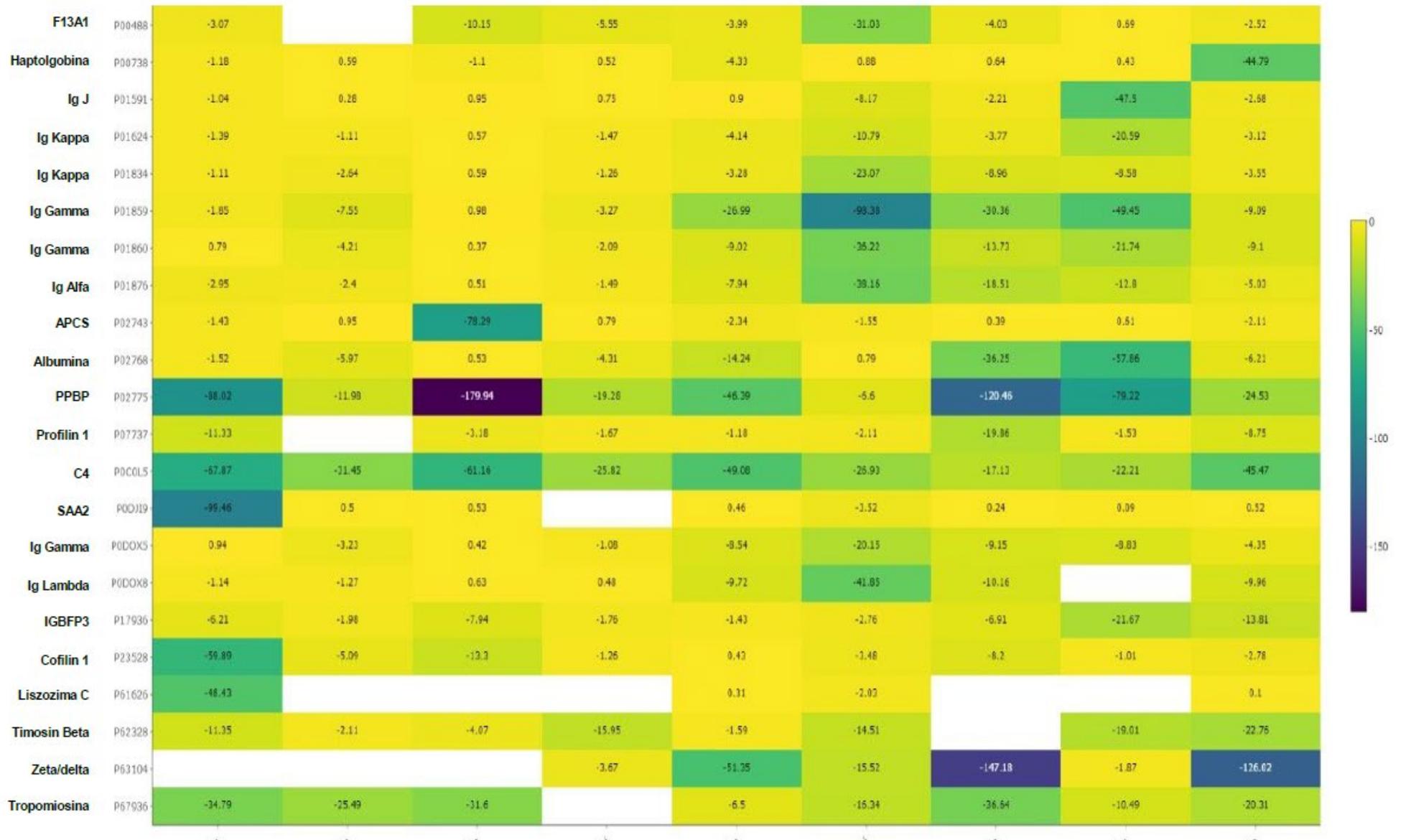


Tabla 3. Resumen proteínas

Proteína	Gen	Locus	Función	Patologías Asociadas	Expresión en este estudio
Serpin peptidase inhibitor, clade A, member 5 (protein C inhibitor)	<i>SERPINA5</i> , <i>PCI</i>	14q32.13	Inhibidor de activador de proteína C	Relacionado a diferentes tipos de cáncer y enfermedades cardiovasculares	SP
Profilin 1	<i>PFN 1</i>	17p13.2	Regulador del crecimiento de filamentos de actina	Regulación de respuesta inmune en monocitos, marcador pronóstico en cáncer renal.	MO / SP
Insulin-like growth factor-binding protein 3	<i>IGFBP3</i>	7p12.3	Estimula crecimiento celular, regulador de apoptosis	Angiogénesis, respuesta inmune, regulador apoptosis, marcador pronóstico en cáncer renal, hepático y colorrectal.	MO / SP
Cofilin-1 (CFL1)	<i>CFL1</i>	11q13.1	Regulación dinámica de actina, regulación de morfología celular y organización de citoesqueleto	Detectado en todo tipo de cáncer con baja especificidad. Marcador pronóstico en cáncer hepático.	MO / SP
Timosina Beta 4	<i>TMSB4X</i>	Xp22.2	Organización de citoesqueleto, participa con monómeros de actina	Regulación inmune, marcador pronóstico de cáncer renal.	MO / SP
Peptidil-prolil isomerase A	<i>PPIA</i>	7p13	Activación de células endoteliales y leucocitos; quimiotaxis y apoptosis, activación y agregación plaquetaria	Cáncer de mama, glioma, linfoma, colorrectal	SP
Tubulina alfa 1	<i>TUBA1</i>	12q13.12	Función en microtúbulos y citoesqueleto	Lisencefalia, marcador pronóstico cáncer	SP
Beta 2 microglobulina	<i>B2M</i>	15q21.1	Componente de complejo mayor de histocompatibilidad clase I, presentación de antígenos peptídicos al sistema inmune.	Amiloidosis, cáncer, regulación inmune (macrófagos, monocitos, NK)	SP
Haptoglobina	<i>HP</i>	16q22.2	Antioxidante, respuesta inmune aguda	Nefropatía diabética, enfermedad coronaria, enfermedad de Crohn, Parkinson, cáncer.	MO
Factor 13 alfa 1	<i>F13A1</i>	6p25.1	Estabilizador de coagulo de fibrina. Hemostasis	Alteraciones hemostasis, gen relacionado a cáncer,	MO
Componente amiloide P sérico	<i>APCS</i>	1q23.2	Interacción DNA e histonas, proteína chaperona, control degradación de cromatina, regulador de apoptosis	Cáncer hepático	MO

Proteína pro-plaqueta básica	PPBP	4q13.3	Síntesis DNA, interacción en mitosis	Marcador pronóstico cáncer cérvix, expresión célula mieloides (respuesta inmune), hemostasis	MO / SP
Amiloide sérico A2	SAA2	11p15.1	Reactante de fase aguda.	Amiloidosis, enfermedades inflamatorias crónicas, potencial marcador tumores.	
Tropomiosina	TPM1	15q22.2	Estabilización de filamentos de actina de citoesqueleto. Regulación de calcio y contracción muscular	Cáncer urotelial, cardiomiopatía	MO

CAPÍTULO XII

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Terwilliger T, Abdul-Hay, M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. *Blood Cancer Journal* (2017) 7, e577
- 2.- Hunger, SP et al. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med* 2015; 373:1541-52
- 3.- Lim JY, Bhatia S, Robison LL, Yang JJ. Genomics of racial and ethnic disparities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 2014; 120: 955-62.
- 4.- Jaime-Pérez et al. Results of Treating Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in a Low-middle Income Country: 10 Year Experience in Northeast Mexico. *Archives of Medical Research* 47 (2016) 668e676
- 5.- Jimenez-Hernandez E, Jaimes-Reyes EZ, Arellano-Galindo J, et al. Survival of Mexican children with acute lymphoblastic leukaemia under treatment with the protocol from the Dana-Farber Cancer Institute 00e01. *Biomed Res Int* 2015; 2015:576950.
- 6.- Cui JW, Wang J, He K, Jin BF, Wang HX, Li W et al. Proteomic analysis of human acute leukemia cells: insight into their classification. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 6887–6896
- 7.- Hegedus, CM. Proteomic analysis of childhood leukemia. *Leukemia* (2005) 19, 1713–1718

- 8.- Jiang, N. Identification of prognostic protein biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Journal of Proteomics* 7 4 (2011) 843 – 857.
- 9.- Braoudaki et al. Protein biomarkers distinguish between high- and low-risk pediatric acute lymphoblastic leukemia in a tissue specific manner. *Journal of Hematology & Oncology* 2013, 6:52
- 10.- Wang, D. et al. Differential protein analysis of lymphocytes between children with acute lymphoblastic leukemia and healthy children. *Leukemia & Lymphoma*, February 2013; 54(2): 381–386
- 11.- López-Villar et al. Application of oncoproteomics to aberrant signalling networks in changing the treatment paradigm in acute lymphoblastic leukaemia. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 19, No 1, 2015 pp. 46-52
- 12.- López-Villar et al. Proteomics-based discovery of biomarkers for paediatric acute lymphoblastic leukaemia: challenges and opportunities. *J. Cell. Mol. Med.* Vol 18, No 7, 2014 pp. 1239-1246
- 13.- Francis SL, Antonipillai J. Cytoskeletal Molecules Play a Major Role in Cancer Progression. *Insights Biomed.* 2017, 2:2.doi:10.21767/2572-5610.100009
- 14.- Verrills et al. Alterations in γ -Actin and Tubulin-Targeted Drug Resistance in Childhood Leukemia. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, Volume 98, Issue 19, 4 October 2006, Pages 1363–1374

- 15.- Gondo H, et al. Differential expression of the human thymosin-beta 4 gene in lymphocytes, macrophages, and granulocytes. *J Immunol* December 1, 1987, 139 (11) 3840-3848;
- 16.- Mohnike, K.L., Kluba, U., Mittler, U. et al. Serum levels of insulin-like growth factor-I,-II and insulin-like growth factor binding proteins-2 and-3 in children with acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Pediatr* 155, 81 (1996).
- 17.- Vorwerk P. et al, Expression of components of the IGF signalling system in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Mol Pathol*. 2002 Feb; 55(1): 40–45.
- 18.- Palaniachamy JK, et al. RNA-binding protein IGF2BP3 targeting of oncogenic transcripts promotes hematopoietic progenitor proliferation. *J Clin Invest*. 2016 Apr 1; 126(4): 1495–1511.
- 19.- Borro M. et al. Specific effects exerted by B-lymphoproliferative diseases on peripheral T-lymphocyte protein expression. 2010 *British Journal of Haematology*,150, 463–472
- 20.- Zhu, C et al. Cancer-associated exportin-6 upregulation inhibits the transcriptionally repressive and anticancer effects of nuclear profilin-1. *Cell Rep*. 2021 Feb 16; 34(7): 108749.
- 21.- Gang Xu, et al. Label-free quantitative proteomics reveals differentially expressed proteins in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia. *J J Proteomics* 2017 Jan 6;150:1-8.

CAPITULO XII

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Sergio Antonio Ramírez Cortinas

Candidato para el Grado de Especialista en Hematología pediátrica

Tesis: “Análisis proteómico de antígenos de superficie y su asociación con sobrevida en niños con leucemia linfoblástica aguda B”

Campo de estudio: Ciencias de Salud / Hematología pediátrica

Biografía:

Datos personales: Nacido en San Pedro, Coahuila el 23 de enero de 1989. Hijo de Sergio Antonio Ramírez Reyes y María Guadalupe Cortinas Agüero.

Educación: Egresado de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido de Médico Cirujano y Partero en 2014

Especialidad en pediatría, residencia médica realizada en el Hospital Universitario “Dr. José Eleuterio González”, grado obtenido en 2019.