

# ESTUDIO DE MARCADORES MOLECULARES COMO FACTORES PRONÓSTICOS EN LEUCEMIAS INFANTILES

Ayala-Lugo A<sup>2-3</sup>, Zelada O<sup>1-2</sup>, Figueredo D<sup>1-2</sup>, Jolly V<sup>3</sup>, Franco L<sup>3</sup>; Samudio MA<sup>1</sup>, Samudio A<sup>1-2</sup>

1. Fundación Red Nacional de Lucha Contra el Cáncer Infantil. RENACI.
2. Laboratorio de Citometría de Flujo y Biología Molecular (HOPE). Hospital de Clínicas. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Asunción (FCM – UNA).
3. Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción. San Lorenzo, Paraguay. Montevideo Uruguay.

PROGRAMA PROCIENCIA – CONVOCATORIA 2013 – PROYECTO 14-INV-327

## INTRODUCCIÓN

La leucemia es el cáncer más común en pediatría. A nivel mundial representa aproximadamente el 35% de todos los tipos de cáncer en menores de 15 años. Se originan debido a mutaciones en las células progenitoras que, según la línea celular afectada, puede ser de origen mieloide o linfóide. En pediatría las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) constituyen el 75 a 80% de los casos. Actualmente el tratamiento de las leucemias pediátricas está fundamentado en la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo de acuerdo a parámetros clínicos y biológicos presentes al momento del diagnóstico y a la respuesta al tratamiento. Entre los parámetros biológicos de mayor importancia se encuentra la presencia de anomalías genéticas que se utilizan como marcadores moleculares, constituyéndose estas como uno de los factores pronósticos más consistentes y decisivos para el tratamiento del paciente.

## OBJETIVO

El objetivo del presente proyecto es estudiar los marcadores moleculares como factores pronósticos de riesgo en pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Fueron incluidos pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia que acudieron al Departamento de Hemato-Oncología Pediátrica FCM – UNA entre marzo del 2016 julio del 2018. Para el diagnóstico de leucemias se estudió la citomorfología y el inmunofenotipo utilizando paneles de linaje y anticuerpos específicos de línea mediante citometría de flujo (tabla 1). Para la detección de los marcadores moleculares de riesgo en las leucemias linfoblásticas agudas tipo B (LLA B) se estudió la presencia de los rearrreglos génicos *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABL p190*, *MLL-AF4* Y *E2A-PBX*, que corresponden a las translocaciones t(12;21), t(9;22), t(4;11) y t(1;19) respectivamente. Para la detección de marcadores moleculares en las leucemias de origen mieloide (LMA) se estudió la presencia de los rearrreglos: *PML-RARA*, *AML1-ETO*, *BCR-ABL p210* y *CBFB/MYH11*, que corresponden a las translocaciones t(15;17), t(12;21), t(9;22) e inv (16).

La técnica utilizada fue RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) a partir de ARN extraído de células de médula ósea (en EDTA), con posterior revelado en geles de agarosa al 2% y tinción con *sybrgreen*. Se utilizó como gen control de calidad de la muestra el estudio del gen ABL.

Tabla 1. Panel de anticuerpos utilizados

Panel de anticuerpos utilizados	
LLA tipo B	Anti-CD10, anti-CD19, anti-CD20, anti-CD22, anti-CD79A, anti-IgM, anti kappa, anti Lambda
LLA tipo T	Anti-CD7, anti-CD2, anti-CD8, anti-CD3, anti-CD5, anti-CD1a
LMA	Anti-CD13, anti-CD33, anti-CD14, anti-CD15, anti-CD65, anti-CD7.1, anti-CD61, anti-mieloperoxidasa
Otros	Anti-HLA-DR, anti-TdT, anti-CD38, anti-CD34, anti-CD45, anti-CD56, anti-Korsa

## RESULTADOS

Fueron incluidos 100 pacientes pediátricos con diagnóstico de leucemia. La procedencia y las características sociodemográficas de los pacientes presentan en la fig. 1 y tabla 1.

El 85% de los pacientes presentaron diagnóstico de LLA B, 14% de LMA y 1% de LMC. En la fig. 2 se observa los diferentes tipos de leucemias presentes en los pacientes determinados por inmunofenotipo mediante citometría de flujo.

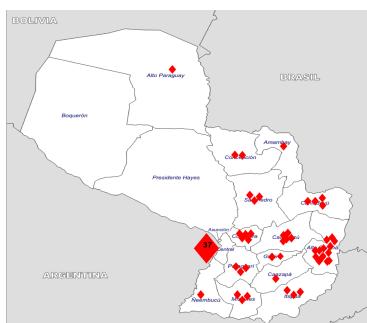


Figura 1. Lugar de residencia de los pacientes reclutados por Departamento

Tabla 2. Características sociodemográficas de los pacientes en estudio.

Características Socio-demográficas	n	%
<b>Sexo</b>		
Masculino	58	58
Femenino	42	42
<b>Edad en años. Mediana = 6 años (3 meses – 17 años)</b>		
< 1 año	5	5
1-9 años	55	55
>10 años	40	40
<b>Ingreso Familiar</b>		
Menor al salario mínimo	61	61
Salario mínimo	35	35
Sin datos	5	5
<b>Nivel de educación de los padres</b>		
Analfabeto	1	1
Primario	42	42
Secundario	41	41
Terciario	9	9
Sin datos	7	7

## RESULTADOS (cont)

En relación al estudio de los marcadores moleculares el 38% de la población estudiada era portador de algún marcador molecular. En el caso de las LLA B el 36.5% (31/85), en las LMAs el 47% (7/15) y en el caso de la LMC (1/1). En la figura 3 se observan diferentes frecuencias y distribuciones de los marcadores moleculares.

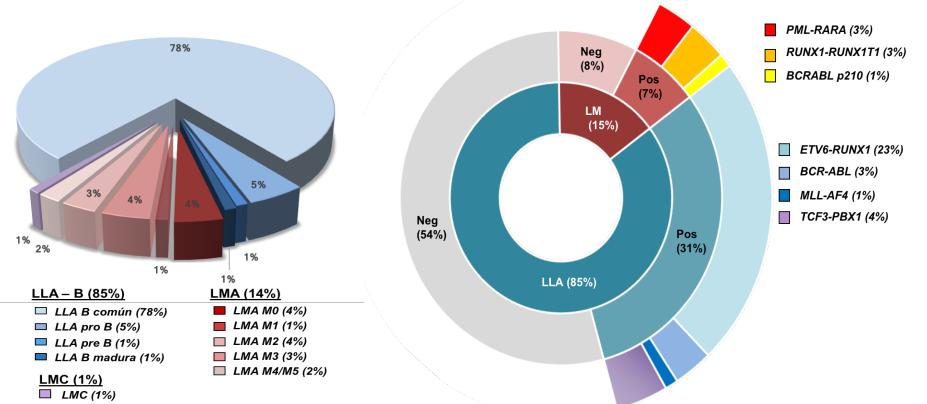


Fig 2. Tipos de leucemia en la población estudiada.

Fig 3. Distribución y frecuencias de los marcadores moleculares encontrados de acuerdo al tipo de leucemia.

Las características clínicas al momento del diagnóstico en relación a la presencia de los diferentes marcadores moleculares se observa en la tabla 3.

Tabla 3. Características de los pacientes en relación al marcador molecular detectado

Marcador molecular	n	H/M	Edad (rango en años)	Mediana de GB* /mm <sup>3</sup>	Rango de GB al diagnóstico/mm <sup>3</sup>	Grupo de riesgo**	Inmunofenotipo (por citometría de flujo)	media de blastos al Dx (%)
<b>LLA B</b>								
<i>ETV6-RUNX1</i>	23	14:9	5,5 (2,5-15)	7.420	3220-150000	estandar	LLA B común	82
<i>BCR-ABL</i>	3	0:3	5 (4-5)	17.700	3250-56000	est.alto	LLA B común	52
<i>MLL-AF4</i>	1	0:1	0,5	300.000	----	alto	LLA pro B	88
<i>TCF3-PBX1</i>	4	0:4	1,3 (5-15)	5.700	4200-111000	estandar	LLA B común + LLA B pro B	72
<b>LMA</b>								
<i>PML-RARA</i>	3	1:2	1,6 (1,5-16)	2.000	980-2000	estandar	LMA M3	72
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	3	3:0	1,0 (3-15)	16.000	12800-28100	alto	LMA M2	70
<b>LMC</b>								
<i>BCR-ABL</i>	1	1:0	14	150.000	----	estandar	LMC	43

\*GB: Glóbulos blancos. \*\* Grupo de riesgo según protocolo

## DISCUSIÓN

Los avances en las técnicas de diagnóstico, y en particular en la biología molecular, han permitido identificar mutaciones en las células leucémicas presentes al momento del diagnóstico. Estas mutaciones se han asociado al pronóstico del paciente y, consecuentemente, han permitido su estratificación en grupos de riesgo para su tratamiento. Los resultados del presente proyecto identificaron la presencia de 9 marcadores moleculares en los diferentes tipos de leucemias. Siendo marcadores de buen pronóstico *ETV6-RUNX1* y *PML-RARA* y de alto riesgo (mal pronóstico): *BCR-ABL*, *MLL-AF4*, *RUNX1-RUNX1T1* y *E2A-PBX*. Cabe mencionar que el estudio por técnicas de biología molecular es de vital importancia debido a la existencia de mutaciones crípticas, como el caso de la t(12;21) que no pueden ser visualizadas por técnicas de citogenética.

## CONCLUSIÓN

El presente trabajo pretende estudiar marcadores moleculares de riesgo en aproximadamente 100 casos de leucemia infantil *de novo* en pacientes que acudan al HOPE para su diagnóstico y tratamiento. Esperamos que su desarrollo contribuya a la implementación de protocolos clínicos de tratamiento donde la determinación de las alteraciones genéticas al momento del diagnóstico, facilite la estratificación de los pacientes en grupos de riesgo y, consecuentemente, el tratamiento del paciente. Esperamos también que contribuya para delinear las bases para protocolos nacionales de tratamiento de la leucemia infantil, considerando que es el primero que incluye estos marcadores.