

PRESENTACIÓN DE CASO

**Transcripto E2A-PBX1 en paciente pediátrico con leucemia aguda híbrida linfoide b/mieloide**

**E2A-PBX1 transcript in pediatric patient with acute hybrid lymphoid b/myeloid leukemia**

**Ana María Amor Vigil, Lesbia Fernández Martínez, Carmen Alina Díaz Alonso, Vera Ruiz Moleón, Kalia Lavaut Sánchez, Vianed Marsán Suárez, Sergio Machín García, Heidys Garrote Santana**

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

**RESUMEN**

Las leucemias agudas representan un grupo heterogéneo de hemopatías malignas que pueden ser de origen linfoide o mieloide en dependencia del clon celular que da lugar al proceso maligno. Sin embargo, existen casos de leucemias agudas con fenotipo mixto donde coexisten características propias de más de un linaje celular y que se conocen hoy como leucemias agudas de fenotipo mixto. Se presenta el caso de un paciente que se diagnosticó como una leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide mediante citometría de flujo. Se encontró la presencia del gen de fusión E2A-PBX1 que se forma como consecuencia de una traslocación entre los cromosomas 1 y 19. El paciente, un niño de 20 meses de nacido, falleció a los 12 días de iniciados los primeros síntomas clínicos. Se conoce que esta anomalía cromosómica está asociada a un pronóstico desfavorable, principalmente por la grave afectación del sistema nervioso central como en efecto ocurrió. Hasta donde se alcanzó a revisar, no se encontró un reporte similar en la literatura de una leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide positiva al gen defusión E2A-PBX1.

**Palabras clave:** transcripto E2A-PBX1; leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide.

---

**ABSTRACT**

The acute leukemias are an heterogenous group of malignant hemopathies diseases characterized by excessive proliferation of an immature cellular clon. Depending of the myeloid or lymphoid origin of such clon, the acute leukemia could be classified in

myeloid or lymphoid respectively. However, there are cases of acute leukemias with mixed phenotype where immunologic markers of more than one lineage are present. In the patient of this report was found a mixed immunophenotype pattern by flow cytometry and the entity was classified as acute hybrid lymphoid B/myeloid leukemia. Based on the initial diagnostic of acute lymphoid leukemia, the molecular study discovered the presence of E2A-PBX1 fusion gene. That molecular anomaly is formed as consequence of a translocation between the 1 and 19 chromosomes. The patient, a child of 20 months, died 12 days after the first clinical symptoms beginning. E2A-PBX1 fusion gene is associated to unfavorable outcome, mainly because the severe damage at the central nervous system as in fact it occurred. Until it was possible review, no any similar report was found about a case of acute hybrid lymphoid B/myeloid leukemia positive to the E2A-PBX1 fusion gene.

**Keywords:** E2A-PBX1 transcript; acute hybrid lymphoid B/myeloid leukemia.

---

## **INTRODUCCIÓN**

Las leucemias agudas (LA), representan un grupo heterogéneo de hemopatías malignas caracterizadas por la excesiva proliferación de un clon celular maligno bloqueado en cierto estado de su desarrollo. Dicho clon celular puede ser de origen linfocítico o mielocítico, dando lugar a las leucemias agudas linfocíticas o mielocíticas (LLA o LMA); pero existen casos de leucemias agudas donde coexiste más de un linaje celular. Estas pueden ser de tres tipos: aquellas de origen totalmente linfocítico con células inmaduras de linaje B y T; las de línea celular mixta con células mielocíticas inmaduras junto a células linfocíticas inmaduras B o T y las que expresan antígenos de las tres naturalezas B, T y mielocíticas. Históricamente se han utilizado varios términos para nombrar este grupo de leucemias: leucemia de linaje mixto, leucemia aguda híbrida, leucemia bilineal y leucemia bifenotípica.<sup>1</sup> Actualmente se utiliza el término leucemia aguda de fenotipo mixto (LAFM) que fue introducido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) en la clasificación de los tumores hematopoyéticos y linfocíticos publicada en 2008 y que se mantiene en la clasificación de 2016.<sup>2,3</sup>

Al momento de clasificar y diagnosticar a un paciente con una LA se analizan en conjunto las características citomorfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas. Los estudios citogenéticos y moleculares son importantes para la subclasificación de las LMA. En las LLA, la importancia de ambos estudios radica en la predicción del transcurso de la enfermedad.

En muchos casos, el examen morfológico del extendido de sangre periférica o medular y la citoquímica permiten identificar el origen mielocítico o linfocítico de los blastos. Sin embargo, en ocasiones no es posible llegar a una definición certera del linaje celular a través del estudio citomorfológico solamente. Por este motivo, el inmunofenotipo ha ganado protagonismo en la definición más precisa del linaje de los procesos leucémicos agudos.

Mediante la citometría de flujo y en base a la presencia de antígenos específicos, es posible diferenciar entre linfoblastos de origen T o B y mieloblastos. Los marcadores inmunológicos CD19, CD20, CD22 y CD79a son característicos de las células B, mientras que CD2, CD3, CD5 y CD7 están presentes en la superficie de las células T.

Excepto en el caso de las leucemias mieloides M0 y M7 (CD41, CD61), los marcadores mieloides son CD13, CD33, CD117 y la mieloperoxidasa (MPO). Sin embargo, en ocasiones se manifiesta una expresión antigénica aberrante que corresponde a la presencia de una LAFM.<sup>4</sup>

Las alteraciones citogenéticas más frecuentes en las LLA son las traslocaciones t (12;21) (p13;q22), t (9;22) (q34;q11), t (4;11) (q21;q23) y t(1;19) (q23;p13).<sup>5</sup> Como consecuencia, a nivel molecular se forman los genes de fusión TEL-AML1, BCR-ABL, MLL-AF4y E2A-PBX1, respectivamente. Actualmente el estudio de estas anomalías se realiza de manera rutinaria en laboratorios dedicados al diagnóstico y clasificación de las leucemias.

Particularmente, la E2A-PBX1 (también llamada TCF3-PBX1) es una alteración molecular mayormente asociada a la LLA de precursores B (pre-B), que puede aparecer en el 20 % de esta variedad, aunque también puede encontrarse en el 5% de las LLA en general.<sup>6</sup> Se presenta frecuentemente en niños con LLA pre-B y raramente en adultos. Esta traslocación implica a los genes E2A y PBX1, localizados en los cromosomas 19p13 y 1q23, respectivamente. El gen E2A es esencial en la linfopoyesis y la regulación del desarrollo normal de las células B. El producto de fusión E2A-PBX1 provoca una pérdida del control de la expresión normal de E2A al ser sustituida por una proteína quimérica con función anormal. Los pacientes portadores de este reordenamiento presentan características clínicas de alto riesgo tales como: un elevado conteo celular, altos niveles en suero de lactato deshidrogenasa y compromiso del sistema nervioso central (SNC).<sup>7</sup> Dado su pronóstico desfavorable y la posibilidad de adecuar el tratamiento, es importante conocer la presencia de esta alteración.

Se presenta el caso de un paciente con leucemia aguda híbrida linfóide B/mieloide que resultó positivo al gen de fusión E2A-PBX1.

## **PRESENTACIÓN DEL CASO**

Niño de 20 meses de nacido, sin antecedentes patológicos anteriores, que comenzó con aumento de volumen abdominal y prurito. Dos días después presentó fiebre persistente de 38 °C y al quinto día se detectó la presencia de blastos en sangre periférica. Ante este hallazgo, fue ingresado.

Al ingreso, el examen físico reveló mucosas pálidas, presencia de equimosis en los miembros inferiores y la región dorsal y, petequias. También, presentaba adenopatías pequeñas, movibles y no dolorosas, en las zonas axilar, inguinal y cervical. Las de mayor tamaño eran aproximadamente de 1,5 cm. Se detectaron ruidos taquicárdicos a la auscultación. La tensión arterial fue de 95/50 mmHg. Se palpó esplenomegalia y hepatomegalia de aproximadamente 5 y 4 cm, respectivamente.

El hemograma al diagnóstico mostró 89 g/L de hemoglobina,  $15,6 \times 10^9/L$  leucocitos y un conteo de plaquetas de  $18 \times 10^9/L$ . El leucograma mostró 8 % de segmentados, 68 % de linfocitos, 1 % de eosinófilos y 23 % de blastos.

A los cinco días del ingreso, se repitió el hemograma y se extrajo sangre medular para exámenes complementarios: medulograma, inmunofenotipo, cariotipo y estudio molecular. En esa fecha, la hemoglobina había descendido a 72 g/L, mientras que las plaquetas y los leucocitos habían aumentado a  $45 \times 10^9/L$  y  $51,2 \times 10^9/L$

respectivamente. Además, se observó en el leucograma, 80 % de blastos, 5 % de mielocitos, 5 % de segmentados, 6 % de linfocitos y 4 % de eosinófilos.

En el estudio citomorfológico de la sangre medular no fueron evaluables la integridad de los sistemas eritropoyético, megacariopoyético y granulopoyético. Se observó monotonía celular y 95 % de blastos de aspecto linfoide. Con estos datos, se concluyó que existía infiltración medular por LLA.

El perfil inmunológico del paciente, estudiado en sangre medular, reveló expresión de antígenos característicos de dos linajes celulares: linfoides B y mieloides (tabla). También hubo expresión de antígenos de linaje no específico; lo que permitió concluir que se trataba de una leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide.

**Tabla.** Inmunofenotipo de paciente pediátrico con leucemia aguda híbrida linfoide b/mieloide obtenido por citometría de flujo

Linaje linfoide B	Linaje mieloides	Linaje inespecífico
CD79a citoplasmático (29,2 %)	MPO* (20,3 %)	HLA-DR** (96,8 %)
CD19 (61,6 %)	CD13 (36,4 %)	HLA-DR** (96,8%)
CD20 (41,5 %)	CD41 (25,8 %)	CD34 (86,1%)
CD38 (21,1 %)		

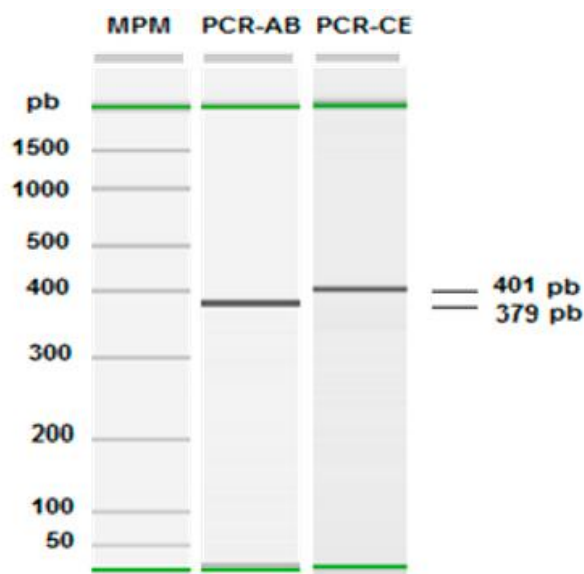
\* MPO mieloperoxidasa

\*\* HLA-DR antígeno leucocitario humano de histocompatibilidad tipo 2

Mediante hibridación *in situ* por fluorescencia (*FISH* por sus siglas en inglés), fue estudiado el gen de fusión BCR-ABL correspondiente a la traslocación t (9;22) (q34;q11) que resultó negativo. No se dispuso de estudio del cariotipo mediante citogenética convencional.

A partir de ARN aislado de sangre medular se realizó el estudio molecular de los genes de fusión BCR-ABL, TEL-AML1, MLL-AF4 y E2A-PBX1 que corresponden a las traslocaciones t (9;22) (q34;q11), t (12;21) (p13;q22), t (4;11) (q21;q23) y t (1;19) (q23;p13), respectivamente. Previa transcripción inversa, para transformar el ARN en ADN complementario, se amplificaron los fragmentos de interés mediante reacción en cadena de la polimerasa. Las secuencias de los cebadores o *primers* específicos utilizados, fueron las reportadas por el consenso europeo de estudio de las leucemias agudas conocido como BIOMED-1.<sup>8</sup> Fueron negativos los genes de fusión: BCR-ABL (sus dos transcriptos conocidos del inglés como *Mayor* y *minor*), TEL-AML1 y MLL-AF4; mientras que el gen de fusión E2A-PBX1 resultó positivo.

En la [figura](#) se muestra el resultado del análisis mediante electroforesis capilar del producto de la amplificación del gen de fusión E2A-PBX1. Se muestran dos amplificaciones positivas de la misma región con el uso de dos pares de cebadores. Con los cebadores E2A-A y PBX1-B, el peso molecular (PM) del fragmento resultó ser de 379 pb (pares de bases) mientras que el correspondiente reportado por BIOMED-1 es de 373 pb. Por su parte, en la PCR llamada de comprobación, con los cebadores E2A-C y PBX1-E3', se obtuvo un fragmento de 401 pb que resultó ser el mismo PM reportado por el protocolo de referencia.<sup>8</sup>



MPM: marcador de peso molecular.  
PCR-AB: PCR con los cebadores E2A-A y PBX-B.  
PCR-CE: PCR de comprobación con los cebadores E2A-C y PBX1-E3'.  
Se señalan los PM en pares de base (pb), de los fragmentos del MPM a la izquierda y de los fragmentos amplificados a la derecha.

**Fig.** Electroforesis capilar de la amplificación por PCR del gen de fusión E2A-PBX1 en paciente pediátrico con leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide.

La evolución del paciente fue inestable y a los siete días del ingreso falleció con un cuadro sobreagudo de hemorragia cerebral. El corto tiempo de evolución no permitió llevar a cabo el tratamiento correspondiente. La necropsia constató infiltración multivisceral que ocasionó sangrado cerebral importante.

## DISCUSIÓN

En el paciente que se reporta, las manifestaciones clínicas comenzaron a los 20 meses de edad de manera extremadamente agresiva, ya que falleció a los siete días del ingreso y solo cinco días antes había comenzado a manifestar síntomas clínicos alarmantes.

A pesar de que originalmente había sido clasificada como LLA, la presencia simultánea de marcadores específicos de células B junto a marcadores de linaje mieloide, permitió concluir que se trataba de una leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide. Se conoce que aproximadamente del 2 al 5 % de las leucemias agudas pueden tener un linaje celular de composición mixta o híbrida denominada LAFM por la OMS.<sup>2,3</sup>

En las LA aparecen alteraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales o una combinación de ambos tipos, que correlacionan con el curso favorable o desfavorable de la enfermedad. Al no contar con el estudio de citogenética convencional no fue posible conocer la presencia de estas alteraciones en el cariotipo. Sin embargo, algunas de ellas dan lugar a la formación de genes de fusión que pueden ser estudiados mediante técnicas de biología molecular. Al recibir un diagnóstico inicial de LLA, el estudio molecular se enfocó en las alteraciones propias y más frecuentes que aparecen en esta entidad.

Aunque no es frecuente, el gen de fusión BCR-ABL puede aparecer en las LLA y su presencia confiere mal pronóstico. Esta alteración ha sido reportada en las LAFM de manera esporádica. Dicho gen de fusión se traduce en una proteína quimérica de igual nombre, portadora de una tirosina quinasa (TQ) constitutivamente activa que interviene como factor de transcripción en muchos procesos celulares. Dos publicaciones recientes reportan respuesta favorable de las LAFM positivas al gen de fusión BCR-ABL al tratamiento con alguno de los inhibidores de TQ (ITQ).<sup>9,10</sup> De haber estado presente, los ITQ hubieran sido la opción terapéutica para el paciente.

La agresividad con que transcurrió la enfermedad en el paciente corresponde con la negatividad observada del gen de fusión TEL-AML1. Tal como se describe, la presencia de esta alteración, hubiera sido predictiva de un curso favorable.<sup>7</sup> Por la misma causa, es decir la adversidad del proceso leucémico de este paciente, así como por su corta edad, se pensó en la presencia del gen de fusión MLL-AF4. Alteración es de pronóstico muy desfavorable en las LLA pediátricas, generalmente asociada a niños menores de cinco años.<sup>7</sup> Sin embargo, el paciente también resultó negativo a esta anomalía.

El análisis de los productos de PCR mediante electroforesis capilar no dejó lugar a dudas acerca de la presencia del gen de fusión E2A-PBX1. La diferencia observada entre el PM del fragmento amplificado en la PCR y el reportado, con el uso de los cebadores E2A-A y PBX1-B, se consideró mínima. La segunda amplificación que se realizó con los cebadores E2A-C y PBX1-E3' permitió descartar cualquier sospecha de inespecificidad. Esta segunda amplificación llamada PCR *shifted* o de comprobación, fue diseñada precisamente para corroborar la especificidad de un fragmento amplificado con los cebadores A y B. Esto permite reducir el porcentaje de falsos positivos, ante la imposibilidad de secuenciar los productos de PCR en un laboratorio de diagnóstico molecular de rutina.<sup>8</sup> La amplificación en ambas PCR permitió asegurar que el paciente era positivo al gen de fusión E2A-PBX1.

Este gen generalmente aparece en el 5-6 % de los casos de LLA pediátrica y, aunque no exclusivamente, se asocia principalmente con las LLA pre-B.<sup>11</sup> Su presencia predice una baja tasa de curación, con alto riesgo de afectar al SNC. Sin embargo, en más de un estudio se ha evidenciado que el mal pronóstico asociado puede ser reducido en presencia de un tratamiento más intensivo.<sup>12,13</sup> Desafortunadamente, la evolución del paciente resultó en extremo agresiva y no fue posible, siquiera, iniciar el tratamiento correspondiente a su diagnóstico inicial de LLA.

El paciente evolucionó de manera desfavorable con una sobrevida de 12 días a partir del inicio de los síntomas. Al respecto se conoce que esta anomalía cromosómica está asociada a un pronóstico desfavorable, principalmente por la grave afectación del SNC como ocurrió en el paciente. Hasta donde se alcanzó a revisar, no se encontró un reporte similar en la literatura, de una leucemia aguda híbrida linfoide B/mieloide positiva al gen de fusión E2A-PBX1.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Weinberg OK, Arber DA. Mixed-phenotype acute leukemia: historical overview and a new definition. *Leukemia*. 2010; 24(11):1844-51
2. Borowitz MJ, Bene MC, Harris NL, Porwit A, Matutes E. Acute leukemias of ambiguous lineage. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW (eds). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. Lyon: IARC Press; 2008. p. 150-5.

3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May, 127(20):2391-2405, doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
4. Sarma A, Sharma JD, Bhuyan C, Hazarika M, Kataki AC. A Biphenotypic (Mixed Phenotypic) Acute Leukemia: Report of Two Cases with Immunophenotypic Study. *OJBD*. 2013 Jun;3(2):65-8. DOI: 10.4236/ojbd.2013.32014
5. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008.
6. Diakos C, Xiao Y, Zheng S, Kager L, Dworzak M, Wiemels JL. Direct and Indirect Targets of the E2A-PBX1 Leukemia-Specific Fusion Protein. *PLoS ONE* 2014;9(2):e87602. doi:10.1371/journal.pone.0087602
7. Alonso CN. t (1;19) (q23;p13) TCF3/PBX1. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. 2013;17(1):45-7. DOI: 10.4267/2042/48472.
8. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of BIOMED-1 Concerted Action. *Leukemia* 1999 Dec;13(12):1901-28.
9. Kawajiri C, Tanaka H, Hashimoto S, Takeda Y, Sakai S, Takagi T, et al. Successful treatment of Philadelphia chromosome-positive mixed phenotype acute leukemia by appropriate alternation of second generation tyrosine kinase inhibitors according to BCR-ABL1 mutation status. *Int J Hematol*. 2014;99(4):513-18.
10. Shimizu H, Yokohama A, Hatsumi N, Takada S, Handa H, Sakura T, et al. Philadelphia chromosome-positive mixed phenotype acute leukemia in the imatinib era. *Eur J Haematol*. 2014;93(4):297-301.
11. Harrison CJ. Targeting signaling pathways in acute lymphoblastic leukemia: new insights. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;(1):118-25.
12. Borowitz MJ, Devidas M, Hungez SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Children's Oncology Group. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 2008;111(12):5477-85.
13. Layton-Tovar C. Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Rev Med Inv* 2015 Ene-Jun;3(1):85-91. DOI: 10.1016/j.mei.2015.02.008.

Recibido: 9 de septiembre de 2016.

Aprobado: 3 de marzo de 2017.

*DraC. Ana María Amor Vigil*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, Cuba.  
Correo electrónico: rchematologia@infomed.sld.cu