

Identificación de alteraciones moleculares en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda

Zapata-Tarres M¹, Sánchez-Huerta JL², Angeles-Florian T², Parra-Ortega I², Klunder-Klunder M³, Vilchis-Ordoñez A², Dorantes-Acosta E⁴, Juárez-Villegas L⁴, Sánchez-Urbina R⁵, López-Martínez B⁶

Resumen

ANTECEDENTES: las leucemias agudas son la neoplasia maligna más frecuente en los niños. La clasificación inmunológica, citogenética y molecular han repercutido de manera importante en la determinación del pronóstico y del esquema de tratamiento adecuado. En México se ha logrado definir el linaje de las células afectadas debido al inmunofenotipo; sin embargo, la clasificación molecular se ha limitado a las translocaciones en leucemias agudas.

OBJETIVO: evaluar el panel de 28 alteraciones genéticas en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda.

MATERIAL Y MÉTODO: estudio descriptivo, trasversal y prospectivo, efectuado de enero de 2013 a noviembre de 2014, en el que se evaluaron 28 translocaciones con 80 puntos de ruptura del paquete comercial RT-PCR HemaVision® (DNA-Technology Denmark) en muestras de pacientes con leucemia aguda.

RESULTADOS: se incluyeron en el estudio 84 pacientes con diagnóstico de leucemia aguda: 67 con leucemia linfoblástica aguda y 17 con leucemia mieloide aguda. El grupo más frecuente de edad al diagnóstico fue de dos a tres años. En 25 pacientes (40%) con leucemia linfoblástica aguda y en 6 pacientes (35%) con leucemia mieloide aguda identificamos una alteración molecular y las alteraciones citogenéticas identificadas fueron las translocaciones t(12;21) (8p13q22) y t(9;22) (q34q11).

CONCLUSIONES: los resultados de la identificación de las alteraciones moleculares permitieron al médico tener un recurso más para estratificar el riesgo de los pacientes que estaban clasificados con riesgo habitual.

PALABRAS CLAVE: leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda, translocaciones.

¹ Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México.

² Departamento de Laboratorio Clínico.

³ Departamento de Investigación en Salud Comunitaria.

⁴ Departamento de Hemato-Oncología.

⁵ Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.

⁶ Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México.

Recibido: enero 2017

Aceptado: marzo 2017

Correspondencia

Dra. Briceida López Martínez
brisalm@yahoo.com.mx

Este artículo debe citarse como

Zapata-Tarres M, Sánchez-Huerta JL, Angeles-Florian T, Parra-Ortega I y col. Identificación de alteraciones moleculares en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia aguda. Hematol Méx. 2017 abr;18(2):47-57.

Rev Hematol Mex. 2017 Apr;18(2):47-57.

Identification of molecular disorders in pediatric patients with diagnosis of acute leukemia.

Zapata-Tarres M¹, Sánchez-Huerta JL², Angeles-Florian T², Parra-Ortega I², Klunder-Klunder M³, Vilchis-Ordoñez A², Dorantes-Acosta E⁴, Juárez-Villegas L⁴, Sánchez-Urbina R⁵, López-Martínez B⁶

Abstract

BACKGROUND: Acute leukemias are the most common cancer in childhood. Immunological and cytogenetics classification are main prognostic factors and determine treatment. In Mexico, cytogenetic classification has been limited.

OBJECTIVE: To evaluate a panel of 28 genetic disorders in pediatric patients with diagnosis of acute leukemia.

MATERIAL AND METHOD: A descriptive, transversal, prospective study, done from January 2013 to November 2014, in which we analyzed 28 translocations with 80 breakpoints of the commercial HemaVision® RT-PCR kit (DNA-Technology Denmark) in samples from patients with acute leukemia.

RESULTS: 84 patients were included, 67 with acute lymphoblastic leukemia and 17 with acute myeloid leukemia, the age group with more cases was from 2 to 3 years. We identified 25 (40%) patients with the acute lymphoblastic leukemia and 6 patients with acute myeloid leukemia with some molecular cytogenetic alteration. The cytogenetic alterations identified were translocations: t(12;21) (8p13q22) and t(9;22) (q34q11).

CONCLUSION: The results of the identification of the molecular alterations allowed the physician to have one more resource to stratify the risk of those patients who were classified with habitual risk.

KEYWORDS: acute lymphoblastic leukemia; myeloid acute leukemia; childhood; molecular cytogenetic alteration

¹ Dirección de Investigación, Instituto Nacional de Pediatría, Ciudad de México.

² Departamento de Laboratorio Clínico.

³ Departamento de Investigación en Salud Comunitaria.

⁴ Departamento de Hemato-Oncología.

⁵ Laboratorio de Investigación en Biología del Desarrollo y Teratogénesis Experimental.

⁶ Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico.

Hospital Infantil de México Federico Gómez, Ciudad de México.

Correspondence

Dra. Briceida López Martínez
brisalm@yahoo.com.mx

ANTECEDENTES

En la población pediátrica los principales tipos de cáncer son las leucemias, los tumores del sistema nervioso central y los linfomas. En todo el mundo se reporta una incidencia de cáncer en edad pediátrica de 100 a 180 por cada

1,000,000 de niños por año, con variantes en cada país.^{1,2}

Las leucemias agudas son la causa más común de cáncer en todo el mundo y constituyen la enfermedad neoplásica maligna más frecuente de la edad pediátrica. Estados Unidos tiene

incidencia de aproximadamente 3.4 casos por 100,000 individuos menores de 15 años,² en tanto que en México es de 57.6 casos por millón de habitantes. La leucemia linfoblástica aguda en nuestro país representa la segunda causa de muerte en la población de 5 a 14 años, precedida por los accidentes.³

Las leucemias agudas se caracterizan por la producción descontrolada y acumulación de células precursoras hematopoyéticas de la serie linfóide o mieloide en la médula ósea,⁴ si bien en la última década se han reportado progresos significativos en el conocimiento de las anomalías genéticas, moleculares y fenotípicas que prevalecen en las leucemias agudas, la comprensión de los mecanismos de daño a los programas de desarrollo linfóide y mieloide es aún deficiente.⁵ Las alteraciones en las vías de diferenciación celular como la proliferación incrementada, apoptosis disminuida y el incremento de la autorrenovación son alteraciones que resultan en la producción constante de clonas leucémicas.⁶

De acuerdo con el linaje afectado, las leucemias agudas se dividen en leucemia linfoblástica aguda y leucemia mieloblástica aguda. El subtipo de mayor frecuencia es la leucemia linfoblástica aguda, que constituye 85% de todos los casos comunicados, mientras que la leucemia de estirpe mieloide contribuye con 15% de ellos.⁷ Los indicadores clínicos y de laboratorio, como la edad, respuesta al esteroide, respuesta a la inducción, cuenta de leucocitos, inmunofenotipo, enfermedad extramedular, infiltración al sistema nervioso central y las pruebas citogenéticas y moleculares se utilizan para clasificar los casos en dos grupos de riesgo, lo que será de utilidad para determinar el tipo de tratamiento.²⁻⁸

Los avances en el campo de la genética han permitido estudiar con mayor precisión las alteraciones genéticas. Los estudios citogenéti-

cos y moleculares en las leucemias agudas son importantes para el diagnóstico, la estrategia terapéutica, el seguimiento y el pronóstico.²⁻⁹

La identificación de alteraciones moleculares específicas es actualmente un elemento indispensable para la estratificación de las leucemias en distintos grupos de pronóstico para su tratamiento adecuado. Entre los subtipos de leucemia aguda se han descrito asociaciones específicas con alteraciones cromosómicas que se utilizan como factor pronóstico y para estratificar grupos de riesgo, aspecto importante para definir alternativas de tratamiento. Hoy sabemos que las alteraciones genéticas de las neoplasias son, generalmente, los agentes causales de la enfermedad y definen distintos comportamientos biológicos, que se traducen en diferentes comportamientos clínicos y finalmente en pronósticos muy variables.^{10,11}

En el caso de las leucemias agudas, se estima que incluso en 60% existe una alteración cromosómica, como las aneuploidías, rearrreglos estructurales, translocaciones, inversiones, deleciones, monosomías y trisomías.⁹ Las translocaciones resultan en proteínas de fusión con funciones anormales y potentes propiedades oncogénicas. La fusión génica ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) resulta de la translocación t(12;21) (p12;q21) y es la alteración genética más común en leucemia linfoblástica aguda infantil; sin embargo, esta translocación confiere buen pronóstico ya que se asocia con celularidad de pre B y con leucocitos menores de 50,000/ μ L. Asimismo, el gen MLL (leucemia de linaje mixto) participa en más de 50 fusiones génicas; entre ellas, la fusión MLL-AF9 está asociada con leucemia mieloide aguda, mientras que la fusión MLL-AF4 t(4;11) (q21;q23) se ha documentado incluso en 80% de las leucemias linfoblásticas agudas en neonatos y alrededor de 2% de leucemias linfoblásticas agudas de niños mayores de un año, y la fusión gen BCR/ABL1 (*breakpoint*

cluster region-Abelson) transcrito de fusión resultante de la t(9;22) (q34;q11) en 5% de las leucemias linfoblásticas agudas pediátricas.¹²

La leucemia mieloblástica aguda es una enfermedad clínica y genéticamente heterogénea, además de la respuesta inicial del paciente al tratamiento, su pronóstico está determinado por la existencia de anomalías citogenéticas. Varias anomalías citogenéticas recurrentes, como el reordenamiento 11q23, nos ayudan a predecir el resultado en las leucemias agudas. Las principales alteraciones descritas son rearrreglos de MLL en 18%, t(8;21) en 12%, t(15;17) en 12%, Inv16 en 8%, delección 9q en 2%. En menor frecuencia se han reportado alteraciones FLT3-ITD, CEBP α , entre otras mutaciones sin correlación clínica hasta este momento.¹³ Las leucemias mieloblásticas agudas son leucemias que deben tratarse con un esquema de tratamiento intensivo; sin embargo, las que presentan la t(15;17) reciben tratamiento con ácido transretinoico, con lo que han tenido tasas de supervivencia mayor de 80%. Asimismo, la existencia de la Inv16 se considera de buen pronóstico pudiendo evitarse el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.¹²

El análisis detallado de los rearrreglos citogenéticos en las leucemias por varios años ha aportado información importante para aclarar las incidencias de anomalías individuales y su significado pronóstico.¹⁴⁻²¹

En el diagnóstico de la leucemia aguda es necesario detectar las alteraciones citogenéticas y moleculares por dos objetivos principales: 1) adecuar el tratamiento de un paciente como en los casos de t(9;22) e Inv16, o en los pacientes en los que se administrarán medicamentos específicos, como el ácido transretinoico en la leucemia promielocítica aguda con t(15;17), y 2) con ello tener la posibilidad de identificar enfermedad mínima residual y administrar los

tratamientos correspondientes. El estudio citogenético convencional se basa en metafases que detectan una minoría de casos, aunado a las limitaciones técnicas y del tiempo de proceso. En la actualidad pueden usarse otros métodos para la identificación de aberraciones cromosómicas, como Southern blot, reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) en tiempo real, PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR), entre otras.¹⁴ En México, en las instituciones públicas y en algunas privadas la búsqueda rutinaria de alteraciones citogenéticas y moleculares en cada paciente con leucemia aguda es limitada por la tecnología y los costos implicados.

El objetivo de este estudio fue investigar el siguiente panel de 28 alteraciones genéticas: del1(p32) (STIL-TAL1), t(1;11) (p32;q23) (MLL-EPS15); t(1;11) (q21;q23) (MLL-MLLT11); t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1); t(3;5) (q25;q34) (NPM1-MLF1); t(3;21) (q26;q22) (RUNX1-MDS1/EVI1); t(4;11) (q21;q23) (MLL-AFF1); t(5;12) (q33;p13) (ETV6-PDGFRB); t(5;17) (q35;q21) (NPM1-RARA); t(6;9) (p23;q34) (DEK-NUP214); t(6;11) (q27;q23) (MLL-MLLT4); t(8;21) (q22;q22) (RUNX1-RUNX1T1); t(9;9) (q34;q34) (SET-NUP214); t(9;11) (p22;q23) (MLL-MLLT3); t(9;12) (q34;p13) (ETV6-ABL1); t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1); t(10;11) (p12;q23) (MLL-MLLT10); t(11;17) (q23;q21) (MLL-MLLT6); t(11;17) (q23;q21) (ZBTB16-RARA); t(11;19) (q23;p13.1) (MLL-ELL); t(11;19) (q23;p13.3) (MLL-MLLT1); t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1); t(12;22) (p13;q11) (ETV6-MN1); t(15;17) (q24;q21) (PML-RARA); Inv(16) (p13;q22) (CBFB-MYH11); t(16;21) (p11;q22) (FUS-ERG); t(17;19) (q22;p13) (TCF3-HLF); t(X;11) (q13;q23) (MLL-FOXO4).

PACIENTES Y MÉTODO

Estudio descriptivo, transversal y prospectivo, efectuado de enero de 2013 a noviembre de 2014 y aprobado por los comités de Bioseguri-

dad, Ética e Investigación, apegado a las normas éticas del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud y a la Declaración de Helsinki y sus enmiendas.

Pacientes

Se incluyeron pacientes menores de 18 años con leucemia aguda, atendidos en el Departamento de Hemato-Oncología del Hospital Infantil de México Federico Gómez, estos niños tenían síntomas sugerentes de leucemia aguda y criterios para realización de aspirado de médula ósea. Se informó y solicitó consentimiento y asentimiento a los padres de familia para realizar en la muestra de médula ósea la clasificación morfológica, inmunológica y la investigación de las alteraciones citogenéticas como objetivo del estudio. De los pacientes incluidos se planteó una cédula con la que se recolectaron los datos demográficos, clínicos y de laboratorio.

Métodos de laboratorio

Análisis de reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR)

Se realizó un ensayo de RT-PCR anidada a través del kit (HemaVision HV01-28N) para búsqueda de 28 translocaciones cromosómicas asociadas con las leucemias agudas incluyendo más de 80 puntos de ruptura, además de las variantes de ensamblaje del ARNm asociado.

Extracción de ARN y síntesis de ADNc

Se obtuvo ARN a partir de muestras de médula ósea, utilizando el kit de extracción de ARN QIAamp® RNA Blood Mini Kit (Qiagen). El ADN complementario (ADNc) se sintetizó mediante el ARN previamente obtenido, utilizando el Mix de ADNc (primers) del paquete de HemaVision® HV01-28N y transcriptasa reversa, buffer 5x, DTT y dNTP. Además, se sintetizó ADNc utili-

zando el paquete de síntesis Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit de Roche®.

Reacción de PCR Master

Una vez que el ADNc se sintetizó, éste se utilizó como molde para las reacciones de amplificación anidada (PCR-I, PCR-II). Se utilizaron para todas las reacciones mezclas de primers del paquete de HemaVision® HV01-28N, así como la ADN polimerasa, el buffer 10x y los dNTPs. El producto de la PCR-II se analizó a través de electroforesis en un gel de agarosa a 1.5%. La banda control de 911pb correspondió al control de amplificación, indicando la integridad del ARN utilizado así como la funcionalidad de las reacciones de RT-PCR. La existencia de alguna otra banda presente indica la positividad para una translocación, la identificación de esa translocación se determina a través de la PCR Split-Out.

PCR Split-Out

Cada reacción de PCR Split Out se realizó con el ADNc (descrito previamente) utilizando sólo un par de primers específicos para cada translocación y un par de primers para el control de la reacción. Al igual que la PCR Master, consistió en una PCR anidada, en donde el producto de la PCR-II se analizó a través de electroforesis en un gel de agarosa a 1.5%.

Interpretación de los experimentos de laboratorio

Se determinó que una muestra es positiva para una translocación cuando en ambas PCR (Master y Split-Out) se observan bandas con un peso molecular idéntico. El punto de ruptura fue identificado por el número de reacción al que correspondió la PCR Split-Out, así como el peso molecular del amplicón específico con ayuda de la tabla proporcionada por el fabricante (**Figura 1**).

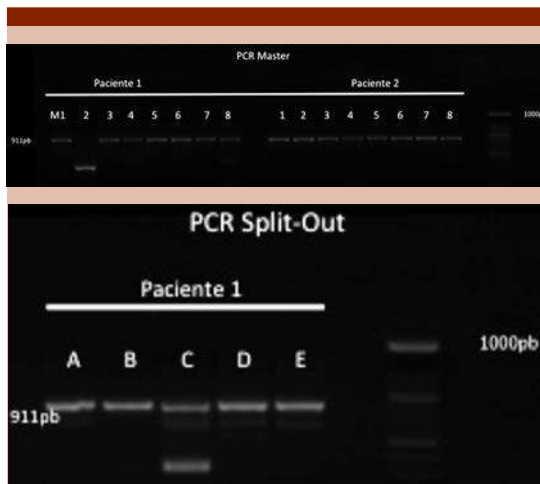


Figura 1. Muestra positiva para una translocación cuando en ambas PCR (Master y Split-Out) se observan bandas con peso molecular idéntico. El punto de ruptura y peso molecular se identificaron por el número de reacción al que correspondió la PCR Split-Out del amplicón específico con ayuda de la tabla proporcionada por el fabricante.

Además del estudio de las 28 translocaciones detectadas a través del paquete de HemaVision® HV01-28N, se verificaron por PCR en tiempo real los siguientes transcritos: PML-RAR t(15;17), BCR-ABL t(9;22), AML-ETO t(8;21) e Inv (16), utilizando el paquete LightMix® de Roche DiagnosticsLightCycler®.

RESULTADOS

De 100 pacientes con diagnóstico morfológico e inmunológico de leucemia aguda a quienes se realizó el estudio de RT-PCR anidada en muestras de médula ósea de enero de 2013 a noviembre de 2014 en el Hospital Infantil de México Federico Gómez, 16 pacientes se excluyeron por no cumplir con la cantidad de ARN necesario para el proceso del perfil de alteraciones moleculares. De 84 pacientes, 51 eran varones. El grupo más frecuente de edad al diagnóstico fue de dos a tres años con 20 pacientes (23%), seguido del

grupo de cuatro a cinco años con 13 pacientes (15%). El grupo de menor incidencia fue el de 16 años con 3 pacientes (3.5%). El 80% de los pacientes (n=67) se diagnosticó con leucemia linfoblástica aguda y 20% (n=17) con leucemia mieloblástica aguda.

De los pacientes con leucemia linfoblástica aguda, se clasificó con riesgo habitual a 17 pacientes (26%) y en riesgo alto a 50 (74%); los principales factores fueron la edad al diagnóstico e hiperleucocitosis. Asimismo, se identificó a un paciente categorizado como de riesgo habitual previo a la identificación de la alteración molecular y con el resultado positivo a una alteración se incluyó en el grupo de riesgo alto. De estos pacientes 55 (82%) respondieron adecuadamente al tratamiento con esteroide y 12 (18%) tuvieron mala respuesta al mismo.

En el grupo de pacientes con leucemia mieloblástica aguda (n=17), se observó respuesta adecuada al primer ciclo de tratamiento en 14 pacientes (79%) y 3 (21%) de ellos no tuvieron buena respuesta.

En 9% de los pacientes estudiados se identificó infiltración al sistema nervioso central y 91% de las muestras de líquido cefalorraquídeo fueron negativas para células neoplásicas.

Alteraciones moleculares identificadas por RT-PCR

De los 84 pacientes 31 (37%) obtuvieron un resultado positivo a alguna de las 28 translocaciones que se encuentran descritas en el kit comercial (HemaVision), mientras que 53 (63%) obtuvieron un resultado negativo para alguna de estas translocaciones.

En el grupo de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (n=67), 25 pacientes (37%) tuvieron un resultado positivo a una translocación, de

las cuales la más común (8 pacientes) fue la t(9;22) (q34;q11) y en 7 la t(12;21) (p13;q22), el resto de las translocaciones fueron: t(11;19) (q23;p13.3), STIL(1p32) (TALI(1p32), t(8;21) (q22q22), t(4;11) (q21q23), t(9;22) (q32q11), MLL(11q23) AFFI(4q21.3). **Cuadro 1**

Al analizar los 25 casos positivos a las alteraciones moleculares y relacionar la translocación con la respuesta clínica, se identificó que sólo en 12% de los pacientes no se logró remisión en médula ósea, en 8% se logró remisión al día 21, en 20% a los 14 días y 60% de los pacientes a los 7 días.

En el caso de los pacientes con leucemia mieloblástica aguda (n=17), 6 tuvieron una translocación, de las cuales las más frecuentes fueron: t(15;17) (q22;q12) y t(8;21) (q22q22). **Cuadro 2**

Al evaluar la respuesta clínica en estos pacientes encontramos que sólo dos no tuvieron buena respuesta al primer ciclo de tratamiento y fueron los positivos a la translocación t(15;17) y t(8;21) (q22q22), respectivamente.

Los resultados obtenidos en las alteraciones PML-RAR t(15;17), BCR-ABL t(9;22), AML-ETO

t(8;21) e Inv (16) se verificaron con el paquete LightMix® de Roche Diagnostics LightCycler® y concordaron con los identificados por Hema-Vision®.

En los **Cuadros 1 y 2** se describen los resultados de translocaciones por clasificación según el riesgo de cada paciente y el tipo de leucemia.

DISCUSIÓN

La descripción de alteraciones moleculares asociadas específicamente con un tipo de leucemia considerada enfermedad multigénica ha permitido conocer el significado clínico de muchos marcadores citogenéticos y, más importante todavía, se ha constituido como un paso previo a la detección y localización de los genes implicados en la génesis tumoral.

En nuestro estudio, incluimos pacientes con leucemia aguda en los que predominó el sexo masculino. En el caso de la línea afectada, la leucemia de estirpe linfóide fue la más diagnosticada en 73%, seguida de la mielóide en 21%, lo que es similar a lo reportado en la bibliografía.³

Cuadro 1. Alteraciones moleculares según el tipo de leucemia

Translocación y punto de ruptura	Leucemia linfoblástica aguda, n=67 (%)	Leucemia mielóide aguda, n=17 (%)
Del 1p32 (STIL-TAL1)	2 (3)	0
t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1)	3 (4.5)	0
t(4;11) (q21;q23) (MLL-AFF1)	2 (3)	0
t(8;21) (q22;q22) (RUNX1-RUNX1T1)	1 (1.5)	2 (12)
t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1)	8 (12)	0
t(10;11) (p12;q23) (MLL-MLLT10)	0	1 (6)
t(11;19) (q23;p13.3) (MLL-MLLT1)	2 (3)	0
t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1)	7 (10.5)	0
t(15;17) (q24;q21) (PML-RARA)	0	2 (12)
t(16;21) (p11;q22) (FUS-ERG)	0	1 (6)
Total	25	6

Cuadro 2. Alteración molecular y clasificación según el riesgo

Translocación y punto de ruptura	Riesgo habitual, n (%)	Riesgo alto, n (%)
Del 1p32 (STIL-TAL1)	0	2 (3)
t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1)	0	3 (4.5)
t(4;11) (q21;q23) (MLL-AFF1)	0	2 (3)
t(8;21) (q22;q22) (RUNX1-RUNX1T1)	1 (4)	2 (3)
t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1)	0	8 (17)
t(10;11) (p12;q23) (MLL-MLLT10)	0	1 (1.5)
t(11;19) (q23;p13.3) (MLL-MLLT1)	0	2 (3)
t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1)	0	7 (10.5)
t(15;17) (q24;q21) (PML-RARA)	2 (8)	0
t(16;21) (p11;q22) (FUS-ERG)	1 (4)	0
Total	4	27

Algunos investigadores consideran que estas alteraciones cromosómicas son un epifenómeno del proceso oncogénico sin relación con su causa. Sin embargo, este criterio cambió completamente, cuando mediante las técnicas de biología molecular se puso en evidencia la existencia de genes específicos comprometidos en las translocaciones cromosómicas presentes en la mayor parte de las leucemias y que son activados por la alteración.⁹

Existen diversos estudios realizados en varios países durante la última década que se han enfocado en analizar la frecuencia y los tipos de alteraciones a nivel de genes y cromosomas de los pacientes con leucemia aguda. Hye-Jin Kim y colaboradores, en un estudio realizado en 270 pacientes coreanos, describieron la frecuencia de las alteraciones genéticas identificadas por RT-PCR (Hema Vision) y concluyeron que la alteración más frecuente es la translocación t(12;21) (p13q22) seguida de t(8;21) (q22q22) y t(9;22) (q32q11).¹⁵ En nuestro estudio se realizó la determinación de las alteraciones genéticas por RT-PCR (HemaVision) en muestras de 84 pacientes con leucemia aguda, 25 de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda tuvieron una alteración genética. Las alteraciones moleculares

que identificamos en orden de frecuencia fueron: t(9;22) (q34q11), t(12;21) (p13q22) y t(11;19) (q23p13.3), las cuales se relacionan con mal pronóstico.

En otros estudios se utilizó cariotipo convencional, como el realizado por Vásquez y su grupo en el Hospital Universitario San Vicente de Pául de Medellín, Colombia, entre 1998 y 2001, donde se analizaron las alteraciones cromosómicas en la médula ósea de 44 niños (entre un mes y 14 años de edad) con leucemia linfoblástica aguda. El estudio reveló que 18 pacientes (41%) tenían cariotipo normal y 26 (59%) lo tenían anormal; de estos últimos 20 (77%) tenían un mosaicismo cromosómico, 4 (15%) exhibían cariotipos hiperdiploides y 2 (8%) mostraban otras alteraciones genéticas.¹⁶

Solís y colaboradores, en Costa Rica, realizaron un estudio citogenético a pacientes con leucemia, referidos al Hospital Nacional de Niños e incluyeron a 107 pacientes menores de 14 años. Las leucemias agudas constituyeron 98% de los casos, 70% leucemia linfoblástica aguda, 27% leucemia mieloblástica aguda y 3% otras neoplasias hematológicas. Los hallazgos citogenéticos fueron principalmente alteraciones numéricas

(trisomías 8, 19, 20, 21 y 22), así como deleciones (cromosomas 5 y 6), translocaciones t(8;14) e inversiones (cromosoma 11).¹⁷

Venegas y su grupo, en otro estudio efectuado en el mismo hospital en 177 niños con leucemia linfoblástica aguda de precursores B, observaron distribución entre cariotipos normales y aquéllos con anormalidades cromosómicas de 29 y 71%, respectivamente. El 71% de las anormalidades encontradas se distribuyó de la siguiente manera: t(4;11) en 3%, t(9;22) en 3%, t(1;19) en 5%, hiperdiploides en 39% y otras aberraciones cromosómicas en 21%.¹⁸

En México, Sierra-Martínez y colaboradores realizaron algunos estudios, pero no limitados a la población pediátrica, como el realizado en el Hospital Juárez de México, sobre la frecuencia de los hallazgos citogenéticos en pacientes con enfermedades hematológicas. Estudiaron 64 pacientes que acudieron al servicio de Hematología de enero de 1999 a junio de 2000; se obtuvieron muestras de médula ósea, de sangre periférica o ambas, se procesaron de manera directa y se realizaron cultivos de 24, 48 o 72 horas. Las metafases se analizaron por técnica de bandas GTG. El intervalo de edad de la población fue de 1 a 77 años, de acuerdo con la clasificación del grupo FAB, 22 pacientes correspondieron al tipo de leucemia linfoblástica aguda, 14 a leucemia mieloblástica aguda, 16 a leucemia granulocítica crónica, 7 a síndrome mielodisplásico y 3 carecieron de diagnóstico confirmado. Se obtuvo el estudio citogenético de los pacientes en 58%, el cariotipo no fue informativo en 26.5% y 15.5% mostró hipocelularidad. De los resultados obtenidos, 28% fue cariotipo normal, 22% tuvieron una alteración numérica y 50% una alteración estructural.¹⁹

Como se ha descrito, la utilización de la citogenética convencional por cariotipo detecta alteraciones en un porcentaje mínimo de pa-

cientes por las características técnicas de la metodología, ya que es limitada en la cantidad de alteraciones genéticas que se identifican en las muestras de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Asimismo, el análisis de las alteraciones moleculares con otras técnicas, como fluorescencia e hibridación *in situ* (FISH), PCR o RT-PCR (HemaVision) incrementa el número de alteraciones detectadas, disminuye el tiempo de procesamiento y podría clasificarse con mayor precisión a los pacientes.^{18,19}

Existen pocos estudios colaborativos en América Latina acerca de la frecuencia y características de los pacientes pediátricos con leucemias agudas y alteraciones moleculares. En México existen investigaciones de los doctores Ruiz-Argüelles y Gómez Almaguer,²⁰⁻²⁴ quienes han demostrado que la identificación de alteraciones moleculares, como mutaciones en FLT3, t(15;17), t(9;22), t(8;21) tienen significado en el comportamiento clínico y desenlace a largo plazo de los pacientes.²³⁻²⁶

En México Ruiz-Argüelles y colaboradores describieron que el punto de ruptura de PML/RAR α en pacientes mestizos mexicanos con leucemia aguda promielocítica es diferente de lo comunicado en los caucásicos.

Los diferentes índices de pronóstico en las leucemias agudas, incluida la edad y la citogenética, ayudan a identificar a pacientes con riesgo alto de recaída o enfermedad resistente. Algunas alteraciones moleculares, como las mutaciones ITD/FLT3 se han relacionado con un resultado adverso en las poblaciones adultas y pediátricas con leucemias agudas mieloides y han adquirido un papel crítico en la estratificación de riesgo. Respecto a las enfermedades hematológicas, existen algunas semejanzas entre mestizos latinoamericanos y los asiáticos, como baja prevalencia de leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, gammapatía monoclonal de

significado indeterminado y macroglobulinemia de Waldenström a una prevalencia alta de anemia aplásica adquirida, lo que ha generado el concepto de hematología geográfica. Por lo anterior, es primordial la generación de información molecular y clínica de los pacientes pediátricos con leucemia aguda; este trabajo aporta información importante a la epidemiología de la leucemia en niños y es necesario generar más informes con las características de pacientes mestizos mexicanos.²⁰⁻²⁶

Por lo anterior es importante continuar investigando sobre las alteraciones moleculares existentes en pacientes con leucemia y utilizar las alteraciones identificadas en cada paciente para su estratificación clínica y valorar el pronóstico en cada paciente que acude a nuestra institución.⁹

Queda por explorar a los pacientes con la translocación BCR-ABL1 *like*, porque se ha demostrado que ésta tiene implicaciones clínicas en pacientes con leucemia linfoblástica aguda² y en reportes internacionales está presente en 12% de los pacientes.

Con tecnología como la secuenciación de genoma completo de siguiente generación (GWAS), se puede amplificar y secuenciar un genoma entero de factores de transcripción o de vital importancia para la aparición y patogénesis de las leucemias agudas, esto es posible para una sola célula, lo que demuestra que existe heterogeneidad clonal en las leucemias agudas^{27,28} y permite identificar incluso 50 alteraciones y rearrreglos en el ADN de las clonas leucémicas y en algunos casos puede darse mejor manejo terapéutico de la enfermedad.²⁹

CONCLUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda es más frecuente en pacientes del género masculino de dos a tres años de edad y, con el tratamiento adecuado, se observa buena respuesta en 82% con remisión de la médula ósea al día 7.

Las alteraciones moleculares más frecuentes en los pacientes con leucemia aguda que acuden al Hospital Infantil de México son la translocación t(12;21) (p13q22) y t(9;22) (q34q11), asimismo, estandarizar esta tecnología nos ha permitido la identificación de alteraciones que se relacionan con mal pronóstico, como la translocación t(11;19) (q23p13.3), que en nuestros pacientes fue la segunda en frecuencia; su identificación es de gran importancia porque en el futuro podría modificarse el tratamiento de estos pacientes mejorando su respuesta al mismo y, por tanto, su pronóstico.

La RT-PCR para la determinación de las alteraciones genéticas es una técnica adecuada porque permite identificar mayor número de alteraciones genéticas en menor tiempo. Por lo que la identificación molecular de los pacientes se precisará en mayor porcentaje, lo que permitirá clasificar mejor el riesgo del paciente y posteriormente realizar la correlación a largo plazo con la respuesta al tratamiento evaluando el pronóstico y la supervivencia de cada paciente.

Limitación del estudio

La limitación de este estudio está relacionada con el diseño descriptivo y observacional. Sin embargo, es la base para iniciar un estudio en el que se busque la asociación de las alteraciones citogenéticas con las características clínico-biológicas de la enfermedad a largo plazo.

Este estudio fue financiado en la convocatoria para financiar proyectos de investigación con Fondos Federales 2012. HIM/2012/035/SSA.1060.

REFERENCIAS

1. Mullighan CH, et al. Acute lymphoblastic leukemia. *Lancet* 2013;381(9881).
2. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1030-43.
3. Pérez Saldivar ML, et al. Childhood acute leukemias are frequent in Mexico City: descriptive epidemiology. *BMC Cancer* 2011;11:355.

4. Khalid S, et al. Retrospective, review of pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia: a single center experience. *Indian J Pathol Microbiol* 2010 Oct-Dec;53(4):704-10.
5. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol* 2005;23:6285-6295.
6. Warner JK, Wang JC, Hope KJ, Jin L, Dick JE. Concepts of human leukemic development. *Oncogene* 2004;20;23(43):7164-77.
7. Onciu M. Acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin N Am* 2009;23:655-674.
8. Chow EJ, Kaminen A, Daling JR, Fraser A, et al. Reproductive outcomes in male childhood cancer survivors: a linked cancer-birth registry analysis. *Arch of Pediatr Adolesc Med* 2009;163(10):887-894.
9. Pui CH, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci R. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: An update. *J Clin Oncol* 2011;29:551-565.
10. Abdullaev FI, Rivera-Luna R, Roitenburd-Belacortu V, Espinosa-Aguirre J. Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch Med Res* 2000;31:526-531.
11. Pullen J, Shuster JJ, Link M, Borowitz M, Amylon M, Carroll AJ et al. Significance of commonly used prognostic factors differs for children with T cell acute lymphocytic leukemia (ALL), as compared to those with B-precursor ALL. A Pediatric Oncology Group (POG) study. *Leukemia* 1999;13 (11):1696-1707.
12. Woo J, et al. Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Experimental Hematology & Oncology* 2014;3:16.
13. Mörücke A, Zimmermann M, Reiter A, Gadner H, et al. Prognostic impact of age in children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia: data from the trials ALL-BFM 86, 90, and 95. *Klin Padiatr* 2005;217(6):310-320.
14. Van der Burg M, Smit B, Brinkhof B, et al. A single split-signal FISH probe set allows detection of TAL1 translocations as well as SIL-TAL1 fusion genes in a single test. *Leukemia* 2002;16:755-761.
15. Kim HJ, Oh HJ, Lee JW, Jang PS, et al. Utility of a multiplex reverse transcriptase polymerase chain reaction assay (HemaVision) in the evaluation of genetic abnormalities in Korean children with acute leukemia: a single institution study. *Korean J Pediatr* 2013;56(6):247-253.
16. Vásquez G, Ramírez JL, Posada A, Sierra M y col. Leucemia linfóide aguda: estudio citogenético en niños atendidos en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl Medellín en el periodo 1998-2001. *Iatreia* 2002;15(4):217-225.
17. Solís MV, De los Ángeles M, Ruiz E, Carrillo JM y col. Citogenética y citotóxica de pacientes con leucemia en dos hospitales neotropicales. *Int J Tropical Biol Conservation* 2000;48(2-3):707-718.
18. Venegas P, Rivera J. Estudios citogenéticos en niños con leucemia linfocítica aguda-B en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 2004;52(3): 551.
19. Sierra-Martínez M, Aguilar F, Cruz R. J, García M, Vergara D. Frecuencia de los hallazgos citogenéticos en pacientes con enfermedades hematológicas que acuden al Hospital Juárez de México. *Rev Sal Pub y Nut* 2000;2.
20. Gómez-Almaguer D, Marcos-Ramírez ER, Montaña-Figueroa EH, Ruiz-Argüelles GJ, Best-Aguilera CR, et al. Acute leukemia characteristics are different around the world: the Mexican perspective. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2017;17(1):46-51.
21. Ruiz-Argüelles GJ. Promyelocytic leukemia in Mexican mestizos. *Blood* 1997;89:348.
22. Ruiz-Delgado GJ, Macías-Gallardo J, Lutz-Presno J, Garcés-Eisele J, Hernández-Arizpe A, Montes-Montiel M, Ruiz-Argüelles GJ. Core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML) in México: a single institution experience. *Rev Invest Clin* 2011;63:25-30.
23. Cuervo-Sierra J, Jaime-Pérez JC, Martínez-Hernández RA, García-Sepúlveda RD, et al. Prevalence and clinical significance of FLT3 mutation status in acute myeloid leukemia patients: A Multicenter Study. *Arch Med Res* 2016 Apr;47:172-179.
24. Rego EM, Kim HT, Ruiz-Argüelles GJ, Undurraga MS, et al. Improving acute promyelocytic leukemia (APL) outcome in developing countries through networking, results of the International Consortium on APL. *Blood* 2013;121:1935-1943.
25. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Gómez-Rangel JD, Ruiz-Delgado GJ. More on geographic hematology: the breakpoint cluster regions of the PML/RARalpha fusion gene in Mexican Mestizo patients with promyelocytic leukemia are different from those in Caucasians. *Leuk Lymphoma* 2004;45:1365-1368.
26. Lucena-Araujo AR, Kim HT, Jacomo RH, Melo RA, et al. Internal tandem duplication of the FLT3 gene confers poor overall survival in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline-based chemotherapy: an International Consortium on Acute Promyelocytic Leukemia study. *Ann Hematol* 2014;93(12):2001-2010.
27. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 2012; 22:153-66.
28. Van Vlierberghe P, Palomero T, Khiabanian H, et al. PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 2010;42:338-42.
29. Zhang J, Mullighan CG, Harvey RC, et al. Key pathways are frequently mutated in high-risk childhood acute lymphoblastic leukemia: a report from the Children's Oncology Group. *Blood* 2011;118:3080-7.