

Instituto de Hematología e Inmunología

## REORDENAMIENTO DEL GEN MLL EN PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LEUCEMIA AGUDA

Lic. Raquel Levón Herrera, Dr. Alejandro González Otero, Dr. Porfirio Hernández Ramírez y Dra. Gisela Martínez Antuña

### RESUMEN

Los reordenamientos del gen MLL están presentes en la mayoría de los casos de leucemia aguda (LA) infantil y están asociados con variables biológicas específicas y con pobres resultados clínicos. Con el objetivo de analizar su incidencia y relevancia pronóstica realizamos un estudio molecular mediante la técnica de Southern blot, en 29 niños de nuestra institución con LA, los cuales se encontraban al inicio o en recaída de la enfermedad. Para el estudio empleamos la sonda FA4, que es un inserto genómico del gen MLL. Pudimos detectar reordenamiento genético en 3 pacientes menores de 1 año que tenían una LMA de tipo morfológico M5, con altos conteos leucocitarios y con visceromegalia. Estos 3 pacientes fallecieron sin alcanzar la remisión, lo que confirmó el valor del reordenamiento del gen MLL como indicador de leucemia de alto riesgo, y por tanto, como una herramienta apropiada para la administración oportuna de terapia adaptada al riesgo.

*DeCS:* REORDENAMIENTO GENICO/genética; LEUCEMIA LINFOCITICA AGUDA/genética; LEUCEMIA MIELOCITICA AGUDA/genética; INFANTE; FACTORES DE RIESGO; PRONOSTICO.

La leucemia aguda (LA) constituye la variedad de cáncer más frecuente en la infancia. Con una incidencia anual de 4,3 casos/100 000 niños menores de 14 años, comprende casi la tercera parte de todas las enfermedades malignas pediátricas. La mayoría (75 a 80 %) corresponde a leucemia linfocítica (LLA) o linfoblástica y el resto a mieloide (LMA); son muy raras las crónicas (2 %). La mayor incidencia ocurre entre los 2 y 5 años de edad, con un pico máximo a los 4.<sup>1</sup>

Dentro de la categoría genérica de LA, hay múltiples subpoblaciones de pacientes

con diferentes pronósticos y diferentes requerimientos de tratamiento. Varios hallazgos clínicos y de laboratorio en el momento del diagnóstico se han correlacionado con el pronóstico. Ellos incluyen los conteos de leucocitos y la infiltración de órganos (especialmente bazo, hígado, timo y ganglios linfáticos). En la LLA los niveles séricos de inmunoglobulinas y lactato deshidrogenasa, además del inmunofenotipo y las alteraciones citogenéticas, están asociados con el resultado. La importancia relativa de un factor dado varía entre los distintos

programas de tratamiento. La identificación de la terapia adecuada a menudo elimina las implicaciones pronósticas de algunos de estos rasgos desfavorables, lo que ilustra que el tratamiento por sí es el más importante factor pronóstico. Sin embargo, ciertas características parecen ser notablemente valiosas en los esquemas de clasificación de riesgo de la leucemia aguda y para la elección de estrategias de tratamiento adaptadas al riesgo clínico. Estas últimas incluyen la medida de masa leucémica total, especialmente los conteos de leucocitos, la edad del paciente y la configuración de determinados genes. Los infantes menores de 1 año al diagnóstico y pacientes con LLA que presentan las translocaciones t(9;22) y t(4;11), esta última que involucra el gen MLL, tienen un pronóstico particularmente pobre, independientemente de otras características que presentan y de los regímenes de tratamiento. Para estos grupos se han señalado diferencias en la biología de las células leucémicas y estos factores específicos se aplican, para estratificar los pacientes en diferentes grupos de tratamiento, acorde con su riesgo de recaída. Las estrategias de tratamiento corrientes son diseñadas para intensificar la terapia a pacientes con más alto riesgo, mientras que eliminan o reducen los componentes más tóxicos como la radiación, antraciclinas y epipodofilotoxinas en pacientes con más bajo riesgo de recaída.<sup>2</sup>

Algunas anomalías que afectan al gen MLL (también conocido como ALL-1, HRX y Htrx) localizado en la banda q23 del cromosoma 11 (11q23), son comunes en niños con LA. Todas estas anomalías confieren un pobre pronóstico, y han sido descritas en LLA, LMA e incluso en linfomas. La diversidad de fenotipos puede residir en la amplia variedad de parejas de fusión con el MLL, que son más de 15. Este

gen abarca 100 kb del ADN genómico, es expresado como un transcrito de 15 kb compuesto de 23 exones y codifica una proteína de 3 972 aminoácidos que está implicada en el desarrollo embriológico.<sup>3</sup>

En la leucemia humana, los puntos de ruptura de la translocación dentro del gen MLL, virtualmente en todos los pacientes, se agrupan en una pequeña región de 8,3 kb que abarca los exones del 5 al 11.<sup>3</sup>

El agrupamiento de las rupturas hace posible usar una sola sonda complementaria al ADN, que abarque el punto de ruptura, para detectar el reordenamiento virtualmente en cualquier paciente mediante análisis por *Southern blot*. Igualmente se puede usar RT-PCR para los puntos de ruptura comunes, en los cuales las otras parejas cromosómicas han sido clonadas.<sup>4</sup>

Aunque se desconoce el mecanismo transformante del MLL en la LA, la capacidad para usar las técnicas tanto de *Southern blot* como de RT-PCR para detectar reordenamiento de MLL, tiene una importancia clínica significativa, ya que estos pacientes tienen un pronóstico particularmente pobre al presentar una duración de la remisión y una supervivencia relativamente cortas. Por ello, estos casos pueden requerir de indicaciones terapéuticas intensivas, que pueden incluir el trasplante de médula ósea. Esto suele ser especialmente útil en el 10 % de pacientes que se presentan con un aparente "buen pronóstico", con citogenética normal, pero con reordenamientos citogenéticamente silentes de MLL.<sup>3</sup> Las técnicas moleculares también son muy valiosas en casos cuyos cariotipos son difíciles de analizar, entre otras cosas por una pobre morfología de las células en metafase o porque la cantidad de material para el análisis resulta insuficiente. En uno u otro caso se subestima la incidencia de los reordena-

mientos en 11q23. Sin embargo, el uso de métodos moleculares ha mostrado una incidencia de estas alteraciones del 50 al 80 % en la LMA y LLA en niños menores de 1 año.<sup>4</sup> El objetivo de nuestro trabajo fue conocer la incidencia y valor pronóstico de esta alteración molecular en niños atendidos en nuestra institución.

## MÉTODOS

Se estudiaron 29 niños con leucemia aguda (18 LLA, 7 LMA, 2 LA híbridas y 2 LA indiferenciadas), los cuales se encontraban al inicio o en recaída de la enfermedad, y cuyas edades estaban comprendidas entre 2 meses y 14 años (media de 5,3 años).

De las 18 LLA estudiadas, 17 eran de estirpe B y una de estirpe T. Las 7 LMA se distribuyeron según la clasificación FAB de la siguiente forma: 2 M2, 4 M5 y 1 M7. El estudio molecular se realizó por la técnica de Southern<sup>5</sup> y se utilizó la sonda designada como FA4, que es un inserto genómico de 480 pb situado entre los exones 8 y 9 del gen MLL. Se utilizaron las enzimas de restricción: Hind III, Bam HI y Eco RI. El ADN se obtuvo a partir de leucocitos de aspirados de médula ósea o de sangre periférica según el método convencional.<sup>5</sup>

## RESULTADOS

De los 29 niños estudiados para los reordenamientos del gen MLL mediante

análisis por *Southern blot*, 3 (10,3 %) presentaron el gen MLL en configuración reordenada al menos con 2 enzimas de restricción diferentes. Esto descarta la posibilidad de una digestión parcial o de un polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP). Estos pacientes mostraron bandas anormales, además de las normales o germinales. Los 26 niños restantes (89,7 %) tuvieron el gen MLL en configuración germinal y mostraron solo bandas germinales o normales (figura).

Los 3 pacientes con reordenamiento de MLL tenían una leucemia mieloide aguda (LMA) monocítica (subtipo M5 de la clasificación FAB). De estos 3 pacientes menores de 1 año, 2 tuvieron conteos de leucocitos mayores de  $100 \times 10^9/L$  y todos mostraron visceromegalia. El resultado para todos fue fatal: muerte súbita en un caso y fallo multiorgánico en los restantes (tabla).

## DISCUSIÓN

La leucemia en niños menores de 1 año (infantes) difiere en varios aspectos clínicos y biológicos de la leucemia en niños mayores o en adultos. La LLA en infantes a menudo está caracterizada por enfermedad extramedular, particularmente infiltración cutánea y del sistema nervioso central (SNC), hiperleucocitosis, y morfología monoblástica (M5) o mielomonoblástica (M4).<sup>6</sup> La LLA en infantes frecuentemente se caracteriza por una gran masa celular leucémica evidenciada por hiperleuco-

Tabla. Datos clínicos en el momento del diagnóstico de los infantes con reordenamiento del gen MLL

No.	Edad (meses)	Sexo	Diagnóstico	Leucocitos ( $\times 10^9/L$ )	Visceromegalia (tipo)	Causa de la muerte
1	6	M	LMA-M5b	148	Hepatoesplenomegalia	Fallo multiorgánico
2	2	M	LMA-M5a	100	Hepatoesplenomegalia	Súbita
3	5	F	LMA-M5a	11,6	Hepatomegalia	Fallo multiorgánico

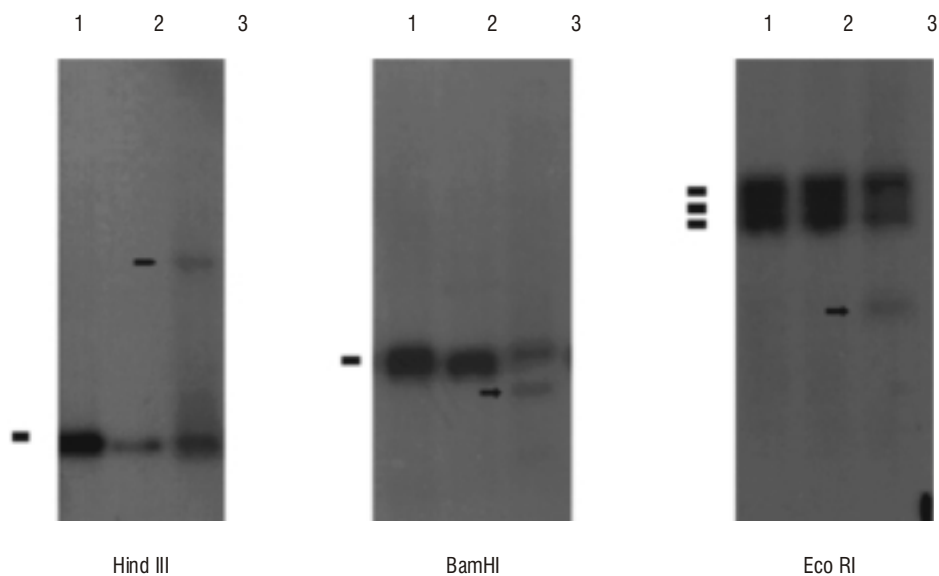


FIG. Análisis por Southern blot del ADN de 5 pacientes (carrileras 1-5) con leucemia aguda digerido con las enzimas de restricción *Hind III*, *Bam HI* y *Eco RI* e hibridado con la sonda FA4 del gen *MLL*. Las barras indican los fragmentos germinales o normales con cada enzima y las flechas indican los fragmentos reordenados. El paciente en la carrilera 4 demuestra bandas de reordenamiento con las 3 enzimas utilizadas. Los restantes pacientes muestran el gen *MLL* en configuración germinal.

citosis, esplenomegalia masiva y enfermedad del SNC y un inmunofenotipo de linaje B muy temprano (pre-pre B) con expresión de antígeno mielóide y ausencia de expresión del antígeno común de la LLA (CD10). La hiperdiploidía, un rasgo favorable en la LLA de otros grupos de edad, no es común en la LLA infantil.<sup>4,7,8</sup> El resultado suele ser pobre en niños menores de 1 año con una u otra forma de leucemia, donde los reordenamientos en 11q23, que involucran al gen *MLL*, son un hallazgo común.<sup>3,4,9,10</sup>

Nuestros resultados confirman estos planteamientos, ya que en nuestro estudio solo detectamos reordenamientos del gen *MLL* en el grupo de pacientes pediátricos menores de 1 año, donde esta alteración tiene una incidencia del 75 al 80 %.<sup>11</sup> En

tanto, los niños con edades comprendidas entre 1 y 14 años no manifestaron reordenamiento, lo que coincide con la literatura, donde se plantea una incidencia mucho más baja, solo del 5 %.<sup>11</sup>

Se ha insistido en que en edades menores de 6 meses, altos conteos leucocitarios, translocaciones que afectan la región 11q23 e inmunofenotipo CD10-, son predictores de un resultado particularmente pobre.<sup>2</sup>

Todos nuestros pacientes con reordenamiento tenían el tipo M5 en sus variantes más y menos diferenciadas. Esto concuerda con lo planteado por otros autores sobre la gran correlación de esta anomalía genética con los fenotipos morfológicos M4 y M5 de LMA.<sup>4,12,13</sup>

Se pudo observar una estrecha relación entre los resultados moleculares y los resultados clínicos en estos 3 pacientes, lo que confirmó el valor del estudio de los reordenamientos del gen MLL para identificar pacientes con leucemia de alto riesgo, y sugiere que la interrupción del gen MLL representa un paso crítico en la patogénesis de la LA en niños menores de 1 año. Se aprecia que aunque las características clínicas constituyen importantes indicadores pronósticos, las alteraciones genéticas de los blastos leucémicos pueden ser mejores predictores del resultado en los pacientes con LA.<sup>14</sup> Por lo tanto, estos datos apoyan el uso de una terapia adaptada al riesgo basado en esquemas de clasificación que incorporan tanto características genéticas como clínico-hematológicas.

La terapia acorde con el riesgo es un pre-requisito esencial para todo ensayo clínico, y este estudio que realizamos de la configuración del gen MLL, es una contribución notable a estos esfuerzos, con una trascendental importancia como criterio pronóstico y de tratamiento en todos los pacientes con LA, pero fundamentalmente en infantes menores de 1 año, que con mayor frecuencia presentan este gen reordenado y manifiestan las funestas consecuencias de esta alteración genética. También este estudio molecular permite monitorear la respuesta a la terapia y detectar la enfermedad mínima residual (EMR) al final de la terapia de inducción o intensificación. La EMR es responsable de la recaída y fallecimiento de los pacientes. Su detección mediante el inmunofenotipo y los métodos bioquímicos no es suficientemente sensible ni específica para los progenitores leucémicos. Sin embargo, los reordenamientos genéticos son marcadores estables de las células leucémicas, de ahí que su determinación es muy valiosa en la estimación de EMR en

cualquier punto del curso de la terapia, como predictor de recaída.<sup>2</sup>

La aplicación de las técnicas moleculares en la LA (*Southern blot*, RT-PCR, FISH) ha revelado que el 85 % de las LLA y el 70 % de las LMA en niños menores de 2 años, presentan las mismas anomalías del gen MLL que las encontradas en LMA secundaria a las drogas quimioterápicas inhibitoras de la ADN topoisomerasa II. La alta frecuencia de reordenamientos del gen MLL en los lactantes con LA y su hallazgo en casos de gemelos monocigóticos, ha sugerido la hipótesis de la adquisición intrauterina.<sup>1</sup> Recientemente se demostró la oncogénesis fetal intrauterina al reportarse un caso de muerte fetal a las 36 semanas de gestación debido a una LMA ampliamente diseminada del subtipo FAB M5, con translocación del gen MLL.<sup>15</sup> De este modo, la exposición fetal transplacentaria a carcinógenos sería probablemente un factor causal de las LA en niños menores de 1 año. Concretamente, la exposición materna gestacional a agentes en la dieta y los medicamentos que, de forma similar a las epipodofilotoxinas y antraciclina, inhiban la función de la enzima ADN topoisomerasa II, puede ser crítica en el desarrollo de la LA en la infancia.<sup>11,16</sup> Esta enzima cataliza la abertura y repliegue correcto de la estructura molecular del ADN. Es un componente primario del andamiaje de proteínas que no son histonas, el cual se une a grandes lazos de ADN en los cromosomas en metafase y es crítica durante el proceso de replicación, donde elimina el estrés torcional y previene o evita la desorganización del ADN de los cromosomas recién replicados.<sup>17,18</sup> Los inhibidores de topoisomerasa II se han encontrado en frutas y vegetales específicos, en la soya, café, vino, té y cocoa, así como en ciertos pesticidas, solventes y medicamentos.<sup>19</sup> También se ha visto relación entre la LA infantil y el consumo de marihuana por las gestantes.<sup>20</sup>

## SUMMARY

---

MLL gene rearrangements are present in most of the cases with infant acute leukemia (AL) and are associated with specific biological variables and with poor clinical outcomes. In order to analyze its incidence and prognostic relevance, a molecular study was conducted in 29 children with AL from our institution by the Southern blot technique. These patients were at the onset of the disease or into a relapse. The FA4 probe that is a genomic insertion of the MLL gene was used in this study. We could detect genetic rearrangement in 3 patients under 1 that had a morphological type M5 AML with high white cell counts and with visceromegaly. These 3 patients died without attaining remission, which confirmed the value of the MLL gene rearrangement as an indicator of high risk leukemia and, therefore, as an appropriate tool for the timely administration of therapy adapted to risk.

*Subject headings:* GENE REARRANGEMENT/genetics; LEUKEMIA, LYMPHOCYTIC, ACUTE/genetics; LEUKEMIA, MYELOCYTIC, ACUTE/genetics; CHILD, PRESCHOOL; RISK FACTORS; PROGNOSIS.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferrís J, García J, Alonso J, Berbel O. Factores de riesgo de las leucemias agudas infantiles. An Esp Pediatr 1999;50:439-46.
2. Niemeyer CM, Sallan SE. Acute lymphoblastic leukemia. En: Nathan DG, Oski SH. Hematology of infancy on childhood. 5 ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1998:1245-85.
3. Golub TR, Gilliland DG. The molecular biology of cancer. En: Nathan DG, Oski SH. Hematology of infancy on childhood. 5. Ed. Philadelphia: W.B Saunders, 1998:1093-146.
4. Sato Y, Rowley JD. Chromosomal abnormalities in childhood hematologic malignant diseases. En: Nathan DG, Oski SH. Hematology of infancy on childhood. 5 ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998; 1149-82.
5. Maniatis F, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Laboratory Cold Spring Harbor, 1982.
6. Kubonishi I, Seto M, Murata N, Kamioka M, Taguchi H, Miyoshi I. Translocation (10;11) (p13;q13) and MLL gene rearrangement in a case of AML (M5a) with aggressive leukemia cutis. Cancer Genet Cytogenet 1998;104:28-31.
7. Kaneko Y. Clinical and hematological characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations. Blood 1986;67:484-7.
8. Hernández P. Alteraciones moleculares en las leucemias agudas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1995;11:75-113.
9. Chen SC. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominant in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. Blood 1993;81:2386-93.
10. Cimino G, et al. Prognostic relevance of ALL - 1 gene rearrangements in acute leukemias. Leukemia 1995;9:39-45.
11. Cimino G, et al. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. Blood 1993;82:544-6.
12. Paul HB, et al. Molecular rearrangements of MLL gene are present in most cases of infant acute leukemia and are strongly correlated with monocytic (M5) or myelomonocytic (M4) phenotypes. J Clin Invest 1994;93:429-37.
13. Felipe M, Zubizarreta P, Alfaro E, Chantada G, Gallego M, Babalardo E, et al. 11q23 rearrangements in childhood acute leukemias: analysis of 23 patients observed in a single institution [Abstract]. Blood 1996;88(Suppl 10 Pte 2):3345 A.

14. Rubnitz JE, Look AT. Molecular genetics of childhood leukemias. *J Pediatr Hematol Oncol* 1998;20: 1-11.
15. Hunger SP, McGravon L, Meltesen L, Parker NB, Kassenbrock CK, Bitter MA. Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an MLL translocation. *Br J Hematol* 1998;103: 539-42.
16. Ross JA. Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int J Can* 1998 (Suppl 1);11:26-8.
17. Darnell J, Ladish H, Baltimore D. The structure of eukaryotic chromosomes. En: *Molecular cell biology*. 2 ed. New York: Scientific American Books, 1990:336-8.
18. ——— Replication, repair and recombination. En: *Molecular cell biology*. 2 ed. New York: Scientific American Books, 1990:469-72.
19. Ross JA, Potter JD, Reaman GH, Pendergrass TW, Robison LL. Maternal exposure to potential inhibitors of DNA topoisomerase II and infant leukemia (United States): a report from the children's Cancer Group. *Cancer Causes Control* 1996;7:581-90.
20. Collins SJ. Pathobiology of AML. En: Hoffman R, Benz EJ, Shatill SJ. *Hematology. Basic principles and practice*. 2 ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1037.

Recibido: 16 de noviembre de 1999. Aprobado: 21 de noviembre del 2000

Lic. *Raquel Levón Herrera*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800, Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf: (537)578268. Fax: (537)338979. e-mail:ihidir@hemato.sld.cu