

Caracterización molecular en leucemia linfoblástica aguda pediátrica en una institución hospitalaria

Alonso, Cristina N.; Gallego, Marta S.; Alfaro, Elizabeth M.; Rossi, Jorge G.; Felice, María S.

Hospital Nacional de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"
Combate de los Pozos 1881, Buenos Aires, CP 1245. TE: 4308-4300

Trabajo premiado en el XVII Congreso Argentino de Hematología,
60º Aniversario de la SAH - III Congreso Internacional de Citometría de Flujo -
VIII Jornadas Científicas del Grupo Rioplatense de Citometría de Flujo

Fecha de recepción: 15/10/05

Fecha de aceptación: 5/11/05



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGIA, Vol. 10 Nº 1: 8-12
Enero-Abril, 2006

RESUMEN

Si bien los rearrreglos moleculares y alteraciones citogenéticas se encuentran entre los factores pronósticos de mayor relevancia en leucemia linfoblástica aguda (LLA) pediátrica, en Argentina el acceso a estas determinaciones se encuentra limitado en el ámbito hospitalario. Las alteraciones genéticas más frecuentes en esta patología son TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL y MLL-AF4. La detección de estos rearrreglos por RT-PCR ofrece gran sensibilidad, siendo especialmente importante en translocaciones crípticas (como TEL-AML1), sólo detectables por técnicas moleculares (PCR ó FISH). Entre Diciembre-02 y Septiembre-05 ingresaron en el Hospital de Pediatría Garrahan 151 niños (M:84/F:67) con diagnóstico de LLA. De ellos, 136 fueron mayores y 15 menores de un año de edad. La búsqueda por RT-PCR de los 4 rearrreglos mencionados se realizó en 129/151 pacientes (85,4%).

El ARN de células mononucleares de la muestra diagnóstica fue retrotranscripto utilizando hexámeros al azar, y se realizaron las PCR correspondientes a cada rearrreglo utilizando los primers y las condiciones descritos en el protocolo BIOMED-1. Los resultados fueron los siguientes: TEL-AML1: 15(11,6%); E2A-PBX1: 5(3,9%); MLL-AF4: 11(8,5%); BCR-ABL: 2(1,6%); negativo para los 4 rearrreglos: 92(71,3%); positivo para otros rearrreglos: 4(3,1%). El estudio molecular confirmó la caracterización citogenética convencional (CC) en 11 casos y la amplió en otros 22: 15 TEL-AML1, 1 E2A-PBX1, 5 MLL-AF4 y 1 BCR-ABL. Sólo una t(1;19) observada por CC no demostró el rearrreglo E2A-PBX1 característico. En conclusión, el diagnóstico molecular de LLA aumenta la detección de anomalías contribuyendo a una mejor caracterización de las leucemias. Su incorporación y estandarización en el ámbito público son fundamentales para optimizar la estratificación de los pacientes de acuerdo al grupo de riesgo con la consiguiente adecuación del tratamiento.

Palabras claves: leucemia linfoblástica aguda, pediatría, diagnóstico molecular, pronóstico.

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en pediatría. El Hospital de Pe-

diatría Garrahan (HPG) recibe en promedio unos 70 nuevos casos por año, y ha aplicado desde su apertura distintos protocolos de tratamiento para LLA con resultados comparables a los de centros internacionalmente reconocidos¹⁻³. Las distintas alteraciones genético-moleculares le confieren a esta entidad aparentemente única diferentes formas de presentación y respuesta al tratamiento, que reflejan su diversidad biológica. La probabilidad de sobrevida libre de eventos (pSLE) en LLA pediátrica se encuentra alrededor del 70% con un rango que va desde un 84% para la t(1;19) hasta un 18% para la t(9;22), de acuerdo con los resultados de nuestro hospital (Figura 1).

Los factores utilizados para clasificar las LLA pediátricas de acuerdo al riesgo de recaída incluyen: edad, recuento leucocitario al momento del diagnóstico, respuesta temprana al tratamiento, inmunofenotipo, índice de ADN, cariotipo, rearrreglos moleculares y determinación de Enfermedad Mínima Residual (EMR). Los rearrreglos moleculares más importantes para LLA por su valor pronóstico y frecuencia son los correspondientes a los genes de fusión BCR/ABL, MLL/AF4, E2A/PBX1 y TEL/AML1, que corresponden respectivamente a las siguientes translocaciones: t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), t(1;19)(q23;p13) y t(12;21)(p13;q22). La mayor sensibilidad de las técnicas de biología molecular permite detectar un mayor número de casos que por citogenética convencional (CC), optimizando así la estratificación en grupos de riesgo y la consiguiente adecuación del tratamiento⁴.

Es bien sabido que hoy en día un correcto diagnóstico de leucemia aguda pediátrica debe incluir además del análisis morfológico y del inmunofenotipo, estudios citogenéticos y moleculares; en nuestro país la posibilidad de realizarlos es limitada, especialmente en el ámbito del Hospital Público.

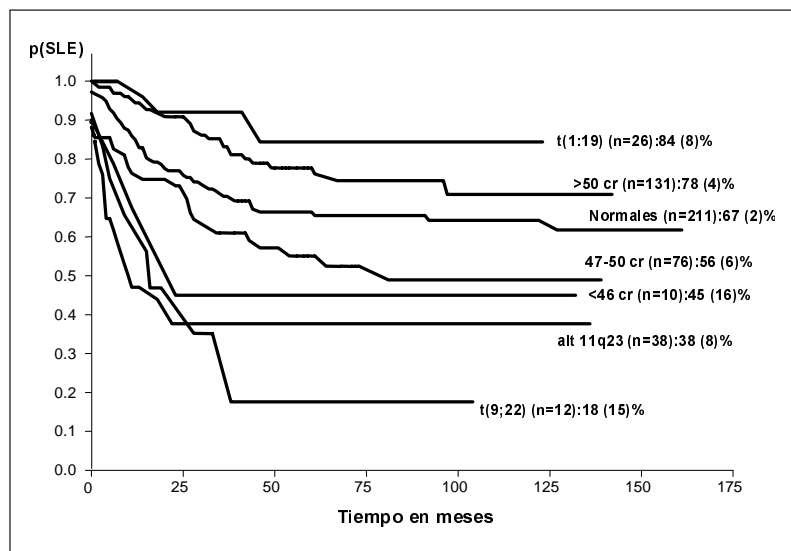


Figura 1: p(SLE) de los pacientes con LLA de acuerdo a las distintas alteraciones citogenéticas (Datos HPG).

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio incluyó a todos los pacientes con diagnóstico de LLA ingresados al HPG desde Diciembre de 2002 hasta Septiembre de 2005. En todos los casos los procedimientos diagnósticos incluyeron la obtención de material para estudios morfológicos, de inmunofenotipo, citogenéticos y de biología molecular (BM). Las determinaciones de BM se realizaron sobre muestras correspondientes al momento del diagnóstico de LLA, de médula ósea (MO) o sangre periférica (SP) si los pacientes presentaban recuentos de leucocitos mayores a $100.000/\text{mm}^3$ con recuento de blastos mayor al 70%, utilizando EDTA como anticoagulante.

En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los padres y/o tutores de los pacientes para incluirlos en el estudio, no realizándose en ningún caso extracción de muestras con el único objetivo de realizar estudios por Biología Molecular.

Los distintos rearrreglos fueron estudiados por Retrotranscripción (RT) seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). Se utilizaron alícuotas de 10×10^6 células mononucleares obtenidas por centrifugación con gradiente de densidad Ficoll-Hypaque. Se extrajo ARN total de las alícuotas de células mononucleares utilizando como reactivo Trizol® (Life Technologies, NY, USA), y se realizó la reacción de RT con hexámeros al azar para obtener el ADN copia (ADNc) correspondiente a $1 \mu\text{g}$ de ARN en un volumen final de $25 \mu\text{l}$. La integridad del ADNc obtenido se analizó por medio de la amplificación por PCR de Beta-Actina como gen control. Los oligonucleótidos (*primers*) y procedimientos utilizados para

las reacciones de PCR fueron los recomendados por el grupo Europeo de Estandarización del diagnóstico molecular de leucemias agudas (BIOMED-1)⁵.

Las reacciones de PCR se realizaron utilizando $1 \mu\text{l}$ de ADNc, 10 pmol de cada *primer*, 0,2mM de dNTP, 2,5mM de Cl_2Mg , 1U de Taq polimerasa (Promega Corporation, Madison, USA), en un volumen final de reacción de $25 \mu\text{l}$. Se realizó una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C seguida de 35 ciclos de: 94°C por 1 min, 65°C por 45 seg y 72°C por 1 min, más 5 min de extensión final a 72°C . Los transcritos de fusión analizados fueron: BCR-ABL (p190), BCR-ABL (p210), MLL-AF4, TEL-AML1 y E2A-PBX1, correspondientes a las t(9;22)(q34;q11), t(4;11)(q21;q23), t(12;21)(p13;q22) y t(1;19)(q23;p13).

En todos los casos el proceso de diagnóstico consistió en una primer PCR utilizando un par de primers denominados A y B, específicos para cada rearrreglo estudiado. Los resultados positivos fueron confirmados con una segunda PCR independiente, utilizando un juego alternativo de primers (llamados C y E3' ó E5' y D) (Figura 2). La realización de una segunda PCR confirmatoria tiene como objetivo aumentar la especificidad de la detección y disminuir la posibilidad de resultados falsos positivos. Ambas PCR se realizaron utilizando como sustrato ADNc y las condiciones de reacción ya descritas, e incluyeron en todos los casos controles positivos para la translocación en estudio y dos controles negativos (agua y ADNc de donantes sanos). El análisis de los resultados se realizó por electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 1,8%, con tinción con Bromuro de Etidio y observación a la luz ultra-viole-

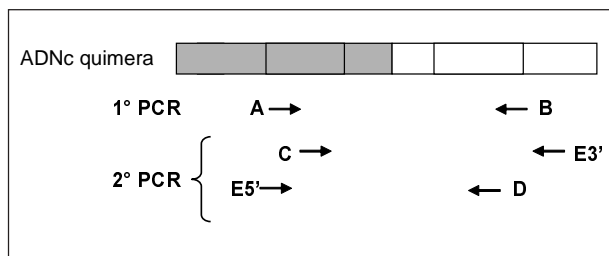


Figura 2: Esquema que muestra la posición relativa de los primers utilizados.

ta (UV). El peso molecular (PM) de las bandas obtenidas fue estimado por comparación con un marcador de PM conocido. Los resultados se documentaron y archivaron en forma de fotografías digitalizadas de dichos geles.

RESULTADOS

Entre Diciembre de 2002 y Septiembre de 2005 ingresaron en el HPG 151 pacientes (M:84/F:67) con diagnóstico de LLA menores de 15 años de edad. De ellos, 15 fueron menores de un año y 136 mayores, siendo el promedio de edad al diagnóstico de 6,5 años. La distribución de los inmunofenotipos analizados por Citometría de Flujo fue la siguiente: 8 Early-B, 80 Común, 43 Pre-B, 15 precursor T, y 5 de inmunofenotipo ambiguo. Se obtuvo resultado informativo por CC en 116 de los pacientes.

La búsqueda por RT-PCR de los rearrreglos moleculares correspondientes a los genes de fusión BCR-ABL, E2A-PBX1, MLL-AF4, y TEL-AML1 se realizó en 129 de los 151 pacientes incluidos (85,4%). Las causas de exclusión de las 22 muestras restantes fueron: material hipocelular de aspirado de MO, dándose prioridad a otros estudios indispensables para arribar al diagnóstico (17 pacientes); pacientes que iniciaron el tratamiento en otros centros, sin toma de muestra

para la realización de estudios por Biología Molecular (4 pacientes); y muestra no amplificable para el gen control (1 paciente).

Los resultados obtenidos en los 129 pacientes procesados fueron los siguientes: BCR-ABL(+): 2 pacientes; MLL-AF4(+): 11 pacientes; E2A-PBX1(+): 5 pacientes; TEL-AML1(+): 15 pacientes; resultado negativo para los 4 rearrreglos: 93 pacientes, incluyendo uno positivo para el rearrreglo MLL-ENL [t(11;19)]; en 3 casos adicionales no se investigó la presencia de los 4 rearrreglos ya que, de acuerdo a lo observado en el CC, sólo se confirmó la presencia de MLL-AF9 [t(9;11)] por RT-PCR. Estos hallazgos y las características clínicas e inmunofenotipos de los pacientes con resultados positivos se muestran en la TABLA I.

El estudio molecular confirmó la caracterización del CC en 11 casos y la amplió en otros 22: 1 BCR-ABL, 5 MLL-AF4, 1 E2A-PBX1 y 15 TEL-AML1 (TABLA II).

Con respecto a los resultados del estudio por CC de los 92 pacientes que presentaron resultado negativo para los cuatro rearrreglos estudiados, uno de ellos presentó la t(1;19), 25 mostraron cariotipo hiper-diploide, 29 pseudodiploide, 23 cariotipo normal, y en 14 de ellos no se obtuvo resultado informativo.

DISCUSIÓN

La necesidad de la incorporación de los estudios de BM (RT-PCR) en un Hospital Público como el HPG se sustenta en la sólida base constituida por su capacidad de proveer un soporte pediátrico y hematológico especializados junto con la accesibilidad a los métodos diagnósticos de probada utilidad.

Las ventajas de la RT-PCR son fundamentalmente las de presentar un resultado objetivo, reproducible y con una alta sensibilidad; estas características la convierten en el complemento ideal para los métodos clásicos de diagnóstico de leucemias agudas.

TABLA I
Características clínicas e inmunofenotipos de los pacientes positivos para los distintos rearrreglos

Parámetro	BCR-ABL	MLL-AF4	E2A-PBX1	TEL- AML1
n (%)	2 (1,6)	11(8,5)	5 (3,9)	15 (11,6)
Sexo: M/F	1/1	4/7	1/4	10/5
< 1 año	0	7	1	0
1-15 años	2	4	4	15
WBC/ μ l mediana	33,1	64,7	25,8	19,3
Rango WBC/ μ l	6,2-60,0	2,3-311,0	11,0-89,0	2,5-119,0
Early-B	-	3	0	0
Común	2	3	0	9
Pre-B	-	5	5	6

TABLA II
Distribución de los rearrreglos moleculares en la población estudiada.
Comparación con las translocaciones cromosómicas detectadas por citogenética convencional.

Translocación	Rearreglo	Citogenético n=112	Total n=128	Biología Molecular	
				Menores 1 año n=15	Mayores 1 año n=113
t(1;19)(q23;p13)	E2A-PBX1	5	5	1	4
t(4;11)(q21;q23)	MLL-AF4	6	11	7	4
t(9;22)(q34;q11)	BCR-ABL	1	2	0	2
t(12;21)(p13;q22)	TEL-AML1	0	15	0	15
Ninguna/Otras	4 neg + otros	104	96*	7*	89*
	No informativo/No metafases	35	22	0	22
	% Procesados	76,8%	85,4%	100%	85,4%
	Total ingresados	151	151	15	136

* incluyen tres pacientes MLL-AF9(+) (2 infantes y uno mayor de 1 año) y un infante MLL-ENL(+).

La mayor sensibilidad de la RT-PCR se ve reflejada en los resultados globales, ya que de los 33 casos positivos para alguno de los rearrreglos, 15 corresponden a TEL-AML1, el cual no puede observarse por técnicas de bandeado G, y de los 18 restantes sólo 12 pacientes presentaban la translocación por CC.

Con respecto a los resultados para cada rearrreglo, podemos evaluarlos de la siguiente manera:

BCR-ABL: en dos casos se obtuvieron resultados positivos, uno para p190 y otro para p210. El primero había sido diagnosticado por CC y el segundo (que por sus características iniciales correspondía al grupo de riesgo intermedio) no tenía muestra evaluable por CC y fue re-estratificado al grupo de alto riesgo con indicación de tratamiento intensivo y TMO, debido al mal pronóstico asociado a su presencia en LLA.

E2A-PBX1: Este rearrreglo fue detectado en 5 casos que, coincidiendo con la literatura, correspondían a inmunofenotipo Pre-B. En cuatro casos coincidió el diagnóstico citogenético y molecular. En el quinto el estudio molecular permitió detectar su presencia, dado que la muestra no fue evaluable por CC. En un sexto caso se detectó la t(1;19) por CC, pero no la presencia del transcrito E2A-PBX1 por biología molecular, lo cual ha sido referido en otras series de pacientes publicadas [6].

MLL-AF4: Esta alteración fue detectada en 11 casos, de los cuales 7 fueron menores de un año, lo cual coincide con la alta frecuencia descrita para el mismo en LLA de infantes. En 6 casos el diagnóstico fue realizado por ambas técnicas, pero la BM lo detectó en 5 casos más: en 3 de ellos no se había obtenido muestra evaluable para observar el cariotipo y en 2 la t(4;11) no había sido detectada. El rearrreglo MLL-AF4 puede presentarse en forma de translocaciones crípticas, que sólo son detectables por técnicas moleculares como RT-PCR y FISH [7]. La detección de estos 5 casos adicionales puede ser útil para re-estratificar a estos niños como de alto riesgo.

TEL-AML1: De los 129 pacientes estudiados, el TEL-AML1 fue positivo para 15 casos. Cabe destacar que este rearrreglo sólo puede ser detectado por técnicas moleculares, ya que no es detectable por CC. Los casos detectados presentaron fenotipo Pre-B o Común, lo cual coincide con lo descrito en la literatura. El porcentaje observado para este rearrreglo es 13,2% considerando sólo las leucemias precursor-B, el cual es menor al 25% reportado en series internacionales, lo cual puede estar relacionado con la gran variabilidad geográfica que presenta el rearrreglo TEL-AML1⁸.

Los resultados de la caracterización molecular de las LLA pediátricas en una Institución Hospitalaria como el HPG constituye según nuestro conocimiento, la serie de pacientes más grande estudiada en el país. Todos los niños estudiados han sido homogéneamente tratados en el marco de protocolos estandarizados, lo cual permitirá evaluar en forma significativa la asociación entre rearrreglo y efectividad de los esquemas de tratamiento aplicados.

Es importante destacar que el HPG como centro de alta complejidad recibe una gran proporción de los infantes (niños menores de un año) con diagnóstico de LLA del país, debido al mayor riesgo de morbimortalidad relacionado con el tratamiento que los mismos deben recibir. Esto se refleja en los resultados generales, observándose altos porcentajes de pacientes con alteraciones que involucran al gen MLL (MLL-AF4, MLL-AF9 y MLL-ENL). Si bien el número de casos estudiados es bajo aún para poder hablar de porcentajes de incidencia de los distintos rearrreglos, los mismos coinciden en términos generales con series publicadas por centros reconocidos a nivel internacional. Por otro lado, el comienzo del estudio sistemático de pacientes con LLA por técnicas de biología molecular hará posible en un futuro el conocimiento de dicha incidencia en nuestra población.

El estudio de las características clínicas y comportamiento biológico de series con gran número de pa-

cientes con LLA permite una constante evolución hacia una clasificación en grupos de riesgo más adecuada. Un correcto diagnóstico de LLA debe incluir hoy en día no sólo la observación citomorfológica sino, además, el inmunofenotipo que permite una primera clasificación que ayuda a definir rápidamente la estrategia terapéutica, el análisis citogenético que brinda una amplia información sobre las alteraciones genéticas observadas, y el análisis por técnicas de BM que aumenta la tasa de detección de los rearrreglos estudiados. La aplicación de los distintos métodos diagnósticos produce un aumento en el número total de casos caracterizados con una mayor sensibilidad, por lo cual es de gran importancia la incorporación de los estudios de BM en la etapa diagnóstica de LLA con el fin de optimizar la estratificación del paciente de acuerdo a los grupos de riesgo. Esto tiene como principal objetivo lograr la adecuación del tratamiento, intensificándolo en aquellos con mayor riesgo de presentar recaídas y disminuyendo su intensidad en los grupos con mayores posibilidades de curación, para evitar las potenciales secuelas que una terapia agresiva puede ocasionar.

En cuanto a las técnicas de BM resulta muy importante destacar la necesidad de trabajar en condiciones estandarizadas, para lograr la mayor sensibilidad y reproducibilidad de los resultados. Los protocolos de RT-PCR utilizados en el presente estudio siguen las normativas del grupo cooperativo europeo BIOMED-1, que reunió a especialistas de los principales centros de diagnóstico y tratamiento de Leucemias Agudas con el fin de optimizar los ensayos utilizados y homogeneizar los criterios diagnósticos. Dichos centros realizan estas determinaciones en forma centralizada, lo cual disminuye la variabilidad de los resultados y permite una adecuada utilización de los recursos destinados a las mismas.

La incorporación de los estudios moleculares de LLA pediátricas en un Hospital Público posibilita el acceso a estos análisis a un gran número de pacientes, y podría permitir en un futuro ofrecer este servicio a los hospitales públicos de todo el país, con el consiguiente beneficio para un mayor número de niños.

ABSTRACT

Two of the most relevant pediatric ALL prognostic factors are molecular and cytogenetic aberrations. The availability of these studies is limited at the public health system in Argentina. According to the reported international series, the most frequent rearrangements in ALL are TEL-AML1, E2A-PBX1, BCR-ABL and MLL-AF4. The RT-PCR detection of these rearrangements shows a high sensibility and plays an important role for cryptic translocations (as TEL-AML1) that are only detectable by molecular techniques (PCR or FISH). One hundred and

fifty one newly diagnosed ALL patients younger than 15 years old were admitted at Garrahan Hospital between Dec-02 and Sep-05 (M: 84/F: 67). Fifteen of them were younger than one year old and 136 were older. The RT-PCR assays for the aforementioned rearrangements were performed in 129 of 151 patients (85.4%). RNA from mononuclear cells at diagnosis was retrotranscribed using random hexamers, followed by the corresponding PCR using primers and conditions described in the BIOMED-1 protocol. The results were: TEL-AML1: 15 (11.6%); E2A-PBX1: 5 (3.9%); MLL-AF4: 11 (8.5%); BCR-ABL: 2 (1.6%); negative for all of them: 92 (71.3%); positive for other rearrangements: 4 (3.1%). Molecular analysis confirmed the conventional cytogenetic (CC) diagnosis in 11 patients and added 22 not detected by CC: 15 TEL-AML1, 1 E2A-PBX1, 5 MLL-AF4 and 1 BCR-ABL. Only one t(1;19) observed at CC didn't show the expected E2A-PBX1 rearrangement. In conclusion, molecular diagnosis of ALL increases the overall abnormalities detection and contributes to a better characterization of leukemia. Its incorporation and standardization at public institutions is essential to optimise patient's stratification according to risk group with a subsequent better treatment tailoring.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, childhood, molecular diagnosis, prognosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sackmann-Muriel F, Felice M, Zubizarreta P y col. Improved outcome in higher-risk acute lymphoblastic leukemia after "back-bone" Berlin-Frankfurt-Munster therapy with weekly rotational continuation therapy. *Int. J. Ped. Hematol. Oncol* 1996; 3: 439-49.
2. Sackmann-Muriel F, Felice M, Zubizarreta P y col. Treatment results in childhood acute lymphoblastic leukemia with a modified ALL-BFM'90 protocol: lack of improvement in high-risk group. *Leukemia Research* 1999; 23: 331-40.
3. Felice M, Alfaro E, Rossi J y col. No benefit of a rotational continuation phase in acute lymphoblastic leukemia (ALL) with a BFM back-bone therapy: Report from a single Institution. *4th Biennial Hannover Symposium on Childhood Leukemia*. Celle, Alemania. 3-5 de Mayo de 2004.
4. Faderl S and Estrov Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukaemia. *Blood* 1998; 91: 3995-4019.
5. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA y col. Report of BIOMED-1 Concerted Action. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999; 13: 1901-28.
6. Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll AJ y col. Predictability of the t(1;19)(q23;p13) from surface antigen phenotype: implications for screening cases of childhood acute lymphoblastic leukemia for molecular analysis: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1993; 82: 1086-91.
7. Poppe B, Cauwelier B, Van Limberger H y col. Novel cryptic chromosomal rearrangements in childhood acute lymphoblastic leukemia detected by multiple colour fluorescent *in situ* hybridization. *Haematologica* 2005; 90: 1179-85.
8. Hill A, Short M, Varghese C y col. The t(12;21) is underrepresented in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Kerala, Southern India. *Haematologica* 2005; 90: 414-16.