

Patrones de hibridación del gen ETV6/RUNX1 en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda

Hybridization patterns of ETV6/RUNX1 gen in pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia

Kalia Lavaut Sánchez, Norbelys Hernández Aguilar

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: la traslocación t(12;21) (p13;q21) es la alteración cromosómica más común en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda de células B(LLA-B), su consecuencia molecular es el gen de fusión ETV6/RUNX1. Esta traslocación es crítica por lo que escapa al diagnóstico de la citogenética convencional. Una de las herramientas diagnósticas utilizadas en estos casos es la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH).

Objetivo : describir los patrones de señales de hibridación observados en pacientes pediátricos con LLA-B.

Métodos: se estudiaron muestras de sangre medular de 25 pacientes pediátricos con LLA-B, recibidas en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología. Se empleó la sonda *LSI ETV6/RUNX1 Dual Color Dual Fusion* para su estudio.

Resultados: ocho muestras resultaron positivas al gen de fusión ETV6/RUNX1, en cuatro de ellas se observaron alteraciones cromosómicas adicionales: delección del gen ETV6 en el alelo no traslocado, una copia adicional del cromosoma 21 derivativo y copias extras del cromosoma 21. De las 17 muestras negativas al gen de fusión, se observó hiperdiploidía en tres de ellas.

Conclusiones: la técnica de FISH resultó útil para la detección de alteraciones cromosómicas no visibles al cariotipo, como la t (12;21) y su gen de fusión, además facilitó la detección de alteraciones cromosómicas adicionales con implicación pronóstica.

Palabras clave: leucemia linfoblástica aguda, gen de fusión ETV6/RUNX1, hibridación *in situ* fluorescente.

ABSTRACT

Introduction: The t(12;21) (p13;q22) translocation is the most common chromosomal abnormality alteration in pediatric patients with B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL), its molecular consequence is the fusion gene ETV6/RUNX1. This translocation is cryptic, so it escapes conventional cytogenetic diagnosis. One of the diagnosis tool is the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique.

Objective: To describe hybridization signals patterns observed in pediatric patients with B-ALL.

Methods: Bone marrow samples of 25 pediatric patients with diagnosis of ALL-B were studied at the Cytogenetics Laboratory of the Institute of Hematology and Immunology. *LSI ETV6/RUNX1 Dual Color Dual Fusion* probe was used.

Results: Eight samples were positive to ETV6/RUNX1 fusion gene, in four of them additional chromosomal alterations were observed: deletion of ETV6 gene allele not translocated, one extra copy of chromosome 21 derivative and extra copies of chromosome 21. Of the 17 negative fusion gene samples, hyperdiploidy was observed in three of them.

Conclusions: The FISH technique was useful for detecting chromosomal abnormalities non visible to karyotype such as t (12;21) and its fusion gene. Also it facilitated the diagnosis of additional chromosomal alterations with prognostic implications.

Keywords: acute lymphoblastic leukemia, ETV6/RUNX1 fusion gene, fluorescence *in situ* hybridization.

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia hematológica más frecuente en la infancia, constituye el 80 % de todas las leucemias agudas en edad pediátrica. Su mayor incidencia es entre los 2 y 5 años de edad. Aproximadamente, en el 90 % de los pacientes se presentan alteraciones cromosómicas clonales. Estas alteraciones genéticas específicas son útiles en el diagnóstico y definen grupos pronósticos¹.

El análisis citogenético por técnica de banda G es indispensable para conocer las alteraciones cromosómicas presentes en los pacientes con LLA; sin embargo, existen rearrreglos submicroscópicos o crípticos que afectan regiones pequeñas, los cuales son difíciles de detectar con el uso de esta técnica. Para superar esta limitante se puede utilizar la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés).

Entre los rearrreglos no visibles por citogenética convencional, se encuentra la traslocación entre los cromosomas 12y 21,t (12;21)(p13;q22). Esta alteración cromosómica aparece en el 25 % de los pacientes pediátricos con LLA de células B, fue descrita por primera vez en 1994².

El resultado molecular de la traslocación es la fusión de dos genes: ETV6 mapeado en 12p13 y el RUNX1 localizado en 21q22. Esta fusión codifica para un factor de transcripción quimérico que compromete la porción N-terminal de ETV6 y casi toda la proteína RUNX1 y convierte a esta última, de un modulador transcripcional a un represor transcripcional de genes diana del RUNX1³. Se han descrito genes dianas regulados directa e indirectamente por este transcrito de fusión que explica el mecanismo asociado con la proliferación, transporte y migración celular, así como las respuestas al estrés⁴.

Modelos de investigación ejemplifican que este gen de fusión se forma durante el desarrollo fetal y aunque constituye el inicio, su presencia no es suficiente para la transformación leucémica, ya que solamente el 1 % de los recién nacidos con este gen de fusión, desarrollará la leucemia. Estudios en gemelos concordantes para la LLA revelaron que el gen de fusión ETV6/RUNX1 es un evento genético prenatal con otras alteraciones subclonales y probablemente postnatales. Sugieren que la función preleucémica está asociada con expansión clonal temprana en la línea fetal de células B⁵⁻⁶.

La implicación pronóstica de esta alteración cromosómica ha sido ampliamente debatida. La mayoría de las publicaciones asocian esta alteración con un pronóstico favorable⁷⁻⁸. Otros estudios plantean que este no parece ser un factor independiente, por lo que la respuesta favorable de estos pacientes pudiera estar relacionada con otros factores como edad, sexo, recuento de leucocitos, inmunofenotipo, hiperdiploidía y respuesta a la terapia⁹⁻¹⁰. Existe evidencia de que la presencia de alteraciones cromosómicas secundarias, tales como la delección del alelo ETV6 no traslocado o la duplicación del cromosoma 21 derivativo, influirían de forma adversa en el curso clínico de los pacientes¹¹.

El presente trabajo describe los patrones de señales de hibridación observados en pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de células B, con el uso de la sonda *ETV6/RUNX1 Dual color Dual fusión* mediante la técnica de FISH, a partir de la introducción de este método diagnóstico en el Instituto de Hematología e Inmunología¹².

MÉTODO

Se estudiaron muestras de sangre medular de 25 pacientes pediátricos con diagnóstico de LLA de células B, recibidas en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología, entre agosto de 2015 y mayo de 2016.

Para el estudio por FISH de la t (12;21) y su gen de fusión se utilizó la sonda comercial LSI ETV6/RUNX1 *Dual color Dual fusión*.

Preparación de las muestras

Las muestras fueron cultivadas de igual manera que para la técnica de citogenética convencional y posteriormente se realizó el procedimiento descrito para el método de FISH.¹²

Análisis

Las señales de hibridación se analizaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51. Los núcleos con marcaje evidente fueron seleccionados para el conteo de las señales. Se descartaron los que aparecían sobrelapados o con un marcaje débil.

En cada muestra se analizaron 200 núcleos. El resultado se consideró positivo cuando la alteración cromosómica estuvo presente en más del 10% de los núcleos observados, según la bibliografía consultada.¹³⁻¹⁴

Cada cromosoma (en la región de interés) se marca con un fluorocromo diferente, el cromosoma 12 en verde (V), y el cromosoma 21 en rojo (R). En las células negativas, el patrón normal de hibridación muestra dos señales verdes (2V) y dos señales rojas (2R) separadas e independientes, correspondientes a cada par cromosómico, (2V2R).

En las células positivas a la t(12;21)(ETV6/RUNX1+) se observa el patrón (1V1R1r1A), donde la señal V corresponde al cromosoma 12 normal, la R al cromosoma 21 normal, una roja pequeña (r) al cromosoma 12 derivativo y una señal amarilla (A) al derivativo del cromosoma 21. Se pueden observar otros patrones de señales cuando existen alteraciones cromosómicas adicionales.

RESULTADOS

Del total de 25 muestras marcadas con la sonda LSI ETV6/RUNX1, 17 resultaron negativas al gen de fusión ETV6/RUNX1 ([Fig. 1a](#)), pero en tres de estas se observó un patrón de hibridación 3V4R que sugieren hiperdiploidía ([Fig. 1b](#)) mientras que en otra se observó un patrón correspondiente a trisomía del cromosoma 21 (2V3R) ([Fig. 1c](#)).

Se observaron ocho muestras positivas al gen de fusión ETV6/RUNX1 con diferentes patrones de hibridación. ([Tabla](#)) ([Fig. 2a-c](#))

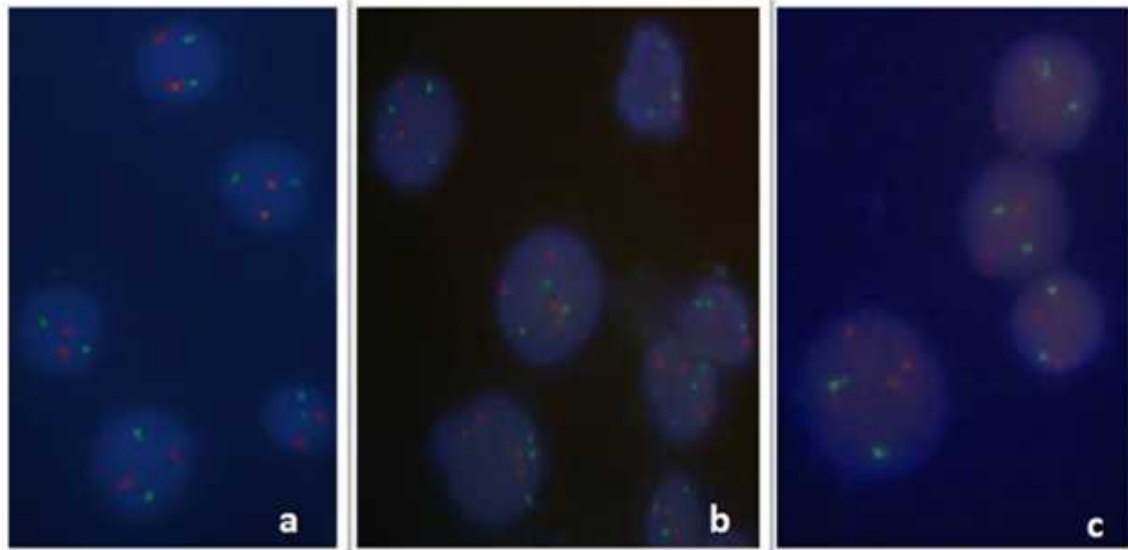


Fig. 1. FISH ETV6/RUNX1 negativos en células en interfase con el empleo de la sonda *LSI ETV6/RUNX1 DCDF*
V: señal verde (cromosoma 12), R: señal roja (cromosoma 21)
a) 2V 2R (patrón normal): cromosomas 12 y 21 normales
b) 3V 4R (hiperdiploidía): tres copias del cromosoma 12 y cuatro del cromosoma 21
c) 2V 3R (trisomía 21): dos cromosomas 12 y trisomía del 21

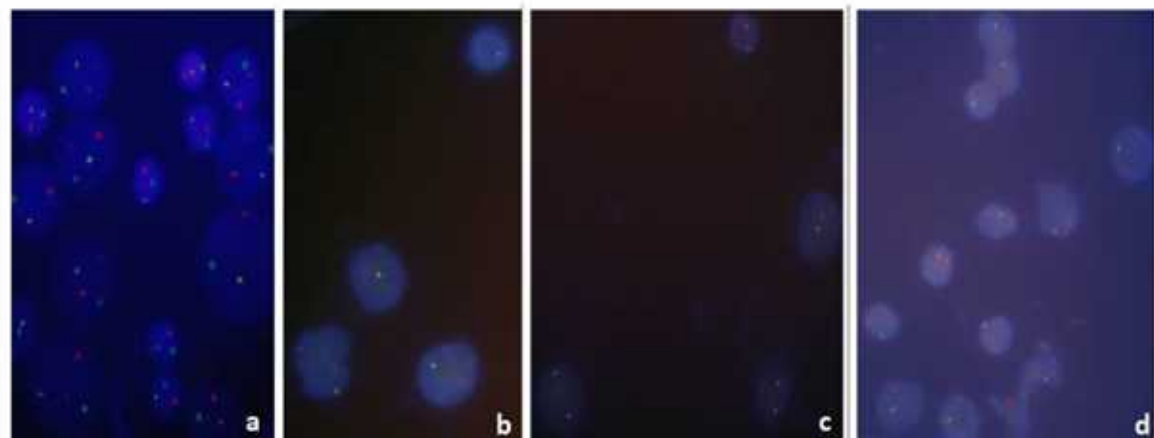


Fig. 2. FISH ETV6/RUNX1 positivas en células en interfase con el empleo de la sonda *LSI ETV6/RUNX1 DCDF*
V: señal verde (cromosoma 12), R: señal roja grande (cromosoma 21),
r: señal roja pequeña (cromosoma 12 derivativo), A: señal amarilla (cromosoma 21 derivativo)
a) 1V1R1r1A (patrón típico): cromosoma 12 normal, cromosoma 21 normal, cromosoma 12 derivativo y cromosoma 21 derivativo.
b) 1R1r1A (delección del cromosoma 12 normal, cromosoma 21 normal, cromosoma 12 derivativo y cromosoma 21 derivativo).
c) 1R1r2A (delección del cromosoma 12 normal, cromosoma 21 normal, cromosoma 12 derivativo y dos copias del cromosoma 21 derivativo)
d) 4R1r1A (delección del cromosoma 12 normal, tetrasomía del cromosoma 21, cromosoma 12 derivativo y cromosoma 21 derivativo)

Tabla. Alteraciones citogenéticas en las muestras etv6/runx1 positivas

Alteraciones	No. Muestras
ETV6/RUNX1 (como única alteración)	4
ETV6/RUNX1 + del (12p)	2
ETV6/RUNX1 + del (12p) y dos copias der (21)	1
ETV6/RUNX1 + del (12p) y copias extras del cromosoma 21	1
Total	8(32%)

- ETV6/RUNX1: positivo a t(12;21)
- del(12p): deleción en el brazo corto del cromosoma 12 no traslocado
- der(21): derivativo del cromosoma 21

DISCUSIÓN

La traslocación t(12;21) (p13;q22) (ETV6/RUNX1) es la alteración cromosómica estructural más frecuente en los pacientes pediátricos con LLA de precursores de células B. La mayoría de los autores reportan una frecuencia del 25 %^{11, 15,16}, en este estudio se encontró una frecuencia superior (32 %), este resultado pudiera deberse al tamaño de la muestra estudiada, aunque existen reportes entre 18 % y 33 %.^{1,7}

En el diagnóstico inicial de la enfermedad, más del 80% de los pacientes ETV6/RUNX1 presentan alteraciones cromosómicas adicionales (ACA) en los loci de los genes ETV6 y RUNX1, detectado por FISH. Estas alteraciones incluyen la deleción del gen ETV6 no traslocado (70 %), una copia extra de RUNX1 (23 %) y del cromosoma 21 derivativo (21 der) (10 %). En pacientes en recaída estas alteraciones también son detectadas en el 85%. Existe controversia acerca de si estas ACA pueden influir en el pronóstico de la enfermedad^{11, 18}.

En este estudio las ACA se presentaron en el 50% de las muestras ETV6/RUNX1+. La deleción del gen ETV6 en el alelo normal (12p no traslocado) fue la más frecuente, lo cual coincide con la literatura^{7,10}. Se ha descrito que la pérdida de este alelo ocurre en el período postnatal durante la proliferación mitótica de las células ETV6/RUNX1+¹⁹.

En el locus 12p13, además del gen ETV6, se describen genes candidatos como el BCL2L14, el cual codifica para un miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 y el gen CDKN1B que codifica para una ciclina - inhibidor cinasa dependiente, que es un regulador negativo de la progresión del ciclo celular de G1 a fase S²⁰. La pérdida de estos genes por la deleción está asociada con una remisión más corta de la enfermedad; sin embargo, los análisis multivariados no detectan su influencia pronóstica independiente. En otros estudios de grandes series, se demuestra que la presencia de esta alteración no predice un mayor riesgo de recaída en los pacientes^{17, 18}.

La copia extra del cromosoma (21 der) se reporta con mayor frecuencia en pacientes en recaídas. En este estudio se observó en una muestra ETV6/RUNX1+, que además presentaba la delección ETV6. La mayoría de los autores concuerdan en que la presencia de esta alteración citogenética (dup 21q der) implica un pronóstico desfavorable y requiere un tratamiento más agresivo²¹⁻²².

La copia extra de RUNX1 es una de las alteraciones cromosómicas numéricas más frecuentes en estos casos²³. Desde el punto de vista citogenético se puede interpretar como una trisomía o polisomía del cromosoma 21 de acuerdo al número de señales que observemos en el FISH. Se presenta con mayor frecuencia en pacientes en recaída que al inicio de la enfermedad. Se ha reportado tanto en pacientes ETV6/ RUNX1+ como negativos, lo que coincide con los resultados de este estudio²⁴⁻²⁵.

El mecanismo que explica la relación entre la triplicación del cromosoma 21 y la LLA-B no está bien definido. No obstante, se conoce que en pacientes con Síndrome Down es mayor el riesgo de padecer este tipo de leucemia. Además, la polisomía 21 es la aneuploidía somática más frecuente en la LLA-B. En un estudio realizado con cepa de ratones que poseían una copia adicional de 31 genes identificados en el cromosoma 21q22, se observó que los linfocitos crecían de forma incontrolada, lo mismo que en pacientes con LLA. Las exploraciones de los linfocitos B de estos ratones para determinar su "firma molecular" o el patrón de actividad genética que los distingue de los linfocitos B normales, demostró diferencias. La principal diferencia fue que un grupo de proteínas llamadas PRC2 no funcionaba en las células anormales. Esto impulsaba a los linfocitos B a su división y proliferación de forma prematura²⁶.

La hiperdiploidía está presente en el 25% de los pacientes con LLA-B, la cual puede ser identificada por técnica de citogenética convencional^{1, 27}. Está asociada a buen pronóstico cuando se presenta como única alteración citogenética. Se correlaciona con otros parámetros conocidos de pronóstico favorable, como: bajo conteo de leucocitos, edad entre 1 y 10 años, inmunofenotipo pre-B y respuesta hematológica temprana. En la literatura se reporta, la hiperdiploidía tanto en pacientes ETV6/RUNX1+, como negativos²⁸. En este estudio solo se observó en pacientes negativos a dicho gen de fusión.

El FISH resulta útil para la detección de alteraciones cromosómicas crípticas no visibles al cariotipo, como la t(12;21) y su gen de fusión ETV6/RUNX1 en la LLA-B. Además, facilita la detección de alteraciones adicionales que aportan información de valor pronóstico y a su vez permite una adecuada terapéutica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kerketta LS, Baburao V, Ghosh K. Pattern of chromosome involvement in childhood hyperdiploid pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia cases from India. *Indian J Hum Genet.* 2014 Jan;20(1):32-6.
2. Romana SP, Le Coniat M, Berger R. t(12;21): a new recurrent translocation in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 1994 Mar; 9(3):186-91.
3. Fuka G, Kauer M, Kofler R, Haas OA, Panzer-Grumayer R. The Leukemia-Specific Fusion Gene *ETV6/RUNX1* Perturbs Distinct Key Biological Functions Primarily by Gene Repression. *PLoS One.* 2011;6(10):e26348. doi: 10.1371

4. Linka Y, Ginzl S, Krüger M, Novosel A, Gombert M, Kremmer E et al. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. *Blood Cancer J.* 2013; Oct 11; 3:e151.
5. Alpar D, Wren D, Ermini L, Mansur MB, Van Delft FW, Bateman CM et al. Clonal origins of ETV6-RUNX1⁺ acute lymphoblastic leukemia: studies in monozygotic twins. *Leukemia.* 2015 Apr;29(4):839-46.
6. Nieburhr B, Kriebitzsch N, Fischer M, Beherens K, Gunther T, Alawi M et al. RUNX1 is essential at two stages of early murine B-cell development. *Blood* 2013 Jul 18;122(3):413-23.
7. Artigas CG, Cabrera ME, Melo A, Páez E, Arriagada M, Astete C et al. Frecuencia de los genes de fusión TEL/AML1 y BCR/ABL en pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda. *RevMed Chile* 2006 Nov; 134(11):1367-76.
8. Rahnemoun AR, Zaker F, Izadayar M, Ansari S, Poopak B, Tadavosyan Y. Prevalence of ETV6/RUNX1 Fusion Gene in Pediatric Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia in Iran. *Iran J Pediatr.* 2013 Dec; 23(6):681-6.
9. De Braekeleer E, Basinko A, Douet-Guilbert N, Morel F, Le Bris MJ, Berthou C et al. Cytogenetics in pre-B and B-cell acute lymphoblastic leukemia: a study of 208 patients diagnosed between 1981 and 2008. *Cancer Genet Cytogenet.* 2010 Jul 1;200(1):8-15.
10. Barbany G, Andersen MK, Autio K, Borgström G, Cavalier L, Golovleva I et al. Additional aberrations of the ETV6 and RUNX1 genes have no prognostic impact in 229 t(12;21)(p13;q22)-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias treated according to the NOPHO-ALL-2000 protocol. *Leuk Res* 2012 Jul; 36(7):936-8.
11. Peter A, Heiden T, Taube T, Korner G, Seeger K. Interphase FISH on TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia relapses - analysis of clinical relevance of additional TEL and AML1 copy number changes. *Eur J Haematol* 2009 Nov;83 (5):420-32.
12. Lavaut Sánchez K, Hernández Aguilar N. Hibridación in situ fluorescente: herramienta en el diagnóstico de las hemopatías malignas. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2015;32(1):99-109.
13. Espinet B, Salido M, Solé F. Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones. Utilidad de la citogenética en el estudio de las neoplasias. *Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular. Servei de Patologia. Hospital de Mar de Barcelona.* (citado junio 30, 2015). Disponible en: http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso_Largo_Patologia_Molecular/Citogenetica_molecular.PDF.
14. Solé F. Bases técnicas del FISH. *Servei de Patologia. Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular Hospital del Mar Barcelona.* (citado junio 30, 2015) Disponible en: https://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=065873b3-02a9-452f-9b49-605a3ebcbddd&groupId=10157)

15. Coccé MC, Alonso CN, Rossi JG, Bernasconi AR, Rampazzi MA, Felice MS et al. Cytogenetic and Molecular Findings in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia: Experience of a Single Institution in Argentina. *Mol Syndromol*. 2015 Oct; 6(4):193-203.
16. Liang DC, Shih LY, Yang CP, Hung IJ, Liu HC, Jaing TH *et al*. Frequencies of ETV6-RUNX1 fusion and hyperdiploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia are lower in far east than west. *Pediatr Blood Cancer*. 2010 Sep;55(3):430-3.
17. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomized trial. *Lancet Oncol*. 2010 May;11(5):429-38.
18. Bokemeyer A, Eckert C, Meyr F, Koerner A, von Stackelberg A, Ullmann R et al. Copy number genome alterations are associated with treatment response and outcome in relapsed childhood ETV6/RUNX1-positive acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2014 April;99(4):706-14.
19. Ivanovski I , Garavelli L , Djurić O , Ćirović A , Škorić D , Ivanovski PI . Mitotic crossover promotes leukemogenesis in children born with TEL-AML1 via the generation of loss of heterozygosity at 12p. *Pediatr Med Chir*. 2015 Jun 30;37(2): pmc.2015.112. doi: 10.4081/pmc.2015.112.
20. Guo B, Godzik A, Reed JC. Bcl-G, a novel pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2780-5.
21. Fonzar MA, Marques-Salles TJ, Mkrtchyan H, Soares-Ventura EM, Pereira E , Cartaxo MT , et al. Extra Copies of der(21)t(12;21) plus Deletion of *ETV6* Gene due to dic(12;18) in B-Cell Precursor ALL with Poor Outcome. *Case Rep Genet*. 2012;2012:186532. doi: 10.1155/2012/186532
22. Al-Sweedan SA, Neglia JP, Steiner ME, Bostrom BC, Casey T, Hirsch BA. Characteristics of patients with TEL-AML1-positive acute lymphoblastic leukemia with single or multiple fusions. *Pediatr Blood Cancer* 2007 May;48 (5):510-4.
23. Pérez-Vera P, Montero-Ruiz O, Frías S, Rivera-Luna R, Valladares A, Arenas Detal. Multiple copies of RUNX1: description of 14 new patients, follow-up, and a review of the literature. *Cancer Gen Cytogen*. 2008 Jan;180(2):129-34.
24. Moorman VA, Konn ZJ, Barber KE. The spectrum and prognostic relevance of additional abnormalities, involving 12p and 21q, in children with ETV6-RUNX1 positive acute lymphoblastic leukaemia (ALL). *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2008;112: 430.
25. Aydin C, Cetin Z, Manguoglu AE, Tayfun F, Clark OA, Kupesiz A et al. Evaluation of ETV6/RUNX1 Fusion and Additional Abnormalities involving ETV6 and/or RUNX1 Genes Using FISH Technique in Patients with Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Indian J Hematol Blood Transfus*. 2016 Jun;32(2):154-61.
26. Lane AA, Chapuy B, Lin CY, Tivey T, Li H, Townsend EC et al. Triplication of a 21q22 region contributes to B cell transformation through HMGN1 overexpression and loss of histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat Genet*. 2014 Jun;46(6):618-23.

27. Dastugue N, Suciú S, PlatG, Speleman F, CavéH, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 2013 Mar 28;121(13):2415-23.

28. Katsibardi K, Braoudaki M, Karamolegou K, Tzortzatos-Stathopoulou F. Clinical outcome of the coexistence of ETV6/RUNX1 and high hyperdiploidy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014 Aug;55(8):1946-8.

Recibido: julio 15, 2016.

Aceptado: octubre 21, 2016.

Dra. Kalia Lavaut Sánchez. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268. Email: rchematologia@infomed.sld.cu