

IDENTIFICATION OF MOLECULAR ALTERATIONS IN VENEZUELAN PATIENTS WITH ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA DIAGNOSIS



IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES EN PACIENTES VENEZOLANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

Castro Y.C.¹, Utrera R.¹

¹Laboratorio Genética Molecular Humana, Universidad Simón Bolívar, Venezuela.

Corresponding author:
Yarlenis Castro
liceyarlenis@gmail.com

 ORCID 0000-0002-0579-5717

Cite this article as:

Castro Y.C., Utrera R. 2020.
IDENTIFICACIÓN DE ALTERACIONES MOLECULARES EN PACIENTES VENEZOLANOS CON DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (1): 33-43.

Received: 08/07/2019

Revised version received: 04/23/2020

Accepted: 04/28/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.01.04

ISSN online version: 1852-6233

ABSTRACT

Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL) is the most common neoplasm in pediatric age. In recent years, between 15 and 20% of patients failed in their treatments. Knowledge on cytogenetics and molecular biology has an important impact on the determination of the prognosis and the appropriate treatment scheme. In Venezuela there is limited knowledge regarding the molecular genetics of this onco-hematological alteration. The aim of this work was to evaluate the most frequent genetic alterations in Venezuelan patients with a clinical diagnosis of acute lymphoblastic leukemia. A cross-sectional, descriptive and prospective study was carried out from 2006 to 2014, in which the translocations *ETV6/RUNX1*, *MLL/AF4*, *TCF3/PBX1*, *BCR/ABL1*, as well as mutations in the *PAX5* and *FLT3* genes were evaluated through the use of different types of PCR. One hundred and thirty patients with a clinical diagnosis of acute lymphocytic leukemia were included in the study. Molecular alterations were identified in 56 patients (43.1%), in which we observed the presence of one or several alterations in conjunction in the same patient. The alterations identified were t(12; 21) (11.5%), t(4; 11) (8.5%), t(1; 19) (10%), t(9; 22) (20.8%), ITD-*FLT3* (14.8%), P80S mutation (4.2%) and S77del (4.2%) in the *PAX5* gene. The prevalence of *BCR/ABL* is one of the highest described so far in cases of ALL where most of the population is made up of pediatric patients. These results represent the first molecular study of ALL in Venezuela, laying the foundations for the diagnosis and monitoring of the disease in its population.

Key words: Acute Lymphoblastic Leukemia; Translocations; *ETV6/RUNX1*; *MLL/AF4*; *TCF3/PBX1*; *BCR/ABL1*; *PAX5*; *FLT3*

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la neoplasia más frecuente en edad pediátrica. En los últimos años, entre el 15 y 20% de los pacientes fracasan en el tratamiento. Conocimientos en citogenética y biología molecular repercuten de manera importante en la determinación del pronóstico y del esquema de tratamiento adecuado. En Venezuela existe un conocimiento limitado en cuanto a la genética molecular de esta alteración onco-hematológica. El objetivo del trabajo fue evaluar las alteraciones genéticas más frecuentes en pacientes venezolanos con diagnóstico clínico de leucemia linfoblástica aguda. Se realizó un estudio transversal, descriptivo y prospectivo de 2006 a 2014, en el que se evaluaron las translocaciones *ETV6/RUNX1*, *MLL/AF4*, *TCF3/PBX1*, *BCR/ABL1*, así como las mutaciones en los genes *PAX5* y *FLT3* mediante el uso de diferentes tipos de PCR. Ciento treinta pacientes con diagnóstico clínico de leucemia linfocítica aguda fueron incluidos en el estudio. Se identificaron alteraciones moleculares en 56 pacientes (43,1%), en los que observamos la presencia de una o varias alteraciones en conjunción en un mismo paciente. Las alteraciones identificadas fueron t(12;21) (11,5%), t(4;11) (8,5%), t(1;19) (10%), t(9;22) (20,8%), ITD-*FLT3* (14,8%), mutación P80S (4,2%) y S77del (4,2%) en el gen *PAX5*. La prevalencia de *BCR/ABL*, es una de las más altas que ha sido descrita hasta ahora en casos de LLA donde la mayor parte de la población está conformada por pacientes pediátricos. Estos resultados representan el primer estudio molecular de la LLA en Venezuela, sentando las bases para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad en su población.

Palabras clave: Leucemia Linfoblástica Aguda; Translocaciones; *ETV6/RUNX1*; *MLL/AF4*; *TCF3/PBX1*; *BCR/ABL1*; *PAX5*; *FLT3*.

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

INTRODUCCIÓN

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), se define clínicamente como la expansión clonal de células progenitoras linfoides (linfoblastos), comprometidas a un linaje, ya sea B o T, transformadas malignamente a través de un bloqueo en un punto de su diferenciación, dando lugar a células inmaduras e indiferenciadas. Estas células inmaduras que se multiplican de forma incontrolada, infiltran la médula ósea, producen un grado variable de pancitopenia y pueden comprometer diferentes órganos y/o sistemas y causar la muerte por hemorragia y/o infección (Teitell y Pandolfi, 2009).

Se caracteriza por tener una distribución bimodal con un primer pico en pacientes menores de 20 años ($\pm 60\%$) y el segundo a partir de los 45 años de edad (20%) (Smith *et al.*, 1999). Representa el 75-80% de las leucemias agudas en edad pediátrica con un pico de incidencia entre los 2 a 5 años y un 20% en edad adulta (Smith *et al.*, 1999; Wiemels, 2012).

Venezuela es un país con una población aproximada de 33 millones de habitantes, y el cáncer constituye la segunda causa de muerte según el Anuario de Mortalidad 2014, publicado en el año 2015 por el Ministerio del Poder Popular para la Salud. En los registros oficiales, que datan del año 2009, donde se engloban todos los tipos de cáncer sin hacer diferenciación entre ellos, se indicó que el cáncer fue causante de 20.288 defunciones, representando el 15,5% del total registrado. Los datos para el año 2019, mostraron un incremento en la cifra de fallecidos por cáncer del 16,6% con respecto a lo establecido en las proyecciones oficiales. Esta posición en la que se localiza el cáncer en Venezuela se ha mantenido en los últimos 25 años, y sólo ha sido superada por enfermedades del corazón. Aun cuando en Venezuela no existen cifras concretas, las tasas de morbi-mortalidad asociadas con la leucemia en el país son cada vez mayores (Villalta *et al.*, 2019; Capote, 2012).

Hasta hace aproximadamente 45 años la LLA era una enfermedad incurable; pero desde la década del 70 se abrieron nuevas perspectivas, motivado al reconocimiento de una serie de factores que produjeron cambios en el manejo de la enfermedad, como la necesidad de dar profilaxis al sistema nervioso central y el uso de protocolos con poliquimioterapia que, en su conjunto, resultaron en una mejoría de las tasas de curación en muchos países del mundo. Actualmente, utilizando las mismas drogas de manera más apropiada, países desarrollados reportan una tasa de curación entre el 80 y el 85% y algunos centros internacionales de tratamiento e investigación reportan hasta de un 90% (Globocan, 2012; Tirado *et al.*, 2007). En nuestro país la situación se presenta de forma diferente. A pesar que la respuesta inicial se obtiene en el 85% de los casos, la tasa de recaídas medulares es alta (13-15%) (Landolfi *et al.*, 2013). Esto puede deberse a posibles fallas en el

tratamiento de quimioterapia de inducción o a factores inherentes a alteraciones moleculares adquiridas luego de la remisión inicial (Landolfi *et al.*, 2013).

En los últimos años, gracias a la citogenética y a la biología molecular, se han efectuado grandes avances en el conocimiento de los mecanismos que determinan la transformación maligna de las células precursoras de la hematopoyesis. Estos conocimientos se han traducido en un aumento de los métodos de diagnóstico, terapia molecular dirigida, así como también, mejoras en el seguimiento y pronóstico de la enfermedad (Pui *et al.*, 2008; 2011).

Se estima que en el 60% de las leucemias agudas existe una alteración cromosómica como las aneuploidías, rearrreglos estructurales, translocaciones, inversiones, deleciones, monosomías y trisomías (Pui *et al.*, 2011). La identificación de estas alteraciones moleculares específicas es actualmente un elemento indispensable para la estratificación de las leucemias en distintos grupos de pronóstico para su tratamiento adecuado. Asimismo, se sabe 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 (Abdullaev *et al.*, 2000).

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 (Jiménez Morales, 2002).

A pesar de los grandes avances que han ido apareciendo en la sociedad referidos a nuevos conocimientos y tratamientos de las leucemias, todavía fallece un porcentaje considerable de niños debido a esta enfermedad o por los efectos secundarios de la terapia; por lo tanto, la leucemia sigue siendo la principal causa de muerte por padecimientos oncológicos en pediatría, razón por la cual en la actualidad se están realizando diversos estudios enfocados a determinar la frecuencia y prevalencia de estas alteraciones en las diferentes poblaciones, así como en supervisar y analizar las diversas anomalías genéticas presentes en las células leucémicas (Pulte *et al.*, 2009).

El conocimiento aún limitado en relación a la genética molecular de la leucemia en pacientes pediátricos venezolanos, pudiera ser la causa de que en algunos niños sus tratamientos sean sobredimensionados, o por el contrario, subestimados. En efecto, el uso de esquemas de quimioterapia muy agresivos aumenta el riesgo de desarrollar neoplasias secundarias, y con ello mayores dificultades en estos pacientes (Díaz Beveridge y Urtasun Aparicio, 2003). Por ello, se ha hecho necesario el desarrollo y/o mejoramiento de técnicas de diagnóstico más eficientes, como por ejemplo, la detección de marcadores moleculares asociados a pronóstico.

La detección y conocimiento de los marcadores moleculares frecuentes en la LLA como son *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL*, *TCF3/PBX1* y *MLL/AF4* permitirá corroborar el diagnóstico, establecer la gravedad de la enfermedad y contribuir en el desarrollo de nuevos esquemas de tratamiento; los cuales a su vez, permitirán establecer terapias más adecuadas e individualizadas basadas en las características genéticas propias de las células malignas presentes. También permitirá monitorear los procesos de remisión o agravamiento de la enfermedad, para finalmente aumentar la sobrevivencia y calidad de vida de los pacientes con dicha patología (Woo *et al.*, 2014).

Un punto interesante en este tipo de estudio es que los individuos responden de manera diferente a las drogas, y que a veces los efectos pueden ser impredecibles. Las diferencias en la secuencia del ADN que altera la expresión o función de las proteínas a las que van dirigidas estas drogas, puede contribuir significativamente a la variación en la respuesta de los individuos. Por ejemplo, mientras los niños con la t(12;21) *ETV6/RUNX1* responden bien a terapias basadas en antimetabolitos, los que presentan la t(9;22) *BCR/ABL* no lo hacen de igual manera y en su defecto deben ser tratados con inhibidores de tirosin-kinasa (Pui *et al.*, 2011). Por tal motivo, este estudio molecular de las distintas alteraciones que conducen a la transformación maligna de las células linfoides preparará el camino para el desarrollo de terapias individualizadas dirigidas al defecto genético causante de la proliferación anómala que presenten menores efectos secundarios, evitando así tratamientos excesivos e ineficientes y optimizando de esta manera el tratamiento.

El objetivo de este estudio fue investigar los eventos moleculares más frecuentes, entre ellos, *ETV6/RUNX1*, *BCR/ABL*, *TCF3/PBX1* y *MLL/AF4*, y las alteraciones en los genes *PAX5* y *FLT3*, relacionados a la Leucemia Linfocítica Aguda en pacientes venezolanos con edades comprendidas entre 0 y 66 años (abarcando los grupos etarios más afectados por esta alteración hematológica) diagnosticados clínicamente con LLA.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio transversal, descriptivo y prospectivo, efectuado entre los años 2006 al 2014, con muestras tomadas bajo previo consentimiento informado, llevado a cabo en forma conjunta entre el Laboratorio de Genética Molecular Humana de la Universidad Simón Bolívar (USB), el Hospital “Miguel Pérez Carreño”, Hospital “J.M de los Ríos” y el Banco Municipal de Sangre de Caracas, Venezuela.

Pacientes

Se evaluaron 130 pacientes con diagnóstico clínico y citomorfológico de LLA, con edades comprendidas entre

0 y 66 años, abarcando ambos géneros. La toma de muestra de los pacientes se llevó a cabo en el servicio de hematología de los centros de salud antes mencionados. Las muestras procesadas fueron obtenidas a través de aspirados de médula ósea (MO) y/o sangre periférica (SP), colectadas en tubos con anticoagulante EDTA, mantenidas a temperatura ambiente. Se lograron recolectar datos de laboratorio en 89 pacientes; asimismo, en sólo 38 órdenes de las 130 se denotó alguna observación donde se indicó si el paciente se encontraba para diagnóstico inicial o si estaba en recaída medular luego de remisión o tratamiento.

Métodos de laboratorio

Extracción de ARNtotal (ARNt) y síntesis de ADNcomplementario (ADNc) por transcripción reversa
Los leucocitos (glóbulos blancos) se obtuvieron mediante el método de separación por gradiente de Ficoll, siguiendo las instrucciones sugeridas por la casa comercial “Amersham Biosciences”. El concentrado de linfocitos se almacenó en Trizol® Reagent (Invitrogen) a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción de ARN se realizó según el método de Chomczynski (Chomczynski *et al.*, 1987).

La integridad del ARNt se evaluó tanto por cuantificación espectrofotométrica donde además se determinó la pureza, estimando el índice de absorbancia 260:280 nm, así como a través de electroforesis en geles de agarosa bajo condiciones desnaturizantes (Agarosa UltraPure™ RNAsafree, Invitrogen) al 1%, MOPS 10X (MOPS 0,2 M, acetato de sodio 0,05M, EDTA 0,01M, pH 8,0 y formaldehído 37%), obteniendo de esta manera una estimación visual aproximada de la concentración del ARNt. Los geles seleccionados fueron fotografiados y visualizados empleando el equipo y programa “Gel Doc 2000™ Gel Documentation System CCIR”, Quantity One 4.2.1, ambos de BIO RAD.

A partir del ARN mensajero se obtuvo un ADN complementario mediante la reacción de transcriptasa reversa (enzima M-MVL Invitrogen), el cual se usó en cada uno de los casos para amplificar secuencias específicas de las alteraciones moleculares evaluadas.

Reacción de PCR

El ADNc previamente sintetizado se utilizó como molde para las siguientes reacciones de amplificación utilizando en común componentes como: buffer de enzima (Tris-HCL 10 mM pH8,3, KCL 50 mM) 1X, dNTP's 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, TaqADN polimerasa 0,05 U/μL y cebadores 0,75 μM. Todos estos ensayos de PCR se llevaron a cabo en un termociclador programable Mod TC-100™ (MJ Research Inc.).

a) Amplificación del gen GAPDH mediante PCR convencional (PCR-I) para evaluar la integridad de

los ADNc sintetizados. La secuencia de los cebadores utilizados GAPDHup y GAPDHdown se pueden observar en la tabla 1; las condiciones de la pcr: 35 ciclos 95 °C- 4 min, 95 °C- 30 seg, 50 °C- 1 min, 72 °C- 1 min.

b) Amplificación por PCR anidada (PCR-I, PCR-II) para identificar las quimeras *ETV6/RUNX-1*, *MLL/AF4*, *E2A/PBX-1* y amplificación por PCR convencional para la identificación de la quimera *BCR/ABL* y sus variantes más frecuentes en la LLA (p190 y p210). La secuencia de los cebadores utilizados tanto en PCR-I como PCR-II, según el orden en que se nombraron las quimeras evaluadas se observan en la tabla 1. En cuanto a las condiciones, particularmente para la detección de la quimera *ETV6/RUNX-1*, en la PCR-I se llevó a cabo una PCR con condiciones características de una PCR "Touch Down", la cual se llevó a cabo en dos etapas. En la primera etapa se realizó un ciclo a 94 °C 3 min, 8 ciclos de hibridación a 50 °C 45 seg donde por cada ciclo se disminuyó 1° C la temperatura y una extensión a 72 °C 45 seg. En la segunda etapa se realizaron 35 ciclos 94 °C 45 seg, 60 °C 45 seg, 72 °C 1 min y extensión final 72 °C 3 min. Para el resto de las translocaciones, las condiciones solo variaron en la temperatura de hibridación 60 °C (*MLL/AF4*), 65 °C (*TCF3/PBX1*) y 55 °C (*BCR/ABL1*) y el tiempo de extensión final para *BCR/ABL* que fue de 10 min, para las otras quimeras fue de 4 min.

c) Amplificación por PCR convencional para la detección de duplicaciones en tándem en los exones 14 y 15 del gen *FLT3* y PCR-RFLP para la detección de la mutación D835 en el exón 20 del mismo gen. Para la ejecución del último ensayo mencionado, posterior a la amplificación por PCR se llevó a cabo la digestión del producto amplificado con la enzima EcoRV (Promega). Se amplificaron las muestras de 54 del total de pacientes evaluados con diagnóstico clínico y citomorfológico de LLA. Dentro de estas 54 muestras escogidas, estuvieron todas aquellas que resultaron ser positivas para la translocación *MLL/AF4*, esto debido a que una de las características que distingue a las LLA generadas por alteraciones del gen *MLL* es la alteración del gen *FLT3* (Armstrong *et al.*, 2002; 2003; Stam *et al.*, 2005). El resto de los pacientes se distribuyeron de la siguiente manera: pacientes positivos para el resto de las translocaciones evaluadas *ETV6/RUNX-1*, *TCF3/PBX1*, *BCR/ABL-1* y pacientes cuya muestra no amplificó para ninguna de las alteraciones cromosómicas antes mencionadas. Para el ensayo de detección de duplicaciones en tándem se utilizó una concentración final de MgCl₂ de 1Mm y los productos de PCR obtenidos fueron analizados mediante corridas electroforéticas de geles de agarosa al 3%, para garantizar la visualización de las bandas correspondientes a los fragmentos presentes de las ITD. La secuencia de los cebadores utilizados se presentan en la tabla 1, mientras que las condiciones de la pcr fueron las mismas para las

dos amplificaciones, 35 ciclos 94 °C 4 min, 95 °C 30 seg, 51 °C 1 min, 72 °C 1 min y extensión final por 7 min.

d) AS-PCR para la detección de la mutación puntual P80R en el gen *PAX-5*. Para este ensayo solo se analizaron 24 muestras de pacientes con diagnóstico clínico y citomorfológico de LLA, debido a que al momento de realizar el análisis de esta mutación, la cantidad disponible de muchas de las muestras de pacientes evaluados era insuficiente. Para ello, fueron seleccionados pacientes positivos de cada una de las translocaciones evaluadas previamente: *ETV6/RUNX-1*, *MLL/AF4*, *TCF3/PBX-1*, *BCR/ABL-1* y pacientes cuyas muestras no amplificaron para ninguna de las alteraciones cromosómicas evaluadas. La secuencia de los cebadores se observan en la tabla 1 y las condiciones de pcr: 95 °C 4 min, 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 72 °C 7 min durante 35 ciclos.

Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5%, teñidos con bromuro de etidio. Todas las reacciones contaron con controles positivos y negativos. Asimismo, los productos de PCR fueron secuenciados utilizando el servicio comercial de Macrogen Inc. Korea y se corrió BLAST para la coincidencia nucleotídica (<http://www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast>). Para cambiar la secuencia a reverso complementario en los casos donde se tuvo que secuenciar con el Oligo antisentido se utilizó el software en línea http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html; para realizar alineamientos y traducción de secuencias se utilizó y <http://bio.lundberg.gu.se/>. Además se utilizaron los software SIFT (<http://sift.jcvi.org/>) y PROVEAN (<http://provean.jcvi.org/>) para determinar si las mutaciones encontradas podrían ejercer un efecto negativo en la función de la proteína afectada, y predecir si la sustitución o delección de un aminoácido tenía un impacto en la función biológica de la proteína.

RESULTADOS

Se evaluó la integridad, tanto de los ARNt extraídos como del ADNc sintetizado de las 130 muestras de pacientes con diagnóstico clínico y citomorfológico de leucemia linfocítica aguda (LLA), para confirmar si cumplían con la cantidad de ARN necesario para el proceso de análisis de las alteraciones moleculares. Se encontró que en algunos casos, la cantidad de ARNt obtenida fue baja, sin embargo esto no afectó los posteriores análisis realizados sobre las muestras. Aún en los casos de muestras que presentaron una degradación parcial fue posible realizar los ensayos posteriores por PCR, ya que los fragmentos amplificados se encontraban delimitados en un promedio de tamaño comprendido entre 200/800 pb. Por otra parte, en los casos que contenían abundante cantidad de ARNt, debido a la cuantiosa cantidad de células inmaduras, se procedió a la preparación de las diluciones respectivas para así evitar que las reacciones

de amplificación posteriores se vieran inhibidas por exceso de muestra.

De 130 pacientes, 86 eran varones. El grupo más frecuente de edad al diagnóstico fue de 0 a 10 años, 89 pacientes (68,5%); seguido del grupo de 11 a 18 años, 31 pacientes (23.8%). El grupo de menor incidencia lo ocuparon pacientes con edad mayor a 18 años, 10 pacientes (7.7%).

El promedio del total de los pacientes según presentación del gen de fusión u otra alteración génica se presenta en la Tabla 2.

Tabla 1. Secuencia de cebadores para amplificación por PCR

| Cebador | Secuencia |
|-----------------|--------------------------------|
| GAPDHup | 5'catcaagaaggtggtgaa3' |
| GAPDHdown | 5'gggtcttactcctggag3' |
| ETV6.1 | 5'cactcctggattcaaacagtc3' |
| RUNX1.1 | 5'agccgagtagtttcatcattgc3' |
| ETV6.2 | 5'tcatcgggaagacctggctta3' |
| RUNX1.2 | 5'agcacggagcagaggaagtgc3' |
| MLL.1 | 5'ccgcctcagccacctac3' |
| AF4.1 | 5'cgacctcagctcagtgaca3' |
| MLL.2 | 5'aggaccgcaagaaaaga3' |
| AF4.2 | 5'ctcactcaaatctcagc3' |
| TCF3.1 | 5'ttctcgtccagccctctacc3' |
| PBX1.1 | 5'gccacgcttccgctaac3' |
| TCF3.2 | 5'ctacgacgggggtctccac3' |
| PBX1.2 | 5'catgtgtccagccgatgat3' |
| BCR | 5'accgatgttccggacaaaagc3' |
| B2B | 5'acagattccgctgaccatcaataag3' |
| C5e | 5'ataggatccttgcaaccgggtctgaa3' |
| CA3 | 5'tgtgactggcgtgatgtagttgcttg3' |
| FLT3ITDup | 5'cgtttaaccctgtaattgtca3' |
| FLT3ITDdown | 5'agctgggtcatccttgattct3' |
| FLT3D835up | 5'gccaagggaatggaattctg3' |
| FLT3D835down | 5'atcaaccggaatgccaggta3' |
| PAXwt (normal) | 5'agacaggaagcatcaagtc3' |
| PAXmut (mutado) | 5'agacaggaagcatcaagcg3' |
| PAXcomún | 5'atagtgccactggtccg 3' |

Tabla 2. Características de los pacientes según presentación del gen de fusión u otra alteración génica

| Translocación | Pacientes Leucemia Linfocítica Aguda N= 130 (%) | Pacientes edad pediátrica (0-17) N= 121 (%) | Pacientes edad adulta (≥18) N= 9 (%) | SEXO Predominante (%) |
|--|---|--|---|---------------------------------|
| t(9;22) (q34;q11) (BCR-ABL1) | 27 (20.8) | 25 (19.2) | 2 (1.5) | Masculino (66.7) |
| t(12;21) (p13;q22) (ETV6-RUNX1) | 15 (11.5) | 14 (10.7) | 1 (0.8) | Masculino (66.7) |
| t(1;19) (q23;p13) (TCF3-PBX1) | 13 (10) | 13 (10) | 0 | Masculino (61.5) |
| t(4;11) (q21;q23) (MLL-AF4) | 11 (8.5) | 10 (7.7) | 1 (0.8) | Masculino (63.6) |
| Alteraciones moleculares en otros genes | Pacientes Leucemia Linfocítica Aguda N= 54 (%) | N= 45 (%) | N= 9 (%) | |
| ITD-FLT3 | 8 (14.8) | 7 (12.9) | 1 (1.9) | Masculino (62.5) |
| | Pacientes Leucemia Linfocítica Aguda N= 24 (%) | N= 19 (%) | N= 5 (%) | |
| Mutación P80S (PAX5) | 2 (8.3) | 1 (4.2) | 1 (4.2) | Masculino (50) Femenino (50) |
| S77del (PAX5) | 1 (4.2) | 1 (4.2) | 0 | Masculino (100) |

Alteraciones moleculares evaluadas

A) *Translocación ETV6/RUNX1*: Se detectó este transcrito en 15/130 (11,5%) pacientes evaluados. En el subgrupo correspondiente a los pacientes en edad pediátrica comprendida entre 0 y 18 años, se encontró la translocación *ETV6/RUNX1* en 14/15 (93,3%) de ellos. Mientras que en la población adulta se halló positividad para esta translocación en 1/15 (6,7%), paciente femenino de 66 años de edad. La edad promedio de los pacientes pediátricos positivos para *ETV6/RUNX1* (14) fue de 8 años, de los cuales 10/14 (71,4%) fueron masculinos y 4/14 (28,6%) fueron del género femenino.

Doce de las muestras evaluadas positivas para la quimera *ETV6/RUNX1*, presentaron el mismo punto de corte descrito y señalado en los estudios realizados en otros países en relación a la translocación *ETV6/RUNX1*, el cual incluyó la unión del extremo 3' del exón 5 del gen *ETV6*, con el extremo 5' del exón 3 del gen *RUNX1* (Paciente A-Figura 1). Contrariamente, 3 de las muestras de los pacientes con LLA evaluados presentaron un punto de corte distinto al clásicamente señalado en la bibliografía. En este último caso, el punto de corte se ubicó entre el exón 5 del gen *ETV6* y el exón 4 del gen *RUNX1* (Paciente B- Figura 1). Este nuevo punto de corte encontrado en estos pacientes venezolanos, no ha sido aún reportado en las investigaciones de otros países.

B) *Translocación MLL/AF4*: Se detectó esta alteración en 11/130 (8,5%) del total de pacientes evaluados. La edad promedio fue de 6,1 años, de los cuales 7/11 (63,64%) fueron del sexo femenino y 4/11 (36,36%) del sexo masculino. Del total de pacientes pediátricos que se evaluaron en este estudio (120 - 92,3%), se encontró la translocación *MLL/AF4* en 10 (8,3%) de ellos, con edades comprendidas entre 0 y 12 años. Mientras que de la población adulta fueron evaluadas 10 muestras de pacientes con LLA (7,7%), detectando positividad para esta translocación en un paciente femenino (10%), de 19 años de edad.

En todas las secuencias obtenidas de las muestras positivas para esta translocación se verificó la posición del punto de corte, el cual estuvo ubicado entre el final del exón 8 del gen *MLL* y el inicio del exón 5 del gen *AF4*, lo cual representa el punto de corte descrito en la literatura para la translocación *MLL/AF4*. Al realizar el análisis *in silico*, en lo que respecta a la traducción de secuencia para cada una de las muestras analizadas, se observó que se mantuvo el marco de lectura, y por ende, se llevó a cabo la traducción de la proteína quimérica *MLL/AF4* en todos los casos detectados y evaluados.

C) *Translocación BCR/ABL1*: Este transcrito fue detectado en 27/130 (20,8%) muestras de pacientes con diagnóstico clínico de LLA, de las cuales 22 (16,9%) fueron positivas solo para la variante p190 de la translocación *BCR/ABL*,

2 (1,5%) fueron positivas solo para la variante p210 de la translocación *BCR/ABL*, y 3 (2,3%) presentaron ambas variantes (p190 y p210) simultáneamente. La edad promedio de los pacientes con esta translocación, independientemente de la variante presente fue de 10 años, donde el sexo masculino fue prevalente, encontrándose 18/27 (66,7%) pacientes positivos del sexo masculino; mientras que el sexo femenino por su parte representó el 33,3% (9/27 pacientes) de las muestras positivas encontradas para la translocación *BCR/ABL*. Haciendo énfasis en la edad y género de los pacientes positivos encontrados para cada variante, se obtuvo que para la variante p190 (e1a2) la edad promedio fue de 10,4 años, encontrándose 17 pacientes de sexo masculino (68%) y 8 pacientes de sexo femenino (32%). Por su parte, de los 5 pacientes positivos para la variante p210, la edad promedio fue de 15,8 años donde el sexo masculino prevaleció representando el 80%, mientras que el sexo femenino solo representó el 20% del total de muestras positivas para esta variante.

En lo que respecta a las muestras positivas para la variante p190, en todas las secuencias se observó que la posición del punto de corte estuvo ubicado entre el exón 1 del gen *BCR* y el exón 2 del gen *ABL1*, lo cual representa el punto de corte descrito en la literatura para la translocación *BCR/ABL* variante p190. Por su parte, en la secuencia de todas las muestras positivas para la variante p210, se obtuvo un punto de corte generado por la unión del exón 13 del gen *BCR* con el exón 2 del gen *ABL1* (variante b2a2).

D) *Translocación TCF3/PBX1*: Se detectó esta translocación en 13/130 (10%) del total de pacientes analizados, mostrando la mayoría de las muestras positivas una banda con un tamaño aproximado de 289 pb (9/13), mientras que 4/13 pacientes positivos mostraron una banda de 200 pb aproximadamente. De las 13 muestras de pacientes positivos, 8/13 (61,5%) fueron del sexo masculino, mientras que 5/13 (38,5%) fueron del sexo femenino. Todos los pacientes positivos encontrados en este estudio para esta translocación pertenecen al grupo pediátrico con edades comprendidas entre 3 y 13 años con un promedio de edad de 6 años.

Post-secuenciación se observó que la porción de la secuencia que fue reconocida correspondió al exón 3 del gen *PBX1*. Destacando que el cebador con el que se envió a secuenciar fue el correspondiente al gen *TCF3* en segunda ronda (*TCF3.2*), el cual se encuentra ubicado en el exón 14 del gen *TCF3*. Por lo tanto, se dedujo que la ausencia de región perteneciente al gen *TCF3* en la secuencia de los pacientes positivos para la translocación *TCF3/PBX1*, pudo deberse a que el cebador (*TCF3.2*) con el cual fueron enviadas a secuenciar estas muestras, se encuentra ubicado a solo 7 bases nucleotídicas del extremo 3' del exón 14. Por lo que, al encontrarse cercano al final del exón había pocas probabilidades de detectar parte de

la secuencia del gen *TCF3*. De esta manera, la posición del punto de corte para las muestras positivas para esta alteración, estuvo ubicado entre el exón 14 del gen *TCF3* y 7 el exón 3 del gen *PBX1*.

E) Alteraciones en el gen *FLT3*: Para el análisis de detección de las duplicaciones internas en tándem (ITD), se evaluaron 54 pacientes, donde se pudo detectar duplicaciones internas en tándem (ITD) en 8/54 (14,8%) de los pacientes, de los cuales 5/8 (62,5%) de ellos fueron positivos para la translocación *MLL/AF4*. Dentro de este grupo, también se encontraron pacientes positivos para la translocación *ETV6/RUNX1* 1/5 (20%); translocación *TCF3/PBX1*2/5 (40%) y pacientes con la translocación *BCR/ABL*12/5 (40%), las cuales estuvieron en conjunción con el transcrito *MLL/AF4*. Los otros 3/8 pacientes positivos ITD no presentaron ninguna de las alteraciones moleculares aquí evaluadas. Asimismo, 5/8 (62,5%) pacientes ITD positivos fueron del sexo masculino y 3/8 (37,5%) fueron del sexo femenino, en donde la edad promedio fue de 10,8 años, presentándose un adulto (12,5%) con una edad de 56 años y siete niños (87,5%) con edades desde 0 hasta 10 años. Por otra parte se destaca que, la mayoría de los pacientes positivos para las mutaciones ITD/*FLT3* presentaron un alto porcentaje de blastos linfoides (datos no mostrados) en comparación con los valores normales.

Ninguno de los pacientes analizados para la mutación D835 en el exón 20 del gen *FLT3* presentó el patrón mutado, concluyendo así, que entre los pacientes evaluados para esta mutación no hubo heterocigotos.

F) Alteraciones en el gen *PAX5*: 12/24 (50%) de las muestras evaluadas para la mutación P80R, presentaron un patrón de heterocigosis para dicha mutación. En el análisis de secuencia de estas muestras se observó que

ninguna presentó la mutación P80R, sin embargo, dos de las muestras evaluadas presentaron una sustitución de la base C por T en la posición 686 de la hebra transcrita, conduciendo a un codón TCT que sustituye al codón CCT en el ARNm, el cual codifica al aminoácido Serina en lugar de Prolina, dando origen a la mutación P80S. Adicionalmente, uno de estos dos pacientes presentó una deleción del triplete AGC el cual codifica para el aminoácido serina en posición 77 de la proteína (Panel A-Figura 2).

A su vez, se observó en uno de los pacientes positivos para la mutación P80S, la presencia de dos mutaciones silenciosas (la ubicación de estas mutaciones están señaladas con flechas de color verde en el panel A de la Figura 2). Así se tiene para este paciente, el triplete GGC en lugar de GGA generando el aminoácido Glicina en posición 76 de la proteína, y el triplete ATA en lugar de ATT generando el aminoácido Isoleucina en posición 83 de la proteína en ambos casos. Por su parte, en el panel B de la Figura 2 se pueden observar las diferencias en la secuencia que presentan las muestras de los pacientes en comparación con la proteína tipo silvestre (wt-wild type) y con la proteína que se genera por la mutación reportada en la bibliografía (mutación P80R).

Es importante resaltar que en ambos pacientes (C y D), además de la mutación puntual presente en el gen *PAX5*, también presentaron positividad para otras de las alteraciones evaluadas (Tabla 3).

En otro orden de ideas, se evidenció mediante el uso de la herramienta bioinformática SIFT, que la mutación P80S es considerada perjudicial para el funcionamiento de la proteína *PAX5* (ENSP00000350844), asimismo, el uso de PROVEAN permitió evidenciar que la deleción S77del es considerada perjudicial para el funcionamiento de la proteína *PAX5*.

Tabla 3. Coexistencia de alteraciones moleculares

| Paciente | Alteraciones Moleculares | Edad (años) | Sexo |
|----------|---|-------------|------|
| A | ETV6/RUNX1; TCF3/PBX1 | 4 | M |
| C | BCR/ABL variante p210; P80S (PAX5) | 34 | F |
| D | MLL/AF4; ETV6/RUNX1; TCF3/PBX1, ITD FLT3; P80S (PAX5) | 3 | M |
| F | ETV6/RUNX1; BCR/ABL variante p190 | 66 | F |
| G | ETV6/RUNX1; TCF3/PBX1 | 8 | M |
| H | TCF3/PBX1; BCR/ABL variante p190 | 4 | F |
| I | MLL/AF4; BCR/ABL variante p210 | 12 | M |
| J | MLL/AF4; BCR/ABL variante p190 | 2 | F |
| K | MLL/AF4; BCR/ABL variante p190 y p210; ITD FLT3 | 10 | M |
| L | MLL/AF4; TCF3/PBX1; ITD FLT3 | 5 | M |
| M | MLL/AF4; ITD FLT3 | 5 | F |
| N | MLL/AF4; BCR/ABL variante p190 | 11 meses | F |
| O | MLL/AF4(previo); BCR/ABL variante p190; ITD FLT3 | 3 meses | M |

DISCUSIÓN

La leucemia linfocítica aguda sigue siendo la principal causa de muerte en niños y adultos jóvenes, aunque la tasa de supervivencia se ubica en casi el 90% (Conter *et al.*, 2010; Pui *et al.*, 2011). Las muestras biológicas utilizadas para el diagnóstico de la LLA en la mayoría de los casos, están compuestas por múltiples clones con distintas alteraciones genéticas, lo cual puede influir categóricamente en la respuesta a tratamiento, y a su vez en el riesgo de reaparición del cuadro leucémico (Mullighan *et al.*, 2008). Se ha determinado que tanto en pacientes pediátricos como en pacientes adultos, el proceso de transformación es usualmente iniciado por una translocación cromosomal, creando un gen de fusión con una actividad aberrante. Algunos de estos genes de fusión pueden interferir en el nivel transcripcional (*MLL/AF4*, *ETV6/RUNX1*, *E2A/PBX1*), mientras que otros pueden activar rutas de señalización que promueven la oncogénesis (*BCR/ABL1*) (Mullighan *et al.*, 2008).

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 (Pui *et al.*, 2011).

En nuestro estudio se observó un predominio de pacientes de sexo masculino tanto incluidos en el estudio, como con presencia de alteraciones moleculares, lo que es similar a lo reportado en la bibliografía (Pui *et al.*, 2015). Aunque el sexo y la etnia no son utilizados en la estratificación de riesgo, tienen importancia pronóstica. De hecho, se ha determinado que el sexo masculino presenta peor pronóstico en comparación con el sexo femenino (Hunger *et al.*, 2012).

Son innumerables las investigaciones que han permitido conocer el espectro de frecuencia con la que se presenta esta patología en distintas partes del mundo, lo que ha permitido a su vez ampliar tanto el conocimiento que se tiene sobre la enfermedad, así como también establecer comparaciones entre las distintas poblaciones donde se ha reportado su incidencia. En el presente estudio se realizó la determinación de las alteraciones genéticas utilizando diferentes tipos de PCR en muestras de 130 pacientes con diagnóstico clínico de leucemia linfocítica aguda, en donde 56 de estos pacientes tuvieron una o varias alteraciones genéticas. Las alteraciones moleculares que identificamos en orden de frecuencia fueron: *t(9;22)(q34;q11)*, *t(12;21)(p13;q22)*, *t(11;19)(q23;p13.3)* y *t(4;11)(q21;q23)* además de mutaciones en el gen *FLT3* y *PAX5*, en su mayoría relacionadas con mal pronóstico. A pesar de nuestro pequeño tamaño de muestras, los datos aquí obtenidos nos indican la

importancia que representa la identificación en forma rutinaria de todas estas alteraciones.

Hasta el momento son pocas las publicaciones que han reportado coexistencia de transcritos en pacientes con LLA. La coexistencia de alteraciones se ha visto con mayor frecuencia entre las translocaciones *BCR/ABL* y *TCF3/PBX1* (Jiménez Morales *et al.*, 2008; Devaraj *et al.*, 1995). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente estudio (Tabla 3) indican una alta frecuencia de coexistencia de alteraciones genéticas en pacientes venezolanos 13/130 (10%). La información aquí obtenida aporta datos relevantes en cuanto a la heterogeneidad clonal y la diversidad de cambios presentes en pacientes LLA y a su vez aporta una idea en lo que respecta a los efectos que cada una de estas alteraciones podría ejercer a nivel de las células linfoides y a nivel de la hematopoyesis en general.

La frecuencia del gen de fusión *ETV6/RUNX1* en este estudio (11,5%), estuvo por debajo de lo reportado en gran parte de la literatura (25%) (Pui *et al.*, 2008). Sin embargo, trabajos realizados en México (7,2%) (Guerra *et al.*, 2016) y Tailandia (4,2%) (Limsuwanachot *et al.*, 2016), también han reportado porcentajes más bajo de lo frecuente. Aunque la mayoría de las publicaciones asocian esta alteración con un pronóstico favorable, particularmente en la población pediátrica, existen estudios que demuestran lo contrario; de hecho, hay evidencia que la presencia de anomalías cromosómicas secundarias tales como la delección del alelo *ETV6* no translocado, la duplicación del cromosoma 21, alteraciones genéticas submicroscópicas en los genes *EBF1*, *PAX5*, *BTLA*, *NR3C1*, *TOX*, *BMF*, *TBL1XR1* y *BTG1*, influirían adversamente en el curso clínico de los pacientes *ETV6/RUNX1*⁺ (Mullighan *et al.*, 2008). Varios de los genes antes mencionados están asociados con la resistencia a drogas y a casos de recaída en pacientes con LLA *ETV6/RUNX1*⁺ (Lindqvist *et al.*, 2015).

Comparando la frecuencia obtenida en la población venezolana para el oncogén *BCR/ABL1* con lo observado en otros países, podemos decir que tenemos una frecuencia alta de presentación de este oncogén (específicamente la variante p190 fue la que se presentó con mayor porcentaje), particularmente tomando en cuenta que la mayor parte de la población estudiada estuvo conformada por pacientes pediátricos (Limsuwanachot *et al.*, 2016; Carranza *et al.*, 2013). De manera interesante, se lograron detectar pacientes que presentaron ambas variantes al mismo tiempo (p190 y p210), todos pertenecientes a la población pediátrica. Este último hallazgo es de relevancia para nuestra población, ya que la conjunción de ambas variantes ha sido observada con mayor frecuencia en pacientes con leucemia mieloide crónica (Ayatollahi *et al.*, 2018), además de que nos conduce a no restringir la identificación del gen de fusión *BCR/ABL1* en pacientes LLA, solo a la variante p190 por ser la más común.

Por otra parte, el porcentaje de presentación de mutación es ITD en el gen *FLT3* en concordancia con la presencia del oncogen *MLL/AF4* en varios de los pacientes incluidos en este estudio, se correlacionan con lo establecido en la bibliografía donde se ha indicado la estrecha relación entre la expresión alterada del gen *FLT3* y las alteraciones en *MLL*. También se ha observado la actividad aumentada de *FLT3* en conjunción con otros genes de fusión t(12;21) *ETV6/RUNX1* y t(9;22) *BCR/ABL1* (Chillon *et al.*, 2012) (Tabla 3). Otro estudio ha resaltado que la asociación de mutaciones en *FLT3* conjuntamente a alteraciones en el gen *MLL*, se presentan en pacientes con diagnóstico de leucemias bifenotípicas, las cuales cursan con leucocitosis alto porcentaje de blastos en médula ósea y mal pronóstico (Xu *et al.*, 2005). La expresión alterada de *FLT3* puede predecir el pronóstico de las LLA t(4;11)⁺, generando respuestas negativas, evidenciadas por una supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad más corta. Este impacto de pronóstico negativo en los pacientes LLA portadores de tales mutaciones en dicho gen, viene dado a que la presencia de mutaciones (*FLT3*/ITD) genera activación constitutiva del receptor *FLT3* y puede desempeñar un papel en la supervivencia o la proliferación de blastos leucémicos (Woo *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2012). Lo anteriormente dicho sugiere que la vigilancia constante del perfil de expresión de *FLT3* en pacientes LLA, podría conducir a un mejor seguimiento en relación con el protocolo de terapia.

Montes *et al.* (2014) modelaron el efecto de *FLT3* en células de sangre de cordón humano (CD34) transducidas con *MLL/AF4* y un *FLT3* mutado. Observaron que, aunque los ratones no desarrollaron leucemia, se presentó una expansión transitoria de las células de la sangre del cordón CD34 que expresaban *MLL/AF4* tras la activación de *FLT3*.

Por su parte, la mutación P80S encontrada en el gen *PAX5* se clasificó como una mutación con cambio de sentido (*missense mutation*), cuya sustitución de una única base genera un nuevo codón el cual codifica un aminoácido diferente, generando alteración de la estructura proteica, que viene dada por sustitución de un aminoácido no polar por un aminoácido polar, que puede establecer enlaces de hidrógeno con el agua, atenuación de la capacidad de unión al ADN y de la actividad de transactivación por la ubicación tanto de la mutación P80S como de la delección S77del en el dominio *paired* (este dominio puede funcionar como activador o represor de la transcripción) de la proteína (Woo *et al.*, 2014).

Aunque las características clínicas, tales como el tipo de leucemia, edad, alta carga tumoral, infiltración al SNC, entre otras, han sido tradicionalmente usadas para estimar el pronóstico de los pacientes, las alteraciones genéticas específicas ofrecen una forma más directa y quizá más segura para determinar la progresión de la enfermedad. Por lo tanto, la detección

eficiente de fusiones génicas es de importancia crítica para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo después del tratamiento. Además, se recomienda el uso de metodologías más sensibles como la PCR en tiempo real, análisis por microarreglos, identificación de SNPs (Pui *et al.*, 2015), tecnologías como la secuenciación de genoma completo de siguiente generación (GWAS) y NGS, de tal manera que se permita establecer un diagnóstico certero y oportuno, además de contribuir al desarrollo de fármacos dirigidos a inhibir la función de proteínas oncogénicas y al diseño de esquemas de tratamiento específicos que permitan mejorar la sobrevida libre de enfermedad (SLE) y disminuir las probabilidades de desarrollar efectos colaterales o resistencia a drogas antineoplásicas. De tal forma que la leucemia debe ser considerada y por ende, tratada como una enfermedad compleja (Pui *et al.*, 2015).

CONCLUSIONES

Mediante el uso de protocolos modernos de tratamiento en la LLA, se ha logrado mejorar hasta 80% la sobrevida libre de enfermedad, estos logros se deben principalmente al uso de terapias basadas en el riesgo, lo que implica dar un tratamiento con una intensidad específica para cada paciente en función del riesgo de recaída; de esta manera los pacientes no son subtratados ni sobretatados, lo cual disminuye los efectos colaterales y por lo tanto aumenta las probabilidades de curación. Sin embargo, en Venezuela la clasificación de riesgo de los pacientes con LLA con base a las características moleculares es aún limitado. Este trabajo presenta un panorama general de la frecuencia de las anomalías genéticas más comunes descritas en otras poblaciones, y aunque hasta el momento no ha sido posible determinar el valor pronóstico de ellas en los pacientes venezolanos, estamos encontrando datos interesantes con respecto a la frecuencia de las alteraciones moleculares más relevantes en pacientes con LLA, lo cual plantea la urgente necesidad de realizar, tanto estudios multidisciplinarios en el que se aplique la combinación de herramientas citogenéticas y moleculares, como la necesidad de poner en práctica la aplicación de tecnologías moleculares más avanzadas de forma rutinaria, que permitan conocer las características genéticas de la LLA en los pacientes venezolanos, para desarrollar un algoritmo de diagnóstico que conduzca a una mejor clasificación genética de los pacientes por estratificación de riesgo, y por ende conlleven al desarrollo de mejores esquemas de tratamiento.

LIMITACIONES 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.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdullaev F., Rivera Luna R., Roitenburd Belacortu V., Espinosa Aguirre J. (2000) Pattern of childhood cancer mortality in Mexico. *Arch. Med. Res.* 31: 526-531.
- Armstrong S.A., Kung A.L., Mabon M.E., Silverman L.B., Stam R.W., den Boer M.L. (2003) Inhibition of FLT3 in MLL. Validation of a therapeutic target identified by gene expression based classification. *Cancer Cell.* 3 (2): 173-183.
- Armstrong S.A., Staunton J.E., Silverman L.B., Pieters R., den Boer M.L. (2002) MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat. Genet.* 30 (1): 41-7.
- Ayatollahi H., Keramati M.R., Shirdel A., Kooshyar M.M., Raiszadeh M., Shakeri S. (2018) BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran. *Caspian J. Intern. Med.* 9 (1): 65-70.
- Capote L. (2012) Perfil epidemiológico y control del cáncer en Venezuela. *Academia Nacional de Medicina* 4 (44).
- Carranza C., Granados L., Morales O., Jo W., Villagran S., Tinti D., Villegas M., Antillón F., Torselli S., Silva G. (2013) Frequency of the ETV6-RUNX1, BCR-ABL1, TCF3-PBX1 and MLL-AFF1 fusion genes in Guatemalan pediatric acute lymphoblastic leukemia patients and their ethnic associations. *Cancer Genet.* 206 (6): 227-32.
- Chillon M.C., Gomez Casares M.T., López Jorge C.E., Rodriguez Medina C., Molines A., Sarasquete M.E., Alcoceba M., Miguel J.D.G.S., Bueno C., Montes R., Ramos F., Rodríguez J.N., Giraldo P., Ramírez M., García Delgado R., Fuster J.L., González Díaz M., Menéndez P. (2012) Prognostic significance of FLT3 mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germlineacute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 26 (11): 2360-2366. doi:10.1038/leu.2012.161.
- Chomczynski P., Sachi N. (1987). Single step method of RNA isolation by aid guanidiniumthiocyanate phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162: 156-159.
- Conter V., Aricò M., Basso G., Biondi A., Barisone E., Messina C. (2010) Long-term results of the Italian Association of Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP) Studies 82, 87, 88, 91 and 95 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 24 (2): 255-64. doi: 10.1038/leu.2009.250.
- Devaraj P.E., Foroni L., Kitra Roussos V., Secker Walker L.M. (1995) Detection of BCR-ABL and E2A-PBX1 fusion genes by RT-PCR in acute lymphoblastic leukaemia with failed or normal cytogenetics. *Br. J. Haematol.* 89 (2): 349-55.
- Díaz Beveridge J., Urtasun Aparicio R. (2003) Leucemias agudas y síndromes mielodisplásicos secundarios al tratamiento oncológico. *An. Med. Interna (Madrid)* Vol. 20 (5): 257-268.
- Globocan (2012) Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2012 <http://www-dep.iarc.fr> (referencia electrónica).
- Guerra Castillo F.X., Ramos Cervantes M.T., Rosel Pech C., Jiménez Hernández E., Bekker Méndez V.C. (2016) PCR detection of relevant translocations in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.* 54 (3): S302-S308.
- Hunger S.P., Lu X., Devidas M., Camitta B.M., Gaynon P.S., Winick N.J. (2012) Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J. Clin. Oncol.* 30 (14): 1663-9.
- Jiménez Morales S. (2002) Caracterización molecular de la leucemia aguda linfoblástica infantil. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México.
- Jiménez Morales S., Miranda Peralta E., Saldaña Álvarez Y., Pérez Vera P., Paredes Aguilera R., Rivera Luna R. (2008) BCR-ABL, ETV6-RUNX1 and E2A-PBX1: Prevalence of the most common acute lymphoblastic leukemia fusion genes in Mexican patients. *Leuk. Res.* 32 (10): 1518-22.
- Kang H., Wilson C.S., Harvey R.C. (2012) Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study. *Blood* 119: 1872-1881.
- Landolfi C., Corredor M., Fernandez I., García R., González S., Latuff J., Rodríguez P., Tersek Y., Tovar E., Urdaneta B., Acosta M., Araujo C., Catalayud J., Collazo M., Costa M., Cova J., DiStefano M., Díaz M., Duerto M., García R., González L., López J., Lugo I., Mejía M., Pachano S., Ramírez F., Rojas V., Salazar E., Salazar M., Sánchez M., Sánchez P., Vizcaíno J., Zavastra M., Chacín M., Gross A., Oliveros A., Prado A., Travieso B., Aponte B., Castro Y., Cedres S., Deninzon L., Mendoza F., Ramírez R., Soto A. (2013) I Consenso Venezolano sobre leucemia aguda de la infancia y adolescencia. Sociedad Venezolana de Hematología.
- Limsuwanachot N., Siriboonpiputtana T., Karntisawiwat K., Chareonsirisuthigul T., Chuncharunee S., Rerkamnuaychoke B. (2016) Multiplex RT-PCR Assay for Detection of Common Fusion Transcripts in Acute Lymphoblastic Leukemia and Chronic Myeloid Leukemia Cases. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 17 (2): 677-84.
- Lindqvist C.M., Nordlund J., Ekman D., Johansson A., Moghadam B.T., Raine A. (2015) The mutational landscape in pediatric acute lymphoblastic leukemia deciphered by whole genome sequencing. *Hum. Mutat.* 36: 118-128.
- Montes R., Ayllon V., Prieto C., Bursen A., Prella C., Romero Moya D. (2014) Ligand-independent FLT3 activation does not cooperate with MLL-AF4 to immortalize/transform cord blood CD34+ cells. *Leukemia* 28 (3): 666-674. doi:10.1038/leu.2013.346.
- Mullighan C.G., Phillips L.A., Su X., Ma J., Miller C.B., Shurtleff S.A. (2008) Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science* 322 (5906): 1377-80. doi: 10.1126/science.1164266.
- Pulte D., Gondos A., Brenner H. (2009) Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st Century. *Blood* 113 (7): 1408-11.
- Pui C.H., Carroll W.L., Meshinchi S., Arceci R.J. (2011) Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J. Clin. Oncol.* 29 (5): 551-65.
- Pui C.H., Robison L.L., Look A.T. (2008) Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet* 371: 1030-43.
- Pui C.H., Yang J.J., Hunger S.P., Pieters R., Schrappe M., Biondi A. (2015) Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Progress Through Collaboration. *J. Clin. Oncol.* 33 (27): 2938-48.
- Smith M.A., Ries L.A., Gurney J.G. (1999) Leukemia. In: Ries L.A., Smith M.A., Gurney J.G. (Eds.) *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*. Bethesda, Md: National Cancer Institute, SEER Program, 1999. NIH Pub. N° 99-4649., pp. 17-34. Also available online. Last accessed October 19, 2010.
- Stam R.W., den Boer M.L., Schneider P., Nollau P., Horstmann M., Beverloo H.B. (2005) Targeting FLT3 in primary MLL-gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 106 (7): 2484-90.
- Teitell M.A., Pandolfi P.P. (2009) Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Annu. Rev. Pathol.* 4: 175-98.
- Tirado L., Mohar A. (2007) Epidemiología de las Neoplasias Hematológicas. *Rev. Inst. Nal. Cancerol.* 2: 109-120.
- Villalta D., Sajo Castelli A.M., Ovalles P. (2019) Pronósticos de la mortalidad e incidencia de cáncer en Venezuela año 2019. Sociedad Anticancerosa de Venezuela.

- Wiemels J. (2012) Perspectives on the causes of childhood leukemia. *Chem. Biol. Interact.* 196: 59-67.
- Woo J., Alberti M., Tirado C. (2014) Childhood B-acute lymphoblastic leukemia: a genetic update. *Experimental Hematology & Oncology* 3: 16.
- Xu B., Li L., Tang J.H., Zhou S.Y. (2005) Detection of FLT3 gene and FLT3/ITD mutation by polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism in patients with acute lymphoblastic leukemia. *Di Yi Jun Yi Da XueXueBao* 25 (10): 1207-10.

AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Ciencia y Tecnología por el otorgamiento de la Beca “Misión Ciencia” para estudios de postgrado y Fonacit Venezuela (proyecto G2001000784) por su apoyo financiero. A los Doctores y asistentes de los distintos centros hospitalarios por su colaboración y disposición en la obtención de muestras e historias clínicas de los pacientes, lo cual hizo posible la realización de esta investigación.

—