



UNIVERSIDAD NACIONAL DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Laboratorio de Biología Molecular  
Servicio de Hematología-Oncología  
Hospital Nacional de Pediatría "Prof. Dr. Juan P. Garrahan"

## **TESIS DOCTORAL**

LEUCEMIA AGUDA EN MENORES DE UN AÑO: CARACTERIZACIÓN  
MOLECULAR Y DETERMINACION DE LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

Autor: Bioquímico Adrián Pablo Mansini

Directora de Tesis: Dra. Maria Sara Felice

Directora adjunta de Tesis: Dra. Cristina Noemí Alonso

Consejero de Estudios: Dr. Alberto Lazarowski

AÑO 2015

# ÍNDICE

	Pág.
<b>Agradecimientos</b> .....	I
<b>Listado de Figuras</b> .....	IV
<b>Listado de Tablas</b> .....	VI
<b>Glosario de Abreviaturas</b> .....	IX
<b>Importancia del Trabajo</b> .....	XI
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Incidencia de Enfermedades Neoplásicas en Pediatría.....	1
1.2. Clasificación de las Leucemias Agudas.....	3
1.3. Leucemias Agudas de Infantes.....	7
1.3.1. Generalidades.....	7
1.3.2. Etiología de las LAI con Rearreglos de MLL.....	8
1.3.3. Características y Manifestaciones Clínicas de las LAI.....	11
1.4. Leucemias agudas y Gen MLL.....	13
1.4.1. Rearreglos del gen MLL en Leucemias Agudas.....	13
1.4.2. Rearreglos del gen MLL en Leucemias Agudas con cambio de Linaje.....	14
1.4.3. Rearreglos del gen MLL en Leucemias B Maduras.....	17
1.4.4. Rearreglos de MLL y Pronóstico en LLA de Infantes.....	18
1.4.5. Enfermedad Mínima Residual. Importancia de su determinación.....	19
1.4.6. Estudios para la Detección de los Rearreglos de MLL.....	22
1.4.7. Utilidad de los rearreglos de Ig/TCR en Leucemia Aguda Pediátrica.....	25
1.4.8. Rearreglos de Ig/TCR en Leucemia Linfoblástica Aguda de Infantes.....	28
1.5. Generalidades de MLL.....	30
1.5.1. Gen MLL.....	30
1.5.2. Proteína MLL.....	30
1.5.3. MLL y Ciclo Celular.....	35
1.5.4. Mecanismos de los Rearreglos de MLL.....	36
1.5.6. Mecanismo de Leucemogénesis por las Proteínas de Fusión MLL.....	38
1.6. Alteraciones del Gen FLT3.....	40
1.6.1. Duplicaciones Internas en Tándem de FLT3.....	42
1.6.2. Mutaciones Puntuales en FLT3.....	43

1.7. Síndrome de Down y Mielopoyesis Anormal Transitoria.....	44
1.7.1. Mutaciones del Gen GATA-1.....	45
<b>2. Hipótesis y Objetivos.....</b>	<b>47</b>
2.1. Hipótesis de Trabajo.....	47
2.2. Objetivos Generales.....	48
2.3. Objetivos Específicos.....	48
2.4. Objetivos Técnicos.....	49
<b>3. Parte Experimental.....</b>	<b>51</b>
3.1. Pacientes y Métodos.....	51
3.1.1. Población Estudiada.....	51
3.1.2. Criterios de Inclusión y Exclusión.....	51
3.1.3. Diagnóstico de LLA y LMA.....	52
3.1.4. Caracterización Inmunofenotípica.....	53
3.1.5. Estudio Citogenético y Citogenético Molecular.....	53
3.1.6. Estudio de los Rearreglos Moleculares Recurrentes por RT-PCR.....	55
3.1.7. Estudio de los Rearreglos Moleculares Infrecuentes por RT-PCR.....	58
3.1.8. LDI-PCR: Estudio de los Rearreglos de MLL a Nivel Genómico.....	65
3.1.9. Caracterización de los Rearreglos del gen MLL por LDI-PCR.....	65
3.1.10. Caracterización de los Rearreglos de los genes de Ig/TCR.....	80
3.1.11. Determinación de la EMR Mediante Rearreglos de MLL.....	83
3.2. Estudio de las mutaciones del gen FLT3.....	85
3.3. Estudio de las mutaciones del gen GATA-1.....	86
<b>4. Resultados.....</b>	<b>87</b>
4.1 Modificaciones en la Técnica LDI-PCR Para la Puesta a Punto.....	87
4.2. Leucemias con Rearreglos del gen MLL.....	88
4.2.1. Caracterización de los Pacientes y Respuesta al Tratamiento.....	88
4.2.2. Estudio Citogenético y Citogenético Molecular.....	93
4.2.3. Estudio de los Rearreglos Moleculares Recurrentes por RT-PCR.....	96
4.2.4. Caracterización de los Rearreglos del gen MLL por LDI-PCR.....	98
4.2.5. Primers para la Detección de Rearreglos Infrecuentes por RT-PCR.....	103

4.2.6. Caracterización de los Rearreglos de los genes de Ig/TCR.....	105
4.2.7. Primers Paciente Específicos para la Detección de la EMR.....	111
4.2.8. Análisis de la zona de fusión de los Rearreglos detectados en forma Directa y Recíproca.....	116
4.2.9. Determinación de la EMR Mediante Rearreglos de MLL.....	124
4.2.10. Rearreglos de Gen MLL en Leucemias B Maduras.....	133
4.3. Mutaciones del gen FLT3.....	136
4.4. Mutaciones del gen GATA-1.....	137
<b>5. Discusión.....</b>	<b>143</b>
5.1. Modificaciones Realizadas en la Técnica LDI-PCR para la Puesta a Punto.....	143
5.2. Caracterización de los Rearreglos del gen MLL.....	143
5.3. Detección de Rearreglos Infrecuentes por RT-PCR.....	151
5.4. Determinación de la EMR Mediante Rearreglos de MLL.....	152
5.5. Análisis de las Secuencias de Fusión de los Rearreglos Recíprocos.....	155
5.6. Rearreglos de Ig/TCR en Leucemia Aguda con alteraciones en MLL.....	156
5.7. Rearreglos de MLL en Leucemias B Maduras.....	158
5.8. MLL y Leucemias Agudas con Cambios de Linaje.....	165
5.9. Mutaciones del gen FLT3.....	166
5.10. Mutaciones del gen GATA-1.....	168
<b>6. Conclusiones.....</b>	<b>173</b>
<b>7. Resumen.....</b>	<b>175</b>
<b>8. Bibliografía.....</b>	<b>179</b>

## AGRADECIMIENTOS

Al crecer, con el paso del tiempo nos damos cuenta que uno de los motivos por la que vale la pena luchar es por cumplir nuestros sueños, de hecho, nosotros mismo somos parte del sueño de nuestros padres.

Desde mi adolescencia, cuando participé por primera vez del taller de ciencia en mi escuela secundaria, supe qué quería ser. Al principio guiado por lo que el conocimiento provocaba en mí. Ya más grande, cuando ingresé a la Universidad de Buenos Aires a estudiar bioquímica, por todo lo que la investigación representaba para mí. Siempre me imaginé trabajando con animales o células, pensaba que los pacientes eran solo para los médicos. Mientras cursaba las materias de grado, aprendí a amar la universidad pública, me di cuenta del gran esfuerzo y dedicación que ponían mis profesores y ayudantes. La pasión con la que explicaban y el amor que le tenían a la facultad me abrió los ojos a un nuevo mundo, me di cuenta que yo también quería participar de la docencia, es por eso que comencé con la ayudantía en una cátedra. Era la combinación perfecta, me daba cuenta día a día cuánto aprendía enseñando, y combinando la docencia con la investigación pase los últimos años previos a mi graduación.

Ya al recibirme sabía que quería hacer un doctorado y ese, era y es, uno de los sueños más anhelados de mi vida. Hasta que buscando posibles becas de doctorado encontré una de la agencia nacional de promoción científica y tecnológica que se iba a llevar a cabo en el Hospital de Pediatría Garrahan, al principio no sabía si presentarme ya que tenía ese pensamiento erróneo de que el hospital era para los médicos y ahora también para los bioquímicos y farmacéuticos que no se dedican a la investigación. Por suerte me presenté y al recibir el llamado que me comunicaba el otorgamiento de la beca me puse a llorar, recuerdo que no me salía ni una palabra, me faltaba el aire y sentí que ese día era un punto de inflexión en mi vida. Así fue. Entrar al hospital Garrahan fue entrar a un mundo increíble, un mundo donde el médico y el bioquímico trabajan codo a codo en beneficio del paciente, conocí grupos integrados por profesionales de diferentes áreas, que investigan, enseñan, transmiten sus conocimientos y luchan por el correcto diagnóstico y tratamiento de los pacientes; es aquí donde llevé a cabo mi investigación, rodeado de personas que me

enorgullecen, dando la jerarquía que el hospital público se merece y sobre todo contagiándome del amor desinteresado por el prójimo.

Quiero agradecer a mi directora de tesis María Sara Felice, “Marisa”, por darme la oportunidad de cumplir este sueño tan anhelado por mí, por enseñarme a caminar en el camino de la ciencia, por guiarme en todo momento, por transmitirme el amor por el trabajo en equipo y por estar siempre cuando la necesité, siempre en forma desinteresada, humilde y brillante.

A mi directora adjunta Cristina Noemí Alonso, “Kristi”, por estar a mi lado constantemente todos los días en el laboratorio, por sostener mi mano y darme aliento cuando los resultados no salían, por enseñarme a dar los primeros pasos en mundo de la biología molecular y sobre todo por luchar a mi lado para llevar a cabo esta tesis.

A mi compañera infaltable Adriana Medina, “Adri”, por enseñarme la importancia del esfuerzo en el trabajo, por aconsejarme siempre, por compartir los mates de cada mañana y porque estuvo a mi lado trabajando codo a codo para obtener los resultados que hicieron posible esta tesis.

A Patricia Rubio, “Pato”, por ayudarme en cada experimento nuevo que emprendí, por los congresos, cursos y talleres compartidos, por ser la mejor compañera que uno puede tener en un laboratorio.

A Jorge Rossi, por ser un ejemplo de sencillez, por compartir sus conocimientos, por fomentar el trabajo interdisciplinario y en equipo, y sobre todo por tener la humildad de los grandes.

A Elisa Sajaroff, “Ely”, la mejor citometrista que conozco, por compartir sus conocimientos y los resultados de sus trabajos para que pueda realizar esta tesis.

A Marta Gallego y Mariela Coccé del Laboratorio de Citogenética, por los citogenéticos realizados, por su profesionalismo, responsabilidad y por formar parte del equipo interdisciplinario de leucemias.

A todos mis compañeros de los diferentes servicios de Biología Molecular, por compartir los almuerzos con risas y llenándolos de alegría, por ser fuentes de consultas y experiencias.

A mis compañeros y amigos Fernando Aguirre y Diego Fernández por llenar mis días de risas y alegría en el laboratorio, porque a pesar de la distancia caminan y caminarán conmigo siempre.

A la Dra. Teresa Guereño, por mostrarme el camino a seguir, por incentivar me constantemente, por darme fuerzas, aliento, por confiar en mí y sobre todo por estar.

Al Dr. Alberto Lazarowski, mi consejero de estudio, por ser fuente de consulta para la escritura de la tesis y por sus millones de consejos en las charlas de café compartidas.

A mis viejos, por estar a mi lado en todo momento, por darme la oportunidad de estudiar a través de sus esfuerzos, por mostrarme el camino correcto en la vida, por enseñarme a levantar cada vez que caigo y por apoyarme incondicionalmente. Los amo.

A mi hermana Jor, porque a pesar de la distancia está en cada pensamiento que nace de mi ser, por enseñarme a volar, a luchar por cumplir los sueños, por ser mi refugio y mi fuente de felicidad.

A mi esposa Maru, por ser el viento que mueve las pasivas aguas de mi alma llenándola de vida, de fuerza en movimiento, por ser la compañera de vida que elegí y que elijo todos los días, por jugarse por mí sin esperar nada a cambio, por su paciencia, por hacerme feliz y porque caminamos juntos a la par.

A mis abuel@s, ti@s, prim@s, vecinos y amigos porque ellos son parte de mí, porque nada de esto sería posible sin ellos, porque sin ellos yo no sería el mismo. Gracias por estar siempre.

## LISTADO DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1. Número de casos de Leucemias Agudas en niños menores de 15 años en Argentina entre los años 2000 y 2008, agrupadas por rangos de edad.</i>	2
<i>Figura 2. Comparación de la pSLE de los pacientes LLA con MLL germinal y MLL rearrreglado con diferentes compañeros de fusión.</i>	19
<i>Figura 3. Grupos de riesgo para estratificación de LAI en el Protocolo Interfant-2006.</i>	20
<i>Figura 4. Receptor de Ig de membrana y el TCR con sus regiones constantes y variables.</i>	27
<i>Figura 5. Recombinación somática de los fragmentos V-(D)-J de las regiones variables de las Ig y los TCR.</i>	27
<i>Figura 6. Estructura tridimensional de los diferentes dominios conservados de la proteína MLL.</i>	31
<i>Figura 7. Representación esquemática de los dominios de la proteína MLL y su procesamiento proteolítico.</i>	32
<i>Figura 8. Complejo multiproteico MLL.</i>	35
<i>Figura 9. Esquema del gen MLL donde se muestra la zona de ruptura frecuente (bcr) y los dos subclusters de rupturas</i>	37
<i>Figura 10. Vías de señalización intracelular de FLT3.</i>	41
<i>Figura 11. Mutaciones de FLT3.</i>	41
<i>Figura 12. Receptor FLT3 mutado. Se esquematiza el tipo de mutación FLT3-ITD a nivel proteico</i>	42
<i>Figura 13. Receptor FLT3 mutado. Se esquematiza el tipo de mutación FLT3-TKD a nivel proteico</i>	43
<i>Figura 14. Esquema del gen GATA-1 y proteína GATA-1S.</i>	46
<i>Figura 15. Rearreglo del gen MLL detectado por Vysis MLL probe.</i>	55
<i>Figura 16. Resumen de la técnica LDI-PCR para la detección de rearrreglos del gen MLL.</i>	67
<i>Figura 17. Comparación del bcr de MLL en estado germinal y traslocado evidenciando el cambio en los sitios de restricción.</i>	68
<i>Figura 18. Representación del bcr del gen MLL en estado germinal.</i>	74



<b>Figura 19.</b> Representación simple del bcr del gen MLL en estado germinal luego del proceso de digestión y ligación.	74
<b>Figura 20.</b> Representación a escala del bcr del gen MLL en estado germinal luego del proceso de digestión y ligación.	75
<b>Figura 21.</b> Ejemplo de una corrida electroforética del producto de LDI-PCR de MLL germinal.	78
<b>Figura 22.</b> Ejemplo de una corrida electroforética del producto de LDI-PCR de MLL germinal y traslocado.	79
<b>Figura 23.</b> Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL diferenciando a los pacientes por su edad.	101
<b>Figura 24.</b> Esquema a escala de la distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL en los 34 casos estudiados por LDI-PCR.	101
<b>Figura 25.</b> Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL de la población estudiada con diagnóstico de LMA diferenciando a los pacientes por la edad.	102
<b>Figura 26.</b> Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL de la población estudiada con diagnóstico de LLA diferenciando a los pacientes por edad.	102
<b>Figura 27.</b> Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL de la población estudiada menor de 12 meses de edad con diagnóstico de LLA según el inmunofenotipo.	103
<b>Figura 28.</b> Primers utilizados para la detección de rearrreglos moleculares infrecuentes del gen MLL.	104
<b>Figura 29.</b> Frecuencia de los rearrreglos de Ig/TCR encontrada según el inmunofenotipo.	110
<b>Figura 30.</b> MLL germinal y rearrreglado. Obsérvese las regiones 5' y 3' antes y después del rearrreglo.	117
<b>Figura 31.</b> Ejemplo de curva estándar realizada a partir de diluciones seriadas de la muestra del diagnóstico.	125
<b>Figura 32.</b> Ejemplo de curva de melting realizada a partir de diluciones seriadas de la muestra del diagnóstico.	126
<b>Figura 33.</b> Curva de amplificación correspondiente al caso #4.	126
<b>Figura 34.</b> Curva de melting correspondiente al caso #4.	127
<b>Figura 35.</b> Curva estándar correspondiente al caso #9.	128
<b>Figura 36.</b> Curva de melting correspondiente al caso #9.	128

<i>Figura 37. Curva estándar correspondiente al caso #11.</i>	129
<i>Figura 38. Curva de melting correspondiente al caso #11.</i>	129
<i>Figura 39. Curva estándar correspondiente al caso #13.</i>	130
<i>Figura 40. Curva de melting correspondiente al caso #13.</i>	130
<i>Figura 41. Curva estándar correspondiente al caso #26.</i>	131
<i>Figura 42. Curva estándar correspondiente al caso #31.</i>	132
<i>Figura 43. Curva de melting correspondiente al caso #31.</i>	132
<i>Figura 44. Tinción de May-Grünwald-Giemsa del aspirado de MO del paciente del caso #1 de LLA B madura y rearreglo de MLL.</i>	135
<i>Figura 45. Esquema representativo del exón 2 del gen GATA-1. Se señala la ubicación de los sitios de las mutaciones detectadas.</i>	142
<i>Figura 46. Hipótesis de la cinética de los blastos como parámetro pronóstico en los recién nacidos con SD.</i>	170

## LISTADO DE TABLAS

	Pág.
<i>Tabla 1. Distribución de casos según la Clasificación Internacional de Cáncer Pediátrico (ICCC), promedio años 2000-2008.</i>	1
<i>Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la detección de rearreglos recurrentes por RT-PCR.</i>	57
<i>Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la detección de rearreglos moleculares infrecuentes por RT-PCR.</i>	59
<i>Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen control.</i>	62
<i>Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de LDI-PCR.</i>	76
<i>Tabla 6. Peso Molecular de las bandas germinales esperadas cuando se amplifican con los diferentes juegos de primers en las reacciones de LDI-PCR.</i>	78
<i>Tabla 7. Combinaciones de primers utilizados para la caracterización de Ig/TCR.</i>	81

<b>Tabla 8.</b> Características clínicas y hematológicas de los 34 pacientes con LA estudiados para la detección de rearrreglos de MLL.	90
<b>Tabla 9.</b> Inmunofenotipo, respuesta al tratamiento y evolución de los 34 pacientes con LA estudiados para la detección de rearrreglos de MLL.	92
<b>Tabla 10.</b> Resultados de los estudios citogenéticos y citogenéticos moleculares de los 34 pacientes con Leucemia Aguda.	95
<b>Tabla 11.</b> Resultados de los estudios moleculares de los 34 pacientes con Leucemia Aguda.	97
<b>Tabla 12.</b> Resultados de los estudios de los rearrreglos de Ig de cadena pesada.	106
<b>Tabla 13.</b> Resultados de los estudios de los rearrreglos de Ig de cadena liviana.	107
<b>Tabla 14.</b> Resultados de los estudios de los rearrreglos del TCR beta.	108
<b>Tabla 15.</b> Resultados de los estudios de los rearrreglos del TCR gamma.	108
<b>Tabla 16.</b> Resultados de los estudios de los rearrreglos del TCR delta.	109
<b>Tabla 17.</b> Resumen de los rearrreglos de Ig/TCR encontrados.	109
<b>Tabla 18.</b> Cantidad de rearrreglos encontrados, número de pacientes en los que se encontraron los rearrreglos y edad promedio según el inmunofenotipo.	111
<b>Tabla 19.</b> Características clínicas y hematológicas de los 3 pacientes con LLA-B madura y alteraciones en el gen MLL.	135
<b>Tabla 20.</b> Resultado del inmunofenotipo de los pacientes con LLA-B madura y alteraciones en el gen MLL.	135
<b>Tabla 21.</b> Características clínicas y hematológicas de los pacientes con LLA-B madura.	136
<b>Tabla 22.</b> Respuesta temprana al tratamiento y seguimiento de los pacientes con LLA-B madura y alteraciones en el gen MLL.	136
<b>Tabla 23.</b> Resultado de los estudios de las mutaciones en FLT3.	137
<b>Tabla 24.</b> Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con SD y MAT o LMCA al momento del diagnóstico.	140
<b>Tabla 25.</b> Resultado de los estudios citogenéticos realizados en las muestras de MO de los 1 casos con DS y MAT o LMCA.	141
<b>Tabla 26.</b> Resumen de las mutaciones del gen GATA-1 en las muestras de médula ósea estudiadas y predicción de sus consecuencias a nivel proteico.	142

**Tabla 27.** Principales características inmunofenotípicas, citogenéticas y 163  
moleculares encontradas en todos los casos publicados de LLA B maduro con  
MLL-r.

---

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- ADNc: ADN copia
- AT-hooks: Dominio de unión al DNA
- bcr: Sitios de ruptura frecuente (*Breakpoint Cluster Regions*)
- BD: Bromodominio
- Buffy*: Pool de ADN
- CBP: proteína de unión a CREB
- CDK: Quinasa dependiente de ciclina
- CDKIs: Inhibidores de quinasa dependientes de ciclina
- CF: gen compañero de fusión de *MLL*
- CST: Control sin templado
- CXXC: Dominio rico en cisteína
- EGIL: Grupo Europeo para la Caracterización Inmunológica de Leucemias (*European Group for the Immunological Characterization of Leukemias*)
- EMR: Enfermedad mínima residual
- FISH: Hibridación con Fluorescencia *in situ*
- FLT3: *Fms-related tyrosine kinase 3*
- FLT3-ITD: Duplicación interna en tándem del gen *FLT3* (*internal tandem duplication*)
- FLT3-TKD: Mutación del dominio tirosina quinasa del gen *FLT3* (*tyrosin kinase domain mutation*)
- H3K4: Lisina-4 de la Histona 3
- HOX: Genes *homeobox*
- HPG: Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan”
- Ig: Inmunoglobulinas
- LA: Leucemia aguda
- LAI: Leucemia aguda de infantes
- LDI-PCR: PCR inversa de larga distancia
- LLA: Leucemia linfoblástica aguda
- LLA-B: Leucemia linfoblástica aguda precursor B
- LLA-T: Leucemia linfoblástica aguda precursor T
- LMA: Leucemia mieloblástica aguda
- LMCA: Leucemia megacarioblástica aguda

MAT: Mielopoyesis anormal transitoria

MLL: Gen de la leucemia de linaje mixto

MLL-C: MLL carboxilo terminal

MLL-N: MLL amino terminal

MO: Médula ósea

PHD: *plant homeodomain finger motifs*

RC: Remisión completa

RCC: Remisión completa continua

RT-PCR: Trascrición reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa

RQ-PCR: PCR en tiempo real

TAD: Dominio de transactivación

TCR: Receptor de linfocitos T

TrxG: proteínas del grupo trithorax

WBC: Recuento de leucocitos

WDR5: *WD repeat-containing protein 5*

## IMPORTANCIA DEL TRABAJO

Las enfermedades malignas son la primera causa de muerte en los niños menores de 15 años en la ciudad de Buenos Aires (De Sarrasqueta *et al.*, 1991) y la leucemia aguda corresponde a la enfermedad maligna más frecuente en pediatría de acuerdo al Registro Onco Pediátrico Argentino (Moreno, 2011). Sin embargo, las leucemias agudas no presentan una incidencia elevada en los lactantes (niños menores de 2 años) y menos aún en los niños menores de 1 año. Cuando una leucemia aguda es diagnosticada en lactantes o niños menores de 1 año de edad es importante tener presente que se trata de un sub-grupo especial de leucemia, con características peculiares, que la diferencian de otros subtipos de leucemia.

La leucemia aguda en pacientes menores de un año (denominados infantes) es una enfermedad genéticamente heterogénea, con características clínicas y biológicas que la diferencian de las leucemias de los niños mayores de 1 año o 2 años de vida. Este particular subgrupo de leucemias se caracteriza por una alta frecuencia de alteraciones que afectan al gen de la leucemia de linaje mixto (*MLL*, actualmente denominado *KMT2A*) ubicado en la banda cromosómica 11q23. Los blastos presentan además un inmunofenotipo en general inmaduro y una alta carga tumoral al momento del diagnóstico. Estas características se relacionan además con una mala respuesta al tratamiento y, por lo tanto, a un pobre pronóstico de este grupo de pacientes. Diferentes estudios a nivel mundial reportaron que la sobrevida libre de eventos en los pacientes infantes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) se encuentra entre 28-45% (Ferster *et al.*, 1994; Frankel *et al.*, 1997; Silverman *et al.*, 1997; Lauer *et al.*, 1998; Dordelmann *et al.*, 1999; Reaman *et al.*, 1999; Chessells *et al.*, 2002; Biondi *et al.*, 2006; Hilden *et al.*, 2006). Estas tasas de sobrevida son significativamente menores a las observadas en el

resto de los pacientes pediátricos con LLA quienes alcanzan tasas de sobrevida de aproximadamente el 80% (Biondi *et al.*, 2000; Pieters, 2003).

Considerando estas diferencias, se han desarrollado protocolos de tratamiento específicos, con el fin de lograr mejores tasas de sobrevida. Uno de los protocolos actuales para el tratamiento de la LLA de infantes es el Interfant-99 primero y el Interfant-2006 después, que se aplica en numerosos centros del mundo, incluyendo varios centros en nuestro país.

El protocolo Interfant-2006 estratifica a los pacientes en 3 grupos de riesgo con diferente probabilidad de sobrevida, basados en el análisis de los resultados del protocolo previo, Interfant-99 para esta población particular de pacientes (Pieters *et al.*, 2007). Esta estratificación se basa en la presencia de factores pronósticos que han demostrado en un análisis de multivarianza un valor predictor con significancia estadística. Estos factores son: el estado del gen *MLL*, la edad al momento del diagnóstico y el recuento de leucocitos al momento del diagnóstico. A estos tres factores pronósticos propios del paciente y de la enfermedad se suma un factor relacionado con la respuesta temprana al tratamiento a la pre-fase con prednisona durante la primera semana del tratamiento. Esta evaluación de la respuesta se realiza en diferentes momentos durante las etapas iniciales del tratamiento y con parámetros diferentes, sumándose a la respuesta en el día 8 del tratamiento a la prednisona, el estudio de la enfermedad mínima residual en diferentes puntos del tratamiento. El estudio de la enfermedad mínima residual puede realizarse por diferentes métodos (citometría de flujo, biología molecular).

La evaluación de la respuesta al tratamiento requiere de blancos específicos que permitan detectar con alta sensibilidad a las células leucémicas y en un futuro poder re-



estratificar a los pacientes en los diferentes grupos de riesgo, según respondan o no al tratamiento y por lo tanto, puedan o no eliminarse esos elementos malignos (blastos).

Los blancos moleculares utilizados en la determinación de la enfermedad mínima residual en los pacientes pediátricos mayores de un año de edad con diagnóstico de LLA son los rearrreglos de Ig/TCR, pero en el grupo de infantes estos rearrreglos tienen menor frecuencia y son más oligoclonales, lo que dificulta el seguimiento.

Por otro lado, en leucemia mieloblástica aguda (LMA) pediátricas, sólo el 5% presentan rearrreglos de Ig/TCR lo que imposibilita el uso como blanco molecular para evaluar la evolución del tratamiento. Por tal motivo resulta imperioso buscar nuevos blancos moleculares que permitan ser utilizados para el seguimiento de este grupo tan particular de pacientes.

El hecho de que aproximadamente el 80% de los infantes con LLA y el 50% con LMA presentan alteraciones en el gen *MLL*, abre un camino importantísimo desde el punto de vista molecular, por un lado para lograr una correcta caracterización de este grupo de pacientes y por otro lado para desarrollar el estudio de nuevos blancos de seguimiento que se reflejen en una mejor adecuación del tratamiento con la finalidad de lograr una mejoría de la sobrevida libre de eventos en este grupo tan vulnerable de pacientes.

Por otro lado, en este grupo de pacientes también se han reconocido alteraciones en la expresión o mutaciones en otros genes, entre ellos pueden mencionarse las alteraciones detectadas en el gen *FLT3*. Los estudios de mutaciones en el gen *FLT3* desarrollados en esta tesis, permitirán profundizar el conocimiento de las características biológicas y del proceso de leucemogénesis en las leucemias de infantes. Su estudio resulta relevante ya que se ha descrito que un alto porcentaje de leucemias con alteraciones en el gen *MLL* que presentan altos niveles de expresión del receptor FLT3 en la superficie celular, y además pueden presentar mutaciones que producen su activación constitutiva. El

estudio de estas alteraciones ha permitido en los últimos tiempos el desarrollo de drogas inhibidoras de la actividad tirosina-kinasa de FLT3, ofreciendo una nueva opción para el tratamiento de este grupo de pacientes, dentro del grupo de las terapias “*target*” o terapias “blanco”, dirigidas directamente contra estas alteraciones.

Finalmente, en el presente trabajo de tesis se analizarán los estudios realizados sobre las mutaciones del gen *GATA-1* en los infantes con síndrome de Down, ya que para este grupo de pacientes presenta, dentro del grupo de los pacientes menores de 1 año, características que también lo diferencian del resto de los infantes, entre ellas se ha descrito una alta frecuencia de mutaciones de este gen. Uno de los hallazgos más importantes se relaciona con la presencia de mutaciones en este gen en pacientes con Síndrome de Down que presentan alteraciones hematológicas durante el período neonatal. Es sabido que los pacientes con Síndrome de Down presentan riesgo aumentado de desarrollar leucemia aguda, generalmente leucemia megacarioblástica y que aproximadamente el 10% de los neonatos con este síndrome presenta un desorden denominado mielopoyesis anormal transitoria indistinguible de la leucemia megacarioblástica aguda, que en general remite espontáneamente antes de los 3 meses de evolución. Este estudio permitirá conocer la frecuencia y tipo de mutaciones que podrían estar participando de la evolución de mielopoyesis anormal transitoria y la leucemia megacarioblástica aguda.

En resumen, la importancia del presente trabajo de tesis está centrada en la puesta a punto y desarrollo de nuevas metodologías que permitan el mejor conocimiento de las alteraciones moleculares de este tipo particular de leucemias y a través de este mejor conocimiento de la enfermedad a lograr en un futuro su aplicabilidad para obtener mejores resultados de tratamiento, en una población de pacientes que actualmente presentan en general escasas posibilidades curativas.

# 1. Introducción

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. INCIDENCIA DE ENFERMEDADES NEOPLÁSICAS EN PEDIATRÍA

Las enfermedades malignas constituyen la primera causa de muerte asociada a enfermedad en los pacientes pediátricos en la ciudad de Buenos Aires (De Sarrasqueta *et al.*, 1998). El Hospital de Pediatría “Prof. Dr. Juan P. Garrahan” (HPG) recibe anualmente un promedio de 350-400 casos de pacientes oncológicos, lo que representa aproximadamente el 33% de los casos que se diagnostican en nuestro país. De acuerdo con los datos de grupos internacionales y del Registro Oncopediátrico Argentino (ROHA), las leucemias agudas son el tipo de neoplasia más frecuente en los niños menores de 15 años y en nuestro país constituyen un 37% de las mismas, con un promedio de 467 nuevos casos por año (Swerdlow *et al.* 2008; Moreno, 2011).

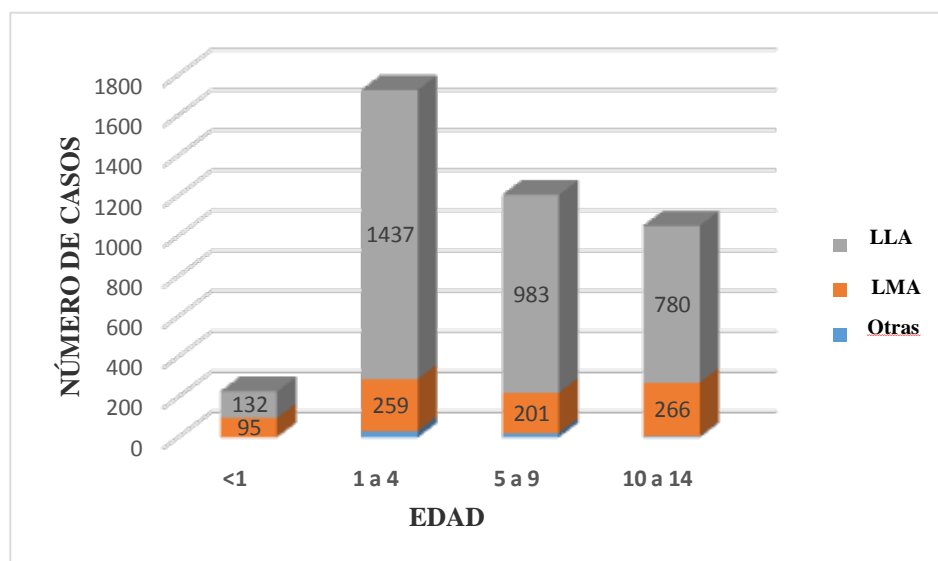
Clasificación Internacional de Cáncer Pediátrico	Promedio Anual	Porcentaje
<b>I Leucemias</b>	<b>467</b>	<b>36,7%</b>
II Linfomas y Tumores Reticuloendoteliales	162	12,7%
III Tumores Sistema Nervioso Central	235	18,5%
IV Neuroblastoma y otros T. Sist. Nervioso Periférico	71	5,6%
V Retinoblastoma	44	3,5%
VI Tumores Renales	63	5,0%
VII Tumores Hepáticos	18	1,4%
VIII Tumores Óseos	60	4,7%
IX Tumores Partes Blandas	78	6,1%
X Tumores Células Germinales	41	3,2%
XI Carcinomas y otros T. Epiteliales	23	1,8%
XII Tumores varios e Inespecíficos	10	0,8%
<b>Total</b>	<b>1272</b>	<b>100%</b>

*Tabla 1. Distribución de casos según la Clasificación Internacional de Cáncer Pediátrico (ICCC), promedio años 2000-2008 (Moreno, 2011). T. Sist.: tumores del sistema nervioso.*

La leucemia es una enfermedad genéticamente heterogénea que resulta de una variedad de alteraciones en numerosos genes importantes para el crecimiento, la diferenciación y la muerte celular. La identificación y caracterización de estos rearrreglos genéticos ha demostrado ser muy valiosa para realizar un diagnóstico preciso de esta enfermedad, definir el pronóstico, el correcto tratamiento y para poder llevar a cabo el seguimiento de la respuesta de la enfermedad al tratamiento.

El tipo de leucemia con mayor incidencia en pediatría es LLA, correspondiendo al 74% de los casos reportados en nuestro país, mientras que los casos de LMA comprenden el 23% de las mismas. El restante 3% de las leucemias agudas reportadas se definen dentro del grupo de leucemias de linaje ambiguo u otro tipo de leucemias inusuales.

Analizando los datos de acuerdo con la edad de aparición, se observa una mayor prevalencia de LLA en los grupos de niños entre 1 y 4 años de edad, mientras que la menor prevalencia corresponde al grupo de infantes (Figura 1).



**Figura 1.** Número de casos de Leucemias Agudas en niños menores de 15 años en Argentina entre los años 2000 y 2008, agrupadas por rangos de edad (Moreno, 2011).

## 1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

De acuerdo con la clasificación actual de Tumores de Tejidos Hematopoyéticos y Linfoides, publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2008 (Swerdlow et al., 2008), la LLA es definida como una neoplasia de células precursoras linfoides, denominada genéricamente como Leucemia/Linfoma Linfoblástica/o. Dentro de las neoplasias que involucran células precursoras linfoides, se distinguen entonces tres entidades, cuya clasificación se basa especialmente en los diferentes subtipos citogenético-moleculares:

### 1. Leucemia/Linfoma Linfoblástica/o de células precursoras B con anomalías genéticas recurrentes, que comprende:

- a. LLA B con t(9;22)(q34;q11.2)/*BCR-ABL1*
- b. LLA B con t(v;11q23)/ rearreglos de *MLL*
- c. LLA B con t(12;21)(p13;q22)/ *TEL-AML1 (ETV6-RUNX1)*
- d. LLA B con t(1;19)(q23;p13.3)/ *E2A-PBX1 (TCF3-PBX1)*
- e. LLA B con hiperdiploidía (más de 50 cromosomas)
- f. LLA B con hipodiploidía (menos de 45 cromosomas)
- g. LLA B con t(5;14)(q31;q32);/ *IGH-IL3*

### 2. Leucemia/Linfoma Linfoblástica/o de células precursoras B no especificada en otras categorías.

### 3. Leucemia/Linfoma Linfoblástica/o de células precursoras T.

- a. LLA-T con rearreglo clonal de receptor TCR
- b. LLA-T con rearreglo del gen IGH

- c. LLA-T con alteraciones en genes relacionados con factores de transcripción: *HOX11 (TLX1)* y *HOX11L2 (TLX3)*
- d. LLA-T con alteraciones de otros factores de transcripción involucrados; *SIL-TALI (1p32)*, *RBTN1*, *RBTN2* y *LYL1*
- e. LLA-T con mutaciones del gen *NOTCH1*
- f. LLA-T con alteraciones de tirosina quinasa citoplasmática *LCK (1p34.3-35)*

Por otro lado, dentro de las neoplasias que involucran células precursoras mieloides, pueden distinguirse diferentes entidades:

### **1. Leucemia Mieloide Aguda y neoplasias relacionadas con precursores mieloides:**

- a. LMA con anomalías genéticas recurrentes
- b. LMA con cambios mielodisplásicos
- c. LMA relacionadas con terapia previa
- d. LMA no definidas de otra manera
- e. Sarcoma mieloide
- f. Proliferaciones mieloides relacionadas a Síndrome de Down
- g. Neoplasias de células dendríticas plasmocitoides

A su vez dentro de las LMA con anomalías citogenéticas recurrentes, se encuentran:

### **2. Leucemia Mieloide Aguda con inversiones/translocaciones balanceadas, que comprende:**

- a. LMA con *t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO(RUNX1-RUNX1T1)*
- b. LMA con *inv(16)(p13.1q22)* o *t(16;16) (p13.1;q22)/CBFB-MYH11*
- c. Leucemia Promielocítica Aguda con *t(15;17)(q24;q12)/PML-RARA*

- d. LMA con t(9;11)(p22;q23)/*MLL-AF9(MLL-MLLT3)(KMT2A-MLLT3)*
- e. LMA con t(6;9)(p22;q34)/*DEK-NUP214*
- f. LMA con inv(3)(q21q26.2) o t(3;3) (q21;q26.2) /*RPNI-MECOM*
- g. LMA (megacarioblástica) con t(1;22) (p13;q13)/*RBM15-MKLI*
- h. LMA con *NPM1* mutado (entidad provisional)
- i. LMA con *CBPA* mutado (entidad provisional)

### **3. Leucemia Mieloide Aguda con cambios mielodisplásicos relacionados a la terapia previa**

### **4. Leucemia Mieloide Aguda no definidas de otra manera**

- a. LMA con mínima diferenciación
- b. LMA sin maduración
- c. LMA con maduración
- d. LMA mielomonocítica
- e. Leucemia aguda monoblástica o monocítica
- f. Leucemia aguda eritroide
- g. Leucemia aguda megacarioblástica
- h. Leucemia aguda basófila
- i. Panmielosis aguda con mielofibrosis

La clasificación de la OMS 2008 tiene como objetivo la diferenciación de los subtipos dentro de las leucemias agudas, basándose en las características no sólo biológicas de estas enfermedades, especialmente en las alteraciones citogenéticas/moleculares, sino también considerando el valor pronóstico de cada subtipo de leucemia y las implicancias terapéuticas relacionadas con la presencia de las mismas.



Existen en esta clasificación dos grupos de leucemias que resultan el foco de interés de este trabajo de tesis: por un lado, el grupo de las LLA, como en el de las LMA, las leucemias con alteraciones en el gen *MLL* que corresponden a un grupo especial de leucemias.

En segundo lugar, las LMA que ocurren en los pacientes con Síndrome de Down son consideradas especialmente como un subgrupo con características particulares que las diferencian de las demás LMA, por su comportamiento clínico y por las alteraciones citogenético-moleculares particulares que presentan.

### 1.3. LEUCEMIAS AGUDAS DE INFANTES

#### 1.3.1. GENERALIDADES

El término leucemia aguda de infantes (LAI) refiere a la LLA o LMA diagnosticadas durante el primer año de vida de los niños. Las LAI constituyen una entidad única, con características biológicas y clínicas particulares que necesita un tratamiento individualizado. Se cree que las mujeres tienen mayor riesgo de desarrollar LAI que los varones, pero menor riesgo de desarrollar leucemia más allá del año de vida (Pui et al., 1987; Birch y Blair, 1992; Chessells, 1992). El riesgo incrementado en las mujeres infantes condujo a Ross y colaboradores a postular que el desarrollo de leucemias en estos casos, podría deberse a eventos genéticos u hormonales propios del sexo femenino, o a que los varones podrían morir con mayor frecuencia intra útero como resultado del evento leucemogénico (Ross et al., 1997); sin embargo, los diferentes estudios realizados hasta la fecha no han mostrado una diferencia estadísticamente significativa, aunque según algunos autores, es atribuible a la pequeña cantidad de casos analizados en cada estudio (Ross y Robinson, 1997).

Si se compara a las LAI con las leucemias agudas de los niños mayores de 1 año de edad al momento del diagnóstico, puede observarse que presentan características sugestivas de una mayor agresividad, incluyendo alto recuento de leucocitos (WBC), hepato-esplenomegalia, compromiso extramedular en general y en especial del sistema nervioso central y manifestaciones cutáneas (leucemia *cutis*) (Hilden et al., 2006; Creutzig et al. 2012).

Uno alto porcentaje de las leucemias agudas que ocurre en los infantes está caracterizada citogenéticamente por presentar alteraciones cromosómicas que involucran al gen de la *Leucemia de Linaje Mixto (MLL)*, el cual se encuentra ubicado

en el cromosoma 11 banda q23. A principios de siglo la frecuencia descrita para los rearrreglos de *MLL* (*MLL-r*) en las LAI era de 30-35% (Diller y Li, 1998; Biondi et al., 2000). Actualmente con el aporte de la biología molecular y el desarrollo de nuevas técnicas más sofisticadas, la frecuencia de estos rearrreglos en este grupo tan particular de pacientes llega hasta el 93% (van der Linden et al., 2009). Para la LLA en infantes se ha descrito que la presencia de *MLL-r* se encuentra en el 70-80% de los casos (Hilden et al., 2006; Pieters et al., 2007).

Las LMA de niños mayores de un año los *MLL-r* corresponden al 15%-20%, mientras que en los infantes los *MLL-r* se encuentran aproximadamente en el 50% de los casos (Harrison et al., 2010). Los casos de leucemia megacarioblástica aguda (LMCA) descritos con rearrreglos de *MLL* son muy poco frecuentes (Takita et al., 2009).

Por otro lado, la LMCA es un subtipo de LMA poco frecuente en infantes, excepto en un grupo particular de pacientes en los que la presencia de LMCA es muy común: los infantes con Síndrome de Down (SD). Se ha descrito además otro subtipo de cuadro de proliferación megacarioblástica, que se presenta en aproximadamente un 10% de los recién nacidos con SD. Este cuadro se denomina mielopoyesis anormal transitoria (MAT), es indistinguible de la LMCA, pero que remite espontáneamente. En este grupo de pacientes no se han detectado alteraciones en el gen *MLL*, pero se ha descrito una alta incidencia de mutaciones en el gen *GATA1*.

### **1.3.2. ETIOLOGÍA DE LAS LAI CON REARRREGLOS DE *MLL***

La etiología de las LAI constituye un tema controversial y ha sido objeto de numerosos estudios epidemiológicos algunos de los cuales fueron revisados por Ross y

colaboradores (Ross et al., 1994). Se ha descrito una asociación con la exposición ambiental u ocupacional a radiación ionizante, solventes, productos derivados del petróleo y pesticidas (Buckley et al., 1989; 1992). Algunos autores asocian su desarrollo con la exposición materna a múltiples toxinas, incluso se ha demostrado que existe un riesgo incrementado de que los infantes desarrollen leucemia cuando son hijos de madres que consumen marihuana y/o alcohol durante el embarazo (Robison et al., 1989; Buckley et al., 1992; Severson et al., 1993; Shu et al., 1996).

La observación adicional de que la administración de drogas quimioterápicas inhibidoras de la enzima topoisomerasa II se asocia con mayor incidencia de LMA con *MLL-r* llevó a desarrollar estudios epidemiológicos y experimentales relacionando una dieta rica en flavonoides con la presencia de rearrreglos de este gen. Estos estudios demostraron *in vitro* que los flavonoides, inhibidores de la enzima Topoisomerasa II, presentes en algunas frutas, vinos y tés inducen rupturas de la doble hebra de ADN a nivel del gen *MLL*. Esto condujo a la hipótesis de que una dieta materna rica en flavonoides e isoflavonoides puede incrementar el riesgo de LAI con rearrreglos de *MLL*, aunque no hay evidencia definitiva que certifique esta hipótesis, posiblemente debido a la complejidad de las dietas estudiadas y a la baja incidencia de LAI con rearrreglos de *MLL* (Spector et al., 2005; Ross, 1998).

Dentro de los inhibidores de la topoisomerasa II de la dieta se incluyen además la cafeína, las catequinas del cacao y la quercetina presente en las frutas frescas y vegetales. Distintas formulaciones a base de soja pueden exponer a los infantes a altos niveles de isoflavonoides, incluyendo daidzeína y genisteína obteniéndose la misma consecuencia (Corbett y Osheroff, 1993; Setchell et al., 1997). Se cree también, que los metabolitos del alcohol pueden interferir con la acción de la enzima, incluso el etanol

podría inducir enzimas microsomales, como por ejemplo la enzima citocromo P450, la cual activaría a diferentes precarcinógenos (Shu et al., 1996).

La ocurrencia muy temprana de las leucemias con *MLL-r* y las muertes descritas por LMA con *MLL-r* sugiere que los eventos leucemogénicos probablemente ocurren en la etapa prenatal (Sansone y Negri, 1992; Hunger et al. 1998), del mismo modo ocurre con los estudios de LLA, donde los resultados epidemiológicos y genético moleculares demuestran que la mayoría de los casos de LAI ocurren intra útero. (Wasserman et al., 1992). Otro dato que apoya fuertemente esta hipótesis es el reporte de varios casos de clones leucémicos idénticos, con rearreglo de *MLL* no constitucional en las células leucémicas de gemelos univitelinos, sugiriendo un evento clonal que genera una progenie leucémica que metastatiza en el otro gemelo a través de la placenta o por circulación materna (Ford et al., 1993; Gill Super et al., 1994; Mahmoud et al., 1995; Campbell et al., 1996; Richkind et al., 1998).

Muchos de estos estudios muestran como resultado la asociación entre alto peso al nacer y mayor tasa de mortalidad infantil, sugiriendo que altos niveles del factor de crecimiento insulínico tipo 1 también conocido como somatomedina C, o IGF-1 (del inglés: *insulin-like growth factor-1*) pueden contribuir con la leucemogénesis (Wertelecki y Mantel, 1973; Kaye et al., 1991; Cnattingius et al., 1995; Ross et al., 1996; 1997; Westergaard et al., 1997). Por otro lado, el grupo de estudio Children's Cancer Group encontró una asociación entre la historia materna de pérdidas fetales previas, con el desarrollo de LMA (M4/M5) en infantes (Yeazel et al., 1995).

### 1.3.3. CARACTERÍSTICAS Y MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LAS LAI

La hepato-esplenomegalia detectada al momento del diagnóstico de LAI es muy frecuente y puede encontrarse en el 80% de los pacientes (Bresters et al., 2002; Ishii et al., 2006). El aumento del tamaño del hígado es más frecuente que el del bazo y el aumento de tamaño de los ganglios (adenomegalia) se encuentra en un 25% de los pacientes (Bresters et al., 2002). En todos los casos la organomegalia tiene la característica de ser indolora y suele presentarse con una consistencia aumentada con respecto a lo normal de los órganos comprometidos.

La leucemia *cutis*, o infiltración de células leucémicas a nivel de la piel, se encuentra en el 60% de los pacientes (Bresters et al., 2002; Isaacs, 2003; Ishii et al., 2006). Aparece como firmes nódulos de color azul, rojo o púrpura con distribución generalizada y parece ser el primer signo de presentación en la mitad de los pacientes neonatos (Isaacs et al., 2003); debido a esto, se los llama “*blueberry muffin baby*”.

Otra de las características clínicas más importantes presente en estos pacientes es la hiperleucocitosis, es decir el recuento de leucocitos  $>100 \times 10^9/L$  al momento del diagnóstico, la cual se encuentra en la mayoría de los casos, siendo esta más frecuente en LLA que en LMA (Isaacs et al., 2003). Puede observarse también que la infiltración medular de la leucemia se haga manifiesta a través del desarrollo de anemia, trombocitopenia y en muchos casos neutropenia que puede causar manifestaciones clínicas secundarias como el sangrado o incluso infecciones.

La infiltración extramedular de la leucemia puede observarse en localizaciones muy variadas. Dentro de ellas el compromiso del sistema nervioso central es uno de los sitios de compromiso extramedular más frecuente. Como manifestación de este compromiso

pueden observarse alteraciones neurológicas como por ejemplo parálisis de los nervios craneales, convulsiones y papiledema probablemente relacionado a la infiltración del sistema nervioso central. La infiltración meníngea puede también hacerse evidente a través del aumento de tensión de la fontanela. Alternativamente, las alteraciones neurológicas pueden ser explicadas por el desarrollo de sangrado, como resultado de la trombocitopenia y en otros casos secundarios al desarrollo de infarto vascular debido a la presencia de leucostasis asociada a los recuentos leucocitarios iniciales elevados.

Los signos y síntomas respiratorios pueden estar presentes debido a la ocurrencia de hemorragia pulmonar producto de la trombocitopenia, o también debido a la presencia de infiltración de las células leucémicas provocando leucostasis, o en algunos casos al desarrollo infecciones respiratorias como consecuencia de la neutropenia, que en general presentan estos pacientes. Por otro lado, en algunos casos, se encontró falla cardíaca e hidropesía consecuencia de la anemia severa (Arcasoy y Gallagher, 2005). La anemia y la trombocitopenia pueden conducir a diversos signos como por ejemplo el desarrollo de palidez, letargia, retraso del crecimiento, melena y predisposición al sangrado.

## **1.4. LEUCEMIAS AGUDAS Y GEN MLL**

### **1.4.1. REARREGLOS DEL GEN MLL EN LEUCEMIAS AGUDAS**

Los rearreglos del gen *MLL* pueden encontrarse en leucemias agudas de linajes B, T, mieloide y de linaje mixto. Las LLA con rearreglos de este gen generalmente presentan un fenotipo de precursor temprano, Pro-B de acuerdo a la clasificación del grupo Grupo europeo para la caracterización inmunológica de leucemias EGIL (Bené et al., 1995). Pueden ser identificadas en general por su inmunofenotipo inmaduro generalmente CD10- / CD24-, con co-expresión de CD9 y asociado a la expresión de marcadores mieloides como ser el CDw65 y CD15 (Behm et al., 1996; Wuchter et al., 2000; Borkhardt et al., 2002; Schwartz et al., 2003). Algunas veces se acompaña con co-expresión de NG2 (proteoglicano condroitín-sulfato) (Hrusák y Porwit-MacDonald, 2002). Este último marcador ha sido descrito como marcador fuertemente asociado a la presencia de rearreglos de *MLL*, pero su utilización aún es controvertida. Algunos autores encontraron que la expresión de NG2 solo se asociaba y predecía algunos rearreglos específicos como las traslocaciones t(4;11) y t(9;11), pero estos resultados no han sido confirmados ya que también se observó que la expresión de NG2 es independiente del tipo de leucemia. El NG2 es un marcador de inmadurez, por lo que podría ser frecuentemente encontrado en células progenitoras inmaduras (Bueno et al., 2008).

Estudios de inmunofenotipificación por citometría de flujo muestran que las leucemias con rearreglos del gen *MLL* presentan un perfil típico de progenitor hematopoyético temprano, por lo cual se ha propuesto que probablemente el impacto leucemogénico sea muy temprano y esto apoye el concepto de que este grupo de leucemias constituya una



entidad única, que puede ser separada de otros subtipos de LLA (Yeoh et al., 2002; Harvey et al., 2010).

Con respecto a los rearrreglos que involucran a *MLL*, han sido reportados más de 100 diferentes y se han descrito más de 79 genes compañeros de fusión, ubicados en todos los cromosomas, siendo los más comunes: *MLLT2/AFF1/AF4*, *MLLT3/AF9*, *MLLT1/ENL*, *MLLT10/AF10*, *MLLT4/AF6*, *ELL*, *EPS15/AF1P* y *MLLT6/AF17* (Meyer et al., 2010).

En las LLA de Infantes, se ha descrito que los rearrreglos *MLL-MLLT2*, *MLL-MLLT1* y *MLL-MLLT3* corresponden a más del 80% de los casos, mientras que en los pacientes pediátricos mayores de 1 año la frecuencia disminuye notablemente, siendo *MLL-MLLT2* el más frecuente (Mel Greaves, 2002).

#### **1.4.2. REARRREGLOS DEL GEN MLL EN LEUCEMIAS AGUDAS CON CAMBIO DE LINAJE**

La gran heterogeneidad de las leucemias agudas permite encontrar casos de leucemias bifenotípicas, caracterizadas por la expresión de marcadores de dos o más linajes celulares en un mismo blasto y también leucemias con dos poblaciones de blastos de linajes diferentes (leucemias bilineales) (Gagnon et al., 1989; Borowitz et al., 2008).

Los cambios en el linaje de los blastos o “*switch* de linaje” observados durante o luego de finalizado el tratamiento, como recaída de la enfermedad, pueden ser considerados una variación de la leucemia bilineal, que podrían relacionarse con la plasticidad de estas células inmaduras para des-diferenciarse y luego diferenciarse a otro linaje hematopoyético y que se hace evidente en los cambios en el linaje que expresan los

blastos en los estudios de inmunofenotipificación, de LLA a LMA o viceversa, siendo más frecuentes los cambios de leucemia linfoblástica precursor B a mieloblástica (Imataki et al., 2010).

Se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar los cambios de linaje dentro de un mismo clon leucémico, pero el o los mecanismos realmente involucrados siguen siendo poco claros (Szczepanski et al., 2001). Una posible explicación podría ser que ocurra la selección minoritaria de células de diferente linaje entre la población blástica predominante al momento del diagnóstico, consecuencia de la quimioterapia con la consiguiente aparición de un subclon que expresa un repertorio antigénico diferente (Chapiro et al., 2006). Otra posibilidad podría ser la reprogramación de una célula madre pluripotente maligna, por ejemplo un precursor con capacidad de diferenciación a más de un linaje, por ejemplo precursor B y mieloide (Montecino-Rodriguez y Dorshkind, 2002; Hou et al., 2005). Por último, la forma mieloide podría desarrollarse a partir de un progenitor de células B ya comprometido, ya sea directamente a través de trans-diferenciación o indirectamente a través de la des-diferenciación y re-diferenciación, como se mencionó anteriormente (Hutter et al., 2010).

Es importante tener en cuenta que en la ontogenia celular, el concepto de que las decisiones del destino de linaje son binarias e irreversibles se encuentra cada vez más cuestionada, y se cree que las vías de diferenciación pueden ser revertidas durante la evolución de la maduración celular. De hecho, también se ha descrito la conversión de células B maduras a macrófagos en circunstancias normales (Montecino-Rodriguez et al., 2001; Kawamoto, 2006; Baba et al., 2004).

Varios de los casos de leucemias con cambios de linaje fueron reportados en infantes, muchos de los cuales presentaban alteraciones en el gen *MLL* (Sakaki et al., 2010; Rossi et al., 2012). Esta asociación entre la alta frecuencia de cambios de linaje y la presencia de alteraciones en la banda 11q23/*MLL* refuerza la idea de que el *MLL* rearrreglado participa en la generación del *switch* e incluso se cree que los blastos de los infantes con LLA y *MLL*-r derivan de una célula precursora B con potencial de diferenciación linfoide-mieloide.

Por otro lado, se ha demostrado recientemente que las proteínas fusión de *MLL* también pueden inducir el desarrollo de leucemia en los progenitores ya comprometidos por la activación de los programas de células madre (Krivtsov et al., 2010).

El correcto diagnóstico de un cambio de linaje depende de la detección de las mismas alteraciones citogenéticas o moleculares antes y después de la detección de los cambios en el inmunofenotipo, permitiendo distinguirlo de una leucemia como segunda enfermedad maligna (Winick et al., 1993; Chapiro et al., 2006). Por ello es importante que, ante la sospecha de desarrollo de un cambio de linaje y de su confirmación por la observación de un inmunofenotipo diferente, se realicen todos los estudios moleculares necesarios para diferenciar si este cambio en la expresión del inmunofenotipo se trata de un cambio de linaje de la misma enfermedad o de una enfermedad distinta a la primera. Estos estudios incluyen, además de la citometría de flujo, la realización de tinciones citoquímicas, estudios citogenéticos convencionales y estudios moleculares. Desde el punto de vista molecular los marcadores buscados para su detección son los rearrreglos de *Ig/TCR* o los transcritos de fusión por RT-PCR, y la estabilidad de los mismos permite confirmar el cambio de linaje en blastos con iguales alteraciones moleculares.

### 1.4.3. REARREGLOS DEL GEN MLL EN LEUCEMIAS B MADURAS

Ya se ha mencionado que una de las características de las LLA en los infantes es que corresponden en general a leucemias de precursores B inmaduros. Por otro lado, las leucemias agudas con inmunofenotipo maduro, caracterizadas por la expresión de Ig de superficie, pérdida de marcadores de inmadurez como el CD34 y la enzima TdT, y morfología L3, están generalmente asociados a translocaciones cromosómicas específicas como lo es la t(8;14)(q24;q32) con compromiso de la banda 8q24, o algunas de sus variantes. Esta translocación, yuxtapone el proto-oncogen *c-myc* ubicado en el cromosoma 8q24 y el gen de la cadena pesada de inmunoglobulinas en 14q32 provocando la activación constitutiva de *c-myc*, lo cual resulta en un evento genético fundamental en la leucemogénesis de la leucemia B madura o del Linfoma no Hodgkin, en su variedad de Linfoma de Burkitt.

Sin embargo, en pediatría existen muy pocos casos de leucemias linfoblásticas B maduras con morfología FAB L1 o L2 y ausencia de alteraciones en *c-myc*. La mayoría de ellos corresponden a infantes, que además tienen rearrreglado el gen *MLL* y en su mayoría con la translocación t(9;11)(p21-22;q23) (Finlay y Borcharding, 1988; Shende et al., 1988; Sullivan et al., 1990; Li y Lew, 2003). Es por ello que, entre las leucemias con alteraciones del gen *MLL*, incluirá este trabajo de tesis el análisis de este grupo especial de leucemias dentro del grupo de las LLA con *MLL-r*.

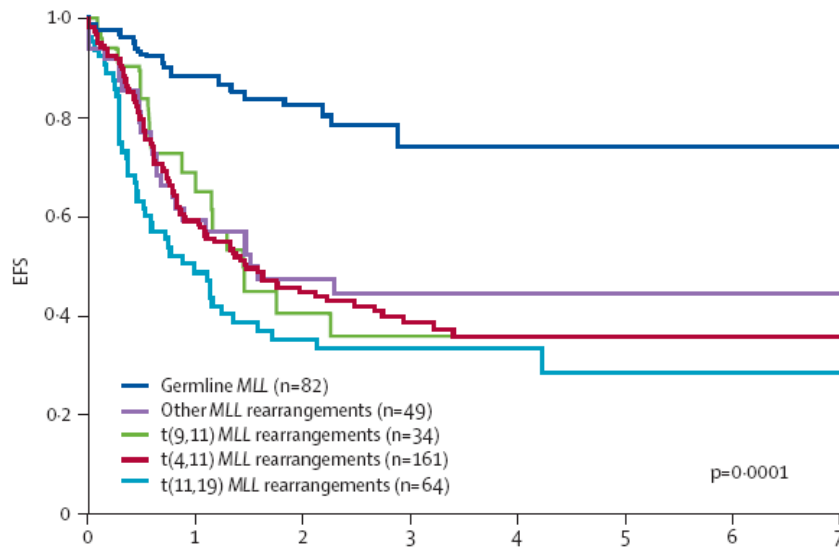
#### **1.4.4 REARREGLOS DE MLL Y PRONÓSTICO EN LLA DE INFANTES**

A diferencia de los pacientes con LLA mayores de un año de edad al momento de su diagnóstico, en los que ha sido descripta una probabilidad de sobrevida libre de eventos (pSLE) de 80% (Biondi et al., 2000; Pieters, 2003), diferentes estudios a nivel mundial coinciden en que los pacientes infantiles con LLA tienen una pSLE de 22-54% (Ferster et al., 1994; Frankel et al., 1997; Dördelmann et al., 1999; Reaman et al., 1999; Chessels et al., 2002) y que estos pobres resultados se deben fundamentalmente a las altas tasas de recaída de la enfermedad observadas en este grupo de pacientes, sumado a la mayor morbi-mortalidad debida a los efectos tóxicos de la quimioterapia administrada.

La recaída es la reaparición de la enfermedad luego de alcanzada la remisión completa (RC) y que ocurre debido a la persistencia y expansión de mínimas cantidades de células leucémicas residuales, indetectables por observación al microscopio óptico. Mientras que la RC es definida como la presencia de menos de 5% de blastos o células leucémicas a la observación morfológica por microscopía óptica, sin otra evidencia de compromiso por la enfermedad. En base a las características de los infantes y al comportamiento de la enfermedad, se plantearon diferentes abordajes de tratamiento en los cuales estos pacientes menores de un año al momento del diagnóstico de su enfermedad se estratificaban en diferentes grupos de riesgo. Las bajas probabilidad de curación de los infantes orientó en general a una intensificación en la intensidad de quimioterapia administrada, e incluso contemplaba el trasplante de médula ósea en los pacientes pertenecientes al grupo de alto riesgo (Pieters et al., 2007).

El análisis de los resultados del protocolo Interfant-99, que reunió un número significativo de pacientes, permitió identificar diferentes factores pronóstico. La

presencia de alteraciones en el gen *MLL* demostró ser un factor de mal pronóstico independientemente de cual fuese su gen compañero de fusión (Pieters et al., 2007) (Figura 2).



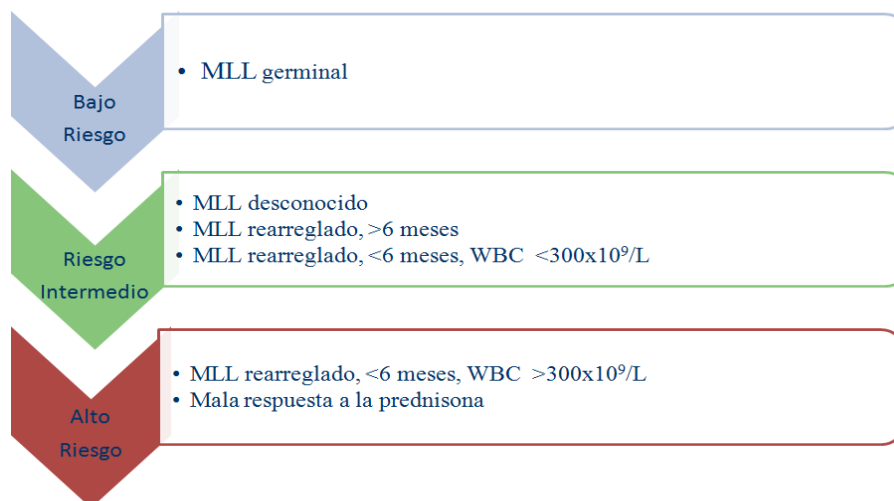
**Figura 2.** Comparación de la pSLE de los pacientes LLA con *MLL* germinal y *MLL* rearrreglado con diferentes compañeros de fusión (Pieters et al., 2007).

#### 1.4.5. ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL. IMPORTANCIA DE SU DETERMINACION

La importancia clínica de la determinación de la enfermedad mínima residual (EMR) en LLA y en algunos subtipos de LMA, ha demostrado una muy buena correlación entre la persistencia de la EMR y el riesgo de recaída (Campana, 2002; Szczepanski, 2007). En la década del '90 diferentes grupos a nivel internacional demostraron que la presencia de mínimos niveles de blastos leucémicos remanentes en etapas específicas del tratamiento provee información pronóstica significativa, definiendo así, las bases de los actuales protocolos de tratamiento de la LLA pediátrica. En la mayoría de los protocolos que actualmente se aplican en Argentina y que tienen su base en la estrategia del grupo

alemán BFM, se definen los grupos de riesgo teniendo en cuenta la respuesta a la prednisona y los niveles de EMR determinada por citometría de flujo al día 15 del tratamiento y por biología molecular en la semana 5 (fin de la fase de inducción) y 12 (previo a la fase de consolidación) del tratamiento (Ratei et al., 2009).

Uno de los protocolos actuales de tratamiento de LLA para infantes (Interfant 2006) estratifica a los pacientes en tres grupos de riesgo, con diferente probabilidad de presentar una recaída de la enfermedad. Esta estratificación se basa en factores biológicos como la edad del paciente al momento del diagnóstico (>6 meses o <6 meses de edad), recuento inicial de leucocitos y la presencia de alteraciones citogenéticas y/o moleculares en el gen *MLL*. Se basa también, en la respuesta temprana al tratamiento mediante el recuento absoluto de blastos en sangre periférica por observación morfológica al día 8 del tratamiento (Figura 3). A este último dato se lo conoce como respuesta a la prednisona.



**Figura 3.** Grupos de riesgo para estratificación de LAI en el Protocolo Interfant-2006. Estratificación basada en los factores biológicos, la presencia de alteraciones citogenéticas y/o moleculares en el gen *MLL* y la respuesta a la prednisona.

La determinación de la EMR requiere de técnicas altamente sensibles capaces de detectar al menos una célula leucémica entre 1.000 células normales (preferentemente  $10^{-4}$ - $10^{-6}$ ), por lo que la citometría de flujo y la biología molecular son actualmente las técnicas disponibles para este tipo de determinación. Ambas técnicas son complementarias al momento de la determinación (Basso et al., 2009). La citometría de flujo es ideal para fases tempranas del tratamiento (día 15) donde hay ausencia o escasa presencia de precursores hematopoyéticos normales, brindando información sobre la rapidez de la respuesta al tratamiento; y las técnicas de biología molecular han demostrado su utilidad en etapas posteriores donde la presencia de precursores normales no altera la capacidad de detección de los blastos, aportando una valiosa información sobre la calidad de la remisión. También cabe aclarar, que la determinación de la EMR no se limita a la estratificación de los diferentes grupos de riesgo, su hallazgo también permite predecir y/o detectar recaídas en etapas previas a su manifestación clínica, además de poseer impacto pronóstico en los pacientes que sufrieron una recaída y están en tratamiento de la misma, así como en las etapas pre y post trasplante de células hematopoyéticas (Campana y Coustan-Smith, 2004; Campana, 2004; 2012).

La determinación de la EMR por citometría de flujo consiste en la detección y cuantificación de los blastos leucémicos basándose en que los mismos suelen expresar un inmunofenotipo aberrante o diferente al de los precursores hematopoyéticos normales. Estos blastos leucémicos pueden presentar expresión de antígenos de otro linaje, asincronismo madurativo o ausencia de expresión de algún marcador en particular lo que posibilita su identificación.

Las técnicas de biología molecular utilizan distintos blancos moleculares que son detectados y cuantificados por PCR. Los tres principales blancos son los rearrreglos de



Ig/TCR, los transcritos de fusión y/o las fusiones génicas y finalmente los genes aberrantes o aberrantemente expresados.

#### **1.4.6. ESTUDIOS PARA LA DETECCIÓN DE LOS REARREGLOS DE MLL**

Los rearrreglos cromosómicos que involucran al gen *MLL* están asociados al desarrollo de leucemias agudas y representan, como ya se ha mencionado, un factor de riesgo que define a las leucemias con estas alteraciones como un grupo con pronóstico desfavorable. Los pacientes con estos rearrreglos usualmente son tratados con protocolos de alto riesgo. La identificación de estos rearrreglos es fundamental para la rápida decisión clínica que define un régimen de intensidad adecuada de quimioterapia.

Las alteraciones de *11q23/MLL* pueden ser estudiadas por diferentes técnicas como por ejemplo el bandeo G, la hibridación con fluorescencia *in situ* (FISH), la transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o la PCR inversa de larga distancia (LDI-PCR), entre otras. Cada una de estas técnicas presenta ventajas y desventajas, pero todas ellas son complementarias para lograr una caracterización precisa de las alteraciones de este gen.

Una de las técnicas que brinda información rápida y confiable es FISH. Esta técnica permite la detección de rearrreglos del gen *MLL* tanto en interfase como en metafase, pudiendo ser utilizar en situaciones donde las células anormales en cultivo no se dividen o en los casos en los cuales las translocaciones son crípticas y no pueden ser detectadas por el análisis citogenético convencional (bandeo G). El FISH es una técnica molecular muy versátil e informativa que utiliza sondas marcadas contra la secuencia del gen de interés, en este caso el *MLL*. Permite detectar rearrreglos recurrentes, así como también

deleciones y duplicaciones del gen. La principal desventaja del FISH con respecto al estudio de bandeo G es su limitación a la detección de reordenamientos específicos, ya que al utilizar sondas, el estudio se focaliza exclusivamente en el gen o genes de interés, es decir en el *MLL*. Si existiese la presencia de otros rearrreglos o alteraciones numéricas en los cromosomas no pueden ser detectadas. Por otro lado, si bien la técnica de FISH puede ser de suma utilidad para definir el estado del gen *MLL*, la sensibilidad de esta técnica no es adecuada para el seguimiento de la enfermedad residual, una vez administrado el tratamiento.

Esta técnica es considerada “*gold standard*” y debe ser utilizada como primer abordaje al estudio de los pacientes con LAI ya que su resultado permite junto con la edad del paciente, el WBC y la respuesta a la prednisona, agruparlos en los diferentes grupos de riesgo, para su correcto tratamiento (Pieters et al., 2007).

El análisis citogenético convencional generalmente realizado por bandeo G permite detectar la mayoría de las anomalías cromosómicas, tanto numéricas como estructurales presentes en las células leucémicas y aporta información de gran valor en el estudio de cariotipos complejos. Esta técnica presenta ciertas limitaciones relacionadas con la dificultad de obtener *in vitro* células leucémicas en división para la observación de metafases analizables (no es posible obtener metafases en aproximadamente un 15% de los casos) y también presenta la imposibilidad de visualizar las anomalías llamadas crípticas, es decir, aquellas alteraciones que no son visibles en el examen microscópico por bandeo G (Van der Burg *et al.*, 2004; Lahortiga y Cools, 2006; Rowley, 2008).

En la técnica de RT-PCR el ARN total de las células leucémicas se retro-transcribe *in vitro* para obtener el ADN copia (ADNc) correspondiente, que es luego usado como

molde para la reacción de PCR en la cual se utilizan oligonucleótidos específicos para cada transcripto de fusión cuya presencia se desea investigar (Pallisgaard et al., 1998; Van Dongen et al., 1999; Elia et al., 2003; Bacarani et al., 2008; Burmeister, et al., 2015).

Esta técnica es relativamente rápida y posee una muy alta sensibilidad y especificidad. Además, no necesita la obtención de células en división activa, y es aplicable a la gran mayoría de los pacientes. Otra ventaja de los estudios de RT-PCR es la de permitir la detección de los transcriptos de fusión de traslocaciones crípticas recurrentes, imposibles de observar en el análisis citogenético convencional.

Las limitaciones de la RT-PCR están dadas por la necesidad de conocer o sospechar las alteraciones que se buscan, ya que se deben realizar reacciones de PCR específicas para cada gen de fusión que se desea estudiar, por lo cual su uso de rutina se aplica principalmente a la búsqueda de los rearrreglos recurrentes. Tiene también como desventajas la relativa inestabilidad del ARN con el que se trabaja. Por otro lado, la gran sensibilidad de detección aumenta la posibilidad de contaminación y la consiguiente obtención de resultados falsos positivos, que pueden evitarse a través de la utilización estricta de buenas prácticas de laboratorio.

La LDI-PCR, sobre la cual constituye el principal foco de este trabajo de tesis, es una técnica basada en la digestión de ADN de los pacientes utilizando enzimas de restricción, la autoligación de los fragmentos de ADN resultantes y una posterior reacción de PCR utilizando diferentes juegos de *primers*. Esta novedosa técnica permite la detección de cualquier rearrreglo de *MLL*, e incluso específicamente es útil en los casos en que se desconoce el gen compañero de fusión (Van Dongen et al., 1999; Meyer

et al., 2005). Otra de las ventajas que presenta es que utiliza pequeñas cantidades de ADN genómico por lo que es independiente de la expresión del transcrito de fusión, además este material genético es mucho más estable que el ARN. Pero la ventaja principal es que permite detectar el sitio de fusión a nivel genómico, que es un marcador molecular único, propio del blasto leucémico y del paciente, lo cual constituye un posible blanco molecular por excelencia en el seguimiento del paciente durante y después del tratamiento a través de la determinación de la EMR (Burmeister et al., 2012).

Es interesante resaltar que unos pocos compañeros de fusión de *MLL* son los más frecuentemente encontrados en los pacientes con leucemia. En el 80% de los casos se encuentran el *MLLT2/AF4*, *MLLT3/AF9*, *MLLT1/ENL*, *MLLT10/AF10* y *MLLT4/AF6*. Con excepción del *MLLT4/AF6* los primeros 5 restantes forman parte de la maquinaria de proteínas que estimula el complejo de elongación de la ARN polimerasa II y el remodelado de la cromatina (Estable et al., 2002; Zeisig et al., 2005; Bitoun et al., 2007). El restante 20% puede corresponder a otros genes como por ejemplo el *EPS15/AF-1P*, *MLLT11/AF1Q*, *SEPT9* y el *MLLT6/AF17* o genes que se han identificado hasta el momento sólo en casos aislados (Meyer et al., 2006).

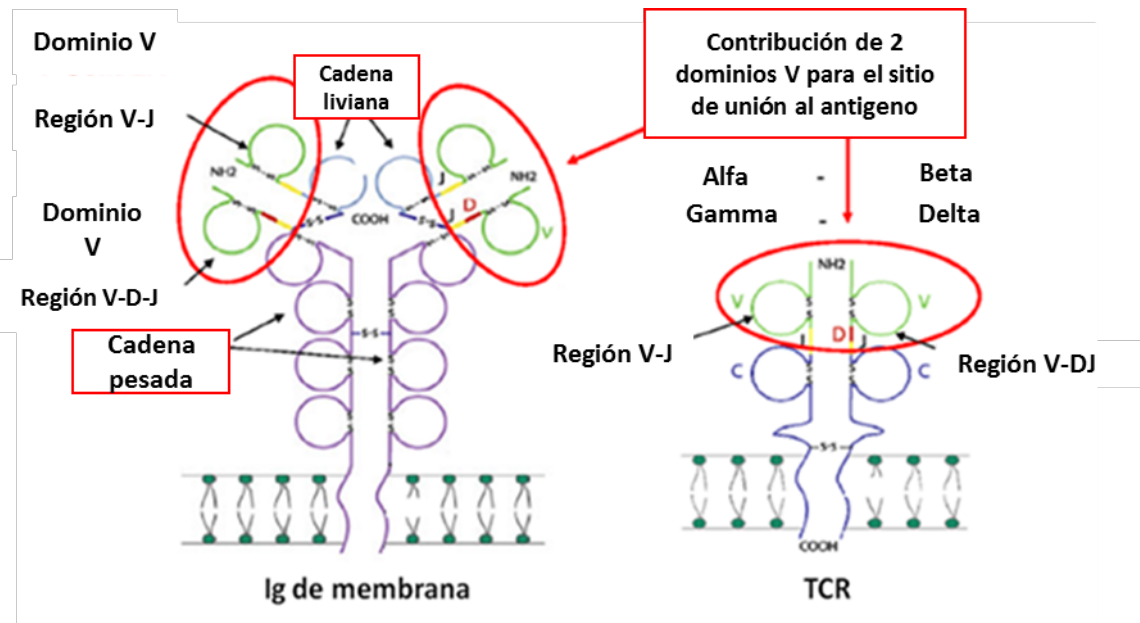
#### **1.4.7. UTILIDAD DE LOS REARREGLOS DE Ig/TCR EN LEUCEMIA AGUDA PEDIÁTRICA**

Durante la ontogenia, los linfocitos B como los T presentan cambios específicos en la estructura de los genes que codifican para las regiones variables de las Ig y/o TCR (Figura 4). Este proceso es denominado recombinación somática de los fragmentos de los genes variables (V), de diversidad (D) y de unión (J) de las inmunoglobulinas del

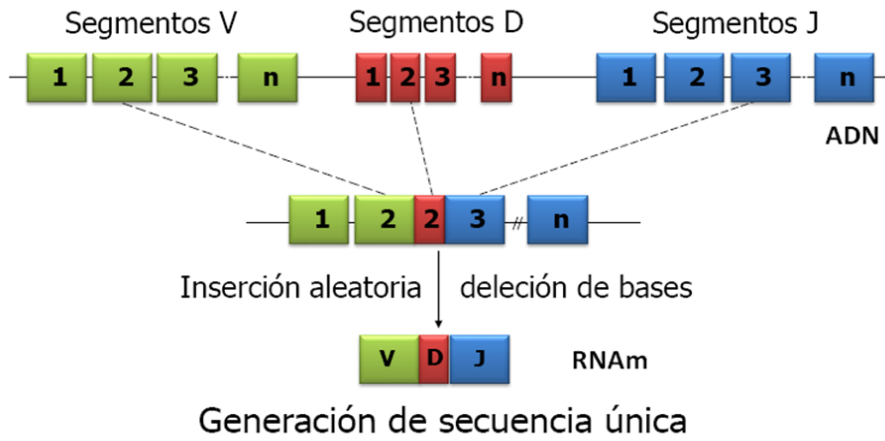
receptor del linfocito B o del receptor del linfocito T. Durante este proceso, cada linfocito adquiere una combinación única y específica de los genes V-(D)-J (Figura 5).

Debido a la existencia de múltiples segmentos génicos V, (D) y J para cada una de las cadenas de los receptores, junto con la delección e inserción aleatoria de nucleótidos en los sitios de recombinación, al final de este proceso se originan regiones variables con secuencias nucleotídicas únicas para cada linfocito, pero que en el caso de las leucemias es específica del clon leucémico y también de cada paciente que la padece. Debido a esta especificidad, los rearrreglos de los genes de las Ig y/o del TCR pueden ser utilizados como marcadores específicos o *targets* de cada paciente para evaluar la respuesta al tratamiento a través de la cuantificación de la EMR.

La determinación de la EMR utilizando los rearrreglos de los genes de las Ig/TCR en pacientes pediátricos con LLA, es aplicable aproximadamente al 95% de los casos (van der Velden et al., 2003a). Sin embargo, su utilidad en pacientes infantiles es algo limitada, ya que un alto porcentaje de las LLA-I no presenta rearrreglos de Ig/TCR, al igual que la mayoría de las leucemias mieloblásticas o tienen menor frecuencia de estos rearrreglos siendo generalmente más oligoclonales (Jansen et al., 2007) lo que dificulta su uso como blanco para el seguimiento.



*Figura 4. Receptor de Ig de membrana y el TCR con sus regiones constantes y variables. Se destacan las regiones codificadas por los genes V-D-J.*



*Figura 5. Recombinación somática de los fragmentos V-(D)-J de las regiones variables de las Ig y los TCR.*

#### **1.4.8. REARREGLOS DE Ig/TCR EN LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA DE INFANTES**

Como ya fue descrito, las LLA-I están principalmente caracterizadas por presentar un inmunofenotipo Pro-B, CD10 negativo con coexpresión frecuente de marcadores mieloides asociados. Estas características inmunofenotípicas la diferencian respecto de las LLA de los niños mayores de 1 año donde el inmunofenotipo de los blastos generalmente es B común (CD10 positivo) o pre-B. La LLA B-madura (leucemia de Burkitt) es reportada excepcionalmente, mientras que LLA de linaje T representa aproximadamente el 5-7 % de los casos de LLA-I (van Dongen et al., 2003; Pieters et al., 2007)

El hecho de que los blastos de los infantes con LLA presenten un inmunofenotipo inmaduro indicaría que la alteración genética se produce en una célula precursora en etapas muy tempranas de la ontogenia, lo que explicaría los hallazgos de varios estudios publicados con datos obtenidos del protocolo de tratamiento Interfant-99. En estos estudios se encontró que los rearreglos de Ig/TCR de los pacientes infantes con LLA tienen baja frecuencia, son más inmaduros y más oligoclonales que los descritos en los pediátricos mayores al año (Van der Velden et al., 2003b, 2004; 2006; Jansen et al., 2007).

Al comparar los rearreglos de los genes de *Ig/TCR* de los infantes con los niños de mayor edad se observa que las frecuencias de los rearreglos de los genes *IGK*, *TCRB* ( $V\beta$ -D $\beta$ -J $\beta$ ), *TCRG* y *TCRD* son significativamente menores. Por otro lado, si bien no se encuentran diferencias significativas en la frecuencia de rearreglos de *IGH* se observó que los infantes frecuentemente presentan un patrón de *IGH* menos maduro, con

rearreglos incompletos *DH-JH* a diferencia de los blastos pre-B que generalmente tienen rearreglos completos *VH-DH-JH*. Incluso si se compara la frecuencia de los rearreglos de *Ig/TCR* de pacientes infantiles con *MLL* rearreglado y con *MLL wild type* se encuentra que los primeros presentan mayor frecuencia de rearreglos incompletos *IGH* (*DH-JH*) y menor frecuencia de rearreglos completos *IGH* (*VH-JH-VH*), *IGK-Kde*, *TCRB*, y *TCRD* (Jansen et al., 2007).

En infantiles con LLA, los rearreglos más inmaduros de *Ig/TCR* fueron encontrados en aquellos casos que expresaban *MLL-MLLT2* y *MLL-MLLT1* y tenían entre 0-6 meses de vida, junto con la ausencia de expresión de CD10. En contraste, los rearreglos más maduros fueron observados en pacientes infantiles con *MLL-MLLT3* y en leucemias sin alteraciones de *MLL*, las cuales se observaron asociadas a una edad mayor y a la expresión de CD10 (Jansen et al., 2007).

La alta prevalencia de oligoclonalidad en el locus de las *IGH* de los pacientes infantiles, principalmente en los pacientes positivos para *MLL-MLLT2*, se relaciona también con la mayor inmadurez de la célula maligna con rearreglos *DH-JH* o genes *IGH* germinales. Por otro lado, se ha sugerido que la pérdida de la expresión de CD10 sobre la superficie celular podría estar relacionada a la presencia del *MLL-r* ya que la mayoría de las leucemias positivas para *MLL-MLLT2* descritas ha presentado un inmunofenotipo Pro-B, e incluso interesantemente, todas las LLA Pre-B que perdieron la expresión de CD10 tenían rearreglado el gen *MLL* (Bertrand et al., 2001; Attarbaschi et al., 2006; Jansen et al., 2007).



## **1.5. GENERALIDADES DE MLL**

### **1.5.1. GEN MLL**

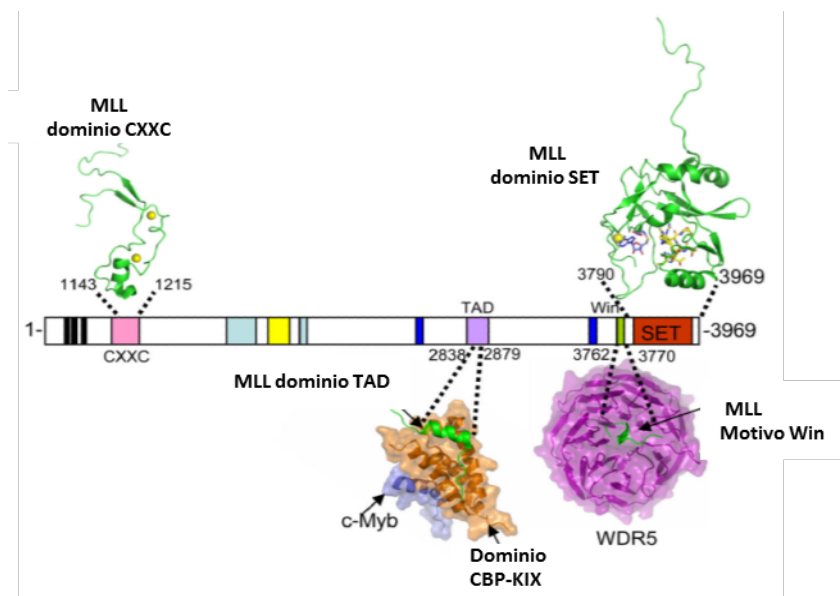
El gen de la leucemia de linaje mixto (*MLL* por sus siglas en inglés, *Mixed Lineage Leukemia*), actualmente conocido como *KMT2A* (*Histone-lysine N-methyltransferase 2A*), *HRX*, *MLL1*, se encuentra ubicado en el brazo largo del cromosoma 11 (11q23) y está constituido por al menos 37 exones que abarcan más de 100 kb. El análisis del ADNc muestra un marco abierto de lectura de 12 kb que codifican para la proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4297>).

### **1.5.2. PROTEINA MLL**

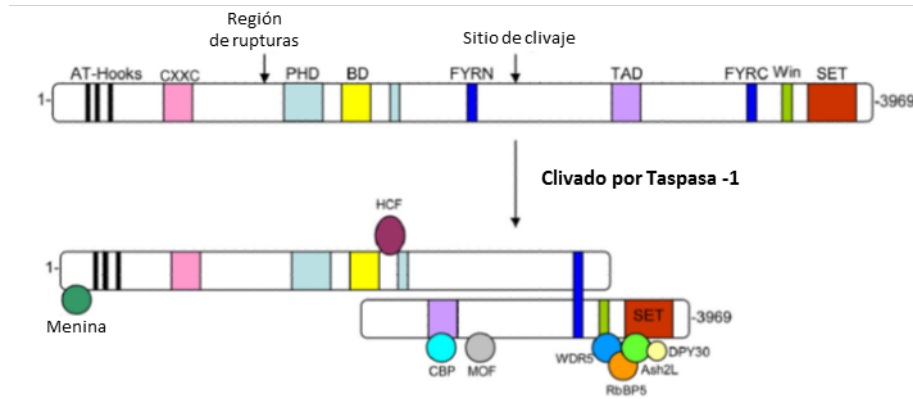
*MLL/KMT2A* es el homólogo de mamífero de la proteína que se encuentra en *Drosophila trithorax*. Es un miembro la familia de proteínas del grupo trithorax (*trxG*), conservado evolutivamente, que regulan positivamente la transcripción de genes y actúan antagónicamente al grupo de proteínas Polycomb (Ringrose y Paro, 2004). La familia *trxG* fue identificada por primera vez a través de estudios de moscas mutantes que muestran transformaciones homeóticas (un fenotipo en el que un segmento de cuerpo se transforma en otro diferente) debido a la expresión inadecuada de los genes *homeobox* (*HOX*) (Brock y van Lohuizen, 2001).

*MLL* es una proteína de localización nuclear, que posee diversos dominios con diferentes propiedades, es ampliamente expresada durante el desarrollo fetal y continúa siendo expresada, pero en bajos niveles, en la etapa adulta en mayoría de los tejidos, incluyendo las células mieloides y linfoides (Hess, 2004). *MLL* es una proteína requerida para el desarrollo normal y la formación del patrón corporal. Está constituida

por 3969 residuos de aminoácidos y contiene diversos dominios conservados con funciones involucradas en la regulación de la transcripción (Figura 6). Estos dominios incluyen un dominio de unión a ADN (AT-*hooks*), un dominio rico en cisteína CXXC con homología a ADN metiltransferasa, un “*plant homeodomain finger motifs*” (PHD), un bromodominio (BD), un dominio de transactivación (TAD), un dominio con motivo de interacción con un receptor nuclear (NR *box*), un motivo con interacción WDR5 o motivo *win* y un dominio SET carboxi(C)-terminal responsable de la actividad metiltransferasa. En condiciones normales de expresión del gen *MLL*, la proteína completa es clivada proteolíticamente por la enzima treonina-aspartasa o Taspasa-1 en dos diferentes fragmentos, MLL-N (320 kDa) y MLL-C (180 kDa) (Figura 7), los cuales heterodimerizan, ingresan al núcleo, y se asocian a múltiples proteínas formando un macrocomplejo multiproteico regulador de la transcripción (Figura 8), que coordina los tres principales mecanismos de modificación de la cromatina: metilación, acetilación y remodelación de nucleosomas (Biondi *et al.*, 2000; Slany, 2009).



**Figura 6.** Estructura tridimensional de los diferentes dominios conservados de la proteína *MLL*. Adaptado de (Cosgrove y Patel, 2010).



**Figura 7.** Representación esquemática de los dominios de la proteína MLL y su procesamiento proteolítico. La forma completa de MLL es rápidamente procesada por la enzima Taspasa-1 en dos fragmentos, MLL-N y MLLC, los cuales se asocian a través de los motivos FYRN y FYRC para generar una estructura estable. Esta proteína madura se ensambla con numerosas proteínas para formar un macrocomplejo multiproteico regulador de la transcripción. Adaptado de (Cosgrove y Patel, 2010).

La función de MLL está asociada con el mantenimiento de la expresión normal de los genes homeóticos de la familia HOX, relacionados con la hematopoyesis normal. Además, interactúa con genes reguladores del ciclo celular a través de la proteína Menina (producto del gen supresor de tumores *MEN1*) lo cual sugiere que regula la expresión de genes y el ciclo celular a través de modificaciones en la cromatina, conocidos como mecanismos epigenéticos.

## DOMINIO CXXC

El mecanismo molecular por el cual la proteína MLL es reclutada a sus genes *target* es pobremente conocido. Es sabido que el dominio CXXC de MLL se une selectivamente a secuencias CpG de ADN no metilado (Biondi et al., 2000), y es esencial para el reconocimiento del gen *target*, la transactivación y la transformación que ocurre como producto de las proteínas de fusión de MLL. Sin embargo, el hecho de que diversos genes contienen secuencias de ADN CpG no metiladas y que no son reguladas por MLL

indica que otros mecanismos contribuyen al reconocimiento de los genes *target* por parte de MLL.

### **DOMINIO TAD**

El dominio TAD de MLL se une a la proteína CBP mediando la activación transcripcional. CBP al igual que su homólogo p300 son co-activadores transcripcionales que poseen actividad histona acetiltransferasa intrínseca y actúan a su vez como andamio para estabilizar interacciones de proteínas adicionales con el complejo transcripcional. Se cree que la interacción de MLL a CBP incrementa la unión de otros activadores transcripcionales que podría resultar en la activación sinérgica de la transcripción, incluso esta unión podría ayudar a MLL a reconocer sus genes *target*. El reclutamiento de MLL a la cromatina resulta en la metilación de la lisina 4, de la Histona 3 (H3K4) por el dominio SET de MLL, una actividad que es regulada en parte por un complejo de proteínas que incluye WDR5, RbBP5, Ash2L y DPY-30 (Dou et al., 2006; Steward et al., 2006; Southhall et al., 2009; Patel et al., 2008a; 2009). La metilación de H3K4 es una marca epigenética correlacionada con la forma de cromatina transcripcionalmente activa y señal de iniciación del proceso de transcripción. Por otro lado, la fracción MLL-C se asocia con MOF, una H4K16 acetil-transferasa, activando la transcripción completa de los genes *Hoxa9*.

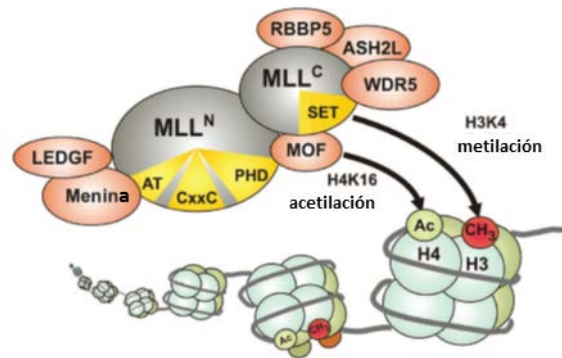
### **DOMINIO SET**

MLL contiene un dominio SET evolutivamente conservado, el cual se halla en un gran número de proteínas asociadas a cromatina con diversas actividades

transcripcionales. Este dominio es un motivo histona metil-transferasa que regula los niveles celulares de la metilación de H3K4 (Shilatifard, 2008; Malik y Bhaumik, 2010). El mismo está constituido por dos regiones canónicamente conservadas, SET-N y SET-C separadas al menos, por una región de inserción (SET-I). Además, este dominio SET está flanqueado en el extremo carboxi(C)-terminal por un dominio post-SET de 22 aminoácidos que proveen diversos residuos conservados que coordinan átomos de Zinc requeridos para la actividad enzimática. El dominio SET es esencial para el correcto ensamblaje del complejo proteico y la actividad metil-transferasa (Patel et al., 2008a; 2008b; Song y Kingston, 2008).

### **DOMINIO DE UNION A LA PROTEÍNA WDR5**

El motivo *Win* o de unión a la proteína WDR5 parece ser importante para la metilación de H3K4 y la expresión de los genes *HOX* durante el desarrollo y la hematopoyesis (Wysocka et al., 2005). WDR5 interactúa directamente con MLL y funciona como un puente de interacción entre MLL y otros componentes del macrocomplejo multiproteico regulador de la transcripción (Cho et al., 2007; Trievel y Shilatifard, 2009). Se ha sugerido que WDR5 funciona en el *core* del complejo multiproteico como un módulo de unión a histona que presenta a la histona H3 para su posterior metilación por MLL (Wysocka et al., 2005; Ruthenburg et al., 2006). Péptidos sintéticos derivados de MLL que carecen del motivo *Win* pierden la capacidad de interacción con los componentes del sub-complejo WDR5-RbBP5-Ash2L, lo que también resulta en la pérdida de la actividad metil-transferasa del complejo MLL sobre H3K4 (Patel et al., 2008a).



**Figura 8.** Complejo multiproteico MLL. Luego del procesamiento proteolítico y dimerización MLL ingresa al núcleo y es incorporado al macrocomplejo multiproteico con función metil-transferasa y acetil-transferasa. Los dominios funcionales de MLL están indicados en amarillo. Adaptado de (Slany et al. 2009)

### 1.5.3. MLL Y CICLO CELULAR

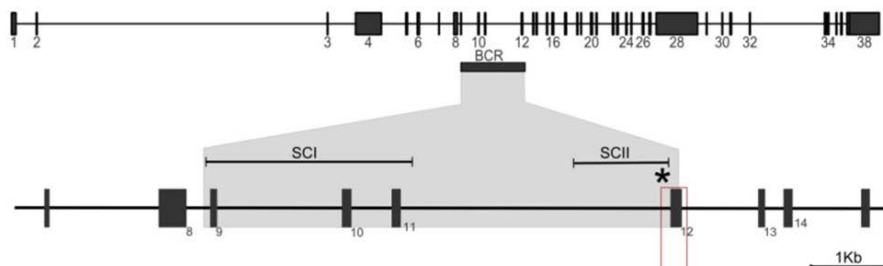
MLL tiene efectos regulatorios sobre los genes que regulan del ciclo celular como por ejemplo las ciclinas y los inhibidores de quinasa dependientes de ciclina (CDKIs). Tanto la proteína p27 como p18 son conocidas por su capacidad de inhibir a las quinasa dependientes de ciclina y ambas son reguladas por MLL en una forma dependiente de Menina (Milne et al., 2005). Si bien es difícil conciliar cómo MLL está involucrado en la regulación del ciclo celular, se postuló que la regulación estaría dada por la degradación de la proteína MLL a través del sistema ubiquitina-proteasoma (Liu et al., 2007), ya que la proteína MLL se degrada durante la fase S y la fase M por los complejos de E3 ubiquitina ligasa SCF<sup>SKP2</sup> y APC<sup>CDC20</sup>. De hecho, los primeros estudios reconocieron que después de la escisión proteolítica, el fragmento MLL-N es extremadamente inestable cuando no se une con MLL-C y que MLL-N puede estar estabilizado en las proteínas quiméricas (Hsieh et al., 2003). Si no se degradan correctamente MLL en estos puntos de control del ciclo celular, se produce un ciclo celular defectuoso. Aunque la ubiquitinación de MLL está mediada a través de la

fracción N-terminal, las proteínas MLL quiméricas muestran resistencia a la degradación, que podría ser un mecanismo que contribuya a la leucemogénesis. Además, este proceso podría estar asociado a la actividad H3K4 metiltransferasa de MLL que tiene acción directa sobre los telómeros induciendo la transcripción de ARN repetitivo no codificante que forma parte integral de la heterocromatina telomérica (Cao *et al.*, 2009). También, es sabido que las proteínas de fusión de MLL influyen en la transcripción de una subunidad principal de la enzima telomerasa de TERT, aparentemente a través de la regulación positiva de los genes *HOXA7* (Gessner *et al.* 2010).

#### **1.5.4. MECANISMOS DE LOS REARREGLOS DE MLL**

Alrededor del 80% de los rearreglos de *MLL* actualmente conocidos son generados por translocaciones cromosómicas recíprocas y balanceadas. Aproximadamente un 5% son inversiones o deleciones que ocurren en el brazo largo del cromosoma 11, sin compromiso de otros cromosomas. En el caso de las inversiones del 11q23, se involucran dos genes con diferente orientación transcripcional, conduciendo a dos genes de fusión, mientras que las deleciones en 11q conducen a fusiones de *MLL* con genes localizados teloméricamente con la misma orientación transcripcional. El restante 15% corresponde a eventos complejos de recombinación, en su mayoría sobre la base de las inserciones de una pequeña porción de material de cromosoma 11 en otro cromosoma, o viceversa, por las inserciones de material cromosómico en el gen *MLL*. Estos mecanismos conducen a la generación de dos genes quiméricos, uno en el cromosoma receptor (alelo de fusión de *MLL*), y el otro, el alelo recíproco de fusión de *MLL* en el cromosoma donante (Meyer *et al.*, 2009b).

A pesar de la extensa longitud de *MLL*, los sitios de ruptura o *breakpoint cluster regions* (bcr) no se encuentran distribuidos azarosamente a lo largo del gen, sino que en su mayoría, con excepción de algunos casos, se encuentran distribuidos en una zona de 8.300 pares de bases que abarca los exones 8 a 12 (Figura 9). Esto conduce a la hipótesis de un “*hot spot*” basado en la identificación de elementos repetitivos *Alu*, secuencias señal de recombinasas, un número de regiones de unión al ADN y sitios consenso de unión de la enzima topoisomerasa II. Las secuencias *Alu* están localizadas en la parte centromérica del bcr mientras que los sitios de unión de la telomerasa II se encuentran en la porción telomérica (Broeker et al., 1996; Marschalek et al., 1997; Biondi et al., 2000; Echlin-Bell et al., 2003).



**Figura 9.** Esquema del gen *MLL* donde se muestra la zona de ruptura frecuente (bcr) y los dos subclusters de rupturas. SCI: subcluster I y SCII: subcluster II. El asterisco con la región color rojo muestra el sitio de unión de la enzima DNAasa I.

Las rupturas del gen en las LLA de niños menores de un año y secundarias al tratamiento, se agrupan en un subcluster II cercano a los intrones 10 y 11 (SCII), mientras que en los niños mayores de un año y en adultos, son más frecuentes las rupturas en el intrón 9 y 10 o subcluster I (SCI) (Figura 9) (van Dongen et al., 1999; Pui et al., 2004; Pieters et al., 2007; van der Burg et al., 2004; Elia et al., 2003; Pallisgaard et al., 1998; Mayer et al., 2009; Harvey et al., 2010).



La ocurrencia de LLA en infantes e incluso al momento del nacimiento hace pensar en que el proceso leucemogénico ocurre en forma muy temprana, incluso algunos autores sugieren que el potente efecto desregulador de la proteína de fusión MLL sobre la expresión génica impactaría sobre dos o más vías intracelulares o bien que promovería la rápida adquisición de nuevos cambios genéticos (Biondi et al., 2000; Strick et al., 2000; Mori et al., 2002; Slany, 2009; Turner et al., 2010).

#### **1.5.6. MECANISMO DE LEUCEMOGÉNESIS POR LAS PROTEÍNAS DE FUSIÓN MLL**

Las proteínas quiméricas o de fusión de MLL conservan la porción N-terminal de MLL, mientras que la porción carboxilo terminal es reemplazada por la porción carboxilo terminal del compañero de fusión. De esta manera, la proteína quimérica mantiene su capacidad de unión a ADN, pero pierde los dominios TAD y SET, relacionados con su actividad metil-transferasa H3K4, así como también el sitio de clivaje de Taspasa 1. La mayoría de los compañeros de fusión de MLL contienen un dominio de activación transcripcional, y cuando MLL es fusionada a su compañero se produce un aumento de la función de MLL mediante dos mecanismos, por un lado, si el compañero de fusión de MLL codifica para una proteína nuclear como es el MLLT2 aportan un dominio de transactivación, como consecuencia se produce una actividad transcripcional constitutiva. Si el compañero codifica para una proteína citoplasmática, provoca dimerización de MLL (Yokoyama et al., 2004). Esta capacidad de dimerización es fundamental para la immortalización de progenitores hematopoyéticos y al mismo tiempo para inhibir su diferenciación (Martin et al., 2003; So et al., 2003).

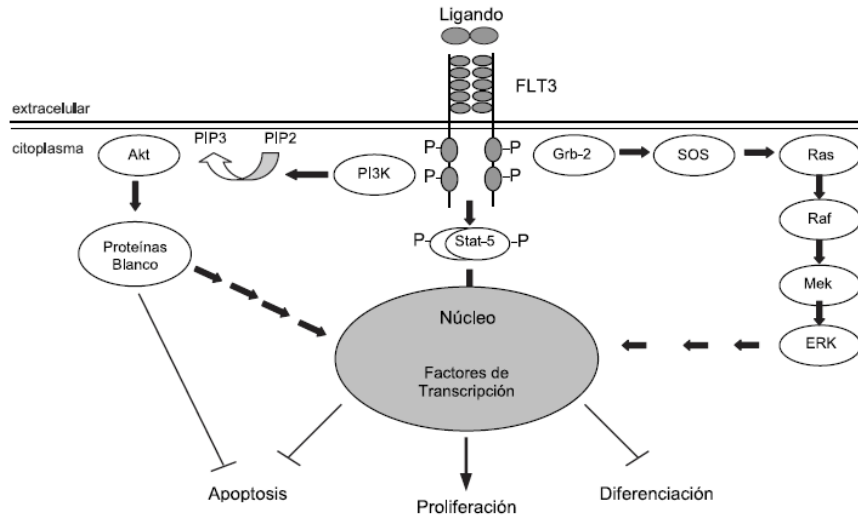
Las proteínas de fusión de MLL aumentan la expresión de los genes *HOX9* y del cofactor Meis1 en las células progenitoras hematopoyéticas (Milne et al., 2002; 2005b). Este aumento de la expresión es en parte el responsable de la capacidad de inmortalizar a los progenitores hematopoyéticos.

Finalmente, si la proteína compañera de fusión de MLL contiene un dominio HAT, puede producirse un aumento de la actividad acetiladora de histonas en regiones de unión de MLL (Daser y Rabbitts, 2004).

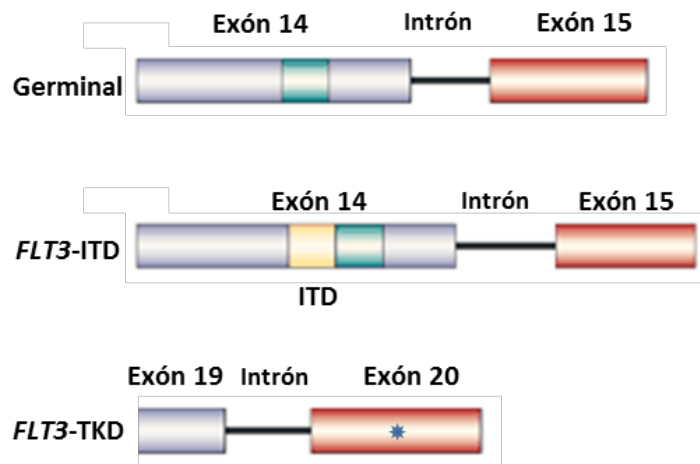
## 1.6. ALTERACIONES DEL GEN FLT3

El gen *FLT3*, también conocido como *fms-related tyrosine kinase*, *FLK2* o *STK1K*, se encuentra localizado en el cromosoma 13q12 y codifica para una proteína de clase III de los receptores tirosina quinasa. *FLT3* se encuentra expresado en progenitores multipotentes hematopoyéticos y en las células con diferenciación monocítica.

La activación de la proteína FLT3 o CD135, cuando se une a su ligando provoca una serie de procesos intracelulares de señalización que inducen la proliferación y supervivencia de las células (Figura 10). Pero también, existen mutaciones que activan constitutivamente a FLT3 independientemente de la presencia del ligando (Figura 11). Estas mutaciones pueden ocurrir en secuencias codificantes para el dominio yuxtamembrana en forma de duplicaciones internas en tándem (*FLT3-ITD*) o mutaciones puntuales en el dominio de activación de quinasas (*FLT3-TKD*) (Nakao et al., 1996, Yamamoto et al., 2001). Existe también casos de sobre-expresión de FLT3 no asociada a mutaciones del gen que se pueden encontrar en leucemias (Libura et al., 2003; Ozeki et al., 2004).



**Figura 10.** Vías de señalización intracelular de FLT3. Las mutaciones FLT3-ITD y FLT3-TKD provocan la activación constitutiva del receptor (Alonso et al., 2007).

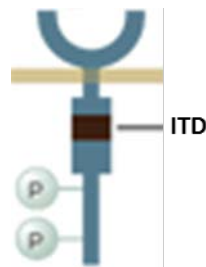


**Figura 11.** Mutaciones de FLT3. Se esquematiza los tipos de mutaciones ITD y TKD a nivel genético.

### 1.6.1. DUPLICACIONES INTERNAS EN TÁNDEM DE FLT3

Las mutaciones *FLT3*-ITD ocurren entre los exones 14 y 15 del gen. Estos exones codifican para los dominios transmembrana y juxtamembrana de FLT3 (Figura 12) y la consecuencia funcional de la mutación es la activación constitutiva independiente de ligando de la proteína FLT3 (Kiyoi et al., 1998) conduciendo a la activación constante de la vía de STAT5, RAS/MAPK y PI3-K. Aunque también provoca inhibición de los factores de transcripción mieloide como son el CBPA y PU.1 (Hayakawa et al., 2000; Tse et al., 2000). Por tanto, las mutaciones *FLT3*-ITD provocan aumento de la proliferación y supervivencia y al mismo tiempo bloqueo de la diferenciación mieloide.

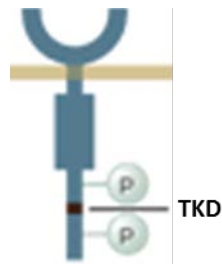
Existe evidencia de que las mutaciones en *FLT3*-ITD se asocian con un pronóstico desfavorable en LMA (Schnittger et al., 2002; Thiede et al., 2002; Stirewalt et al., 2006; Meshinchi et al., 2006).



**Figura 12.** Receptor *FLT3* mutado. Se esquematiza el tipo de mutación *FLT3*-ITD a nivel proteico.

### 1.6.2. MUTACIONES PUNTUALES EN FLT3

Las mutaciones puntuales más frecuentes de *FLT3*-TKD ocurren en el exón 20 de gen y generalmente provocan la sustitución de un ácido aspártico en la posición 835 o la isoleucina de la posición 836 por diferentes aminoácidos en el dominio de activación de tirosina quinasa (Yamamoto et al., 2001) (Figura 13). También han sido descritos casos esporádicos de mutaciones puntuales en el dominio juxtamembrana y en la Serina de la posición 840 del TKD (Spiekermann et al., 2002; Reindl et al., 2006).



**Figura 13.** Receptor *FLT3* mutado. Se esquematiza el tipo de mutación *FLT3*-TKD a nivel proteico.

### 1.7. SÍNDROME DE DOWN Y MIELOPOYESIS ANORMAL TRANSITORIA

Los niños con Síndrome de Down (SD) presentan una mayor predisposición a desarrollar leucemia aguda, más frecuentemente LMCA, especialmente durante los dos primeros años de vida (Fong y Brodeur, 1987; Webb et al., 2007). Además, durante el período neonatal aproximadamente el 10% de los niños con trisomía 21 presenta un desorden clonal que afecta fundamentalmente a la serie megacariocítica, denominado MAT que en la gran mayoría de los casos presenta una resolución espontánea luego de aproximadamente 3 meses de evolución. Durante este período, los neonatos presentan reducción en el número circulante de plaquetas y un aumento de la cantidad de megacarioblastos anormales en médula ósea que son indistinguibles desde el punto de vista morfológico e inmunofenotípico de los blastos de la LMCA. Aunque alrededor del 80% de los casos presenta remisión espontánea en menos de 3 meses, aproximadamente el 20 al 30% de los pacientes con MAT puede desarrollar leucemia aguda, especialmente durante los 3 primeros años de vida (Baumann et al., 2008).

En los pacientes con SD y MAT y/o LMCA se ha descrito una alta incidencia de mutaciones en el gen *GATA-1* (Wechsler et al., 2002; Xu et al., 2003). Debido a la temprana edad de desarrollo de estas patologías asociadas a las mutaciones en este gen, se especula que las alteraciones se originarían *intra-útero*, en algún momento del desarrollo fetal. La presencia de la trisomía del cromosoma 21 es considerada como el primer evento que ocurre en estos desórdenes, predisponiendo a las células hematopoyéticas a la adquisición de mutaciones en *GATA-1* que explicarían la aparición del síndrome de MAT.

### 1.7.1. MUTACIONES DEL GEN GATA-1

El gen *GATA binding protein 1 (globin transcription factor 1)* o *GATA-1*, también llamado factor de transcripción eritroide 1, se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma X (Xp11.23), y pertenece a una familia de factores de transcripción altamente conservados durante la evolución. *GATA-1* codifica para un factor de activación de la transcripción de 50 kDa que resulta crítico para el normal desarrollo de las ontogénias eritroide y megacariocítica (Cantor y Orkin, 2002; Shivdasani, 2001). La proteína, de localización nuclear, posee un dominio de activación y dos dominios con conformación de dedos de zinc que interactúan con el ADN, uno ubicado hacia el extremo carboxilo terminal y otro ubicado hacia su extremo amino terminal (Figura 14). El dominio C-terminal de la proteína interactúa con el ADN mediante secuencias específicas de unión, mientras que el dominio N-terminal modula la unión al ADN e interactúa con múltiples proteínas, como FOG-1 (Friend-of-GATA-1), entre otras (Martin y Orkin, 1990; Merika y Orkin, 1993; Newton et al., 2001). La interacción de GATA-1 con FOG-1 parece resultar particularmente importante ya que este complejo GATA-1/FOG-1, puede actuar como modulador de la expresión de diversos genes que intervienen en el complejo proceso de la hematopoyesis.

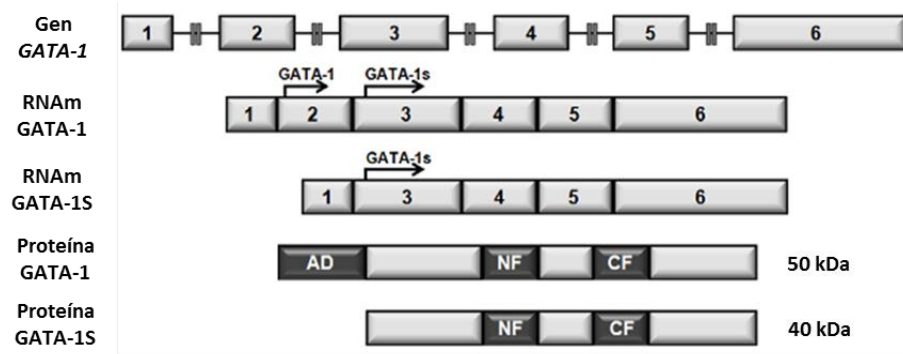
Es sabido que GATA-1 y GATA-2, otro factor transcripcional de la misma familia, son recíprocamente expresados durante la hematopoyesis normal y esta reciprocidad está mediada en parte por la represión transcripcional del complejo GATA-1/FOG-1 sobre GATA-2 (Pal et al., 2004; Bresnick et al., 2010; Zheng y Blobel, 2010).

Han sido descriptas mutaciones en el exón 2 de *GATA-1* en niños con SD y MAT, que también fueron encontradas en aquellos casos que desarrollan LMCA pero que no son



detectables cuando la enfermedad se encuentra en remisión (Wechsler et al., 2002). Se postula que estas mutaciones participan de la evolución de MAT a LMCA en los niños con SD. Cabe destacar que estas alteraciones no se presentan generalmente en niños con SD y otros tipos de leucemia aguda ni tampoco en aquellos pacientes con LMCA pero sin SD (Groet et al., 2003; Ahmed et al., 2004).

Muchas de estas mutaciones tienen como consecuencia la expresión de una isoforma de la proteína denominada GATA-1s (Figura 14), que resulta de la iniciación de la traducción a partir de la metionina 84 ubicada en el exón 3. Esta isoforma, de 40 kDa, carece del dominio N-terminal de GATA-1, involucrado normalmente en el proceso de trans-activación. Kanezaki propone un sistema de clasificación de las mutaciones y observa que los distintos subtipos presentan diferencias cuantitativas en la expresión de GATA-1s, postulando que este hecho podría relacionarse con la probabilidad de progresión a LMCA, aunque publicaciones posteriores no han podido confirmar dicha hipótesis (Kanezaki et al., 2010; Alford et al., 2011).



**Figura 14.** Esquema del gen GATA-1 y proteína GATA-1s. El gen GATA-1 está constituido por 6 exones y puede ser traducido a partir del primer codón de iniciación ubicado en el exón 1 o a partir del segundo ATG ubicado en el exón 2, dando lugar a la forma corta de la proteína. Ante la presencia de mutaciones en el exón 2 o secuencias intrónicas flanqueantes, el RNAm solo puede dar origen a la forma corta de la proteína (GATA-1s). AD: Dominio de activación, NF: dominio con conformación de dedos de zinc amino-terminal; CF: dominios con conformación de dedos de zinc carboxilo-terminal.

## 2. Hipótesis y Objetivos

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **2.1. HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La hipótesis de este trabajo es que la aplicación de nuevas técnicas moleculares contribuirá a una mejor caracterización de las alteraciones genéticas de las LAI, y por lo tanto a un diagnóstico más preciso de este subtipo de leucemias. Además, la aplicación de dichas técnicas es potencialmente valiosa para permitir una mejor evaluación de la respuesta al tratamiento *in vivo* (a través de la determinación de la EMR) y se espera que pueda contribuir a mejorar los resultados actuales de su tratamiento, que se vea reflejado en un aumento en los valores de pSLE.

Por otra parte, también debe considerarse que la puesta a punto e implementación de estas técnicas pueden luego permitir su aplicación en otros subtipos de leucemias, también como herramienta diagnóstica y para el seguimiento a través de los estudios de EMR.

Otro objetivo importante de este trabajo ha sido estudiar otros subtipos especiales de infantes y lactantes que desarrollan leucemias con características particulares como los pacientes con Síndrome de Down, que presentan alteraciones moleculares particulares, para un mejor entendimiento de este grupo etario especial.

Finalmente, el presente proyecto podrá permitir la aplicación en forma centralizada de estas técnicas para ofrecerlas a todos los infantes de nuestro país independientemente de la Institución en la cual ellos reciban su tratamiento, ya que se trata de técnicas complejas, de difícil desarrollo para su implementación, y que por lo tanto no se justifica a nivel de organización de salud que se encuentren puestas a punto en numerosos centros en nuestro país.

## **2.2. OBJETIVOS GENERALES**

El presente trabajo comprende la puesta en marcha de técnicas especializadas para realizar la caracterización molecular de las LAI y para realizar luego la determinación de EMR utilizando los blancos adecuados para cada paciente, con la finalidad de optimizar la evaluación de respuesta al tratamiento.

Además, el estudio de las mutaciones en el gen *FLT3* permitirá no sólo el mejor conocimiento de este grupo especial de leucemias sino también un mejor entendimiento de los mecanismos leucemogénicos asociados y la individualización de pacientes candidatos a recibir drogas inhibidoras de FLT3, actualmente en estudio.

Se analizará además la presencia de mutaciones del gen *GATA-1* en pacientes con MAT y LMCA, con la finalidad de caracterizar correctamente este grupo de pacientes.

## **2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos científico-asistenciales son:

1. Incorporar nuevas técnicas de mayor complejidad a las técnicas moleculares de estudio disponibles en nuestro país aplicables a las LAI y también a las LA pediátricas en general.
2. Lograr una mejor adecuación de la intensidad del tratamiento en cada paciente.
3. Detección de nuevos blancos terapéuticos para aumentar la pSLE de los infantes con LA.
4. Adquirir mayor conocimiento de los procesos leucemogénicos involucrados en las leucemias pediátricas.

## 2.4. OBJETIVOS TÉCNICOS

1. Lograr la puesta a punto y desarrollo de la técnica LDI-PCR para detectar alteraciones del gen *MLL* a nivel genómico específicas de cada clon leucémico, incluso en los casos en que el gen compañero de fusión no sea conocido, ampliando nuestra capacidad de detección actual
2. Caracterizar los rearrreglos del gen *MLL* a nivel genómico para evaluar la posibilidad de utilizar estos rearrreglos como blanco para la cuantificación de EMR.
3. Describir casos inusuales de leucemia linfoblástica B madura con morfología FAB L1 o L2 y ausencia de alteraciones en *c-myc* y que corresponden a casos de pacientes con rearrreglos el gen *MLL*.
4. Describir la caracterización molecular de los reordenamientos de genes de *Ig* y *TCR* para identificar los segmentos génicos involucrados en los rearrreglos y sus secuencias únicas, específicas del clon leucémico, con el doble objetivo de conocer las frecuencias de los rearrreglos en la población de infantes y evaluar la posibilidad de utilizarlos como blanco para la cuantificación de EMR.
5. Sentar las bases para la puesta a punto de la EMR por PCR-cuantitativa utilizando como blanco leucemia-específico la secuencia de fusión de los rearrreglos del gen *MLL* a nivel genómico con el fin de evaluar la respuesta in vivo al tratamiento quimioterápico.
6. Analizar la presencia de mutaciones del gen *FLT3* a través de PCR y RFLP, con el fin de individualizar pacientes candidatos a recibir nuevas drogas en desarrollo inhibitoras de *FLT3*.

7. Analizar la frecuencia y características de las mutaciones en el gen *GATA-1* en pacientes con SD con diagnóstico de Mielopoyesis Anormal Transitoria y/o Leucemia Megacarioblástica Aguda.

## 3. Parte Experimental

### **3.1. PACIENTES Y MÉTODOS**

#### **3.1.1. POBLACIÓN ESTUDIADA**

En el presente trabajo de tesis han sido incluidos 34 pacientes con diagnóstico de LA (LMA n=12, LLA n=20 y LALA n=2), en los cuales fue posible realizar la búsqueda de rearrreglos moleculares de MLL a través de la técnica de LDI-PCR. Veintinueve de estos pacientes fueron infantes tratados en el contexto de los Protocolos Interfant-99 (Pieters et al., 2007) e Interfant-06, mientras que los restantes 5 niños, fueron pacientes mayores de 1 año de edad, tratados con el protocolo ALLIC 2002 para los casos de LLA (Stary et al., 2014) o Protocolo LMA-99 en el caso de las LMA. Estos últimos pacientes mayores de 1 año de edad al momento del diagnóstico de su LA fueron incluidos porque su estudio citogenético presentaba alta sospecha de alteraciones en el gen *MLL*.

En cuanto a la población de pacientes con SD, se estudiaron 14 muestras de pacientes con SD y diagnóstico de MAT y/o LMA (MAT n=10 LMA n=4), incluyendo 2 muestras de un mismo paciente que desarrolló MAT y luego LMCA con la finalidad de caracterizar correctamente este grupo de pacientes.

Adicionalmente, se estudió la presencia de mutaciones en GATA-1 en muestras de 21 pacientes con diagnóstico de otros tipos de LA: 7 pacientes con SD y diagnóstico de LLA (n= 6) y LMA-M2 (n= 1); y 14 pacientes sin SD que presentaban LMA no-LMCA con trisomía 21 (n= 8) y LLA (n= 4) o LMA no-LMCA (n= 2).

#### **3.1.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

Todos los pacientes incluidos en el presente trabajo de tesis tenían realizados estudios morfológicos, citoquímicos, de inmunofenotipo por citometría de flujo y citogenéticos completos al momento del diagnóstico.



Se excluyeron de este análisis los siguientes pacientes:

- Los pacientes que habían recibido algún tipo de tratamiento quimioterápico antes de ingresar a nuestro Hospital.
- Los pacientes con patologías subyacentes que sean causa de co-morbilidad (inmunodeficiencias, síndromes de fragilidad cromosómica, HIV).
- Aquellos pacientes en los cuales no fue posible la realización de los estudios diagnósticos completos.
- Pacientes en los cuales no fue posible obtener suficiente material para realizar estudios por Biología Molecular.

### **3.1.3. DIAGNÓSTICO DE LLA Y LMA**

Todos los pacientes fueron diagnosticados como LLA o LMA de acuerdo a los criterios morfológicos, citoquímicos, de inmunofenotipo y citogenético/moleculares de la clasificación de la OMS (Swerdlow et al., 2008).

### **MOMENTOS DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS**

Las determinaciones de caracterización molecular de las leucemias agudas y MAT se realizaron en muestras de aspirado de médula ósea correspondientes al momento del diagnóstico.

La determinación de la EMR en LLA por técnicas moleculares se realizó con muestras correspondientes al día 33 y a la semana 12. Dichas muestras corresponden a puntos de control del tratamiento establecidos en los protocolos de tratamiento y en ningún caso se

obtuvieron muestras sólo para la realización de los estudios incluidos en el presente trabajo.

### **3.1.4. CARACTERIZACIÓN INMUNOFENOTÍPICA**

La caracterización inmunofenotípica estuvo a cargo del equipo del Dr. Jorge Rossi, jefe del Laboratorio de Inmunología Celular del HPG y la Dra. Elisa Sajaroff. El análisis de los marcadores de superficie se realizó sobre las células mononucleares obtenidas del aspirado de médula ósea. Las células fueron analizadas con el software CellQuest en el Citómetro de Flujo FACSORT (Becton-Dickinson, San Jose, CA), adquiriendo al menos 10.000 eventos por tubo. Los anticuerpos de superficie incluidos en el panel de inmunotipificación para leucemia aguda fueron anti CD2, CD3, CD4, CD7, CD10, CD13, CD19, CD20, CD38, CD33, CD34, CD45, CD11b, CD13, CD14, CD33, CD64, CD117, CD36, anti NG2 (7.1), CD42a, CD61, CD41 y HLA-DR. Además, se incluyó el estudio de los antígenos citoplasmáticos CD22, CD3, mieloperoxidasa (MPO), CD79, TdT, e IgM<sub>cit</sub>, utilizando un permeabilizante celular comercial de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

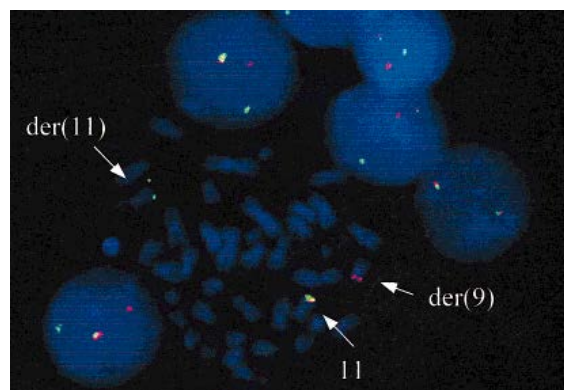
En todos los casos de MAT y LMCA el inmunofenotipo fue confirmado por análisis de la expresión de antígenos plaquetarios (CD61, CD42a, CD41) por microscopía de fluorescencia.

### **3.1.5. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO Y CITOGÉNÉTICO MOLECULAR**

Los estudios citogenéticos realizados, estuvieron a cargo del equipo de las Dras. Marta Gallego y Mariela Coccé del Servicio de Genética del HPG. El análisis cromosómico fue realizado de acuerdo a técnicas estándar sobre muestras de médula ósea con el

agregado de mitógenos, incluyendo bandeo G. Se analizaron al menos 20 metafases en cada caso, para que los mismos fueran considerados evaluables. El criterio de clonalidad, la identificación y designación del cariotipo se realizaron siguiendo las guías definidas por el ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature), definiendo que para que una alteración sea considerada clonal debía estar presente en al menos 2 metafases para las alteraciones citogenéticas recurrentes y en al menos 3 metafases cuando se trataba de una alteración del número modal de cromosomas (Shaffer et al., 2009).

En los casos en que se encontraba disponible, se utilizaron sondas de *Split FISH MLL Dual Color, Break Apart Rearrangement Probe* (Vysis/Abbott, Des Plaines, IL, USA). El tipo de sondas utilizado genera un patrón de señal dado por una separación de las dos sondas diferentemente marcadas. Estas sondas se ubican a ambos lados de la región del bcr del gen. En este estudio si el gen *MLL* se encuentra en estado germinal se obtiene una señal roja y una verde co-localizada (señal de fusión rojo/verde en cada cromosoma 11), mientras que si el *MLL* se encuentra involucrado en algún tipo de rearreglo, se produce la separación de las dos sondas, resultando en una señal verde correspondiente a la sonda del cromosoma der (11) y una señal roja correspondiente a la sonda del cromosoma derivado n [der(n)] (Figura 15).



**Figura 15.** Rearreglo del gen *MLL* detectado por Vysis *MLL* probe. En la figura se muestra el caso de una  $t(9;11)(p21;q23)$ . El alelo germinal de *MLL* se observa en color anaranjado, debido a la fusión de los dos colores de ambas sondas (rojo y verde), mientras que el rearreglo del otro alelo produce la separación de la señal en dos, una verde que encuentra sobre el cromosoma *der(11)* y una roja que se encuentra sobre el cromosoma *der(9)*.

Con este tipo de sondas la detección de rearreglos del gen *MLL* es independiente de la detección de ambos derivados participantes de la translocación. Solamente la separación de la señal roja de la señal verde es condición necesaria para evidenciar el rearreglo del gen.

### **3.1.6. ESTUDIO DE LOS REARREGLOS MOLECULARES RECURRENTES POR RT-PCR**

Los estudios moleculares estuvieron a cargo de la Dra. Cristina Alonso, jefa del Laboratorio de Biología Molecular del Servicio de Hematología Oncología y la técnica Adriana Medina del mismo servicio. Para el análisis de los diferentes transcritos de fusión se realizó la búsqueda por RT-PCR según el inmunofenotipo de los blastos. Esto se debe a que la frecuencia y tipo de los rearreglos no es la misma en LLA que en LMA (Meyer et al., 2013).

La determinación por RT-PCR para la detección de rearrreglos en LLA incluyó *MLL-MLLT1*, *MLL-AFF1*, *MLL-MLLT3*, *ETV6-RUNX1*, *BCR-ABLp190*, *BCR-ABLp210* y *TCF3-PBX1*. Mientras que la correspondiente a LMA incluyó *MLL-MLLT3*, *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* y *CBFB-MYH11*.

En este estudio molecular para la detección de las traslocaciones cromosómicas a través de RT-PCR se utilizaron oligonucleótidos (*primers*) que se unen específicamente sobre cada uno de los genes involucrados en la traslocación, a ambos lados del sitio de fusión, de manera tal que la distancia entre ellos fuera aproximadamente de 400 a 600 pares de bases para todos los rearrreglos, permitiendo homogeneizar las condiciones de ciclado y de la reacción de PCR. Los *primers* y protocolos para las reacciones de RT-PCR fueron consensuados y estandarizados en un estudio cooperativo entre laboratorios europeos de referencia y pueden ser aplicados en forma confiable para la clasificación molecular al momento del diagnóstico (van Dongen et al., 1999). Los *primers* utilizados para la detección de *MLL-MLLT1* y *MLL-MLLT3* fueron diseñados en el HPG tomando en cuenta los sitios de corte reportados en la bibliografía internacional (Pallisgaard et al., 1998; van Dongen et al., 1999). La secuencia y ubicación de los oligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de rearrreglos recurrentes por RT-PCR.

Rearreglo	Nombre	Sentido	Secuencia (5' → 3')
<i>MLL-x</i>	MLL-A	Fw 1	CCGCCTCAGCCACCTAC
	MLL-E5'	Fw 2	AAGCCCGTCGAGGAAAAG
<i>MLL-AFF1</i>	AF4-B	Rev 1	TGTCACTGAGCTGAAGGTCG
	AF4-D	Rev 2	CGTTCCTTGCTGAGAATTTG
<i>MLL-MLLT1</i>	ENL-B3	Rev 1	ACCATCCAGTCGTGAGTGAAC
	ENL-B2	Rev 1	AGCGTACCCCGACTCCTCTA
	ENL-B1	Rev 1	TCGGCGCTGTTGTCACTCTC
	ENL-B4	Rev 1	CTCCTTCGGGCATTACCA
<i>MLL-MLLT3</i>	AF9-A	Rev 1	TTCGGCTGCCTCCTCTATTTAC
	AF9-B	Rev 1	CCAGATGTTTCCAGGTAACCTCTGT
	AF9-C	Rev 1	AGTTTTTCCTTGTGCTCCTTCATT

Oligonucleótidos utilizados para la detección de los diferentes rearrreglos, indicando su sentido y posición del extremo 5' con respecto a la secuencia de ARNm que se indica como referencia. *MLL-x*: los oligonucleótidos fueron utilizados para los 3 rearrreglos de *MLL* estudiados.

Las reacciones de PCR se realizaron en todos los casos a partir de 1 µl de ADNc (equivalente a 50 ng de ARN) en un volumen final de 25 µl. La concentración final de *primers* utilizada en la reacción fue de 400 nM, junto con 0,2 mM de dNTPs, y 2,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg en todos los casos. Se utilizaron 0,5 Unidades de enzima Taq Polimerasa por tubo de reacción junto con el buffer de reacción correspondiente en concentración 1X, según lo recomendado por el fabricante.

El programa de ciclado fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación de *primers* a (61-66)°C, 45 segundos de extensión a 72°C, y una elongación final de 10 minutos a 72°C. La temperatura de hibridación fue 65°C para *MLL-AFF1*; 63°C para *MLL-MLLT1*, *MLL-MLLT3* y 61°C para *ABL1* como gen control.

### **3.1.7. ESTUDIO DE LOS REARREGLOS MOLECULARES INFRECIENTES POR RT-PCR**

En el contexto de esta tesis se realizó la puesta a punto de esta técnica, para lo cual se diseñó un ensayo de PCR basándose en los protocolos ya establecidos y estandarizados por el grupo Biomed para la detección de los rearreglos recurrentes (van Dongen et al., 1999). Se mantuvieron las mismas condiciones de reacción que para los otros rearreglos. La reacción de PCR se realizó a partir de 1 µl de ADNc (equivalente a 50 ng de ARN) en un volumen final de 25 µl. La concentración final de los oligonucleótidos utilizada en la reacción fue de 400 nM, junto con 0,2mM de dNTPs, y 2,5 mM de Cl<sub>2</sub>Mg. Se utilizaron 0,5 Unidades de enzima Taq Polimerasa por tubo de reacción junto con el buffer de reacción correspondiente en concentración 1X, según lo recomendado por el fabricante.

El programa de ciclado fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 45 segundos de hibridación de *primers* a 63°C, 45 segundos de extensión a 72°C, y una elongación final de 10 minutos a 72°C. Los *primers* utilizados para esta reacción se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la detección de rearrreglos moleculares infrecuentes por RT-PCR.

Nombre	Sentido	Secuencia	
		Complementaria	Secuencia (5' → 3')
MLL-A	Fw	MLL exón 8	CCGCCTCAGCCACCTAC
AF10-A	Rv	MLLT10 exón 9	TGGACATTATCGGCACCATTAC
AF10-B	Rv	MLLT10 exón 12	TTGCCCTCTGACCCTCTAGTCT
BTBD18	Rv	BTBD18 exón 3	GCACTTGTGTTGGTTGTAAGCACT
MLLT4-ex2	Rv	MLLT4 exón 2	AGGACAGCATTCGCATATCAG
MLLT6-ex7	Rv	MLLT6 exón 7	AGATGAAACCACTGCCACCTC
MLLT11-ex2	Rv	MLLT11 exón 2	AGCTCCGACAGATCCAGTTCT

*Oligonucleótidos utilizados para la detección de otros rearrreglos, indicando su sentido, ubicación y secuencia.*

## **OBTENCIÓN DE CÉLULAS LEUCÉMICAS PARA LOS ESTUDIOS MOLECULARES**

Las determinaciones se realizaron en células mononucleares obtenidas de muestras de médula ósea, pero cuando los pacientes presentaron recuentos de leucocitos mayores a 100.000/ $\mu$ l con un recuento de blastos mayor al 70% se utilizó sangre periférica. Se separaron las células mononucleares por medio de gradiente de densidad de 1.077 g/l, y se guardaron alícuotas de las mismas a razón de  $10^7$  por vial en ultra freezer (-80°C) para los estudios de biología molecular.

## **EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL**

El ARN total correspondiente a  $10^7$  células mononucleares fue extraído con trizol, un método basado en Tioisocianato de guanidina (Chomczynski, 1993), según instrucciones del fabricante. La concentración del ARN fue medida por



espectrofotometría (Absorbancia a 260 nm), evaluando el grado de pureza a través de la relación de Absorbancia 260/280 (mayor a 1,8).

### **CONTROL DE INTEGRIDAD DE ARN**

Debido a la labilidad de las moléculas de ARN, es muy importante controlar su grado de integridad. Para ello, además de medir la concentración del ARN obtenido a través de espectrofotometría se realizó electroforesis en gel de agarosa 0,8% en condiciones adecuadas. El patrón de integridad es el correspondiente a las dos bandas del ARN ribosómico, sobre un fondo limpio con ausencia de una banda de mayor peso molecular correspondiente a ADN contaminante.

### **OLIGONUCLEÓTIDOS PARA TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

En el presente trabajo de tesis se utilizaron hexámeros al azar como cebadores de la reacción. El método de RT que utiliza como cebadores a oligonucleótidos al azar (*random primers*) permite obtener ADN copia (ADNc) a partir del ARN total de la muestra, lo cual permite que la misma muestra de ADNc sea utilizada para la investigación de múltiples genes, incluyendo la posibilidad de analizar la amplificación de un gen control.

### **TRANSCRIPCIÓN REVERSA**

La reacción de RT se realizó a partir de 1 µg de ARN total, utilizando 200 Unidades de enzima transcriptasa reversa M-MLV, 1 mM dNTPs, 5µM de hexámeros al azar y 20 U de inhibidor de RNAsas en un volumen final de 20 µl, siguiendo recomendaciones de protocolos de referencia internacional para la detección de los rearrreglos moleculares

recurrentes (van Dongen et al., 1999). El procedimiento incluyó la incubación del ARN a 70°C durante 10 minutos, inmediatamente se colocaron las muestras en hielo, con la finalidad de evitar la formación de estructuras secundarias que pueden disminuir la eficiencia de la reacción. Luego se añadió la mezcla de reactivos necesarios para la RT, y se incubó en termociclador durante 1 hora a 37°C, con un calentamiento final a 99°C durante 3 minutos para inactivación enzimática.

### **CONTROLES DE AMPLIFICABILIDAD**

Como parte del proceso de aseguramiento de la calidad necesaria del diagnóstico de los rearrreglos moleculares por RT-PCR, fue fundamental realizar el control de amplificabilidad de la muestra analizada, ya que un resultado negativo se interpreta como ausencia del rearrreglo estudiado. Este procedimiento permitió evaluar si el ADNc analizado se encontraba en condiciones de ser amplificado, ya que esto puede no ser así incluso a pesar de haber obtenido ARN de buena calidad, ya sea por presencia de inhibidores de la reacción de PCR o bien por fallas en alguno de los múltiples pasos necesarios para la obtención de ADNc. Con este objetivo se realizó una PCR para el transcripto de un gen control, el cual debía poseer un nivel de expresión similar al de los transcriptos de fusión a estudiar, expresarse en forma relativamente constante en los distintos estadios celulares y presentar una estabilidad similar al transcripto analizado. No debían utilizarse como gen control a transcriptos que presentasen muy alta expresión, ya que esto aumentaría la posibilidad de obtener resultados falsos negativos. Un resultado de gen control negativo invalida cualquier otro resultado negativo (Kidd et al., 1997; van Dongen et al., 2006).

En el presente estudio la amplificabilidad de las muestras fue verificada a través de dos reacciones de PCR para el transcripto del gen *ABL1*, que cumple con los requisitos que debe reunir un gen control.

En una de las reacciones se amplificó un fragmento de 578 pb que incluía una zona que abarca desde el exón 1 hasta el exón 4, de tamaño similar al de los productos de las reacciones de RT-PCR que se utilizaron para la detección de los rearrreglos moleculares recurrentes. Con este juego de *primers* no se obtuvo amplificación a partir de ADN genómico debido a que abarca una zona de 27.300 pb.

En la segunda reacción se amplificó un fragmento de 168 pb que comprende parte de los exones 2 y 3 de *ABL1*, ya que el experimento ha sido diseñado con la finalidad de detectar cantidades mínimas de ADN contaminante, debido a que en el caso de existir ADN en la muestra, la amplificación da como resultado un fragmento de 731 pb, que contiene las secuencias exónicas de 168 pb junto con 563 pb correspondientes al pequeño intrón 2. Adicionalmente, este juego de *primers* permitió evaluar la calidad de las muestras ya que permitió distinguir entre aquellas en las cuales no se obtiene amplificación alguna de otras de integridad intermedia, en las cuales no se obtiene el fragmento de 578 pb, pero sí el de 168 pb.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen control.

Gen Control	Nombre	Sentido	Secuencia (5' - 3')
<i>ABL1</i>	ABL-a1	Fw 1	CTGCAAATCCAAGAAGGGGC
	ABL-a4	Rev 1	AATGATGATGAACCAACTCGGC
	ABL-a2	Fw 2	ACCTTTTCGTTGCACTGTATGAT
	ABL-a3E3'	Rev 2	TGACTGGCGTGATGTAGTTGCTT

Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del gen control, indicando su sentido, secuencia

## **CONTROLES DE LOS ENSAYOS DE RT-PCR**

Además de la imprescindible RT-PCR para el gen control, en cada reacción de PCR se incluyeron controles positivos para la presencia del transcripto en estudio y controles negativos para verificar la ausencia de contaminación y evitar resultados falsos positivos.

## **ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA**

El análisis de los resultados de las RT-PCR se realizó por electroforesis del producto de PCR en geles de agarosa al 1,8%, registrando el peso molecular (PM) de la banda obtenida por comparación contra un marcador de PM conocido previa tinción con el colorante bromuro de etidio y observación a la luz ultravioleta. Los resultados fueron documentados y archivados en forma de fotografías digitalizadas de dichos geles.

La interpretación del resultado de la RT-PCR fue cuidadosamente realizada. Todos los resultados positivos con el primer par de *primers* fueron confirmados con una segunda reacción de PCR utilizando un par de oligonucleótidos alternativos. Esta reacción confirmatoria del primer resultado aseguró que el resultado obtenido fuese verdaderamente positivo y no se tratase de una contaminación, evento posible en técnicas de tan alta sensibilidad como la RT-PCR. Cabe destacar que fue necesario conocer en detalle tanto la ubicación de los puntos de ruptura más frecuentes de los genes analizados como la ubicación de los *primers* utilizados y la existencia de posibles fenómenos de corte y empalme (*splicing*) alternativo, con el fin de interpretar correctamente el peso molecular y patrón de bandas obtenidos y optimizar la detección de bandas inespecíficas para evitar resultados falsos positivos.

## SECUENCIACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR

Las bandas del producto de PCR obtenidas fueron escindidas del gel de agarosa, eluídas con un volumen de agua destilada proporcional a su intensidad (45-50µl), incubadas a 70°C durante 1 hora y luego guardadas a temperatura ambiente hasta el día siguiente. Esta muestra (eluato) se utilizó para la reacción de secuenciación con dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y los *primers* correspondientes. El protocolo de secuenciación utilizado fue el siguiente:

Reactivo	Volumen (µl)
Big Dye Sequencing Buffer 5X	1,75
Reaction Premix 2,5X	0,5
Primer 1µM	1
ADN (eluato)	5
H <sub>2</sub> O	0,25

Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 10 seg a 55 °C y 1 min a 60 °C, utilizando una velocidad de rampa lenta.

Una vez culminada la reacción de secuenciación se precipitaron los productos obtenidos de la siguiente manera. Se le agregó a cada tubo 2,5µl de EDTA 125 mM y 30 µl de etanol absoluto frio. Se dejó reposar 15 minutos a temperatura ambiente y se los centrifugó durante 20 minutos a 13.000 r.p.m. Una vez finalizada la centrifugación se descartó el sobrenadante aspirando con pipeta o con vacío y se lavó el precipitado con 250µl de etanol al 70% recién preparado centrifugándolo a 13.000 r.p.m. durante 10

minutos. Se eliminó el sobrenadante de la misma manera que la vez anterior y se dejó secar al aire durante 5-10 minutos antes de ser inyectadas en el analizador genético.

### **3.1.8. LDI-PCR: ESTUDIO DE LOS REARREGLOS DE MLL A NIVEL GENÓMICO**

#### **EXTRACCIÓN DE ADN PARA ESTUDIOS MOLECULARES**

La extracción de ADN genómico de  $10^7$  células mononucleares se realizó por extracción con columnas de afinidad con el fin de garantizar la calidad necesaria para la realización de las subsecuentes reacciones de PCR, muy sensible a la presencia de inhibidores. La concentración de ADN fue medida por espectrofotometría (Absorbancia a 260 nm), evaluando el grado de pureza a través de la relación de Absorbancia 260/280 (mayor a 1,8).

#### **CONTROL DE INTEGRIDAD DE ADN**

Para comprobar la integridad de las muestras y la ausencia de posibles inhibidores de reacción para LDI-PCR se amplificó un segmento de 7,7 kb utilizando los oligonucleótidos B-Y (Tabla 5).

### **3.1.9. CARACTERIZACIÓN DE LOS REARREGLOS DEL GEN MLL POR LDI-PCR**

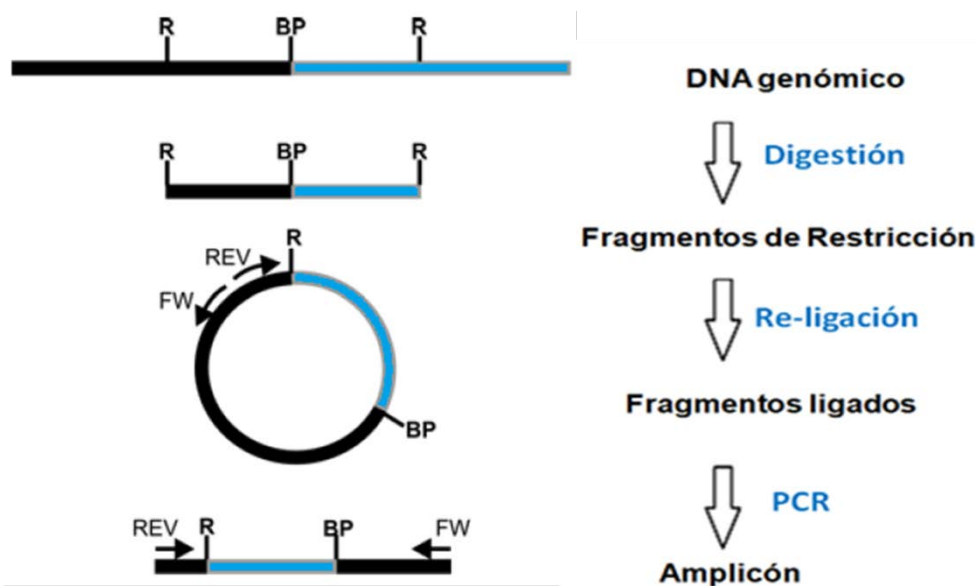
La técnica de LDI-PCR, es una técnica compleja y laboriosa que utiliza ADN genómico para la detección de la gran mayoría de los rearreglos del gen *MLL*, permitiendo detectar al compañero de fusión del mismo, ya sea este gen de fusión conocido o desconocido.

A continuación se describen los pasos seguidos para la puesta a punto de esta técnica, que constituyen uno de los principales resultados de este trabajo de tesis, ya que la misma fue desarrollada y puesta a punto durante el desarrollo del mismo.

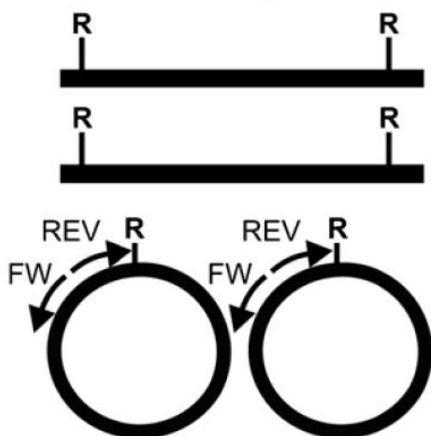
Esta técnica se basa en la digestión de pequeñas cantidades de ADN genómico con enzimas de restricción que generen fragmentos lineales de ADN con extremos cohesivos. Las enzimas utilizadas deben tener sitios de restricción que flanqueen la zona del *bcr* del gen *MLL*, la cual está involucrada en las traslocaciones. De esta manera se originan productos lineales de ADN con extremos cohesivos, muchos de los cuales contienen la secuencia de fusión entre el gen *MLL* y el compañero de fusión. Estos productos son luego ligados *in vitro* en condiciones de dilución tal que favorezcan la autoligación de ambos extremos del mismo fragmento para formar ADN circulares, que luego son utilizados para amplificar por PCR con *primers* ubicados en *MLL* que amplifican en ambos sentidos, comprendiendo entre ellos la secuencia del gen desconocido. Finalmente, el producto obtenido es secuenciado para definir la identidad del gen involucrado en la traslocación (Figura 16).

**Figura 16.** Resumen de la técnica LDI-PCR para la detección de rearrreglos del gen *MLL*.

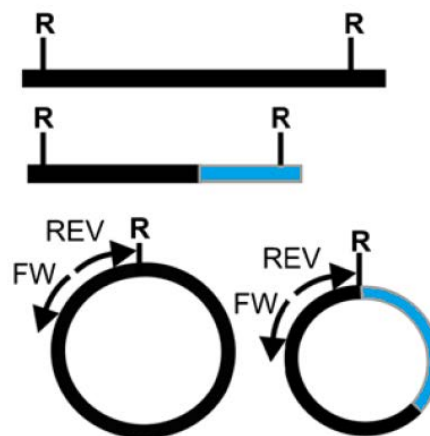
A.



B.



C.



(Adaptado de Schneider et al., 2011)

R: sitio de restricción; BP: secuencia de fusión; REV: *primer reverse*; FW: *primer forward*

(A) se muestra la serie de pasos realizados para obtener el templado para la reacción de LDI-PCR. *MLL* se esquematiza en negro y el gen compañero de fusión desconocido en celeste.

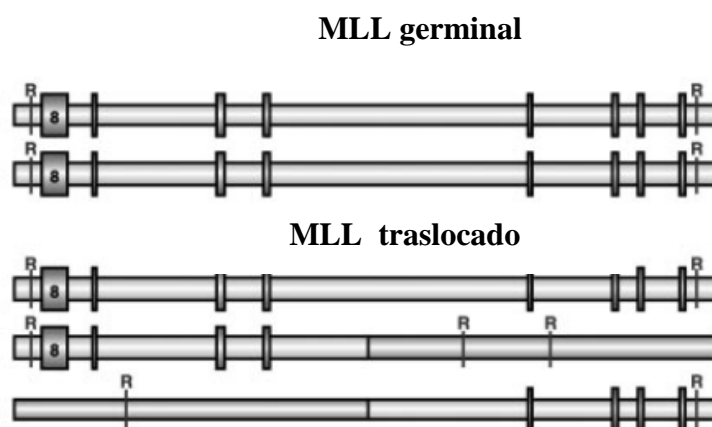
(B) se muestra la el resultado del proceso de digestión y ligación de dos alelos germinales de *MLL* con la ubicación y sentido de los *primers* más externos utilizados en la amplificación.

(C) se muestra la el resultado del proceso de digestión y ligación de un alelo germinal de *MLL* y otro rearrreglado. Obsérvese en el ejemplo la aparición de un nuevo sitio de restricción aportado por el compañero de fusión, algunas veces este nuevo sitio de restricción se encuentra ubicado más cerca de la secuencia de fusión mientras que otras se ubica más lejos, motivo por el cual en ocasiones se debe usar más de una enzima u otra diferente a fin de obtener amplicones de tamaño amplificable. En nuestro caso se utilizó como primera enzima *BamHI* y como segunda *BglII*.



Las enzimas de restricción utilizadas en el presente trabajo de tesis fueron *BamHI* en primer lugar, *BglIII* en algunas ocasiones, donde los sitios de restricción en *MLL* y de su compañero de fusión resultaban en un producto de muy alto PM que no podía ser amplificado por LDI-PCR debido a limitaciones específicas de la técnica (ver explicación Figura 16).

A continuación se muestra más detalladamente la diferencia del *bcr* gen *MLL* en estado germinal y mismo cuando se encuentra traslocado con un compañero de fusión, donde se ve claramente el cambio de los sitios de restricción en ambos estados y la presencia de los sitios de restricción aportados por su compañero fusionado (Figura 17).



**Figura 17.** Comparación del *bcr* de *MLL* en estado germinal y traslocado evidenciando el cambio en los sitios de restricción. El *bcr* de *MLL* germinal se encuentra flanqueado por sitios de restricción de *BamHI* (R).

La enzima *BamHI* reconoce específicamente y corta la secuencia de ADN blanco que se muestra a continuación

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5' GGATCC	5' G GATCC
3' CCTAGG	3' CCTAG G

Mientras que La enzima *BglIII* reconoce específicamente y corta la siguiente secuencias de ADN

Sitio de reconocimiento	Resultado del corte
5' AGATCT	5' A GATCT
3' TCTAGA	3' TCTAG A

La reacción de digestión se realizó de acuerdo con los procedimientos recomendados por el fabricante. El protocolo de digestión utilizado para ambas enzimas fue el siguiente, realizado por duplicado:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10x	5
Enz. Restricción	2
ADNg	x (equivalente a 1µg)
H2O	csp 50

Nota. csp: cantidad suficiente para

La mezcla de reacción se incubó 4 hs a 37 °C. Posteriormente se inactivó a 80 °C durante 20 minutos.

Una vez obtenidos los fragmentos digeridos se juntaron los duplicados para obtener un volumen de 100 µl y se procedió a la purificación utilizando el método del fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1).

Los pasos seguidos para la purificación de los fragmentos digeridos fueron los siguientes:

A los 100  $\mu$ l del digerido se le agregó 50  $\mu$ l de agua destilada para obtener una solución final de 150  $\mu$ l (Sc. A) en un tubo eppendorf. Luego a esa solución se le agregó 150  $\mu$ l de una solución fenol-cloroformo-isoamílico preparada mezclando 75  $\mu$ l de fenol pH 8,0 con 75  $\mu$ l de cloroformo-isoamílico (24:1) fría. Se agitó enérgicamente invirtiendo el eppendorf cabeza-cola y se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm. Luego de la centrifugación se obtuvieron dos fases, una orgánica ubicada en la base del eppendorf y otra acuosa ubicada en la parte superior conteniendo al ADN. Con una pipeta de 20-200  $\mu$ l se extrajo la fase acuosa muy cuidadosamente sin tocar la fase orgánica y se la colocó en otro eppendorf rotulado como ep2. A esta fase acuosa recién extraída se le agregó 150  $\mu$ l de una solución cloroformo-isoamílico (24:1) fría y se agitó enérgicamente invirtiendo el eppendorf cabeza-cola. Seguidamente se centrifugó durante 5 minutos a 13.000 rpm obteniéndose nuevamente las dos fases. Se separó la fase superior (acuosa) en otro tubo eppendorf rotulado como ep3 y se midió el volumen recuperado con una pipeta de 20-200  $\mu$ l. Luego de medir el volumen recuperado se le agregó igual cantidad de una solución 3M de Cloruro de sodio y se lo agitó empleando un vórtex. A esta solución (Sc. B) es a la que se le agregó 2 veces el volumen de la misma de etanol absoluto frío, es decir se le agregó una cantidad de etanol igual a la suma del volumen de la fase acuosa más el volumen de cloruro de sodio agregado. Se lo dejó reposar durante toda la noche (*overnight*) a -20 °C.

Al día siguiente se centrifugó la solución durante 15 minutos a 13.200 rpm y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el precipitado, para finalmente disolverlo en 30  $\mu$ l de buffer tris-EDTA (T.E).

Resumen del protocolo de purificación de los fragmentos digeridos:

1. 100  $\mu$ l ADN digerido + 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O → Sc. A (150  $\mu$ l)
2. 150  $\mu$ l Sc. A + 150  $\mu$ l fenol-CIA (75  $\mu$ l fenol pH 8.0 + 75  $\mu$ l CIA) ---Agitar cabeza cola enérgicamente y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm
3. Fase Acuosa + 150  $\mu$ l CIA ----- Agitar cabeza-cola enérgicamente y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm
4. Fase Acuosa (x  $\mu$ l) + Nacl 3M (x  $\mu$ l) + agitación mediante vórtex → Sc. B
5. Sc. B + 2x  $\mu$ l EtOH abs.
6. -20 °C overnight
7. 15 minutos a 13.200 rpm
8. Descartar el sobrenadante y dejar secar el precipitado resultante
9. Disolver el ADN en 30  $\mu$ l de buffer T.E.

**Nota.** A: solución resultante llamada A; B: solución resultante llamada B; F.A: fase acuosa; CIA: cloroformo-isoamilico (24:1); Buffer T.E: Tris 10mM-EDTA 1mM; EtOH abs: etanol absoluto frio. F.A. (x  $\mu$ l): volumen de Fase Acuosa recuperado cuyo volumen se utilizará como referencia para los siguientes pasos. Cuando se habla de solución cloroformo-isoamilico fria, utilizada sacada de la heladera.

Una vez purificado el ADN se dejó hidratar en el buffer T.E. a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas, mezclando a intervalos de 15 minutos, y se midió la concentración en espectrofotómetro.

Luego de ser cuantificados, los fragmentos digeridos y purificados se ligaron con la enzima T4 DNA ligasa. Dicha enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre el fosfato 5' y el hidroxilo 3' de los extremos cohesivos. Esta reacción se realizó en

condiciones de máxima dilución a fin de favorecer la autoligación de los fragmentos y disminuir la probabilidad de interacción de los diferentes fragmentos lineales entre si.

Para la reacción de ligación se siguieron los pasos detallados por el fabricante. El protocolo de ligación fue el siguiente:

Reactivo	Volumen (µl)
Buffer 10x	10
Enz T4 DNA ligasa	1
ADN digerido	x (2µg)
H2O	csp 80

Nota. csp: cantidad suficiente para

La mezcla de reacción se incubó *overnight* a 16°C, y se inactivó a 65°C durante 10 minutos.

Una vez inactivado el producto de ligación se procedió a agregarle 20 µl de agua destilada para llevarlo a 100 µl y se purificó mediante extracción con solventes orgánicos, utilizando el método del fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) siguiendo el mismo protocolo que para la purificación del producto digerido salvo con la modificación de volúmenes mostrada en el siguiente resumen.

Resumen del protocolo de purificación de los fragmentos ligados:

1. 100 µl ADN ligado + 200 µl H<sub>2</sub>O → Sc. A (300 µl)
2. 300 µl A + 300 µl fenol-CIA (150 µl fenol PH8 + 150 µl CIA) – Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm
3. Fase Acuosa + 300 µl CIA. Agitar cabeza-cola energicamente y centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm

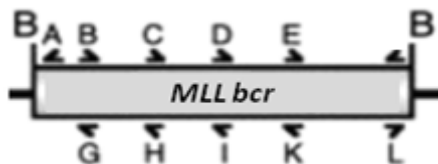
4. Fase Acuosa (x  $\mu$ l) + NaCl 3M (x  $\mu$ l) + vórtex  $\rightarrow$  Sc. B
5. Sc. B + 2x  $\mu$ lEtOH abs.
6. -20 °C overnight
7. 15 minutos a 13.200 rpm
8. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet resultante
9. Disolver el ADN en 30  $\mu$ l de Buffer T.E

**Nota.** A: solución resultante llamada A; : solución resultante llamada B; F.A: fase acuosa; CIA: cloroformo-isoamílico (24:1). T.E: Tris-EDTA; EtOH abs: etanol absoluto frio. F.A. (x  $\mu$ l): volumen recuperado al que hay que agregarle el mismo volumen de NaCl 3M.

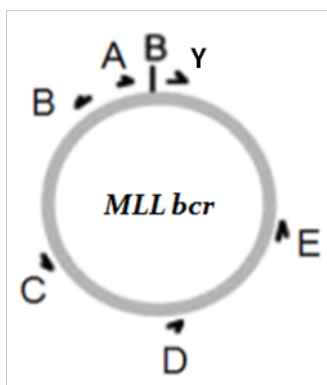
Una vez purificado el ADN se dejó hidratar en el buffer T.E. a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas, mezclando a intervalos de 15 minutos. Este producto purificado fue utilizado como templado en la realización de la LDI-PCR.

Para la realización de la LDI-PCR se utilizaron varias combinaciones de oligonucleótidos que reconocen la secuencia de *MLL* cercana al *bcr* (Figuras 18, 19 y 20). El diseño de los *primers* Y, A y B específicos de *MLL*, se realizó en base a la secuencia del gen (Nº de Acceso de *GenBank* AJ235379), mientras que los restantes han sido descritos previamente por Meyer (Meyer *et al.*, 2005). El *primer* Y fue confeccionado junto con el *primer* B para ser empleados como control de integridad del amplicón. El *primer* B se confeccionó con una ubicación más interna que el publicado por Meyer. En el caso del primer D, éste se modificó en una base respecto de la publicada por Meyer debido a que la secuencia del mismo no coincidía con la secuencia de *MLL*. El total de oligonucleótidos utilizados para las reacciones de LDI-PCR se muestran en la Figura 18. Las diferentes combinaciones utilizadas para la detección de

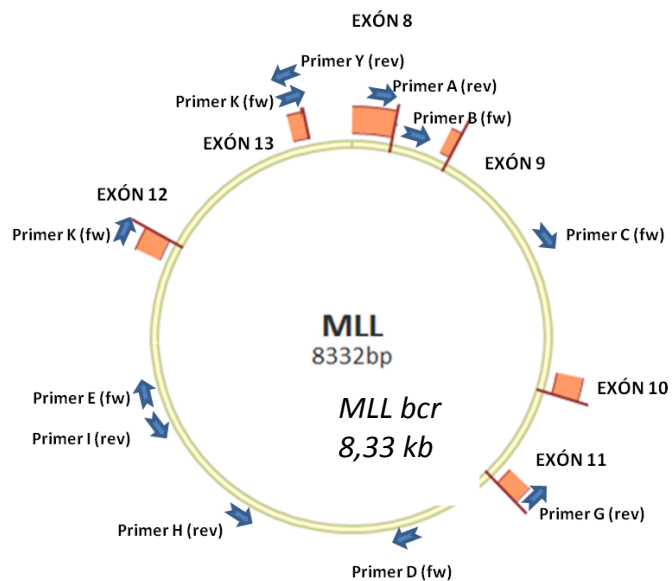
rearrreglo en forma directa (5'-3') se muestran en la Figura 19 y 20, mientras que las secuencias se detallan en la Tabla 5.



**Figura 18.** Representación del bcr del gen MLL en estado germinal. En el esquema se muestra el bcr del gen flanqueado por ambos sitios de restricción para la enzima BamHI y los diferentes primers utilizados mostrando la orientación de los mismos. A,B,C,D,E y Y se usaron para la detección del derivado de MLL mientras que los G,H,I,K y L se utilizaron para los genes de fusión recíprocos (adaptado de Meyer et al., 2005).



**Figura 19.** Representación simple del bcr del gen MLL en estado germinal luego del proceso de digestión y ligación. En el esquema sólo se observa un sitio de restricción para BamHI, ya que fue digerido y ligado. Se muestra también la ubicación de los primers y sentido para la detección del derivado de MLL sobre el cromosoma 11 (adaptado de Meyer et al., 2005).



**Figura 20.** Representación a escala del bcr del gen MLL en estado germinal luego del proceso de digestión y ligación. Obsérvese la ubicación y el sentido de los primers utilizados para la caracterización de los rearrreglo y las posibles combinaciones de primer ensayadas.



**Tabla 5.** Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de LDI-PCR.

Primer	Secuencia 5' --> 3'	Sitio de unión
Y	GTCCCAGGCACTCAGGGTGATAGCTGTTTCGG	MLL ex13
A	GACATTCCCTTCTTCACTCTTTTCCTC	MLL ex8
B	GAAGGAATTGCTGAACCACAAGTACTAACA	MLL int 8 (395)*
C	CCCACATGTTCTAGCCTAGGAATCTGC	MLL int 9 (1.186)*
D	ATCCTGAATAAATGGGGACTTTCTGTTGGTGG	MLL int 11 (665)*
E	CTCTTTTCCGTCTTAATACAGTGCTTTGCACC	MLL int 11 (2.308)*
G	CATCTCCCACACATTTTCTGCTTCACAATCC	MLL ex11
H	CACTCAGTGATATGTCATGGACATCTTTCC	MLL int 11 (1.329)*
I	GCAAAGCACTGTATTAAGACGGAAAAGAGG	MLL int 11 (2.308)*
K	CAAACTTGTGGAAGGGCTCACAAACAGACTTGG	MLL ex12
L	GTGTAATAAGTGCCGAAACAGCTATCACCTG	MLL ex13

\*número de nucleótido contado a partir del primer nucleótido del exón correspondiente.

El protocolo de LDI-PCR se basó en lo especificado por el fabricante del equipo para PCR de larga distancia, en un volumen final de 25  $\mu$ l.

Reactivo	Volumen ( $\mu$ l)
Buffer 3	2,5
dNTPs 2,5 mM (c/u)	5
H <sub>2</sub> O	9,15
Primer fw (10 $\mu$ M)	1,5
Primer rev (10 $\mu$ M)	1,5
Enz Long Taq	0,35
ADN templado	5

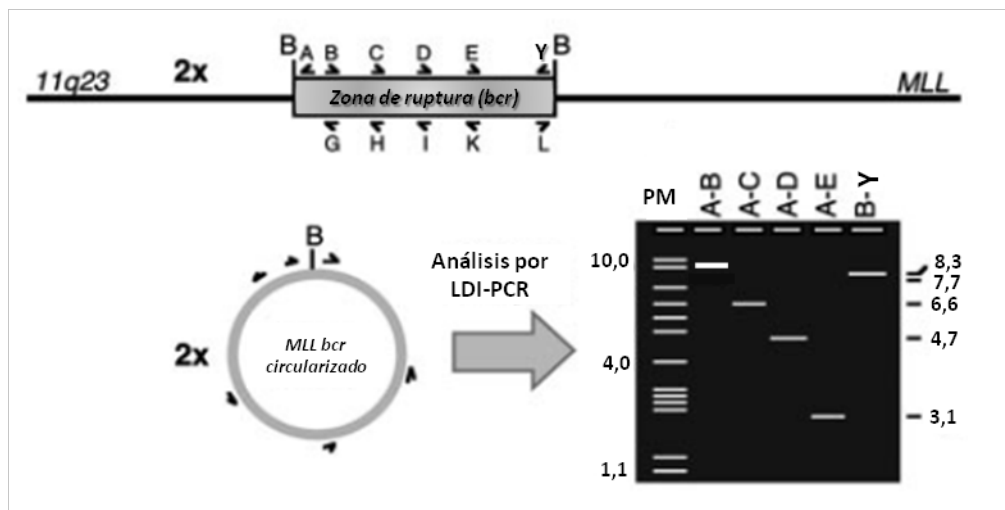
Como enfoque inicial, se realizaron 4 reacciones de LDI-PCR en las siguientes combinaciones: A-B, A-C, A-D y A-E, además de una reacción que sirve como control interno positivo utilizando los oligonucleótidos B-Y que amplifican un fragmento de 7,7 kb de la región *bcr* del alelo normal del gen *MLL*.

Para la detección del gen de fusión recíproco se utilizaron las siguientes combinaciones de *primers*: L-G, L-H, L-I y L-K (Figura 18).

El programa de ciclado fue el siguiente: Una desnaturalización inicial a 93°C durante 3 minutos, seguida de 10 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación de *primers* a 67°C, 10 minutos de extensión a 68°C. Luego se realizaron 25 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 93°C, 30 segundos de hibridación de *primers* a 67°C, 10 minutos de extensión a 68°C con un incremento de tiempo de 15 segundos por ciclo y finalmente una elongación final de 20 minutos a 68°C.

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, coloreados con bromuro de etidio y visualizados a la luz UV. Conociendo la secuencia

del gen normal, los sitios de corte de *Bam*HI, y la ubicación de los *primers* utilizados fue posible predecir el tamaño de los productos correspondientes al gen en su estado germinal (Tabla 6). Cuando el gen se encuentra en estado germinal se obtienen las bandas esperadas representadas en la Figura 21.

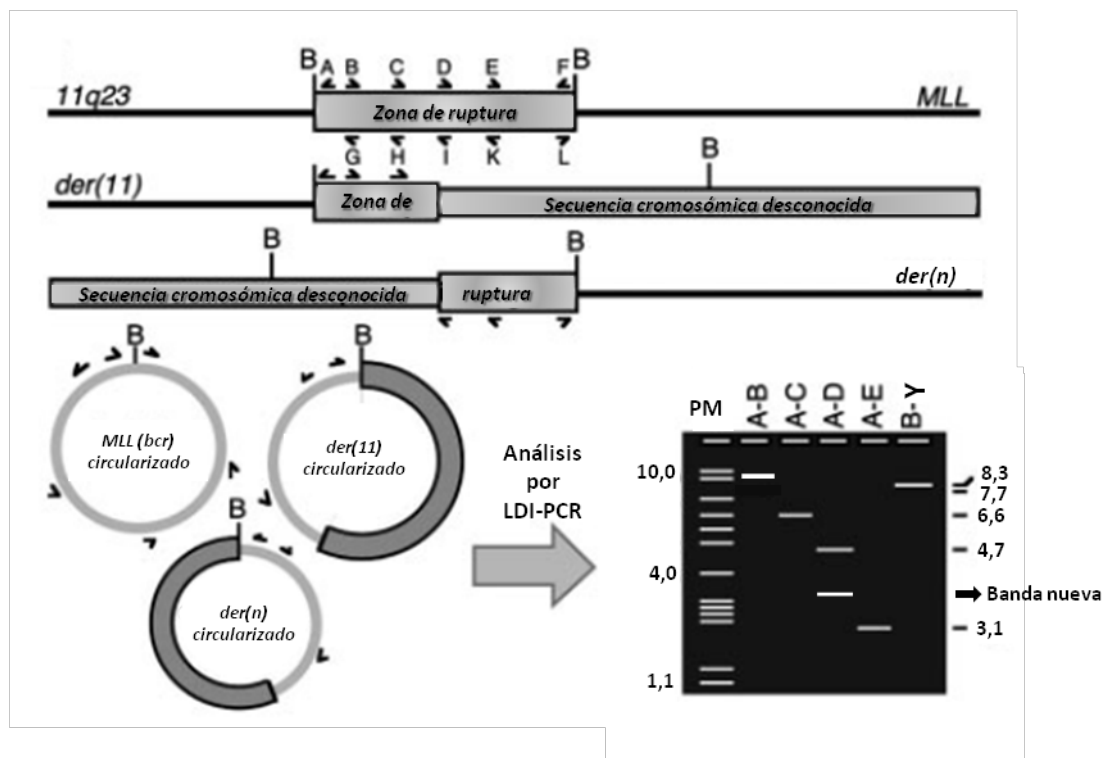


**Figura 21.** Ejemplo de una corrida electroforética del producto de LDI-PCR de *MLL* germinal (Adaptado de Meyer et al., 2005).

**Tabla 6.** Peso Molecular de las bandas germinales esperadas cuando se amplifican con los diferentes juegos de primers en las reacciones de LDI-PCR.

Banda esperada	PM (kb)
A-B	8,3
A-C	6,6
A-D	4,7
A-E	3,1
B-Y	7,7

Por otro lado, cuando el gen *MLL* se encuentra rearrreglado con un compañero de fusión, se obtienen bandas adicionales diferentes a las germinales, mostradas en la Figura 22.



**Figura 22.** Ejemplo de una corrida electroforética del producto de LDI-PCR de *MLL* germinal y traslocado (adaptado de Meyer et al., 2005).

Las bandas de PM diferentes a la banda germinal de *MLL* fueron escindidas del gel, purificadas mediante columnas de purificación siguiendo los pasos detallados por el fabricante. Una vez purificadas, las bandas fueron secuenciadas directamente utilizando diferentes oligonucleótidos. Se comenzó a secuenciar con el oligonucleótido *MLL*-A y según las secuencias obtenidas se continuó con otros oligonucleótidos según conveniencia, ubicados en diferentes posiciones sobre el gen *MLL* hasta lograr secuenciar la zona de fusión.

Una vez obtenida la secuencia fue posible identificar la identidad del compañero de fusión realizando alineamiento de la misma con secuencias de referencia mediante el programa BLAST de libre acceso en el sitio de Internet <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

El protocolo de secuenciación y el programa de ciclado utilizados para la reacción de secuenciación fueron optimizados para los productos obtenidos. Esto es debido a que el amplicón de una reacción de LDI-PCR puede extenderse de 1 a 12 kb o incluso más, lo que dificulta notablemente la obtención de una adecuada secuenciación. El protocolo utilizado para secuencias largas fue el siguiente:

Reactivo	Volumen (µl)
Big Dye Sequencing Buffer 5X	2
Reaction Premix 2,5X	1
Primer 1µM	1
ADN (eluato)	6

Las condiciones de ciclado para secuencias largas fueron: una desnaturalización inicial de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos de 30 seg a 95 °C, 5 seg a 55 °C y 1 min a 60 °C, utilizando una velocidad de rampa lenta.

### **3.1.10. CARACTERIZACIÓN DE LOS REARREGLOS DE LOS GENES DE Ig/TCR**

Las determinaciones por PCR de rearreglos de Ig y TCR incluyeron: IgH, cadenas livianas kappa TCRG, TCRB, y TCRD, respectivamente. Los *primers* y protocolos utilizados han sido estandarizados por el grupo cooperativo europeo Biomed-2 (van Dongen et al., 2003) y son altamente reproducibles. En primer lugar se amplificaron fragmentos de las Ig y/o TCR utilizando *primers* específicos que reconocen los distintos segmentos de los genes a estudiar, para demostrar la presencia de rearreglos clonales de los mismos. Este estudio consta de 15 reacciones de PCR *multiplex*, es decir con múltiples *primers* dirigidos a los diferentes segmentos o familia de segmentos de los

genes de *Ig* y *TCR*, equivalentes a la realización de 417 reacciones de PCR *monoplex* (Tabla 7).

**Tabla 7.** Combinaciones de primers utilizados para la caracterización de *Ig/TCR*.

Gen	15 PCR multiplex	n° de primers forward	n° de primers reverse	417 PCR monoplex
<b>IGH</b>	IGH-FR1	6 VH-FR1	1 JH consenso	6
	IGH-FR2	7 VH-FR2	1 JH consenso	7
	IGH-FR3	7 VH-FR3	1 JH consenso	7
	DH-JH-A	6 DH	1 JH consenso	6
	DH-JH-B	1 DH	1 JH consenso	1
<b>IG κ</b>	IG κ	6 V κ	2 J κ	12
	V κ- κ de	6 V κ, J-C (intr)	1 κ de	7
<b>IG λ</b>	IG λ	2 V λ	2 J λ	2
<b>TCR D</b>	TCR D-A	6 V d, 1 D d2	4 J d, 1 D d3	35
	TCR D-B	1 D d2	1 D d3	1
<b>TCR G</b>	TCR G-A	2 V gA	2 J g	4
	TCR G-B	2 V gB	2 J g	4
<b>TCR B</b>	TCR B-A	23 Vb	9 J bA	207
	TCR B-B	23 Vb	4 J bB	92
	Db-Jb	2 Db	9 J bA, 4 J bB	26

En todas las reacciones se utilizaron los controles correspondientes: ADN de controles positivos ya caracterizados, ADN de pacientes normales (controles negativos) y agua como blanco de amplificación.

## DETECCIÓN DE CLONALIDAD

El producto de PCR se sometió al proceso de heterodúplex, que consiste en un calentamiento a 94°C con posterior enfriamiento a 4°C durante por lo menos 1 hora. Mediante el calentamiento se separan las hebras de la doble cadena de ADN y,

durante el enfriamiento lento, se re-hibridan por homología de secuencia. En caso de existir una población monoclonal, las hebras de ADN iguales forman lo que se denomina homodúplex. El análisis de los resultados se realizó por electroforesis del producto de PCR en gel de poliacrilamida al 6% y observación bajo luz ultravioleta previa tinción con bromuro de etidio. Aquellos pacientes que tuvieron resultado positivo presentaron una banda de producto de PCR definida e intensa correspondiente al rearreglo clonal, mientras que las muestras negativas no presentaron una banda definida.

### **SECUENCIACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR**

Las bandas de homodúplex de producto de PCR obtenidas en el gel de poliacrilamida fueron escindidas y eluidas con un volumen de agua destilada proporcional a su intensidad (45-50µl), se las incubó a 64°C durante 1 hora. Se siguieron los mismos pasos que para la secuenciación de los productos de RT-PCR.

### **ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS REARREGLOS DE Ig/TCR**

Para la correcta caracterización de los rearreglos, las secuencias obtenidas fueron analizadas utilizando los programas de alineamiento de secuencias IMGT/V-quest ([http://www.imgt.org/IMGT\\_vquest/share/textes/](http://www.imgt.org/IMGT_vquest/share/textes/)) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), de acceso libre a través de Internet. Mediante estos programas fue posible identificar las secuencias específicas de los segmentos V, (D), J, correspondientes a todos los rearreglos de cada paciente.

### **3.1.11. DETERMINACIÓN DE LA EMR MEDIANTE REARREGLOS DE MLL**

#### **DISEÑO DE PRIMERS PACIENTE-ESPECÍFICOS**

Una vez conocidas las secuencias de fusión de los rearreglos de *MLL* a nivel genómico mediante la técnica LDI-PCR, se procedió a diseñar los *primers* que reconozcan en forma específica la zona de fusión involucrada en cada rearreglo. El diseño de los PPE se realizó utilizando el software Vector NTI advance™ 10. Los PPE debieron cumplir las siguientes características:

1. El amplicón que debían flanquear debía estar comprendido entre 100 y 250 pb.
2. Tener una temperatura de *annealing* cercana a 65 °C.
3. El porcentaje de C/G no debía superar el 65-70%.
4. Ausencia de formación de dímeros estables
5. Ausencia de formación de estructuras secundarias estables
6. Su secuencia, cuando fuera posible, no debía tener más de tres G seguidas
7. La secuencia de su extremo 3' no debía tener más de 5 G o C.
8. Evitar que su extremo 3' se superponga en 5 o 6 nucleótidos con la secuencia germinal.

Una vez diseñados los PPE se ensayaron en la muestra de ADN al momento del diagnóstico a fin de evaluar la especificidad de cada par a través de una reacción de PCR y corrida en gel de agarosa al 1,8%. Para realizar este ensayo además del tubo de muestra de cada caso, se utilizó un tubo de reacción que contenía un pool de ADN y el juego de PPE correspondiente para cada paciente. En todos los casos de los tubos de muestra se obtuvo una banda con el PM esperado, el cual fue calculado a partir del amplicón amplificado con los correspondientes juegos de PPE. Las bandas fueron escindidas del gel, eluidas como con agua destilada y posteriormente secuenciadas.



## CUANTIFICACIÓN DE LA EMR POR RQ-PCR

La cuantificación se realizó a través de RQ-PCR utilizando sybergreen y los PPE correspondientes a cada paciente. Se analizaron las muestras correspondientes a los tiempos de seguimiento ya establecidos, realizando su cuantificación relativa a la cantidad de enfermedad presente al momento del diagnóstico.

Para ello se realizó una curva estándar a partir de la muestra de ADN del momento del diagnóstico para cada rearrreglo de cada paciente a analizar, realizando diluciones seriadas con ADN de células mononucleares normales. Se incluyeron además controles negativos preparados con un pool de ADN normal (*buffy*), realizados por sextuplicados y un control sin templado (CST) realizado por duplicado.

Debido a que el sistema de detección basado en SYBR Green no es específico para los productos de PCR, se realizó una curva de fusión (*melting*) para evaluar la especificidad de los productos.

Con respecto a la expresión de los datos de EMR, los mismos se expresaron en relación a la muestra del diagnóstico, como porcentaje de la enfermedad inicial, normalizando los resultados con la cuantificación del gen control albúmina.

Para evaluar la calidad y amplificabilidad del ADN de las muestras, se realizó la RQ-PCR para el gen control, considerando que los valores de CT obtenidos deberían ser menores o iguales a 30 para que el ADN sea considerado adecuado para el análisis.

### 3.2. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DEL GEN FLT3

Los 2 tipos de mutaciones más frecuentes de *FLT3* se estudiaron a partir de ADN copia que se realiza como parte necesaria del diagnóstico molecular de las leucemias para el estudio de las traslocaciones más frecuentes por RT-PCR.

#### DETECCIÓN DE FLT3-ITD

Se realizó por amplificación mediante PCR de los exones 14 y 15 del gen que abarcan los dominios transmembrana y juxtamembrana de FLT3, utilizando 1µl de ADNc y los primers R5: 5'-TGTCGAGCAGTACTCTAAACA-3' (*forward*) y R6: 5'-ATCCTAGTACCTTCCCAAACCTC-3' (*reverse*), en las condiciones descritas en la literatura (Nakao *et al.*, 1996). La presencia de duplicaciones internas se analizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 9% y visualización a la luz UV previa tinción con bromuro de etidio. El PM de la banda correspondiente al alelo normal es de 366 pb; toda banda de mayor PM que el esperado fue escindida del gel, eluída con agua y secuenciada utilizando los mismos protocolos y condiciones que para la secuenciación de los productos de RT-PCR.

#### DETECCIÓN DE FLT3-TKD

Se realizó amplificando por PCR el exón 20 del gen *FLT3* con los primers 17F: 5'-CGCCAGGAACGTGCTTGT-3' (*forward*) y 17R: 5'-CATTGCCCTGACAACATAGT-3' (*Reverse*), similares a los ya publicados (Yamamoto *et al.*, 2001), y posterior digestión del producto obtenido con la enzima de restricción *EcoRV*, que reconoce como sitio de corte a la secuencia normal correspondiente a los codones 835-836 de *FLT3* (GATATC). El producto de PCR

tratado con *EcoRV* se sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida al 9%, observándose la presencia de dos bandas de 67 y 37 pb correspondientes a la digestión del producto de PCR del alelo normal y/o una única banda de 104 pb correspondiente al alelo mutado sin digerir.

Las bandas del gel diferentes a las esperadas para el alelo normal fueron escindidas, purificadas y secuenciadas en forma bidireccional con los procedimientos y protocolos anteriormente desarrollados.

### **3.3. ESTUDIO DE LAS MUTACIONES DEL GEN GATA-1**

El Exón 2 del gen *GATA-1* y las secuencias intrónicas flanqueantes fueron amplificados mediante una reacción de PCR utilizando los *primers*: GATA-Fw: 5'-GGATTCTGTGTCTGAGGAC-3' (*forward*) y GATA-Rv: 5'-TCTGACCTAGCCAAGGATCT-3' (*reverse*). Las condiciones de ciclado fueron: una desnaturalización inicial de 3 min a 95 °C, 35 ciclos de 45 seg a 95 °C, 45 seg a 56 °C y 45 seg a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C.

Una vez amplificados, los productos de PCR fueron sometidos al proceso de heterodúplex, posteriormente separados en gel de poliacrilamida al 6% y revelados con bromuro de etidio. Las bandas del gel fueron escindidas, purificadas y secuenciadas en forma bidireccional.

La predicción de las consecuencias a nivel proteico de las diferentes mutaciones del gen *GATA-1* fue analizada con el programa Vector NTI advance™ 10.

## 4. Resultados

## 4. RESULTADOS

### 4.1. MODIFICACIONES EN LA TÉCNICA LDI-PCR PARA LA PUESTA A PUNTO

Para la caracterización de los rearrreglos de *MLL* en LAI fue necesaria la puesta a punto de la técnica LDI-PCR. Durante esta etapa se establecieron todos los pasos del protocolo para llevar a cabo la caracterización de los rearrreglos de *MLL*.

Como primer paso, se determinó el volumen óptimo de ligación con el cual se obtiene la mejor calidad y cantidad de templado para la realización de la LDI-PCR, intentando favorecer la autoligación de los fragmentos de ADN digeridos con la enzima de restricción frente a la ligación entre diferentes fragmentos. El volumen de ligación utilizado para 1 ug de ADN digerido según las publicaciones internacionales van desde 50-80  $\mu$ l (Meyer et al., 2005; Meyer y Marschalek, 2009; Schneider et al., 2011). En este trabajo de tesis, 2  $\mu$ g del ADN digerido fueron ligados en volúmenes variables, entre 50 y 250  $\mu$ l. Se determinó que el volumen final óptimo fue de 80  $\mu$ l. En los volúmenes menores a 80  $\mu$ l se obtuvo en todos los casos mucha inespecificidad evidenciada por la presencia de un chorreado en el gel de agarosa al 0,8%, mientras que con volúmenes superiores no se obtuvo amplificación.

A pesar de que en la bibliografía podemos encontrar que no es necesaria una purificación posterior al paso de ligación y previo a la LDI-PCR propiamente dicha, se concluyó que es necesario realizarla debido a la probable presencia de moléculas que actúan como inhibidores de la PCR en el buffer de ligación comercial.

En la descripción de la técnica publicada por Meyer en 2005 se describen dos *primers* para amplificar un segmento de *MLL* como control de integridad y amplificabilidad de la muestra. Cuando se realizaron los experimentos utilizando este juego de *primers*

siempre se obtuvo un “chorreado” en el gel de agarosa. Ante la imposibilidad de obtener un gen control de aproximadamente 8 kb se solucionó con el diseño de 2 *primers* alternativos (B-Y) que reconocen secuencias específicas de MLL y que amplifican una secuencia de 8,3 kb.

Durante la puesta a punto utilizando los *primers* A-D, no se logró obtener amplificación de los segmentos en ningún caso de los ensayados. Si bien este fragmento de 4,7 kb no puede ser amplificado por PCR convencional, no debería tenerse ningún problema utilizando LDI-PCR, ya que se obtenía el gen control. Esta imposibilidad llevó a evaluar en detalle el amplicón, el juego de *primers* utilizado y el ciclado a fin de encontrar la causa. Se detectó una diferencia de un nucleótido entre la secuencia publicada del *primer* D con respecto a la secuencia del gen *MLL*. Para evaluar si esta pequeña diferencia podría ser la causa, se diseñó un nuevo *primer* D con la secuencia complementaria correcta. Al ser ensayado en combinación con el *primer* A, se logró amplificar el segmento A-D del alelo germinal en todos los casos ensayados, confirmando la causa de la ausencia de la amplificación.

## **4.2. LEUCEMIAS CON REARREGLOS DEL GEN MLL**

### **4.2.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PACIENTES Y RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

Las características clínicas y hematológicas de los 34 pacientes analizados, y que resultaron positivos para la detección de los rearrreglos de *MLL* por LDI-PCR, se muestran en la Tabla 8. La distribución según el sexo de los pacientes fue 20 mujeres y 14 varones. Se observó compromiso extramedular en 14 casos (41%). La media del

recuento de leucocitos fue 190.100 (rango: 2.100-760.000)/mm<sup>3</sup>, observándose hiperleucocitosis (>100.000/mm<sup>3</sup>) en 53% de los casos.

Los diagnósticos fueron: 20 casos de LLA, 12 casos de LMA y 2 casos de leucemia aguda de linaje ambiguo (LALA). Los subtipos de LLA clasificados de acuerdo con el estadio madurativo del EGIL (Bené et al., 1995) de los blastos se muestran en la Tabla 9, correspondiendo el 50% de los casos a LLA de estadio Pro-B. Todos los casos de LMA correspondieron al subtipo monoblástica (FAB-M5), mientras que los dos casos de LALA mostraron compromiso del linaje mieloide con coexpresión de marcadores de linaje B. El paciente del caso #21 fue tratado con el protocolo de LMA, basado en que la población predominante de blastos correspondía a este linaje, mientras que el paciente del caso #18 fue tratado como tratamiento de primera línea con el protocolo de LA de infantes (Interfant), y luego presentó un cambio de linaje a LMA-M5 por lo que el tratamiento fue reemplazado por el de LMA.

En lo referido al análisis de respuesta al tratamiento de los pacientes, 31 (91%) pacientes alcanzaron la remisión completa (RC), mientras que 2 (6%) pacientes fallecieron durante la fase de inducción debido a complicaciones infecciosas secundarias a la mielosupresión derivada de la enfermedad y del tratamiento administrado. Un paciente con diagnóstico de LLA-T no respondió a la terapia de inducción inicialmente administrada, sin embargo, se alcanzó la remisión completa en forma tardía.

Al momento de elaboración de esta tesis 11 de los 34 pacientes con alteraciones del gen *MLL* por LDI-PCR, se encontraban vivos y en remisión completa, con una mediana de seguimiento de 67 (rango: 38-121) meses. Diez de los 11 pacientes se encontraban en primera remisión completa y 1 en segunda remisión completa, luego de haber

presentado una recaída de la enfermedad (la duración de la segunda remisión es de 33 meses).

Por otro lado, de los 11 pacientes que permanecen vivos y libres de leucemia, 5 corresponden a LLA y 6 a LMA.

**Tabla 8.** Características clínicas y hematológicas de los 34 pacientes con LA estudiados para la detección de rearrreglos de MLL.

CASO	EDAD	SEXO	WBC (/mm <sup>3</sup> )	Hb (g/dl)	Plq (x10 <sup>9</sup> /L)	HEP	ESP	COMPROMISO EXTRA MEDULAR
1	3 m	F	6,9	9,3	315	No	Si	Piel
2	2 m	M	550	7,7	30	No	No	Abdomen/ganglios
3	3 m	M	25	8,0	181	No	No	No
4	4 m	F	291	6,7	14	Si	Si	No
5	9 m	M	16	12,3	40	Si	No	No
6	3 m	F	204	10,0	30	Si	Si	No
7	0,1 m	F	90	8,0	12	No	Si	No
8	8 m	M	240	6,0	24	Si	Si	No
9	8 m	M	11	7,2	104	No	Si	Piel
10	4 m	F	136	7,7	33	No	Si	No
11	4,8 a	M	526	5,0	25	No	No	No
12	7 m	M	22,8	10,3	10	No	No	No
13	5 m	F	470	11,0	15	Si	Si	Renal
14	4 m	F	700	9,9	88	Si	Si	SNC
15	2,3 a	F	4,1	4,4	213	Si	Si	No
16	1 m	F	249	9,1	30	No	Si	Piel
17	2 m	F	300	6,8	10	Si	No	No



CASO	EDAD	SEXO	WBC	Hb	Plq	HEP	ESP	COMPROMISO
			(/mm <sup>3</sup> )	(g/dl)	(x10 <sup>9</sup> /L)			EXTRA MEDULAR
18	11 m	F	75,8	7,6	42	Si	Si	No
19	3 m	F	13	5,1	74	Si	Si	No
20	3 m	F	13,5	6,6	14	Si	Si	No
21	0,11 m	F	142	6,8	43	Si	Si	SNC, renal
22	8 m	F	217	6,4	67	Si	Si	No
23	11 m	F	217	7,4	135	Si	Si	Piel
24	3 m	M	3,6	10,0	118	Si	Si	Piel
25	2,8 a	F	3,8	7,9	27	Si	Si	Renal
26	2,1 a	M	43	8,3	138	Si	Si	No
27	3 m	F	760	7,8	9	Si	Si	No
28	9 m	M	2,1	6,3	4	Si	Si	Testicular
29	4 m	M	49,4	11,2	44	Si	Si	No
30	6 m	F	282	4,0	37	Si	Si	No
31	6 m	F	13,9	4,3	11	Si	Si	SNC
32	4 m	M	212,6	6,5	51	Si	Si	No
33	12 m	M	274	6,8	71	Si	Si	SNC, OC, renal
34	5 m	M	300	7,1	47	Si	Si	SNC, piel

M: masculino; F: femenino; a: años; m: meses; WBC: recuentos de glóbulos blancos Hb: hemoglobina; Plq: plaquetas; HEP: hepatomegalia; ESP: esplenomegalia; SNC: sistema nervioso central; OC: órbita ocular.

**Tabla 9.** *Inmunofenotipo, respuesta al tratamiento y evolución de los 34 pacientes con LA estudiados para la detección de rearrreglos de MLL.*

CASO	Inmunofenotipo/ subtipo FAB	Respuesta a la inducción	Evolución (meses)
1	FAB-M5	RC	Recaída (3)
2	Pro-B	RC	RCC (+60)
3	Pro-B	RC	Muerte en RC (6)
4	Pre-B	RC	Recaída (28)
5	Pro-B	RC	Recaída (5)
6	FAB-M5	RC	RCC (+108)
7	Pro-B	RC	RCC (+121)
8	Pro-B	RC	Recaída (12)
9	B Maduro	RC	Recaída (21)
10	FAB-M5	RC	Recaída (15)
11	Pro-B	RC	RCC (+61)
12	Pre-B	RC	RCC (+71)
13	Pre-B	RC	Recaída (3)
14	Pro-B	RC	Recaída (1)
15	FAB-M5	RC	RCC (+87)
16	Pre-B	RC	Recaída (98)
17	Pro-B	RC	Recaída (9)
18	LALA (mieloide + B)	RC	Recaída (6)
19	Pre-B	RC	Muerte en RC (3)
20	Pro-B	RC	Muerte en RC (1)
21	LALA (mieloide + B)	RC	Cambio de linaje (1)
22	FAB-M5	RC	RCC (+67)

CASO	Inmunofenotipo/ subtipo FAB	Respuesta a la inducción	Evolución (meses)
23	FAB-M5	RC	RCC (+66)
24	FAB-M5	RC	Muerte en RC (3)
25	FAB-M5	RC	RCC (+57)
26	T	Respuesta nula	Muerte en RC (6)
27	Pre-B	RC	Recaída (4)
28	FAB-M5	RC	Recaída (11)
29	Pro-B	Muerte en inducción	-
30	FAB-M5	RC	RCC (+52)
31	Pre-B	RC	Muerte en RC (1)
32	FAB-M5	RC	Recaída (11)
33	FAB-M5	Muerte en inducción	-
34	Pre-B	RC	RCC (+38)

RC: remisión completa; RCC: remisión completa continua.

#### 4.2.2. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO Y CITOGÉNÉTICO MOLECULAR

Los resultados de los estudios de bandeo G realizados por el Laboratorio de Genética se muestran en la tabla 10. Este estudio resultó evaluable en 33 de los 34 pacientes incluidos en esta cohorte. Se detectaron anomalías de la región 11q23 en 26 casos por bandeo G. Las alteraciones detectadas fueron las siguientes: t(4;11)(q21;q23) (n=10); t(4;11;10)(q21;q23;q22) (n=1), complementos (11;4)(q23;q21q25) (n=1), t(11;19)(q23;p13) (n=2), t(9;11) (p22;q23) (n=1); t(1;11)(q21;q23) (n=3); inv(11)(q13q23) (n=1), del(11)(q23) (n=1), t(6;11)(q27;q23) (n=1), t(11;17)(q23;q21) (n=1), t(11;22)(q23;q13) (n=1), t(10;11)(p12;q23) (n=1). En dos casos se observó un

cariotipo complejo, uno mostró alteraciones de las regiones 11q23 y 19p13.3, pero sin la típica t(11;19), mientras que el otro caso mostró un cariotipo complejo que involucraba las regiones 9p22 y 11q23.

En tres pacientes se observaron alteraciones que no afectaban la zona 11q23. La presencia de cariotipo normal fue observada en 4 casos, mientras que en 1 caso no fue posible obtener metafases para su análisis.

El análisis de los casos mostró que la alteración cromosómica más frecuentemente observada fue la t(4;11)(q21;q23).

El análisis por FISH se pudo realizar en 21 casos y el resultado mostró SPLIT de la señal en 19 de los casos analizados, 2 de ellos con cariotipos normales y 2 con cariotipo anormal pero que no comprometían a la banda 11q23. De estos últimos casos, uno presentaba la t(9;10)(q32;p11.2) y el estudio de FISH reveló una inserción críptica del gen 5'MLL en el cromosoma derivado 10. Otro caso mostró la t(10;22;11)(p13;q11.2;q13) en el cual el estudio de FISH reveló rearreglo de MLL con señal 5'MLL en 10p12.

**Tabla 10.** Resultados de los estudios citogenéticos y citogenéticos moleculares de los 34 pacientes con Leucemia Aguda.

CASO	CARIOTIPO	SPLIT-FISH
1	46,XX[20]	Positivo
2	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[9]/46,XY[11]	No realizado
3	46,XY,t(4;11;10)(q21;q23;q22),9ph[20]	Positivo
4	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[20]	No realizado
5	46 XY,inv(11)(q13q23)[20]	Positivo
6	46,XY,t(1;11)(q21;q23)[20]	Positivo
7	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[3]/46,XX[17]	No realizado
8	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[14]/46,XY[6]	Positivo
9	46~48,XY,+11,del(11)(q23),add(19)(p13),+mar[cp20]	Positivo
10	46,XX,t(10;22;11)(p13;q11.2;q13)[20]	Positivo
11	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[15]/46,XY[5]	No realizado
12	46XY,t(11;22)(q23;q13),add(12)(p12)[6]/47,idem,+X[11]/46,XY[3]	Positivo
13	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[20]	Positivo
14	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[14]/46,XX[6]	Positivo
15	46,XX,del(1)(q21),add(10)(p11),-11,+mar[6]/46,XX[14]	Positivo
16	46,XX[20]	Positivo
17	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[10]/46,XX[10]	No realizado
18	46,XX,t(11;19)(q23;p13)[14]/46,XX[6]	No realizado
19	45,XX,t(4;11)(q21;q23),der(13;21)(q10;q10)[7]/46,XX [13]	Positivo
20	46,XX t(4;11)(q21;q23)[15]/46,XX[5]	Positivo
21	46,XX,ins(11;4)(q23;q21q25)[14]/46,XX[6]	No realizado
22	46,XX,t(1;11)(q21;q23)[20]	No realizado
23	46,XX[20]	Positivo
24	46,XY[20]	Negativo
25	46,XX,t(1;11)(q21;q23)[2]/48,idem,+8,+21[18]	No realizado
26	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[11]	No realizado

CASO	CARIOTIPO	SPLIT-FISH
27	Sin metafases analizables	No realizado
28	46,XY,t(9;11)(p22;q23)[17]/46,XY[3]	No realizado
29	46,XY,t(4;11)(q21;q23)[16]/46,XY[4]	No realizado
30	46,XX,t(6;11)(q27;q23)[20]	Positivo
31	46,XX,t(11;17)(q23;q21)[4]/46,XX[16]	Positivo
32	46,XY,t(10;11)(p12;q23)[17]/46,XX[3]	Positivo
33	46,XY,t(9;10)(q32;p11.2)[18]/46,XY[2]	Positivo
34	46,XY, der(3)(9pter-->9p22::11q23-->11q23::3p21-->3qter),der(9)(11qter-->11q23::9p22-->9qter),der(11)(11pter-->11q23::3p21-->3pter)[19]/46,XY[1]	Positivo

#### 4.2.3. ESTUDIO DE LOS REARREGLOS MOLECULARES RECURRENTE POR RT-PCR

Mediante la técnica de RT-PCR se detectó la presencia del transcripto de fusión en 31 (91%) de los 34 casos estudiados, y estos resultados se detallan en la Tabla 11.

Los transcriptos de fusión recurrentes de *MLL* encontrados fueron: *MLL-AFF1* (n=12), *MLL-MLLT1* (n=4) y *MLL-MLLT3* (n=3). Otros rearrreglos fueron investigados orientados por los resultados obtenidos mediante LDI-PCR y/o citogenética. Esta investigación permitió detectar los siguientes transcriptos de fusión de *MLL*: *MLL-MLLT10* (n=7), *MLL-MLLT11* (n=3), *MLL-MLLT4* (n=2), *MLL-MLLT6* (n=1) y el transcripto novel *MLL-BTBD18* (n=1), que no había sido descrito con anterioridad (Alonso et al., 2010). En un caso (caso #19) no fue posible detectar la presencia del transcripto de fusión esperado *MLL-AFF1*.

**Tabla 11.** Resultados de los estudios moleculares de los 34 pacientes con Leucemia Aguda.

CASO	RT-PCR	EXONES FUSIONADOS	LDI-PCR (derivado 11)	MLL exon/intron	CF exon/intron	LDI-PCR (recíproco)	CF exon/intron	MLL exon/intron
1	MLL-MLLT10*	ex9-ex8	NEGATIVO	-	-	SVIL-MLL	int3	int10
2	MLL-AFF1	ex9-ex4	MLL-AFF1	int9	int3	-	-	-
3	MLL-AFF1	ex11-ex4	MLL-AFF1	int11	int3	-	-	-
4	MLL-AFF1	ex10-ex4	MLL-AFF1	int10	int3	-	-	-
5	MLL-BTBD18*	ex10-ex3	MLL-BTBD18	ex10	ex3	BTBD18- MLL	ex3	int10
6	MLL-MLLT11*	ex10-ex2	MLL-MLLT11	ex11	int1	MLLT11- MLL	int1	int10
7	MLL-AFF1	ex11-ex4	MLL-AFF1	int11	int3	-	-	-
8	MLL-AFF1	ex11-ex4	MLL-AFF1	int11	int3	-	-	-
9	MLL-MLLT1	ex10-ex1	MLL-MLLT1	int10	<i>SJ</i>	-	-	-
10	MLL-MLLT10*	ex9-ex12	MLL-MLLT10	int9	int11	-	-	-
11	MLL-AFF1	ex9-ex4	MLL-AFF1	ex10	int3	-	-	-
12	MLL-MLLT1	ex9-ex4	MLL-NDUFA9- MLLT1	int9	int3	-	-	-
13	MLL-MLLT1	ex11-ex1	MLL-MLLT1	int11	<i>SJ</i>			
14	MLL-AFF1	ex9-ex4	MLL-AFF1	int9	int3	AFF1-MLL	int3	int9
15	MLL-MLLT10*	ex10-ex6	MLL-MLLT10	int10	int5	-	-	-
16	MLL-MLLT3	ex9-ex6	MLL-MLLT3	int9	int5	LMO2-MLL	int5	int9
17	MLL-AFF1	ex11-ex4	MLL-AFF1	ex11	int3	AFF1-MLL	int3	ex11
18	MLL-MLLT1	ex9-ex5	MLL-MLLT1	int9	int4	-	-	-
19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	-	-	AFF1-MLL	int10	int3
20	MLL-AFF1	ex12-ex4	MLL-AFF1	int11	int3	AFF1-MLL	int3	int11
21	MLL-AFF1	ex11-ex4	MLL-AFF1	int11	int3	4Q22-MLL	NC	int11
22	MLL-MLLT11*	ex9-ex2	MLL-MLLT11	int9	int1	MLLT11- MLL	int1	int9
23	MLL-MLLT10*	ex10-ex11	MLL-MLLT10	int10	int8	-	-	-
24	MLL-MLLT10*	ex10-ex6	MLL-MLLT10	int10	int5	-	-	-

CASO	RT-PCR	EXONES FUSIONADOS	LDI-PCR (derivado 11)	MLL exon/intron	CF exon/intron	LDI-PCR (recíproco)	CF exon/intron	MLL exon/intron
25	MLL-MLLT11*	ex10-ex2	MLL-MLLT11	int10	int1	-	-	-
26	MLL-MLLT4*	ex10-ex2	MLL-MLLT4	int10	int1	-	-	-
27	MLL-AFF1	ex11-ex6	MLL-AFF1	int11	ex5	-	-	-
28	MLL-MLLT3	ex9-ex6	MLL-MLLT3	int9	int5	-	-	-
29	MLL-AFF1	ex11-ex5	MLL-AFF1	int11	ex4	AFF1-MLL	int4	int11
30	MLL-MLLT4*	ex9-ex2	MLL-MLLT4	int9	int1	-	-	-
31	MLL-MLLT6*	ex10-ex7	MLL-MLLT6	int10	int6	-	-	-
32	MLL-MLLT10*	ex9-ex8	MLL-MLLT10	int9	int7	-	-	-
33	MLL-MLLT10*	ex9-ex6	MLL-MLLT10	int9	int5	-	-	-
34	MLL-MLLT3	ex10-ex6	MLL-MLLT3	int10	int5	-	-	-

\*Detección basada en los resultados obtenidos por LDI-PCR; CF: Compañero de fusión; SJ: secuencias de splicing antes del exón 1 de MLLT1; NC: no corresponde.

#### 4.2.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS REARREGLOS DEL GEN MLL POR LDI-PCR

Los rearrreglos del gen *MLL* con los respectivos compañeros de fusión detectados por LDI-PCR se describen en la Tabla 11. Los genes compañeros de fusión detectados por esta técnica sobre el derivado 11 fueron: *AFF1* (n= 12), *MLLT10* (n= 6), *MLLT1* (n= 4), *MLLT3* (n= 3), *MLLT11* (n= 3), *MLLT4* (n= 2), *BTBD18* (n= 1), *MLLT6* (n= 1). La secuencia de fusión partiendo del derivado 11 fue detectada en 32 de los 34 casos. En dos casos sólo fue posible la detección del rearrreglo recíproco (caso #1 y #19), esto significa la detección de la fusión resultante entre el compañero de fusión y *MLL* con orientación 5'-3', es decir, la porción 5' del compañero de fusión y la porción 3' de *MLL*. Estos rearrreglos recíprocos involucraron en uno de los casos al gen *AFF1* y en



otro al *SVIL*. Teniendo en cuenta la detección de los rearrreglos en ambos sentidos, el número total de secuencias de fusión detectadas fue 43.

En 4 casos la técnica LDI-PCR identificó alteraciones del *MLL* que no fueron detectadas por ninguna de las otras técnicas empleadas al momento de la caracterización diagnóstica (bandeo G, FISH o RT-PCR sin incluir la búsqueda de *MLL-MLLT10* que no formaba parte del *screening* en ese momento), incluyendo 3 casos con cariotipo normal y sin resultado de la determinación de FISH (Casos #1, #23 y #24) y 1 caso con t(9;10) mediante bandeo G que no involucraba a la banda 11q23 (Caso #33). Estos casos fueron posteriormente analizados por RT-PCR para validar, independientemente el resultado de LDI-PCR, mediante la comprobación de la presencia del transcrito de fusión *MLL-MLLT10*.

El rearrreglo *MLL-MLLT1* fue detectado en 4 pacientes, incluyendo un caso en el que no existía ningún dato en el bandeo G que alertara sobre la presencia de esta alteración (caso #12), ya que en el mismo se observaba la t(11;22)(q23;q13),add(12)(p12). De los 4 casos, 3 fueron “*spliced junctions*” mientras que en otro caso, un fragmento de 267 bp correspondiente al gen *NDUFA9*, localizado en el cromosoma 12p1.3 fue detectado entre el intrón 9 de *MLL* y el intrón 3 de *MLLT1* (caso #12).

El rearrreglo *MLL-AFF1* fue detectado en 13 casos, 12 de los cuales habían sido detectados por RT-PCR, incluyendo 1 caso con cariotipo normal. En el caso restante (#19), el resultado del bandeo G resultó 45,XX,t(4;11)(q21;q23),der(13;21)(q10;q10), sin embargo, no pudo ser detectada la presencia del transcrito de fusión *MLL-AFF1* por RT-PCR. Del mismo modo, tampoco fue posible la detección a nivel genómico del rearrreglo *MLL-AFF1* por LDI-PCR, aunque sí pudo demostrarse la presencia de la secuencia de fusión recíproca entre el intrón 10 de *AFF1* y el intrón 3 de *MLL*.

La presencia del rearrreglo *MLL-MLLT3* fue detectada en 3 casos, uno de los cuales tenía como resultado del bandeo G un cariotipo normal.

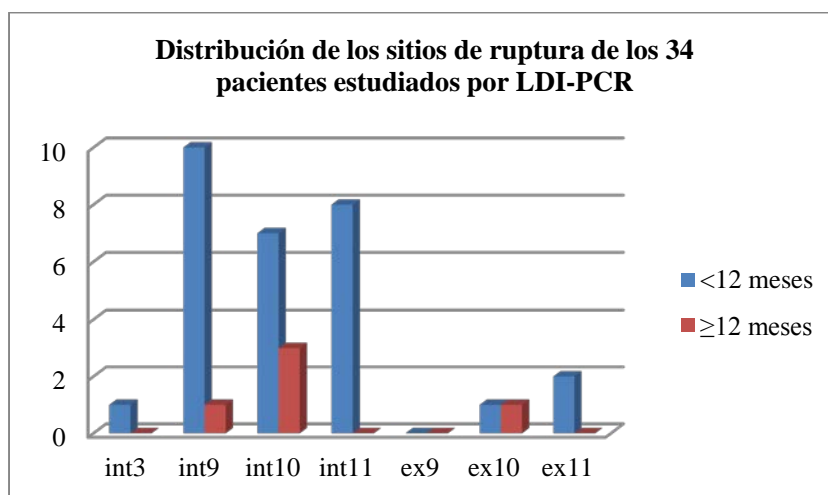
El rearrreglo *MLL-MLLT4* fue observado en 2 casos, uno de los cuales presentaba como única anomalía en el bandeo G una deleción de la banda 11q23.

En 3 casos en los cuales se detectó el rearrreglo *MLL-MLLT11* así como un caso con rearrreglo *MLL-MLLT6* estuvieron en concordancia con los resultados obtenidos por bandeo G. A partir de estos datos, la presencia de los transcritos de fusión correspondientes fue posteriormente demostrada mediante RT-PCR.

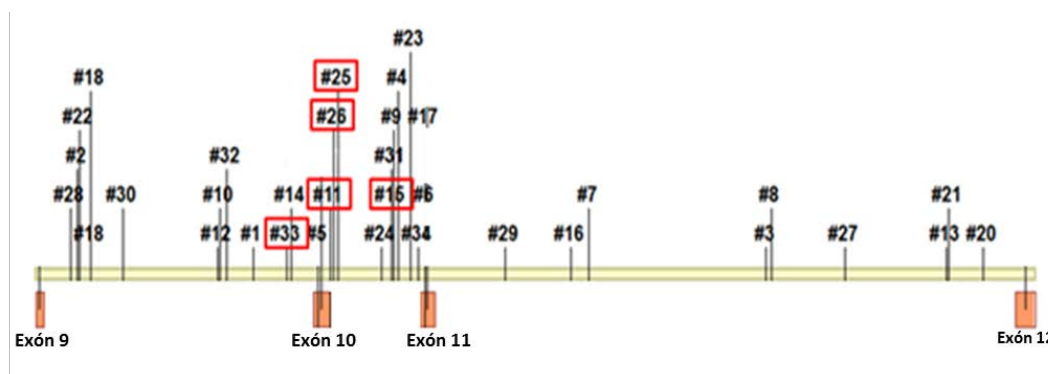
Un nuevo rearrreglo de *MLL*, no descrito previamente, fue el *MLL-BTBD18*, detectado a nivel genómico por LDI-PCR en un paciente con *inv(11q23)*, detectada por bandeo G (Alonso et al., 2010).

En base a los resultados obtenido por LDI-PCR se realizó la búsqueda del transcrito de fusión *MLL-MLLT10*, el cual fue detectado en 6 pacientes (5 LMA y 1 LLA). En 5 de estos casos, LDI-PCR detectó el rearrreglos nivel molecular, mientras que en un caso adicional de LMA con cariotipo normal, fue detectado el transcrito de fusión *MLL-MLLT10* por RT-PCR pero no por LDI-PCR. Sin embargo, el rearrreglo recíproco involucrando al gen *SVIL* localizado en el cromosoma 11p12, fue detectado por esta última técnica.

La distribución de los sitios de ruptura en el gen *MLL* se muestra en la Figura 23 y 24, las cuales fueron confeccionadas teniendo en cuenta los resultados a nivel genómico obtenidos por LDI-PCR. En estos gráficos se observa que, si bien la mayoría de las rupturas se encuentran en secuencias intrónicas, se detectaron rupturas que ocurrieron en secuencias exónicas.

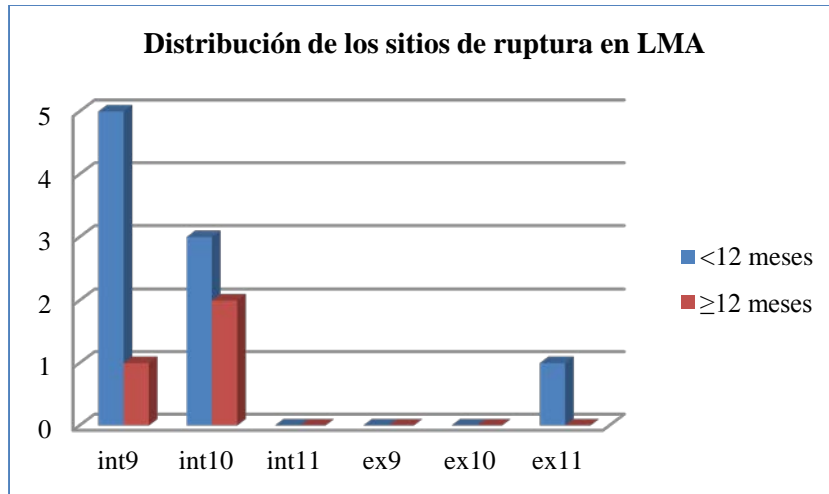


**Figura 23.** Distribución de los sitios de ruptura en el gen *MLL* diferenciando a los pacientes por su edad.

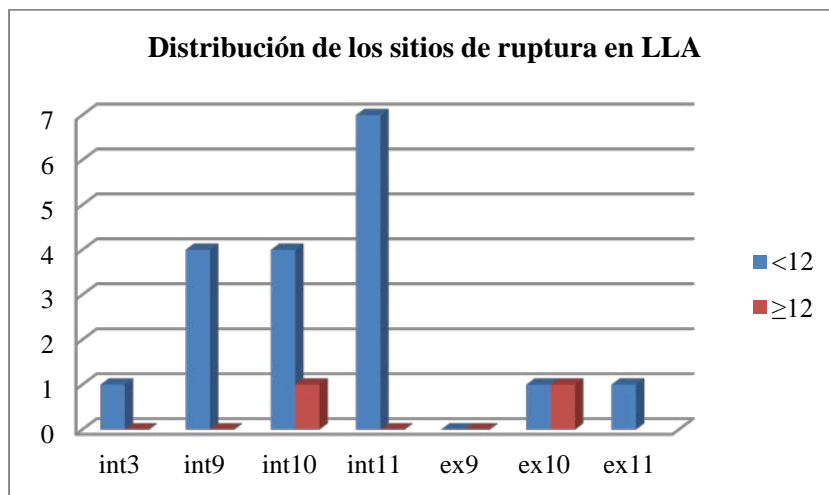


**Figura 24.** Esquema a escala de la distribución de los sitios de ruptura en el gen *MLL* en los 34 casos estudiados por LDI-PCR. El rectángulo rojo indica que el paciente es mayor de 12 meses de edad. No se muestra el caso #19 que presentó una ruptura a nivel del intrón 3.

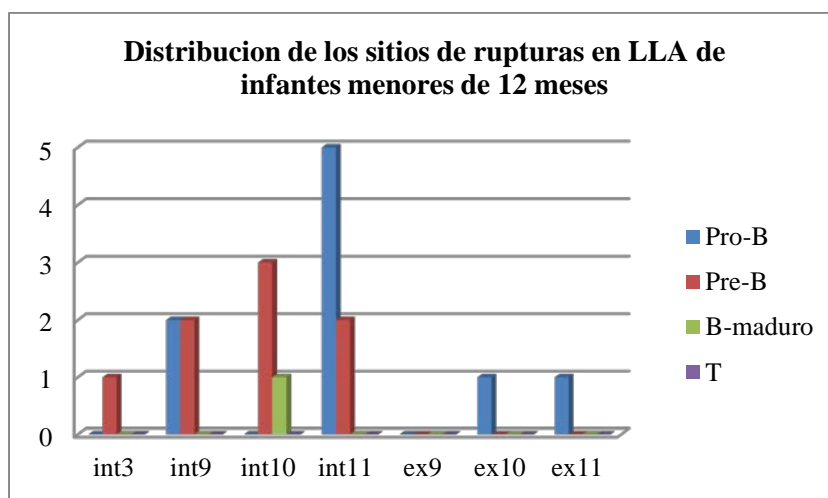
Los sitios de ruptura de la población estudiada, diferenciados según el diagnóstico de LMA y LLA se muestran en los figuras 25 y 26 respectivamente, mientras que la distribución de las rupturas según el inmunofenotipo de LLA en los pacientes menores a 12 meses se muestra en la Figura 27.



**Figura 25.** Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL de la población estudiada con diagnóstico de LMA diferenciando a los pacientes por la edad.



**Figura 26.** Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL de la población estudiada con diagnóstico de LLA diferenciando a los pacientes por edad.

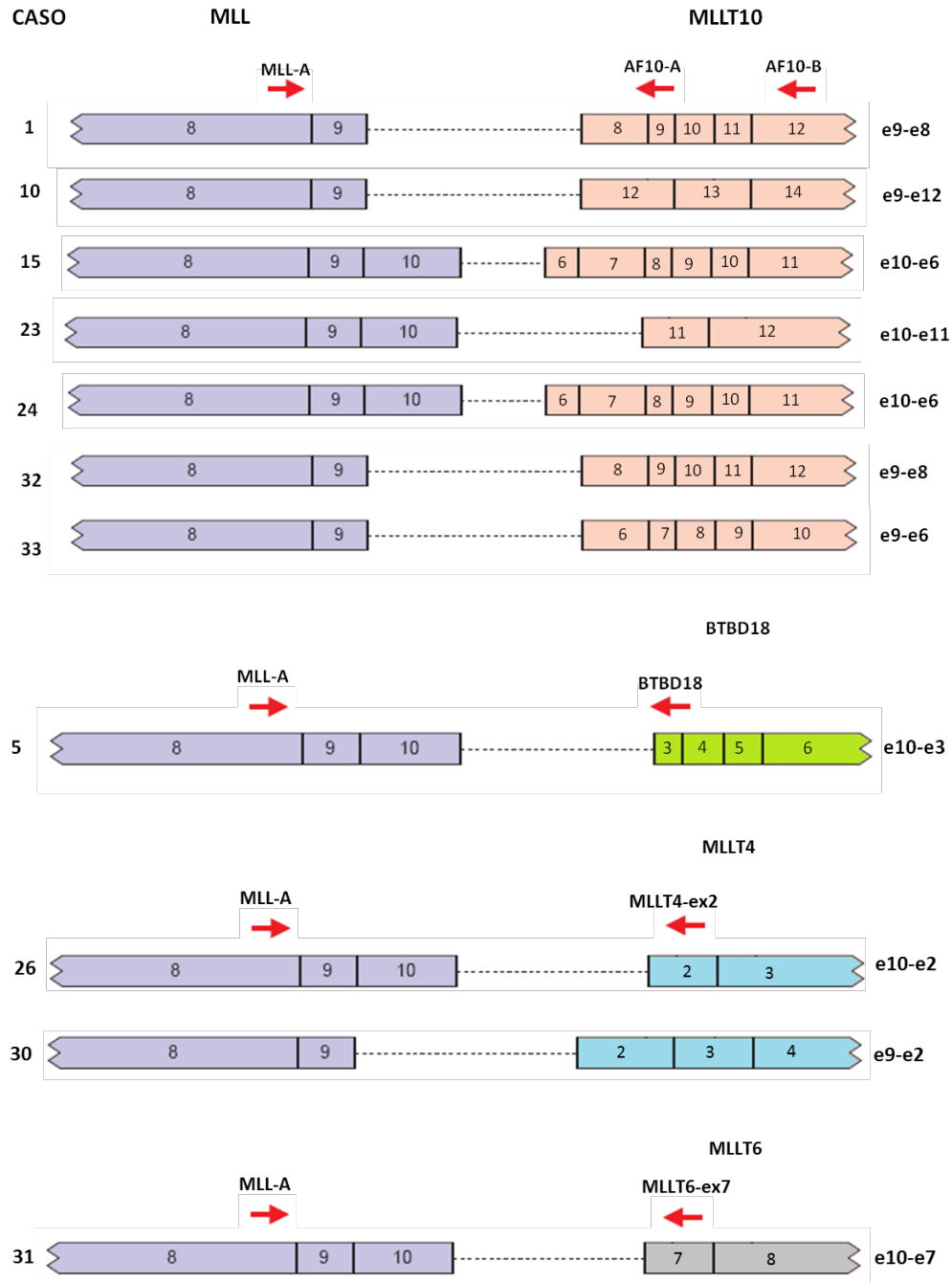


**Figura 27.** Distribución de los sitios de ruptura en el gen MLL de la población estudiada menor de 12 meses de edad con diagnóstico de LLA según el inmunofenotipo.

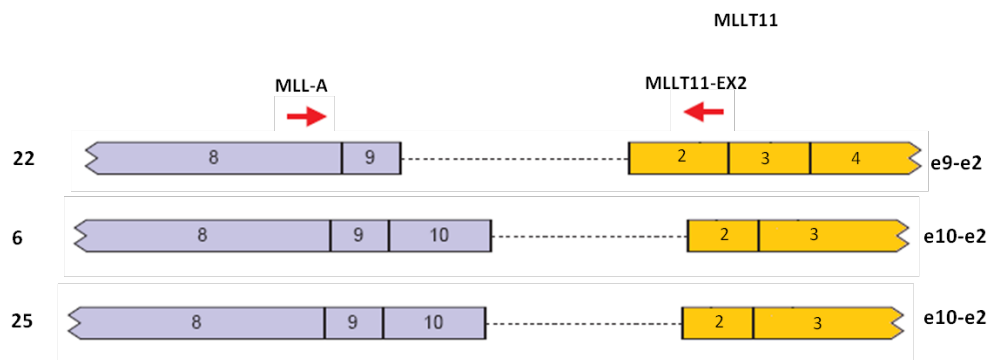
#### 4.2.5. PRIMERS PARA LA DETECCIÓN DE REARREGLOS INFRECIENTES POR RT-PCR

Con el fin de confirmar mediante RT-PCR la presencia del transcripto de fusión correspondiente a los rearreglos obtenidos por LDI-PCR, se diseñaron oligonucleótidos para los transcriptos *MLL-MLLT4*, *MLL-MLLT6*, *MLL-MLLT11* y *MLL-BTBD18*. Estos oligonucleótidos fueron utilizados en las mismas condiciones de reacción que las reacciones de RT-PCR previamente estandarizadas. En todos los casos se diseñaron oligonucleótidos compatibles con MLL-A (*primer forward*), por lo que los 5 oligonucleótidos debieron ser *reverse* y tener la misma temperatura de *annealing*, evitando la posibilidad de generar dímeros de *primers*. Los mismos fueron diseñados complementarios a secuencias del primer exón involucrado posteriormente al corte y fusión del gen compañero con excepción del transcripto MLL-MLLT10 que se diseñó un primer ubicado en el exón 9 y un segundo ubicado en el exón 12 con el objetivo de aumentar la posibilidad de búsqueda (Figura 28). Las secuencias de los diferentes *primers* se muestran en la Tabla 3 de la Sección Pacientes y Métodos. El diseño de estos

oligonucleótidos y su utilización en la reacción de RT-PCR, permitió evidenciar la presencia de los cuatro transcritos de fusión esperados.



**Figura 28.** Primers utilizados para la detección de rearrreglos moleculares infrecuentes del gen MLL. Se muestran los diferentes casos en los que fueron utilizados los primers y la ubicación de los mismos en el exón de cada transcripto. Obsérvese que el primer forward, MLL-A, es común para todos los transcritos, mientras que los diferentes primers reverse diseñados son comunes para cada rearrreglo en particular.



**Figura 28.** Primers utilizados para la detección de rearrreglos moleculares infrecuentes del gen *MLL*. Se muestran los diferentes casos en los que fueron utilizados los primers y la ubicación de los mismos en el exón de cada transcrito. Obsérvese que el primer forward, *MLL-A*, es común para todos los transcritos, mientras que los diferentes primers reverse diseñados son comunes para cada rearrreglo en particular.

#### 4.2.6. CARACTERIZACIÓN DE LOS REARRREGLOS DE LOS GENES DE Ig/TCR

De los 34 casos incluidos en el estudio de los rearrreglos del gen *MLL* por LDI-PCR, en 17 de ellos fueron analizados los rearrreglos de Ig/TCR. Los resultados de esta caracterización se muestran en las tablas 11, 12, 13, 14 y 15. En las tablas solo se muestran los casos con resultado positivo en los cuales fue posible realizar la caracterización mediante alineación de secuencias.

En la detección de estos tipos de rearrreglos se encontró que de los 17 casos analizados, 4 de ellos no presentaban ningún tipo de rearrreglos de Ig/TCR, mientras que 13 presentaban por lo menos un rearrreglo.

En el análisis de los rearrreglos de las cadenas pesadas de Ig se detectaron rearrreglos completos de IgH (VH-DH-JH) en 8 (47%) casos, mientras en 5 (30%) de los 17 casos se encontraron rearrreglos incompletos (DH-JH) y sólo 4 de los casos presentaron ambos

tipos de rearrreglos (Tabla 12). En el análisis de la rearrreglos de cadenas livianas kappa de Ig, se encontró que 3 pacientes presentaron resultado positivo (Tabla 13).

**Tabla 12.** Resultados de los estudios de los rearrreglos de Ig de cadena pesada.

CASO	IGH (VH-DH-JH)	IGH(DH-JH)
2	-	IGHD2-2*01(23)IGHJ6*02
4	IGHV3-11*03(6)IGHD2-2*01(0)IGHJ6*02	IGHD2-2*02(1)IGHJ6*03
5	IGHV3-11*03(4)IGHD1-26*01(0)IGHJ6*02	IGHD2-2*01(4)IGHJ6*03
9	IGHV3-30*18/19(10)IGHD3-22*01(0)IGHJ4*02	IGHD7-27(8)IGHJ6*03
12	IGHV6-1*01/*02(5)IGHD6-6*01(0)IGHJ4*02	-
13	IGHV6-1*01/02(1)IGHD3-10*01(1)IGHJ4*02	-
	IGHV6-1*01/02(3)IGHD7-27*01(1)IGHJ4*02	-
16	IGHV6-1*01(5)IGHD2-15*01(0)IGHJ4*02	-
17	IGHV6-1*01/02(10)IGHJ4*02/J5*02	IGHD7-27*01(11)IGHJ5*02
27	-	IGHD7-27*01(6)IGHJ4*01/02
34	IGHV4-b*01/02(7)IGHD7-27(8)IGHJ4*02	-
	IGHV3-33*01(4)IGHD2-15*01(1)IGHJ5*01/02	-

Los números entre paréntesis indican la cantidad de nucleótidos insertados al azar entre los segmentos V, D y J.



**Tabla 13.** Resultados de los estudios de los rearrreglos de Ig de cadena liviana.

CASO	Ig Kappa A
4	IGKV4-1*01(0)IGKJ4*01 IGKV3-7*02(0)IGKJ2*01 IGKV5*01/02/03(5)IGKJ2*02
5	IGKV2-29*02/03(2)IGKJ2*01/02
12	IGKV7-3*01(1)IGKJ2*01

Los números entre paréntesis indican la cantidad de nucleótidos insertados al azar entre los segmentos V y J. No se detectaron rearrreglos del tipo Ig Kappa B ni Kdel.

Los resultados del análisis de los rearrreglos del TCR se muestran en las Tablas 14, 15 y 16. Se encontró que en 8 casos los pacientes presentaron al menos 1 rearrreglo de tipo monoclonal. En sólo 1 caso se encontró que el paciente presentaba rearrreglos del TCR *beta*, *gamma* y *delta* (caso #26, LLA-T), mientras que otro paciente se encontraron 2 tipos de rearrreglos, 1 en TCR *gamma* y otro en TCR *delta* (caso #5).

En la Tabla 17 se muestra un resumen con los resultados de los rearrreglos de Ig/TCR encontrados discriminando los rearrreglos completos de los incompletos y asociándolos a la cantidad de pacientes en los que se encontraron. En la tabla 18 se relacionan los rearrreglos encontrados con el inmunofenotipo de los blastos y la edad promedio de los pacientes en los que se encontraron. Mientras que en la Figura 29 se muestra la frecuencia de los rearrreglos encontrados según el inmunofenotipo.

**Tabla 14.** Resultados de los estudios de los rearrreglos del TCR beta.

CASO	TCRB (D-J)
16	TRBD1(0)TRBJ2,2 TRBD2(1)TRBJ2,4
26	TRBD1*01(1)TRBJ1,6

No se detectaron rearrreglos del tipo TCR (V-D-J)

**Tabla 15.** Resultados de los estudios de los rearrreglos del TCR gamma.

Caso	TCRG
4	TRGV5*01(2)TRGJ1*01/J2*01
5	TRGV9*01/02(3)TRGJ1/2*01
26	TRGV9*01/02(7)TRGJ1*02
31	TRGV8*01(3)TRGJ1*02

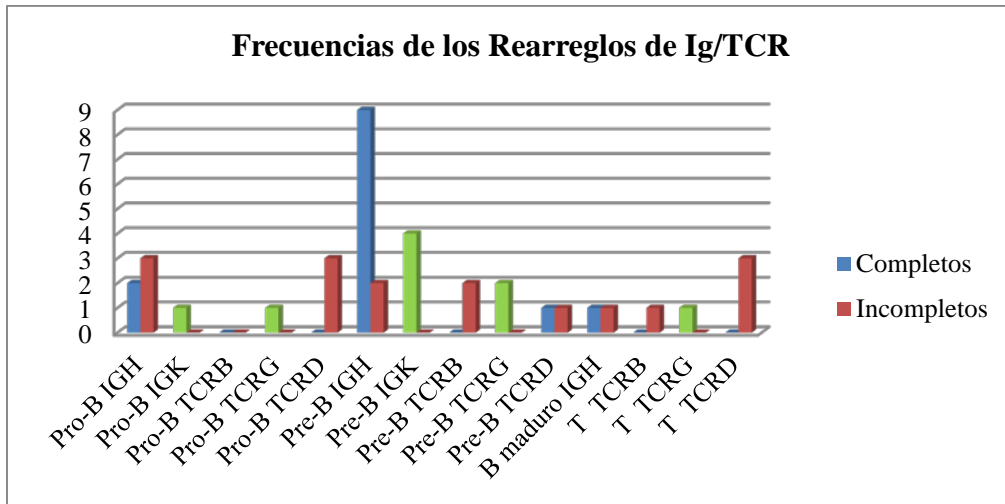
**Tabla 16.** Resultados de los estudios de los rearrreglos del TCR delta.

CASO	TCRD (V-D-J)	TCRD (incompletos)
5		TRAV14/TRDV4(8)TRDd3
13	TRAV29*01/03(6)TRDd3(3)TRDJ1	
14		TRDd2(0)TRDd3
17		TRDV2*01(13)TRDD3*01
26		TRDD2*01(14)TRDJ1*01 TRDV1*01(11)TRDD2*01(0) TRDD3*01(12)TRDJ1*01
34		TRDV2*01(1)TRDD3*01

**Tabla 17.** Resumen de los rearrreglos de Ig/TCR encontrados.

Rearreglos	Completos	Incompletos	Total	n° Pacientes
IGH	12	6	18	10
IGK	5	NA	5	3
TCRB	-	3	3	2
TCRG	4	NA	4	4
TCRD	1	7	8	6

NA: no aplica, no existen rearrreglos incompletos, ya que sólo poseen segmentos V y J.



**Figura 29.** Frecuencia de los rearrreglos de Ig/TCR encontrada según el inmunofenotipo. Las barras en color verde representan única posibilidad, sólo poseen segmentos V y J.

**Tabla 18.** Cantidad de rearrreglos encontrados, número de pacientes en los que se encontraron los rearrreglos y edad promedio según el inmunofenotipo.

Inmunofenotipo	IGH	IGK	TCRB	TCRG	TCRD
Pro-B	5	1	-	1	3
	3 ptes	1 pte		1 pte	3 ptes
	4,33 (2-9) m	9 m		9 m	5 (2-9) m
Pre-B	11	4	2	2	2
	6 ptes	2 ptes	1 pte	2 ptes	2 ptes
	4,16 (1-7) m	5,5 (4-7) m	1 m	5 (4-6) m	5 m
B maduro	2	-	-	-	-
	8 m				
T			1	1	3
	-	-	1 pte	1 pte	1 pte
			2,1 a	2,1 a	2,1 a

*a: años; m: meses; pte (s): pacientes*

#### 4.2.7. PRIMERS PACIENTE ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN DE LA EMR

Se diseñaron 23 juegos de *primers* que reconocen la secuencia de fusión entre el gen *MLL* y su compañero de fusión correspondientes a 22 casos. En todos los casos se evaluó la especificidad por una reacción de PCR convencional siguiendo los pasos descritos en Materiales y Métodos. En todos los casos en el gel de agarosa se obtuvo una banda con el PM esperado, el cual fue calculado a partir del amplicón amplificado con los correspondientes juegos de PPE. Las bandas fueron escindidas del gel, eluidas y posteriormente secuenciadas. El resultado de las secuencias en todos los casos evidenció la presencia del gen de fusión específico del clon leucémico.

A continuación se muestran las secuencias de la fusión de los diferentes casos en los cuales se diseñaron PPE. La secuencia correspondiente a *MLL* se muestra en color violeta, mientras que las secuencias correspondientes a los diferentes compañeros de fusión se encuentran en color verde. Cuando algún nucleótido no pertenece a ninguno de los dos genes involucrados se muestra en color rojo entre dos puntos, mientras que los nucleótidos en color negro entre dos puntos son compartidos por ambos genes, por lo que no pueden ser asignados a ninguno de los genes en particular.

Los sitios de unión de los *primers forward* están remarcados con un recuadro color negro, mientras que los sitios de unión de los *primers reverse* están remarcados con recuadros rojos. En el caso #12 donde se encontró un fragmento de 267 bp correspondiente al gen *NDUFA9* entre el intrón 9 de *MLL* y el intrón 3 de *MLLT1*, este fragmento se muestra en color rojo.

Caso #3

<i>MLL-MLLT2 (int11-int3)</i>
<p>GAATGTTGAGCAGTCAGTGAGACACAAACTAGCTAAGAAAAGTCAACCCTG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CCCACTTGCCATTTGAAGTT</span> ATTACT            AGCAAAATTACAAATTATTGCCTACTATTCATTTACTAACCCACAGTGAAAACTGTGTGATAGTGATTCACCTTGC            ATTCACATA <span style="border: 1px solid red; padding: 0 2px;">TACAAACATTCTTCCTACTTCCA</span> TATTTAATTTAAACCTCAAGAAGAGGGACTTCCCTATTATGAGAT            GATCTAAAC</p>

Caso #4

<i>MLL-MLLT2 (int10-int3)</i>
<p>GATGATTCCTTGAGTCAGCAAACTGTAAGAGAAATTCAAT <span style="border: 1px solid black; padding: 0 2px;">CCCACTTGCCATTTGAAGTT</span> ATTCAATATGAATTG            ACAAAGTGGTGGAGCTTTAATAGTCCGTGTCTGAGATTTAACTTTTTAAAGCAGCAGTTATT•T•ATGCCAGC            AGGTTATTAGATATATAGGTTCAAAGGAG <span style="border: 1px solid red; padding: 0 2px;">ATTGAGGCTGGAGTCTGTT</span> CAACATTTTCAGAGGTGAAGATGACA            CAGGGTTC</p>

Caso #5

*MLL-BTBD18 (ex3-ex3)*

TCATTTGCATTATTATCTGTTGCAAATGTGAAGGCAAATAGGGTGTGATTTTGTCTATATTCATCTTTTGTCTCCTT  
 AGGAAAAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGGGAAGTATCTCAAGAAGAAGCCAGGATGTGCTA  
 TCTGCTGCCCCTCAGCTCCGTGTGTCTGAGCTGGAATCCCTTCAGCTTGAGGGTGGAAAGTTGGTGAAGGCCCA  
 CAGGGCCGAAGGCTGAACCGAGAGTGTCTACAACCAACAAGTGCTGCACCAATCTCTGCCAGAGTGGTGACCC  
 AGCCACCACCCT

Caso #9

*MLL-MLLT1 (int10-splicing)*

TCAGCAAACTGTAAGAGAAATTCAAATCCAGTGATTTTCGCAATATATTCAAATGAATTGAACAACCTAGGTGA  
 GCCTTTAATAGTCCGT•T•GGGCAGCCACCCTAATTTATCCATCCATCCATTCATCTATTGAACTCTCCATT  
 GAACTATCATCTATTATCCTTTAATTTGCCATCCAGTAATTTATCCAACGATTCCGCCTTTCTTCTATTATCTATC  
 TTTAATCCAC

Caso #10

*MLL-MLLT2 (int9-int11)*

CCGAGATCGCGCCACTGCACTCCAGCTTGGGTGACACCGAGACTCCGTCTCAAAAATAAAAGTTTAGGCT  
 TTAGCTGTTTCTTTTTGGTTTCTCCTGTTGCTTTCCCT•T•ATTCTTAGTAGAGACGGGGTTTACCATGTTGG  
 CCAGGCTGGTCTGAACTCTTGGCCTCAAGTGATCCACCTGTGTCGGCCTTAAAGTGTGGGATTACAGGCGCG  
 AGCCACT

Caso #11

*MLL-MLLT2 (ex10-int3)*

AGGAGAATGCAGGCACTTTGAACATCCTCAGCACTCTCTCCAATGGCAATAGTTCTAAGCAAAAATTCCAGCAGA  
 TGGAGTCCACAGGAGAATTTAGGAAAAAATCATTATTGGCTGAGTAGAGGCAATTTCTGGAACCTGGCAATCTT  
 TAGAGTTTCTCTCTCACCCGGGCTGGAATGCAGTAGCAGATCACAGCTCACTTCAGCCTTGAATCTCCTGGGTC  
 CAAGCAGT

Caso #12

*MLL-MLLT1 (int9-int3)*

AAGTTTAGGCTTTAGCCTGTTTCTTTTGGTTTCTCCTGT•G•ACAGAATTCCAATTCTCAGTACATACACCAA  
 TAACTGAAATCAGGGATATTTCTGACATCCATGGTCATTGCAGCATTATTCACAATAGCCAAAAGTGGGAAGAAT  
 CCAAGTATCCATTGATGGATGGCTTATTAACAAAATGTGGTATAGACATATCACAGAATATTATTCAGCCTTCAGT  
 AGGAAGGAAATCACATCACGTGGTACAAACAGGAATGCACCTTGAGCATATTATGCTAAGTCAAATAAGCCAGCTA  
 CGAAAAGGAATTCTATTTTATTGGTCTACGTGTCTGTGCTTATGCTGGCCATACTGTTTTGATGACTGTAGTTGAT  
 AGGAAGTTATTTTATTATTTTATTTATTTTATTTTGGAGACGGAGTCTGGCTCTGTGCGCCAGGCTAGAGTGAGT

Caso #13

*MLL-MLLT1 (int11-splicing)*

AGGAGACTGAGGCTGGAGAATCGCTTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGTCGAGATCGCACCCTGCA  
 CCCCAGCCTGGGCGACAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAATAAATAAATAAAAAATAAAACCTTACCCTTTTGTCA  
 GCATGTCAGGCTTCTGGGTTCCATTCCCCTGAGCCATGGAGCCCTATTGACCCTGGAGTCTGTGAAGGGGAACA

Caso #17

*MLL-AFF1 (ex11-int3)*

TCTCTCTCCACAGGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAACCTATTCAACAAACTGGTA  
 TTTTGTGTTTTGTTTTGTTTTGAGACAGAGTCTTGTCTGTGCGCAGGCTGGAGTGCAATGGCGCAATCTTGG  
 CTCACTGCAACCTCCACCTCCCGGGTTCAAGCGATCCTCCTGCCTCAGCCTTCATGTAGTTGGAACACAGGCATG  
 TGCCACCA

Caso #18

*MLL-MLLT1 (int9-int4)*

AGTTCAAGACCAGCCTGGCAACATAGCAAGACCCTGTCTTTATTTAAACAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAGAAGA  
 AGAAGTTAGC•C•GAAGGAATGGCCTGAGAGCGAATGGGGCTCAGCCTCTGGCAAGCCCGTCTGTGCATGGC  
 AGCCTTCTGTGGCTCCTCCGTGAGCTTGCCTGATGTGCTGCTCCAGAGTGTGGAGGGCCTCCCGTGGCGTGT  
 CAGGGACGGCTGGGGCACACATGCTGTCAAGTGTGAGCTATCATGGTCAGACAGGCTCT

Caso #21

*MLL-AFF1 (int11-int3)*

GGCAGCGCCTGTGATCCAGCTACTCAGGAGACTGAGGCTGGAGAATCGCTTGAACCCAGGAGGCGGAGGTTG  
 CAGTGAGTCGAGATCGCACCCTGCACCCAGCCTGGGCGACAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAATAAATAAATA  
 AAAATTAACAATT•AAAAA•GTATGTATGTTGACATCTTTCATGCAAACCTTATGTTTATGTTATTAATC  
 TGCATGCCA

Caso #22

*MLL-MLLT11 (int9-int1)*

GCAGCGGCTCACGCCTGTGATCCAGCACTTGGGAAGCCGAAGCAGGCAGATCACTTGAGGTCAGGAGTTGGA  
 GACCAGCC•T•TTGTCAAAGAGCTTTTTGTTTTCTCAGATTCTAGCTTGTCTCTACTGCCCTTTGCTTTTCCCAT  
 TCAGAAGGCAATAAGGCCATCCCTATACATAAAATACATTAACAGTGATCTGTAAT

Caso #23

*MLL-MLLT10 (int10-int8)*

CTGAGATTAACCTTTTTAAAGCAGCAGTATTTTTGGACTCATTGAAATGAAATACTTGACATTGTGATGTCACA  
 CTAATTTTATGCTTTTCATCCTATTTTGTATTTTAGTAGAGATGGGGTTTTGCCATGTCGGTCAGGCTGGTTTCA  
 ACTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCTGCCTTGGCCTCCAAGTGCTGGGATTACAGGCATGAACCACTGTGCCCTG  
 CCTTTTTTTT



Caso #24

*MLL-MLLT10 (int10-int5)*

TATCA AACCATGATGATTCCTTGAGTCA GCAAACCTGTAAGAGAAATTAGATACAAATAGATAAAAATTTGGGAGT  
 CACTGTTACATTTTTATAATTTAGTTGGTAATGGAAATTTGGACAATG AGTAAGATTGCCTAGTGTTTCATGTGAAA

Caso #26

*MLL-MLLT4 (int10-int11)*

GGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGGCACTTTGAACATCCTC AGCACTCTCCAATGGCAATAGT TCTAAGCAAAA  
 AATTCCAGCAGATGGAGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAGGTAAAGGTTTTTGAGAGAATTTGACTATTGCTT  
 CTCTGATTTCTTGAGTTTTTGCCAG TCATGGGAAGGACTCTATTTCTCT GTTTTCATCTGTACCTGTGACTGCACTT  
 GACGTGGGT

Caso #27

*MLL-AFF1 (int11-ex5)*

ATGAGTTGTACAGAGAATTCTAAGTA CCCCTCACCAAATTCCTAAGT GTTAATATGTTTCTCTGTGTATATAT  
 TTTACCCATTCATGGCCGCCTCTTGACAGCAATACATACGCCTAGTACAG CTGAGCCATCCAAGTTTCCTTCCCT  
 ACAAAG

Caso #28

*MLL-MLLT3 (int9-int5)*

GTCCAGAGCAGAGCAAACAGAAAAAGTGGCTCC CCGCCCAAGTATCCCTGTAA AACAAAAACCAAAGAAAAG  
 GTGAGGAGAGATTTGTTTCTGCCATTTCTCAGGATGTATTCTATTT GTAGGGAAAAGCCTTATCCTTGACTT C  
 TATGTAGGATGGCAGTGGAATTTCTAAAATTAAGAACTTCAAGTTTAGGCTTTAGCTGGGCACGGTGGCTCAC  
 GCTGGTAATCCAAACTCTAAAATAGAGCC ACAGATAATTTCAACTTCTAGGGGGA TTATGTAAAGTATTTTGTG  
 TTGGGTTTTTAA

Caso #29

*MLL-AFF1 (int11-ex4)*

TATATTGTATATCAAAGCCTTTCATCTATAAGGAGCTCTTACCAATTAAT AAGAAAAAGGAATGACATCCAGAAA  
 AAAAAATAGGCAAAGACAGAAATAGATAATTCACAAA •A• GATTCTGAAGGTGAGTTCACTGTTAATCTTTCTCA  
 TTTGAAGAAATATTTAAGTAGGTAGGCGTACATCCATTTACTTTCACTTTAAGAACAGTTGCCATTGGCTGGGTGC  
 GGTGGC TCATGCCTGTAATCCTAGCACTT TGGAGGCCAAGGT

Caso #30

*MLL-MLLT4 (int9-int1)*

GATTGCATC ATTGCACTCTAGCCTGGACAA CAGAGCTAGACTCCATCCAAAAAAGTAGCCGGGC  
 ACGGTGGCTCACGCCTGTAATCCAGCACTTTGG •AAGG• TATTTACATCGT ACACAGGTGAGGCAAAGAGAA  
 ATTGTTAGTAACTTGTCAAAGTCAGAAATGAACTTGAAGACTAAAAACCATCTCTCTACGTTAGTCTCAGATGT  
 TTATGA

Caso #31

<i>MLL-MLLT6 (int10-int6)</i>
<p>CATACATAATGAAACATTCTATCCATCCTGAGCAGTATCAGAGGAAGTAATTCCTTCACATGGAAAGTATCAAAC            CATGATGATTCCTTGAGTCAGCAAACTGTAAGAGAAATTCATCCAGTGATTTTCGCAATATATTCAATATGAA            TTGAACAAC TAGGTGAGCCTTTTAAAGTTCCTGCCATGTGTTATTTTGTGTGGTCCC</p>

Caso #32

<i>MLL-MLLT10 (int9-int7)</i>
<p>GGCTTAGCCTGTTTCTTTTGGTTTCTTCCTGTTGCTTTTCCCTTCTTGTGGCCCCACATGTTCTAGCCTAGGAA            TCTGCTTATTCTAAAGTGAGATAGACTCCTAGATTAATTATCTTATGTGACACTAGGGGCATATAGATCATTTTTA            AGGGAATATAAGTAAGTGTGATGATTAATGTTTTCAAATTGTTTTAGTTTTTGAAGCTGTTGTTGTGCCATGTAA            TCCATTATGG</p>

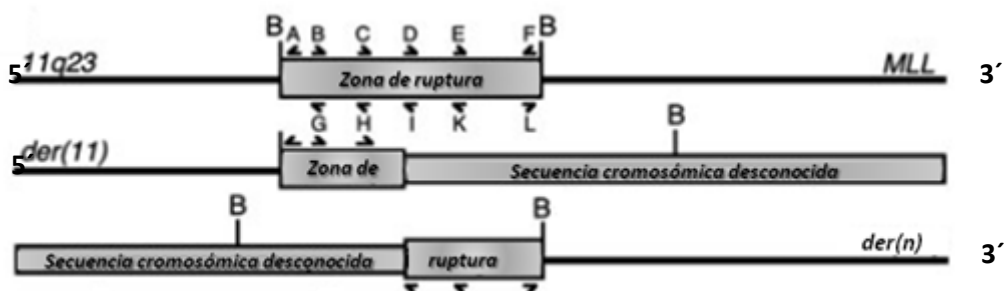
Caso #33

<i>MLL-MLLT10 (int9-int5)</i>
<p>GAGCCCACAAGGTCTAGGCTGCAGTGAAGCTGTGACTGTGCCACTGTATTGCAGCCTAGGCAACAAAGCATTGCTC            TTGTTGCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCATGATCTCTGCTCGTCAACCTCCGCCTCCGGTTTCAAGTGATTCTCC            TGCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGGACTACAGGCACGCACCACATCCCGCTAATTT</p>

**4.2.8. ANÁLISIS DE LA ZONA DE FUSIÓN DE LOS REARREGLOS DETECTADOS EN FORMA DIRECTA Y RECÍPROCA**

Como se explicó anteriormente, cuando se producen las traslocaciones cromosómicas se generan rearreglos a nivel genómico que originan dos genes de fusión. Esta ruptura y fusión ocurre manteniendo el marco de lectura, por lo que al transcribirse y luego traducirse se genera una proteína de fusión formada por la parte amino terminal de un gen y la carboxilo terminal del compañero de fusión. Cuando se trata del caso de *MLL*, este gen mantiene la parte 5' que es la que codifica la amino terminal; mientras que la porción 3', que codifica la parte carboxilo terminal, es reemplazada por la parte 3' de su compañero de fusión. De manera análoga, en el rearreglo recíproco el gen compañero

de fusión mantiene la parte 5' y la porción 3' es reemplazada por la correspondiente 3' de *MLL* (Figura 30).



**Figura 30.** *MLL* germinal y rearrreglado. Obsérvese las regiones 5' y 3' antes y después del rearrreglo (Adaptado de Meyer et al., 2005)

En los casos en los que se detectaron los rearrreglos de *MLL* y el recíproco se analizó la zona de la secuencia de fusión con el fin de evaluar si la fusión de *MLL* con el compañero de fusión ocurre con la secuencia inmediatamente posterior a la ruptura. En ninguno de los casos analizados se encontró que la fusión ocurrió inmediatamente posterior a la ruptura.

El resultado de la secuenciación de ambos genes detectados se muestra a continuación. Las secuencias correspondientes a *MLL* se muestran en color violeta, mientras que las secuencias correspondientes a los diferentes compañeros de fusión se encuentran en color verde. Cuando algún nucleótido no pertenece a ninguno de los dos genes involucrados se muestra en color rojo entre dos puntos, mientras que los nucleótidos en color negro entre dos puntos son compartidos por ambos genes, por lo que no pueden ser asignados a ninguno en particular.

Cada caso es acompañado por un esquema en el que se muestra la secuencia germinal de *MLL*, la secuencia de *MLL* anterior y posterior a la ruptura con el número de nucleótido exacto donde ocurrió, el número, aproximado, esperado en teoría y el número real producto de la secuenciación. Estos números están referidos al último

nucleótido del exón 8 (distancia al término del exón 8, de acuerdo con la secuencia de referencia NC\_000011. 9).

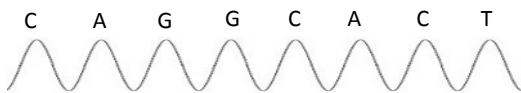
Caso #5

*MLL-BTBD18 (ex10-ex3)*

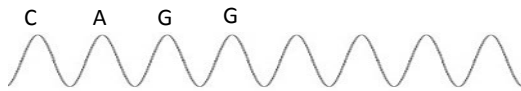
GCATTATTCTGTTGCAAATGTGAAGGCAAATAGGGTGTGATTTTGTCTATATTCATCTTTTGTCTCCTTAGGAA  
AAACCACCTCCGGTCAATAAGCAGGAGAATGCAGG•GGAAGTATCTCAAGAAGAAGCCAGGATGTGCTATCTG  
CTGCCC

*BTBD18-MLL (ex3-int10)*

TGTAGCCCCCTTCTTCACAGAGCGCCTGGAGCGGGAGAGGCCAGCTCAGGGTGGGAAGGTGGTGTAGAGCTGGG  
TGGCC•TG•TGAAGTACTGCAGAACATACATAATGAAACATTCCTATCCATCCTGAGCAGTATCAGAGGAAGTA  
ATTCC



MLL germinal



MLL-BTBD18 2128 pb del ex8



BTBD18-MLL esperado 2129 pb del ex8



BTBD18-MLL detectado 2404 pb del ex8

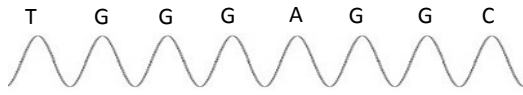
Caso #6

*MLL-MLLT11 (ex11-int1)*

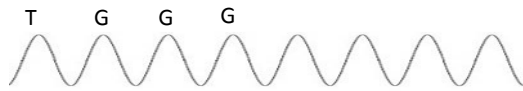
GTAAAACCTTTCCTAAGTGACCTTTCTCTCTCCACAGGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGATGGG•A•T  
TTCATAAAATTTGCTTTAGCTTTTAAATTGCAAGATAGCTCTACCAAACACTCAGGGACTGTTGAGCAGTTTTTTA  
TACATA

*MLLT11-MLL (int1-int10)*

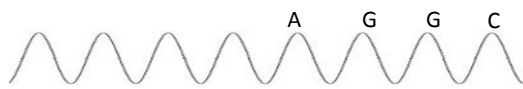
TTTTAGGCCTTTT GAGTTAATATTTTCATAAAAATTTGCTTTAGCTTTTTAAATTGCAAGATAGCTCTACCAAAC•ACT•  
 GCAGAACATACATAATGAAACATTCTATCCATCTGAGCAGTATCAGAGGAAGTAATTCCTTCACATGGAAAAGTA  
 TCAAAC



MLL germinal



MLL-MLLT11 2804 pb del ex8



MLLT11-MLL esperado 2805 pb del ex8



MLLT11-MLL detectado 2414 pb del ex8

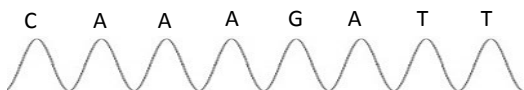
Caso #14

*MLL-AFF1 (int9-int3)*

TGCCACTGTATTGCAGCCTAGGCAACAAAGCAAGACCCAGTCTCTTTTAAAAAAAATTCAA•TAAAATT•GAGC  
 CAAAATTTATATACAGTAAACATAGAGATCATAAGAGTACAGTTTGTGTTTCAAAAAATAGATACACCTATAGGA  
 TCCAAA

*AFF1-MLL (int3-int9)*

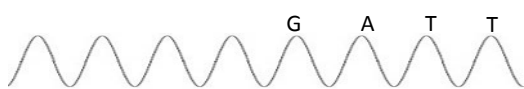
CCAAAATTTATATACAGTAAACATAGAGATCATAAGAGTACAGTTTGTGTTTCA•AAAAAT•CAACTAGGCATGG  
 TGGCATGCACCTGTAGTCCAGCTACTCTTGAGAAGCTGAGGCAGGAGGATCACGAGCCACAAGGTCTAGGCTG  
 CAGTGA



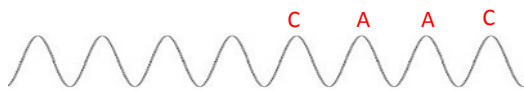
MLL germinal



MLL-AFF1 1958 pb del ex8



AFF1-MLL esperado 1959 pb del ex8

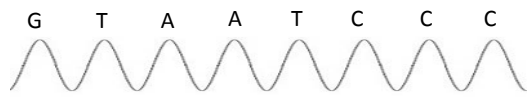


AFF1-MLL detectado 1821 pb del ex8

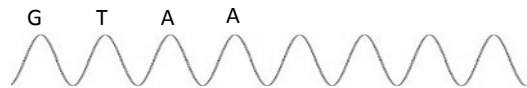
Caso #16

*MLL-MLLT3 (int9-int5)*  
GAGATTGCATCATTGCACTCTAGCCTGGACAACAGAGCTAGACTCCATCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAGCCGG  
GCACGGTGGCTCACGCCTGTAA GTTAAAATATAACAGAAATAAGGACGTTTCCTGTTTTGCTAACAGTTGAGAG  
GGTA

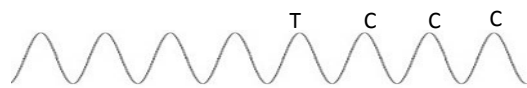
*LMO2-MLL (int5-int9)*  
CTTGCAGATATGGTGGTCCGAGAAAATAAGTAGGATTTTGAATGATCATGCTTATAATTTTGGTCAGTTTTCTTT  
TTTTTAAGTCACAGAAAATAGAACTTGGATAA•T•TCCAGCACTTTGGGAAGCCGAAGCAGGCAGATCACTTGAG  
GTCAGG



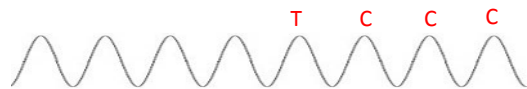
MLL germinal



MLL-MLLT3 1186 pb del ex8



MLLT3-MLL esperado 1187 pb del ex8

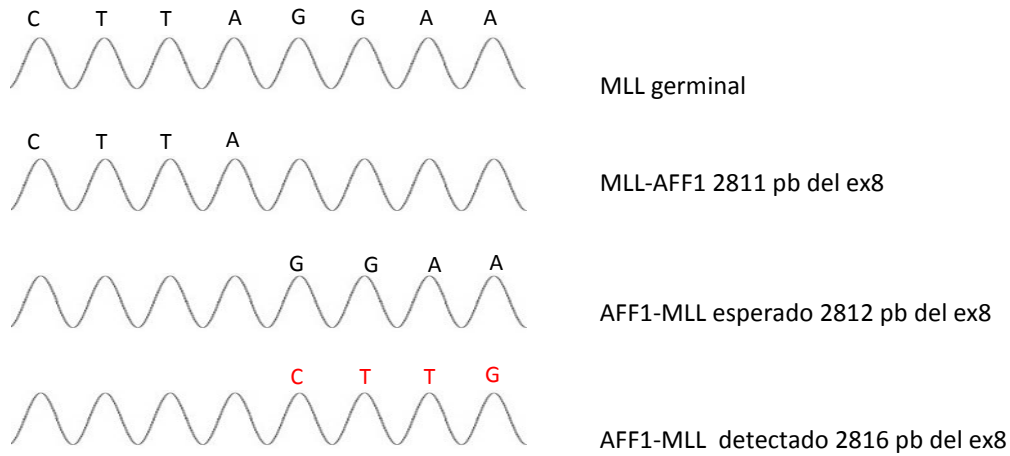


LMO2-MLL detectado 886 pb del ex8

Caso #17

*MLL-AFF1 (ex11-int3)*  
TCTCTCCACAGGAGGATTGTGAAGCAGAAAATGTGTGGGAGATGGGAGGCTTAACTATTCAACAACTGGTA  
TTTTGTTGTTTTGTTTTGTTTTTGGAGACAGAGTCTTGCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTGCAATGGCGCAATCTTGG  
CTCACT

*AFF1-MLL (int3-ex11)*  
CTTTTATCTTTCATCATTCTTTTCTTTCTTTTCTTTTCTTTTTTTTTTTTAAAC•TTAAACA•CTTGACTTCTGTTTCCTA  
TAACACCCAGGGTGGTTGCTTCTCTGTGCCAGTAGTGGGCATGTAGAGGTAAGGCATCTGCTTCTTTGTACCC  
CAGGAA



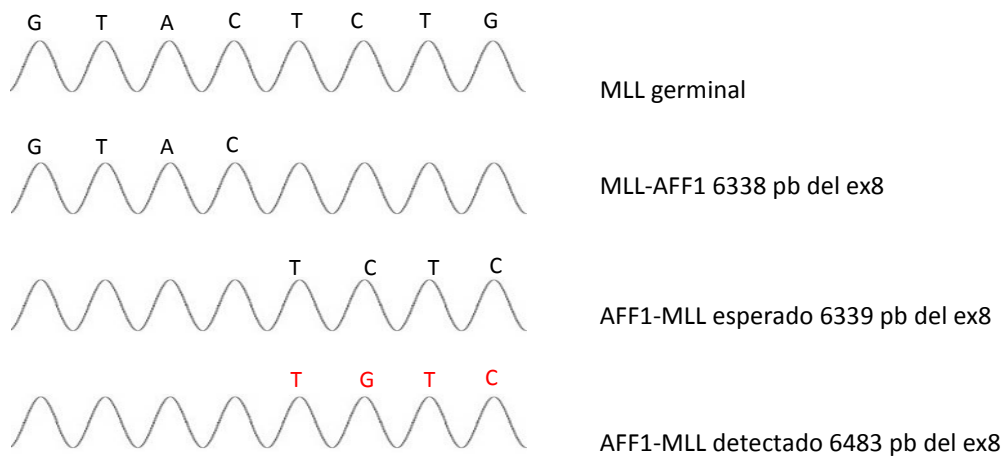
Caso #20

*MLL-AFF1 (int11-int3)*

TCTGTTAAATCTTGTATTATATTTATTTTGTACTTTCTATTCCACTGGTATTACCACTTAGTAC•TCTG•TGACCTG  
GGTCACAAATTTAGTAAGGAAAGGTGTAAGATTAACATATTTTCATGGAATCTCTGAAGGTTCTGAATCCAATA  
TAGAAG

*AFF1-MLL (int3-int11)*

TAATGAAACTCTGTGCATGGATTTAATTTTAGTCAAGTTTTAAATGTTACACTTTTTCAAT•CTCCGCAA•TGTC  
CAACTGTACTTTTTACATAGTCATTGCTTAATGAATATGATTGAATTAATATATGCCAGTGGACTACTAAAC  
CCAAA



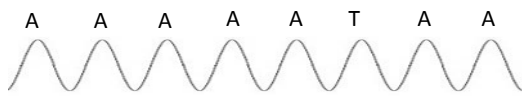
Caso #21

*MLL-AFF1 (int11-int3)*

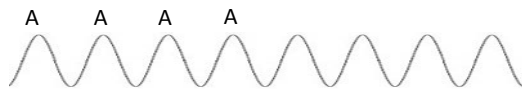
TGAGTCGAGATCGCACCCTGCACCCAGCCTGGGCGACAGCGAGACTCCGTCTCAAAAAATAAATAAATAAAA  
 ATTTAAACAATTAATAAAA•GTATGTATGTTGAACATCTTTCCATGCAAACACCTATGTTTATGTTATTAATCTGCAT  
 GCCA

*4q22-MLL (4q22-int11)*

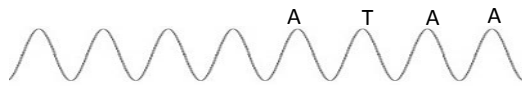
TTTTTAAGTATGTATAAGGCAATACAAACAGGAATTTGATGATGTC•TGTTACTTTCTATTTCCACTGGTATTACCA  
 CTTTAGTACTCTGAATCTCCCGAGTGTCCAATACTGTACTTTTTTACATAGTCATTGCTTAATGAATATGTATTGAA  
 TTAAA



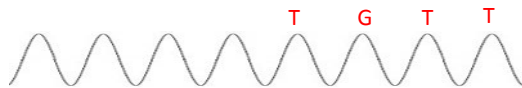
MLL germinal



MLL-AFF1 6123 pb del ex8



AFF1-MLL esperado 6124 pb del ex8



4q22-MLL detectado 6299 pb del ex8

Caso #22

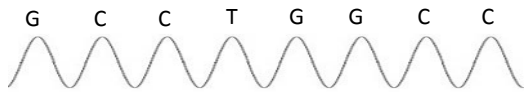
*MLL-MLLT11 (int9-int1)*

GCAGCGGCTCACGCCTGTGATCCAGCACTTTGGGAAGCCGAAGCAGGCAGATCACTTGAGGTCAGGAGTT  
 GGGACCAGCCT•TTGTCAAAGAGCTTTTTGTTTTCTCAGATTCTAGCTTGCTCTCTACTGCCCTTTGCTTTTCC  
 CCATTC

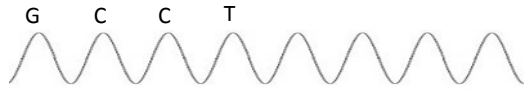
*MLLT11-MLL (int1-int9)*

TTAAATCAAAAATTTCACTACTATTTACATTAGTGAATAGCACTTTAACTCAATTTTCTGTGTAGTCTTATTTTATGT  
 TCTTGACTTGATTTAATGCCACATATGCACAACAGAGCTAGACTCCATCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTAGCCGG  
 GCACG

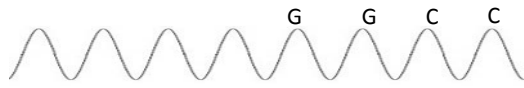




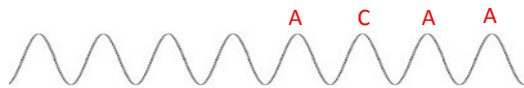
MLL germinal



MLL-MLLT11 949 pb del ex8



MLLT11-MLL esperado 950 pb del ex8



MLLT11-MLL detectado 1117 pb del ex8

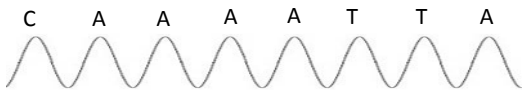
Caso #29

*MLL-AFF1 (int11-ex4)*

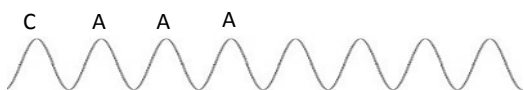
AAAAAATAGGCAAAGACAGAAATAGATAATTCACAAA•A•GATTCTGAAGGTGAGTTCAGTGAATCTTTCTCA  
TTTGAAGAAATATTTAAGTAGGTAGGCGTACATCCATTTACTTTCACTTTAAGAACAGTTGCCATTGGCTGGGTGC  
GGTGG

*AFF1-MLL (int4-int11)*

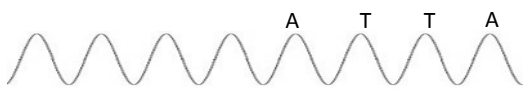
CTGCTGTGAGCTGAGATCACGCCACTGCACTCCAGCCTGGGCAACAGAGTT•GAAA•AAGGAATGACATCCAGAA  
AAAAAATAGGCAAAGACAGAAATAGATAATTCACAAAATTAGAAATAAATACATGTTGGGTGGCAG



MLL germinal



MLL-AFF1 3317 pb del ex8



AFF1-MLL esperado 3318 pb del ex8



AFF1-MLL detectado 3260 pb del ex8

#### 4.2.9. DETERMINACIÓN DE LA EMR MEDIANTE REARREGLOS DE MLL

Con la finalidad de sentar las bases para la detección de la EMR utilizando como blanco molecular los rearreglos de *MLL* se utilizó el juego de PPE diseñado para cada paciente. Luego de ser evaluada la especificidad por PCR convencional y posterior secuenciación del producto obtenido, se procedió a realizar la cuantificación por RQ-PCR.

En la puesta a punto se utilizó como sistema de detección el intercalante *SYBR Green*, el cual se une al surco menor del ADN de doble cadena. Al intercalarse en el ADN, la fluorescencia se potencia entre 800 y 1.000 veces (excitación aprox. a 488 nm y 254 nm; emisión aprox. a 560 nm) respecto a cuando no se encuentra intercalado. Esta intensidad de la fluorescencia se incrementa proporcionalmente a la concentración del ADN bicatenario, por lo que la señal fluorescente es proporcional a la cantidad de producto de la PCR. La utilización de este fluoróforo como sistema de detección es muy económica, sin embargo presenta varias desventajas, una de la más importante es que la señal emitida no es específica, porque el fluoróforo se une a cualquier amplicón del ADN.

Para el uso correcto del *SYBR Green* en la PCR cuantitativa es necesario verificar la especificidad de la señal detectada, analizar la curva de disociación y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se debe sólo a la amplificación del blanco.

Se analizaron 6 de los 34 casos estudiados por LDI-PCR de los cuales se disponía de muestras del seguimiento de los pacientes para dicha determinación. Para cada paciente se realizó una curva estándar utilizando diluciones seriadas de la muestra de ADN correspondiente al diagnóstico junto con los PPE diseñados. La curva debía tener una diferencia de 3,3 Ct entre las distintas concentraciones (Figura 31). Se analizó la especificidad del producto obtenido mediante una curva de *melting* (Figura 32). En los

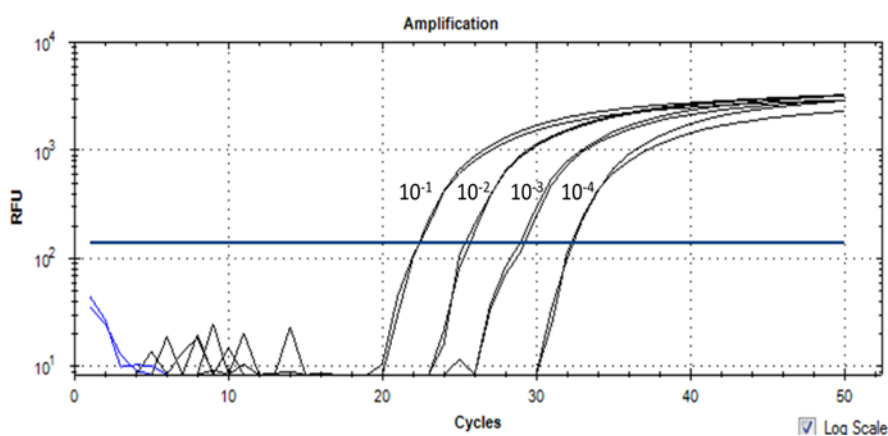
casos que en fue posible el análisis, se determinó la sensibilidad y el rango cuantitativo del ensayo teniendo en cuenta los siguientes criterios (van der Velden et al., 2007):

Criterio de sensibilidad:

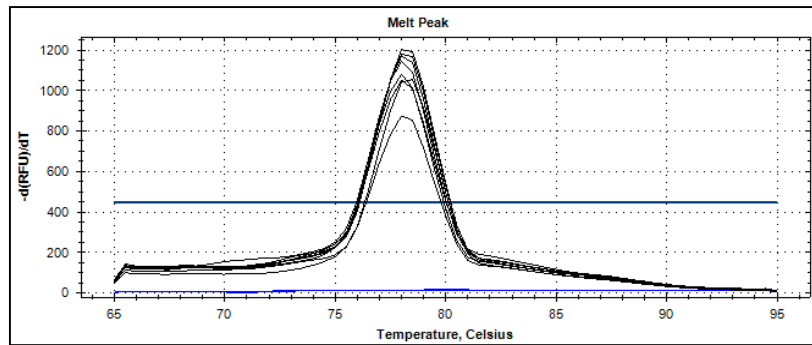
1. tener por lo menos 1 duplicado positivo (sin importar el  $\Delta Ct$ )
2. su mayor Ct debe ser  $\geq 1$  Ct más bajo que el menor Ct del *buffy* (*background* normal)
3. su mayor Ct debe estar no más de 20 Ct por encima de la muestra sin diluir

Rango cuantitativo:

1. ser reproducible (duplicados con  $\Delta Ct \leq 1,5$ )
2. tener una diferencia  $\geq 3$  Ct que el menor Ct del *buffy* (*background* normal)



**Figura 31.** Ejemplo de curva estándar realizada a partir de diluciones seriadas de la muestra del diagnóstico. Las diluciones deben diferenciarse entre sí en 3,3 Ct. Se muestra la curva en color negro y el CST en azul.

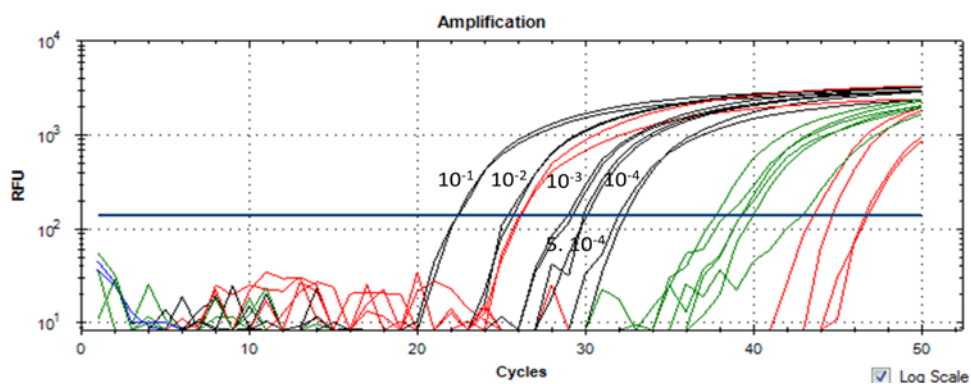


**Figura 32.** Ejemplo de curva de melting realizada a partir de diluciones seriadas de la muestra del diagnóstico. Se muestra en color negro la curva y en color azul en CST. Los productos de amplificación fueron específicos evidenciado por el  $T_m$ . El CST no presenta amplificación.

A continuación se muestran los resultados de los casos analizados:

Caso #4:

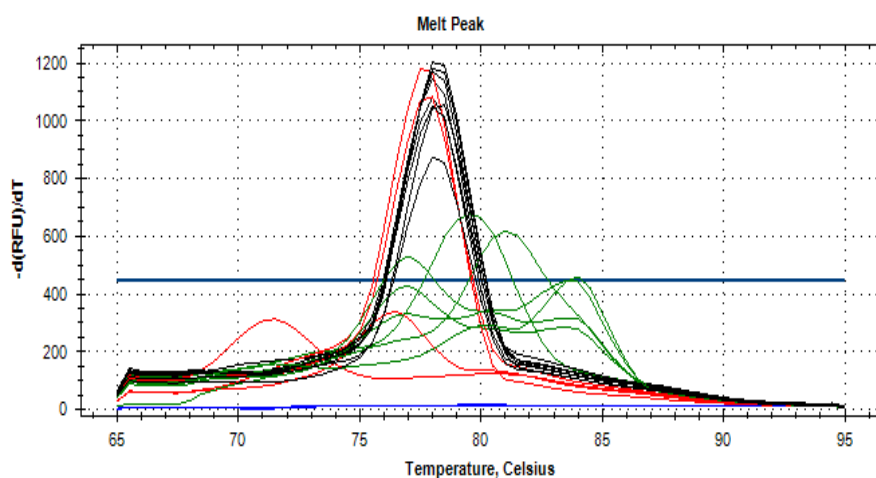
En un mismo experimento se realizó la curva estándar, las muestras del paciente correspondiente a los puntos del control del tratamiento, CST y los 6 controles negativos (*buffy*). El resultado del ensayo se muestra en la Figura 33, donde se observa que el pool de ADN (color rojo) fue amplificado a ciclos muy elevados y alejado de la curva del paciente (color negro). Se observa que 1 muestra (color rojo) fue positiva para la EMR mientras que 2, 1 correspondiente al día 33 y otra a la semana 12, fueron negativas, ya que amplificaron con un Ct mayor al *buffy*.



**Figura 33.** Curva de amplificación correspondiente al caso #4. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestras de seguimiento; color verde: *buffy*; color azul: CST.

La curva de *melting* se muestra en la Figura 34 donde se observa que la amplificación de la muestra positiva del paciente fue específica observándose un pico a 78°C (temperatura de *melting* o Tm) junto con las diluciones de la muestra, mientras que las muestras del paciente con resultado negativo presentan un mínimo de amplificación inespecífica que no interfiere en la cuantificación (Tm 72°C y 76°C). En los controles negativos la amplificación fue inespecífica.

En este ensayo el rango cuantitativo y la sensibilidad coinciden ( $10^{-4}$ ). El valor de EMR calculado en la muestra fue  $>10^{-3}$  ( $7,2 \cdot 10^{-3}$ ), y correspondió a una muestra del fin de la inducción del tratamiento de enfermedad. Este análisis pudo realizarse debido a que la curva estándar del paciente cumplía con los requisitos y a que en la curva de *melting* se observó especificidad del producto amplificado.



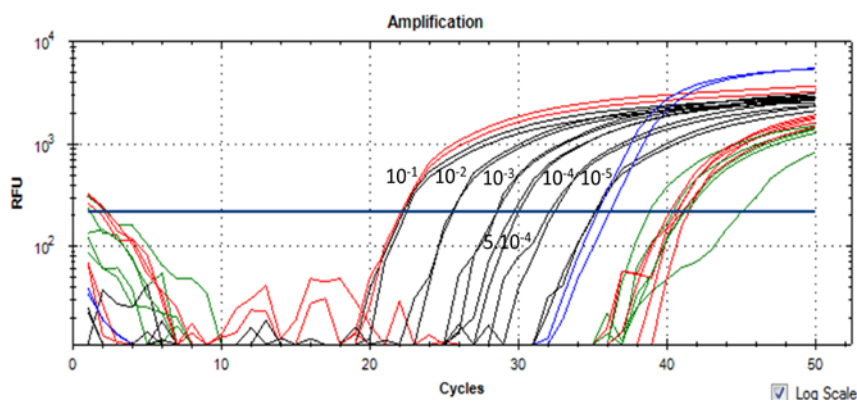
**Figura 34.** Curva de *melting* correspondiente al caso #4. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.

Caso #9:

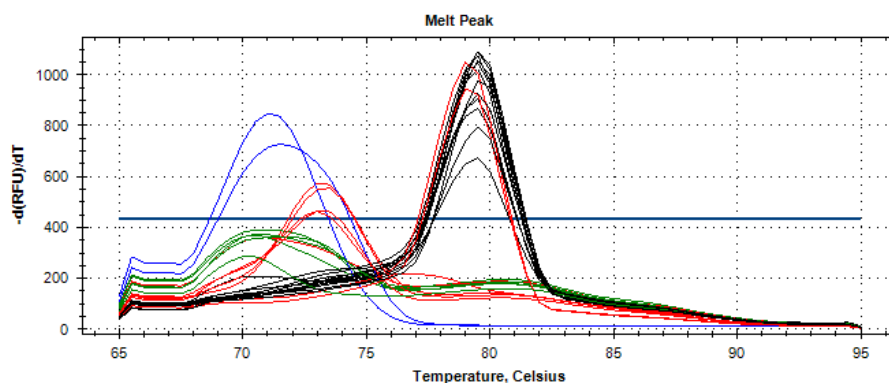
En la Figura 35 se muestra la curva estándar y 3 muestras ensayadas para la detección de la EMR. En este paciente las dos muestras correspondiente al día 33 y a la semana 12

del control del tratamiento fueron negativas, mientras que la muestra correspondiente a la recaída de la enfermedad se observó un resultado positivo  $>10^{-3}$  ( $1,1 \cdot 10^{-1}$ ).

Se observó amplificación inespecífica en el CST a ciclos muy alejados del último punto de la curva estándar. Esa amplificación fue atribuida a la formación de dímeros de *primers* debido al bajo  $T_m$  observado en la curva de melting (Figura 36). En este ensayo el rango cuantitativo fue  $10^{-4}$ , mientras que la sensibilidad fue de  $10^{-5}$ .



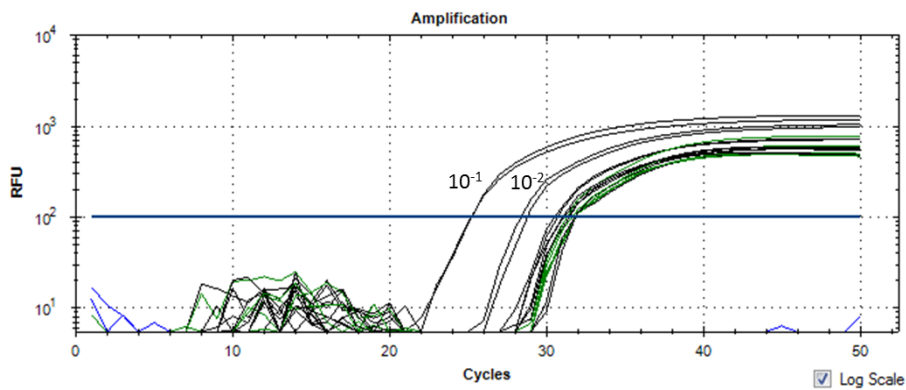
**Figura 35.** Curva estándar correspondiente al caso #9. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.



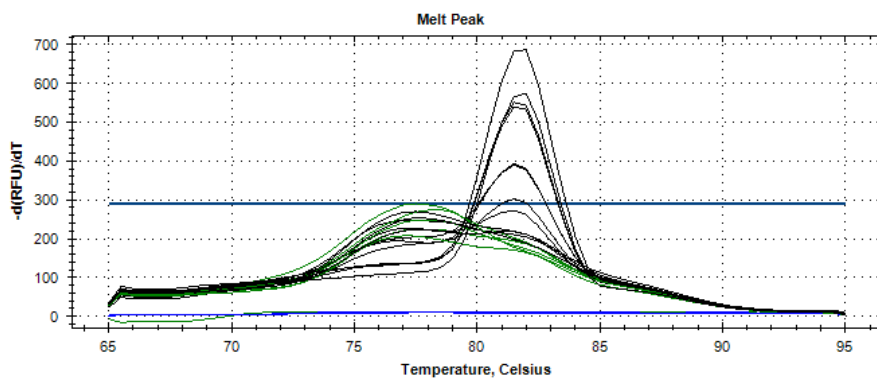
**Figura 36.** Curva de melting correspondiente al caso #9. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.

Caso #11:

En este caso no fue posible determinar el valor de la EMR debido a que la presencia de reacción inespecífica detectada a partir de la dilución  $10^{-3}$ , que disminuye notablemente el rango cuantitativo del ensayo. En la Figura 37 se muestra la curva estándar del paciente, el *buffy* corrido por sextuplicado y el CST. Se observa que el *buffy* reacciona junto con las diferentes diluciones de la muestra, sin embargo en la curva de *melting* se puede identificar fácilmente que la amplificación no es específica diferenciándose del  $T_m$  de la muestra en  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 38).



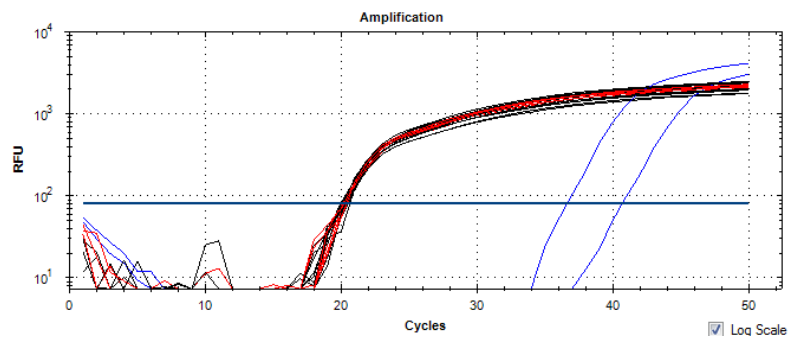
**Figura 37.** Curva estándar correspondiente al caso #11. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.



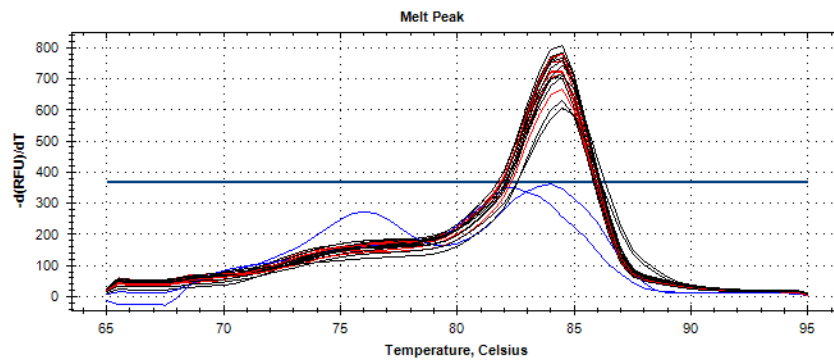
**Figura 38.** Curva de melting correspondiente al caso #11. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.

Caso #13:

En este caso la presencia de amplificación inespecífica imposibilitó determinar la EMR. Si bien el CST no amplificó se observó que en las diluciones de la curva estándar y el buffy la amplificación fue la misma y con el mismo  $T_m$  (Figura 39 y 40) los que significa que la secuencia escogida para el diseño de los PPE no es aceptable.



**Figura 39.** Curva estándar correspondiente al caso #13. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.

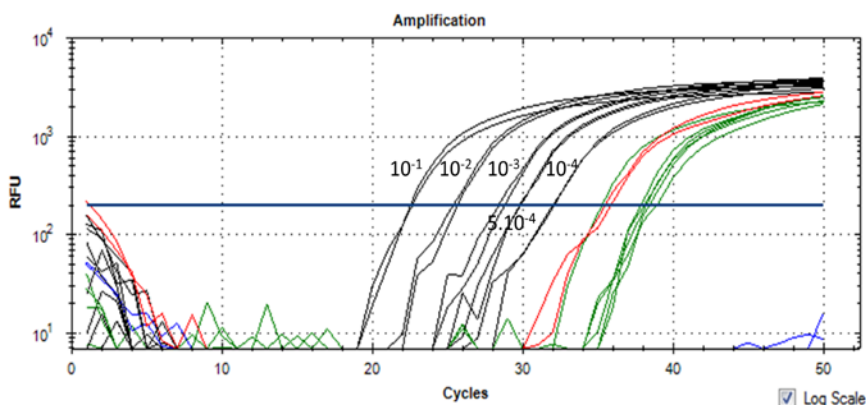


**Figura 40.** Curva de melting correspondiente al caso #13. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.



Caso #26:

En este caso sólo se disponía de la muestra del día 33 del control de seguimiento del tratamiento. El resultado de la determinación de a EMR fue negativo. El rango cuantitativo del ensayo fue  $10^{-4}$  al igual que la sensibilidad. En la Figura 41 se muestra la curva estándar con la muestra negativa del paciente y el CST. Este último control no presentó amplificación, mientras que el sextuplicado del *buffy* amplificó a altos valores de ciclos, que no interferían en determinación de la EMR. En este caso no se realizó la curva de melting.

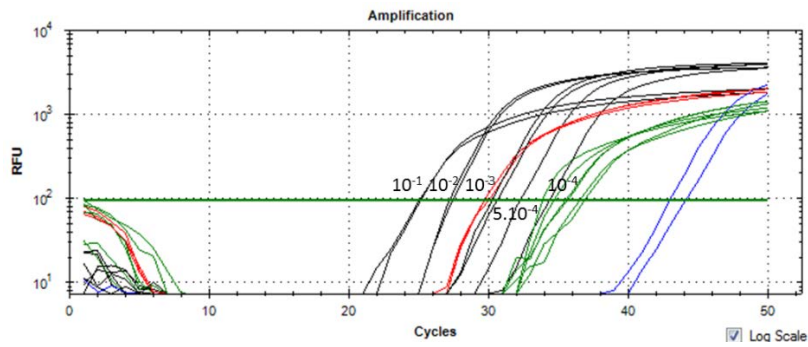


**Figura 41.** Curva estándar correspondiente al caso #26. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: *buffy*; color azul: CST.

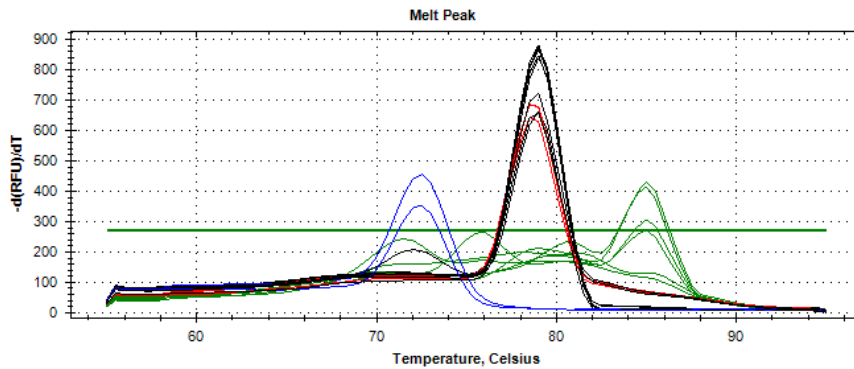
Caso #31:

En la determinación de a EMR la falta de reproducibilidad de las diluciones  $5.10^{-4}$ ,  $10^{-4}$  y la amplificación del *buffy* disminuyeron notablemente el rango cuantitativo del ensayo (Figura 42). La amplificación del *buffy* fue inespecífica, lo cual se demuestra a a partir de los resultados de la curva de *melting* donde se obtuvo una marcada diferencia entre los Tm de la muestra y del *buffy*, siendo el Tm de la muestra 78 °C y el del *buffy* 85 °C (Figura 43). También se observó que en el CST se produce amplificación, con un Tm de 72 °C.

En este ensayo la curva estándar no es óptima, sin embargo el resultado de la determinación de la EMR pudo ser determinado. El resultado de la muestra del paciente correspondiente al día 33 fue positivo. El rango cuantitativo fue  $10^{-3}$  y la sensibilidad fue de  $5 \cdot 10^{-4}$ .



**Figura 42.** Curva estándar correspondiente al caso #31. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.



**Figura 43.** Curva de melting correspondiente al caso #31. Color negro: curva estándar; Color Rojo: muestra; color verde: buffy; color azul: CST.

#### 4.2.10. REARREGLOS DEL GEN *MLL* EN LEUCEMIAS B MADURAS

Se analizaron 3 casos de infantes con LLA B madura, con morfología FAB L1 o L2 y alteraciones gen *MLL*, uno de ellos (el caso #9 de la serie estudiada por LDI-PCR) es el caso #1 de esta población analizada, mientras que los dos restantes son casos analizados por técnicas estándar (bandeo G, FISH o RT-PCR). Los datos clínicos y hematológicos al momento del diagnóstico se muestran en la tabla 19. En la misma se observa que el paciente del caso #2 tenía 13 meses al momento del diagnóstico, pero fue considerado infante a los fines de su tratamiento. Los 3 pacientes presentaron anemia y trombocitopenia. En un caso se observó hiperleucocitosis con hepatomegalia mientras que otro de ellos presentó compromiso extra medular.

La morfología de la MO al momento del diagnóstico mostró blastos de tamaño pequeño a mediano con núcleos irregulares y nucléolos prominentes en algunas células. Todos los blastos fueron descritos como morfología FAB-L1 o L2 (Figura 44) y en todos los casos se descartó la morfología FAB-L3, típica de linfoblastos B maduros. Por citometría de flujo los blastos mostraron un inmunofenotipo de células B maduras (B-IV de la clasificación del EGIL) como se describe en la Tabla 20. La expresión de antígenos inmadurez fue variable: TdT se expresaba en un solo caso, mientras que CD34 y CD10 en 2 de los casos.

Todos los casos presentaron IgM citoplasmática y de superficie, así como la restricción de la cadena liviana lambda, ningún caso exhibió expresión del antígeno mieloide CD15 y 2 casos presentaron expresión de NG2.

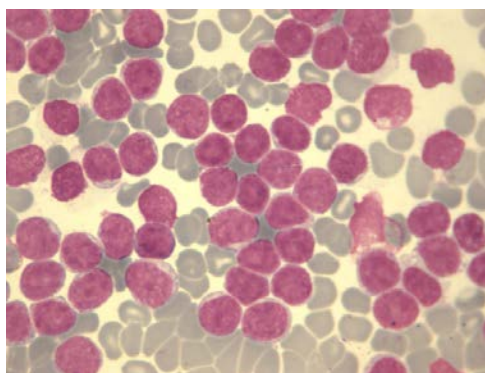
Las anomalías del gen *MLL* fueron detectadas por FISH en todos los pacientes (Tabla 21). En 2 casos los estudios de bandeo G revelaron alteraciones en 11q23 que incluían: un cariotipo complejo que mostraba alteraciones en 11q23 y en 19p13, pero no lo tenía

la típica traslocación t(11;19) (q23;p13); y otro con ins(10;11)(p12;q23q13). En el restante no fue posible obtener metafases para el análisis al momento del diagnóstico.

Por RT-PCR, dos casos fueron positivos en el *screening* para la búsqueda de alteraciones del gen *MLL*. En el caso # 1, se detectó el rearrreglo *MLL-MLLT1* mostrando la fusión del *MLL* exón 10 con el primer exón de *MLLT1*, mientras que en el caso # 2 se detectó la fusión entre el exón 11 de *MLL* y el exón 11 de *MLLT10*.

En cuanto a al tratamiento y seguimientos de los pacientes, los 3 fueron tratados de acuerdo al protocolo Interfant-99 y todos alcanzaron la RC (Tabla 22). Dos pacientes recayeron presentando blastos con el mismo fenotipo y el mismo rearrreglo molecular que al momento del diagnóstico. Ninguno de los pacientes recibió trasplante de médula ósea y el paciente que alcanzó la RC, permanece en RC con un seguimiento de 23 meses.

En los 3 casos los pacientes presentaron recaídas que ocurrieron en MO, una de ellas se presentó en combinación con compromiso testicular. El paciente del caso #3 presentó en la recaída una t(1;11)(p32;q23) detectada por bandeo G, cuyo resultado al momento del diagnóstico no estaba disponible por no presentar metafases analizables.



**Figura 44.** Tinción de May-Grünwald-Giemsa del aspirado de MO del paciente del caso #1 de LLA-B madura y rearreglo de MLL. Se muestra la morfología FAB-L1.

**Tabla 19.** Características clínicas y hematológicas de los 3 pacientes con LLA-B madura y alteraciones en el gen MLL.

CASO	EDAD (meses)	SEXO	WBC (/mm <sup>3</sup> )	Hb (g/dl)	Plq (x10 <sup>9</sup> /L)	HEP	ESP	COMPROMISO EXTRA MEDULAR
1*	8	M	11	7.2	104	No	Si	Piel
2	13	F	39	4.5	11	No	Si	No
3	3	M	857	8.8	46	Si	Si	No

*M: masculino; F: femenino; WBC: recuentos de glóbulos blancos Hb: hemoglobina; Plq: plaquetas; HEP: hepatomegalia; ESP: esplenomegalia. \* Caso #1 es el caso #9 de la tabla 4. Paciente estudiado por LDI-PCR.*

**Tabla 20.** Resultado del inmunofenotipo de los pacientes con LLA-B madura y alteraciones en el gen MLL.

CASO	CD19/Cd79	CD20	cCD22	TdT/CD34	CD10	cIgM	sIg	cadena liviana	CD15	NG2 (7.1)
1*	P/N	N	P	N/N	N	P	M-D	λ	N	ND
2	P/P	-/+	P	P/P	P	P	M	λ	N	P
3	P/P	P	P	N/P	-/+	P	M	λ	N	P

Las muestras fueron consideradas positivo (P) cuando más del 20% de los blastos expresaba el marcador y +/- cuando el marcador fue detectado en menos del 20% de los blastos. ND: no determinado; N: negativo; M: IgM; D: IgD. \* Caso #1 es el caso #9 de la tabla 4. Paciente estudiado por LDI-PCR.

**Tabla 21.** Características clínicas y hematológicas de los pacientes con LLA-B madura.

CASO	FAB	% de infiltración	FISH MLL	Bandeo G	RT-PCR
1*	L1	98	Positivo	46~48,XY,+11,del(11)(q23),add(19)(p13),+mar[cp20]	MLLT-MLLT1
2	L1	85	Positivo	46,XX,add(9)(p24),ins(10;11)(p12;q23q13)[18]/46,XX[2]	MLL-MLLT10
3	L1/L2	90	Positivo	S/M	NEGATIVO(**)

S/M: sin metafases analizables; (\*\*): screening por RT-PCR para los rearrreglos recurrentes. \* Caso #1 es el caso #9 de la tabla 4. Paciente estudiado por LDI-PCR.

**Tabla 22.** Respuesta temprana al tratamiento y seguimiento de los pacientes con LLA-B madura y alteraciones en el gen MLL.

CASO	Respuesta a la Prednisona	Sitio de recaída	SLE(meses)	VIVE
1*	Buena	Medula Ósea	21	no
2	Buena	-	23	si
3	Pobre	Medula ósea y testículos.	4	si

RP: respuesta a la prednisona; B: buena; P: pobre; CF: citometría de flujo; RC: recaída, SLE: sobrevida libre de eventos; n.d: no determinado; N: negativo; MO: médula ósea; Test: testículos. \* Caso #1 es el caso #9 de la tabla 4. Paciente estudiado por LDI-PCR.

### 4.3. MUTACIONES DEL GEN FLT3

En 33 de los 34 casos con alteraciones de MLL confirmados mediante el estudio por LDI-PCR fue posible realizar el estudio de las mutaciones en el gen FLT3. Se detectaron mutaciones del FLT3-TKD en 5 (15,15%) casos, los cuales involucraban a la región codificante para el aspártico 835 y la isoleucina inmediata posterior. En 4 de

ellos, se detectó una mutación puntual que a nivel proteico provoca el cambio del aspártico 835 por aminoácidos con diferentes polaridades (Tabla 23), mientras que en el caso restante se detectó una deleción de 3 nucleótidos que provoca un cambio de aminoácido en la posición 836. En todos los casos las mutaciones detectadas ocurrieron en estado heterocigoto. Con respecto a las mutaciones de tipo FLT3-ITD, no se han detectado en este grupo de pacientes.

**Tabla 23.** Resultado de los estudios de las mutaciones en FLT3.

CASO	DIAG	TIPO DE MUTACION	MUTACIÓN(*)	CONSECUENCIA DE LA MUTACIÓN
7	LLA-ProB	TKD	2503G>C	Asp835His
10	LMA-M5	TKD	2504A>C	Asp835Ala
28	LMA-M5	TKD	2505T>G	Asp835Glu
30	LMA-M5	TKD	2505T>G	Asp835Glu
32	LMA-M5	TKD	2509delCAT	Ile836Met

(\*) El nucleótido número 1 corresponde a la A del codón ATG de iniciación de la traducción ubicado en el exón 1 del gen FLT3 (GenBank: Z26652.1).

#### 4.4. MUTACIONES DEL GEN GATA-1

Los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con SD y MAT o LMCA al momento de su diagnóstico se detallan en la Tabla 24. Las medianas y rangos de edad de las poblaciones estudiadas fueron 9 [1-41] días para los pacientes con MAT y 18 [9-27] meses para los pacientes con LMCA. La mediana del recuento leucocitario fue de  $35,0 \times 10^9/L$  (rango: de 4,7 a 120,0). Uno de los pacientes con MAT desarrollo LMCA nueve meses después de presentar la RC espontánea (casos #6 y #12).

Los resultados de los estudios citogenéticos se muestran en la Tabla 25. El paciente con MAT que desarrolló posteriormente LMCA mostró alteraciones citogenéticas adicionales en el momento del diagnóstico de la LMCA.

Las mutaciones detectadas en el exón 2 del gen GATA-1 se describen en la Tabla 26, incluyendo las consecuencias de las mismas a nivel proteico y su clasificación según lo propuesto por Kanezaki (Kanezaki *et al.*, 2010).

De las 13 mutaciones identificadas en las muestras de MAT y LMCA, 8 (62%) correspondieron a inserciones/deleciones/duplicaciones y 5 (38%) a sustituciones de bases. Se detectaron mutaciones en todos pacientes con MAT; los tipos de mutaciones caracterizadas fueron duplicaciones (n= 5), sustituciones de nucleótido simple (n= 4) y deleción (n= 1). En 3 de los 4 pacientes con LMCA se evidenció la presencia de duplicaciones (n= 2) o sustitución de nucleótido simple (n= 1).

El análisis de las consecuencias de las mutaciones a nivel proteico, predichas a partir del programa computacional, demostró la presencia de un codón de terminación prematuro de la traducción en 5 muestras (MAT= 4/LMCA= 1), la pérdida del exón 2 por modificaciones en los sitios de *splicing* en 6 casos (MAT= 5/LMCA= 1) en los cuales las mutaciones afectaban sitios críticos de reconocimiento de la señal (Figura 45). En tres pacientes se observaron mutaciones que se traducen en cambio de la secuencia aminoacídica, uno de ellos presentó además un codón de terminación prematuro en la posición 142 de la proteína.

No se detectaron mutaciones en *GATA-1* en las muestras de pacientes con diagnóstico de LMA con trisomía 21 de niños sin SD, ni en los casos de Leucemias Agudas no LMCA de niños con o sin SD.



En la evolución de los 10 pacientes con MAT se observó que 8 alcanzaron la RC en forma espontánea, sin recibir ningún tipo de tratamiento quimioterápico, con una media de 3 [1-5] meses. Un paciente falleció antes de alcanzar la RC, debido a una infección respiratoria aguda y un paciente se encuentra perdido en su seguimiento al momento de elaboración de este trabajo de tesis.

De los 8 pacientes que alcanzaron la RC, en forma espontánea, 3 permanecen en RC con +48, +55 y +90 meses de seguimiento. De los restantes 5 pacientes que alcanzaron la RC, 1 paciente desarrolló LMCA luego de 9 meses de RC, 3 pacientes fallecieron en RC debido a sepsis en dos casos y a descompensación de su cardiopatía en el restante. Un paciente dejó de concurrir a control desde hace 31 meses, y se encuentra perdido en su seguimiento al momento de la elaboración de esta tesis.

En cuanto a los 4 pacientes con LMCA, todos alcanzaron la RC. Uno de ellos, recayó tempranamente, se le administró un segundo tratamiento, pero falleció debido a complicaciones infecciosas. No se observó respuesta nula al tratamiento en este grupo de pacientes, ni muertes durante la fase de inducción. Los restantes 3 pacientes viven en RC a +22, +46 y +65 meses desde su diagnóstico.

**Tabla 24.** Datos clínicos y de laboratorio de los pacientes con SD y MAT o LMCA al momento del diagnóstico.

CASO	EDAD (*)	DIAG	SEXO	WBC (/mm <sup>3</sup> )	Hb (g/dl)	Plq (x10 <sup>9</sup> /L)	Hepato megalia	Espleno megalia
1	4 d	MAT	M	45,0	15,1	25	si	si
2	22 d	MAT	F	35,1	9,8	55	si	si
3	13 d	MAT	M	120,0	16,5	186	si	si
4	9 d	MAT	M	83,6	18,8	56	si	si
5	1 m	MAT	F	8,4	9,3	23	si	si
6(&)	6 d	MAT	M	47,2	16,3	195	si	no
7	40 d	MAT	M	57,0	8,7	144	si	si
8	9 d	MAT	M	30,0	12,3	102	si	si
9	1 d	MAT	F	40,0	8,5	531	si	si
10	5 d	MAT	M	34,9	15,5	44	si	si
11	9 m	LMCA	F	6,9	10,2	84	si	no
12(&)	11 m	LMCA	M	4,7	7,5	18	no	no
13	25 m	LMCA	M	9,3	4,4	23	si	si
14	27 m	LMCA	F	25,4	3,7	10	si	si

WBC: recuento leucocitario. (\*)Edad: d (días), m (meses). (&) Mismo paciente.

**Tabla 25.** Resultado de los estudios citogenéticos realizados en las muestras de MO de los 14 casos con DS y MAT o LMCA.

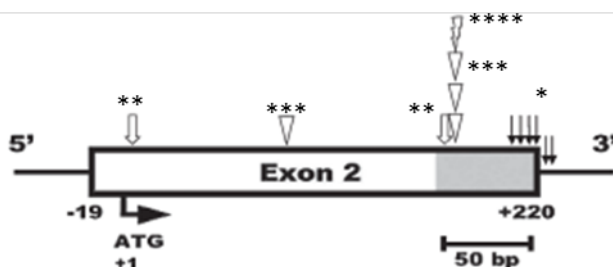
CASO	DIAG	CARIOTIPO
1	MAT	47,XY,+21c[20]
2	MAT	47,XX,+21c[20]
3	MAT	47,XY,+21c[20]
4	MAT	46,XY,-19,+21c[3]/47,XY,+21c [14]
5	MAT	47,XX,+21c[20]
6(&)	MAT	47,XY,+21c[20]
7	MAT	47,XY,+21c[20]
8	MAT	47,XY,+21c[20]
9	MAT	46,XX,+21c,der(21;21)(q10;q10)c[20]
10	MAT	47,XY,+21c[20]
11	LMCA	47,XX,+21c[20]
12(&)	LMCA	47,XY, -7, +21c, +mar[10]/48, XY, idem, +21[6]/47, XY, +21c[4]
13	LMCA	47,XY,i(7)(q10),+21c[4]/47,XY,+21c[16]
14	LMCA	46,XY,der(15)t(9;15)(q11;q11.2),17,add(19)(p13.3),der(21)t(17;21)(q11.2;p13),+mar[16] /47,idem,+21c[4]

MAT: mielopoyesis anormal transitoria; LMCA: leucemia megacarioblástica aguda; (&): muestras correspondientes al mismo paciente.

**Tabla 26.** Resumen de las mutaciones del gen *GATA-1* en las muestras de médula ósea estudiadas y predicción de sus consecuencias a nivel proteico.

CASO	DIAG	MUTACIÓN(*)	CONSECUENCIA DE LA MUTACIÓN	SUBTIPO DE MUTACION (**)
1	MAT	218 ins5 (dup213-217)	Error en Splicing	ES
2	MAT	5A>G	Glu2Gly	NC
3	MAT	89delAG	(Val32Phe) + 38Stop	PTC 1-5'
4	MAT	IVS2+1(220+1) G>A	Error en Splicing	ES
5	MAT	185 ins34 (dup151-184)	Tyr62Stop	PTC 1-5'
6(&)	MAT	185 ins35 (dup150-184)	Tyr62Stop	PTC 1-5'
7	MAT	219 A>G	Error en Splicing	ES
8	MAT	217 ins5 (dup229-233) +del4 (217-220)	Error en Splicing	ES
9	MAT	IVS2+2(220+2) T>C	Error en Splicing	ES
10	MAT	185 insG + ins16 (dup169-184)	Tyr62Trp + 142Stop	PTC 1-3'
11	LMCA	184 ins35 (dup149-183)	Tyr62Arg	NC
12(&)	LMCA	185 ins35 (dup150-184)	Tyr62Stop	PTC 1-5'
13	LMCA	WT	WT	NC
14	LMCA	220 G>A	Error en Splicing	ES

(\*) El nucleótido número 1 corresponde a la A del codón ATG de iniciación de la traducción ubicado en el exón 2 del gen *GATA1* de acuerdo con la secuencia de referencia (NM\_002049.3). (\*\*) Clasificación según Kanazaki et al., 2010. ES: error en splicing; NC: no corresponde. (&) Mismo paciente.



**Figura 45.** Esquema representativo del exón 2 del gen *GATA-1*. Se señala la ubicación de los sitios de las mutaciones detectadas. El símbolo indica el tipo de consecuencia a nivel proteico. \*Pérdida del exón 2 por error en el corte y empalme, \*\*cambio en la secuencia aminoacídica, \*\*\*codón de terminación de la traducción prematuro en el exón 2 y \*\*\*\*codón de terminación de la traducción prematuro en el exón 3.

## 5. Discusión

## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. MODIFICACIONES REALIZADAS EN LA TÉCNICA LDI-PCR PARA LA PUESTA A PUNTO

Las modificaciones realizadas posibilitaron la puesta a punto de la técnica de LDI-PCR para la detección de los rearrreglos de *MLL*. Dicha puesta a punto se basó en los datos previamente publicados y a partir de los mismos se comenzó a realizar pequeñas modificaciones para encontrar las mejores condiciones para la puesta a punto, ya que muchas veces pequeños cambios en los reactivos o el uso de reactivos de diferentes marcas comerciales pueden influenciar notablemente en los resultados, un claro ejemplo de esto es encontrar que el buffer de ligación contenía agentes que actuaban como inhibidores de la reacción de PCR.

Evaluar cada paso descrito en bibliografía y estudiar la secuencia de los *primers* permitió detectar que la secuencia de uno de los *primers* descrito originalmente no coincidía con la secuencia del gen, a pesar de usar la misma secuencia de referencia.

Finalmente el diseño de *primers* localizados en secuencias más internas a los descritos en bibliografía permitió consolidar la puesta a punto de esta técnica.

### 5.2. CARACTERIZACIÓN DE LOS REARREGLOS DEL GEN *MLL*

En el presente trabajo de tesis se realizó la correcta caracterización molecular de 34 pacientes pediátricos con leucemia aguda y rearrreglos del gen *MLL* que fueron diagnosticados y tratados en el HPG. La presencia de alteraciones en este gen es una variable independiente en el análisis de multivarianza realizado en el contexto del Protocolo Interfant-99 (Pieters et al., 2007), que define un grupo con una sobrevida

estadísticamente inferior. Esta es una las bases para definir la necesidad del estudio de los rearrreglos de este gen, ya que a partir de esta definición puede individualizarse un grupo de pacientes que requiere de un tratamiento más especializado (Pieters et al., 2007). La identificación de las alteraciones de *MLL* es un requisito obligatorio para decidir el tratamiento preciso que debe recibir cada paciente. Si bien, las técnicas de diagnóstico utilizadas en la rutina diaria para la detección y caracterización genética de estas alteraciones son varias, la técnica de LDI-PCR parece ser una de las técnicas más útiles para la caracterización a nivel molecular. A pesar, de su ser una técnica muy laboriosa, su aplicación es de gran utilidad y de suma importancia no sólo para la caracterización, sino que también como técnica complementaria al bandeo G, al FISH y a la RT-PCR para la detección de las anomalías de *MLL*. El uso de esta técnica permite la detección de cualquier tipo de rearrreglo de *MLL*, identificando además el compañero de fusión correspondiente.

En los resultados de esta tesis se muestra que LDI-PCR detectó el 100% de los casos con *MLL-r*, detectando la alteración en forma directa 5'-3' (*MLL-X*) o en forma recíproca 3'-5' (*X-MLL*), siendo especialmente útil en los 4 casos con estudio citogenético normal (casos #1, #16, #23 y #24) y en el caso en el cual no se habían obtenido metafases (caso #27) para el estudio de bandeo-G. Por otro lado, en el caso #24 la alteración del gen *MLL* tampoco fue detectada por ninguna de las otras técnicas de rutina empleadas. Este resultado, permitió identificar al paciente como un paciente con mal pronóstico y asignarlo a un grupo con riesgo más alto, que sin este resultado se le hubiera administrado una terapia estándar, la cual seguramente no le sería beneficiosa. Además, en los casos #5, #9, #10, #12, #15, #26 y #34, LDI-PCR permitió identificar la alteración del gen *MLL* y su compañero de fusión exacto. En algunos casos en los cuales la alteración detectada orientaba al compromiso de un compañero de

fusión diferente (casos #12 y #31), LDI-PCR permitió identificar el compañero de fusión correcto. Finalmente, fue posible la descripción de un gen de fusión no descrito previamente (caso #5), en el cual lo que se detectaba era una inversión del cromosoma 11, en 11q23.

La técnica de FISH, considerada la técnica *Gold standard*, fue una herramienta citogenética molecular fundamental al momento del diagnóstico ya que permitió detectar con cierta rapidez una parte importante de las alteraciones del gen *MLL*, esto fue en gran parte por la posibilidad de realizarse en núcleos en interfase. Si bien el FISH no brinda un resultado con información tan detallada como lo hace el bandeo G, su resultado es condición suficiente para estratificar, junto con los datos biológicos y la respuesta a la prednisona, correctamente a los pacientes. De los resultados obtenidos se puede deducir que esta técnica no puede ser utilizada como única técnica de diagnóstico, sino que debe usarse como primer paso para el abordaje del estudio de los pacientes infantiles y complementarse con otras, especialmente porque su sensibilidad no permite el seguimiento de la EMR. Un claro ejemplo de esto es el estudio del caso #24, donde a pesar de que el paciente tenía el rearreglo molecular *MLL-MLLT10*, el FISH no detectó la alteración de *MLL*.

El empleo de FISH en el laboratorio como técnica de rutina para la detección de los rearreglos no fue siempre sencillo, ya que la disponibilidad de la sonda correspondiente no siempre se encuentra en el mercado con facilidad, lo que hace más relevante aún la necesidad de la puesta a punto y aplicación de la técnica de LDI-PCR en nuestro hospital.

La incorporación de LDI-PCR como técnica de diagnóstico complementaria a las ya existentes en nuestro hospital, permitió ampliar el conjunto de las herramientas



---

disponibles para el correcto diagnóstico de las LAI, permitiendo administrar una terapia más personalizada a los pacientes. Si bien LDI-PCR detectó la totalidad de las alteraciones, esta no es una técnica de elección primaria o única para el diagnóstico, no sólo por su complejidad, y requerimiento de personal altamente entrenado en técnicas moleculares para su desarrollo, sino porque como se describe en bibliografía internacional y se confirma con los resultados obtenidos en este trabajo, la mayoría de los pacientes infantiles presentan rearrreglos recurrentes que pueden ser detectados en varios casos por FISH, bandeado G y RT-PCR, obteniéndose resultados en tiempos más cortos.

Además de su utilidad como técnica complementaria de diagnóstico, LDI-PCR fue puesta a punto y desarrollada fundamentalmente por ser la única herramienta que proporciona un blanco molecular específico de cada clon leucémico que puede ser utilizado para la determinación de la EMR, evaluando así, la respuesta al tratamiento *in vivo*.

El empleo de LDI-PCR permitió caracterizar molecularmente los rearrreglos de *MLL* en todos los casos analizados, permitiendo conocer la secuencia de fusión específica del clon leucémico y de cada paciente en particular. La caracterización de estos rearrreglos es fundamental en estos pacientes para poder determinar la EMR, como se mencionó antes, ya que como se muestra en los resultados la mayoría de estos pacientes con LLA presentan rearrreglos de Ig/TCR adecuados para ser usados como blanco molecular. Incluso esta secuencia puede ser utilizada para el seguimiento de los pacientes infantiles con LMA, siendo esta la única posibilidad a nivel molecular utilizando ADN en la actualidad.

En este trabajo, se encontró que en los pacientes infantiles con LLA, la alteración de *MLL* predominante fue el gen de fusión *MLL-MLLT2*, mientras que en los pacientes con LMA resultó ser el *MLL-MLLT10*. Este hallazgo probablemente podría estar relacionado con el número limitado de pacientes, ya que en bibliografía internacional se describe como más frecuente al gen de fusión *MLL-MLLT3* (Meyer et al., 2006; 2009b; 2013). Sin embargo, el hecho de encontrar que, 12 de los 13 infantes con el rearreglo *MLL-AFF1*, (92,3%) fueron menores a 6 meses de edad concuerda con los datos publicados en bibliografía internacional (Jansen et al., 2007). En este estudio Jansen describe al analizar los transcritos de fusión en 133 infantes con LLA que el rearreglo *MLL-AFF1* predominó en los infantes de menor edad, especialmente en los menores de 6 meses de edad al momento del diagnóstico de la leucemia.

Al analizar la distribución de los compañeros de fusión de *MLL* y los sitios de ruptura de los pacientes estudiados, se observa que en los infantes con LLA Pro-B, predominaron los rearreglos *MLL-MLLT2*, donde la zona frecuentemente involucrada en la ruptura y fusión es la del intrón 11. También se observó que en los pacientes, independientemente de la edad y el fenotipo de la leucemia, los sitios de ruptura en *MLL* ocurren mayoritariamente en secuencias intrónicas. Al analizar la distribución de los sitios de ruptura en los casos de LMA, se encontró que frecuentemente están involucrados los intrones 10 y 11. Estos resultados en conjunto, coinciden con los datos de la bibliografía internacional, donde claramente se describe que en los infantes la zona de *MLL* más afectada se encuentra en el SCI que involucra a los intrones 10 y 11.

En los casos de LLA con fenotipo Pro-B las rupturas frecuentemente ocurrieron en el intrón 11, a diferencia de los Pre-B cuya distribución fue más heterogénea, involucrando los intrones 3, 9, 10 y 11.

Por otro lado, los resultados obtenidos, nos llevaron a incluir en el *screening* de LMA la búsqueda del transcrito de fusión *MLL-MLLT10* por RT-PCR siendo de suma importancia en los casos de LMA sin otras anomalías recurrentes demostrables.

En este trabajo describimos también, el caso de un paciente (caso #26) con una delección 11q23 evidenciada por el estudio citogenético convencional, en el cual mediante el estudio de LDI-PCR, pudo demostrarse la fusión entre el *MLL* y el *MLLT4*. Este hallazgo podría ser explicado debido a que la t(6;11) (q27;q23) puede resultar crítica y por lo tanto no ser detectable mediante el bandeo G al microscopio óptico.

Dos casos (#3 y #10) tenían una traslocación compleja que involucra tres cromosomas, y en sólo uno de ellos fue posible detectar la alteración de la banda 11q23 por citogenética convencional. Sin embargo, en ambos casos, la alteración de *MLL* fue evidenciada por FISH, RT-PCR y por LDI-PCR. Este hallazgo refuerza la idea de que las técnicas citogenéticas y moleculares son útiles y complementarias para lograr el correcto diagnóstico de los pacientes. Como se puede observar, sin estos últimos resultados este paciente no habría sido considerado de mal pronóstico.

Del total de casos analizados, en 2 de ellos se observó fusiones de *splicing*. Estas fueron generadas por la fusión a nivel genómico de la parte 5' del gen *MLL* con una región *upstream* del gen *MLLT1*. Como resultado por RT-PCR en ambos casos se detectó el ARNm funcional de *MLL*, en el cual el exón 5' del *MLL* resulta unido mediante *splicing* al exón 2 del gen compañero del *MLL*. Este es un mecanismo que ha sido descrito para la fusión *MLL-MLLT1* (Meyer et al., 2007; 2009b).

Si analizamos las rupturas de *MLL* de la población estudiada, encontramos que no hay asociación entre la distribución de los puntos de ruptura en el gen *MLL* y la edad de los pacientes, aunque existen publicaciones que, al comparar los pacientes infantiles con los

---

pediátricos mayores a 1 año, encuentran que los puntos de rupturas en los intrones 10 y 11 predominan en los primeros (Meyer et al., 2009b). La discrepancia observada puede explicarse no sólo por el número limitado de pacientes analizados, sino también por el hecho de que en este estudio se centró en los pacientes infantes y no en pacientes pediátricos mayores a 1 año. Tampoco se encontró asociación entre los sitios de recombinación dentro de *MLL* y el inmunofenotipo o la etapa madurativa de los blastos.

Las traslocaciones cromosómicas recíprocas y balanceadas fueron los rearrreglos citogenéticos más frecuentemente observados, detectándose en menor cantidad otras anomalías en el brazo largo del cromosoma 11, tales como deleciones, inserciones e inversiones. Estos resultados coinciden con los datos previamente publicados en bibliografía internacional (Meyer et al., 2009b).

En cuatro de los casos analizados, se encontró que presentaban un cariotipo normal mediante bandeo G, mientras que en 3 de ellos, en el estudio de FISH realizado en núcleos en interfase, se encontró división de la señal. Esto podría deberse a la presencia de una anomalía cromosómica críptica o a una población clonal demasiado pequeña para ser detectada por la sensibilidad de los estudios citogenéticos convencionales, que es aproximadamente un 10% (2 metafases patológicas en 20 observadas).

Como se dijo anteriormente, los pacientes con anomalías en *MLL* presentan un pobre pronóstico y son tratados en general de acuerdo a protocolos de alto riesgo (Harrison et al., 2010; Muntean et al., 2012). Acorde con esta información, en la población estudiada se encontró que la mayoría de los pacientes tuvo una baja probabilidad de supervivencia, debida especialmente a desarrollo de recaídas de la enfermedad y también a la ocurrencia de muertes durante la fase de inducción o en remisión completa, independientemente de tener LLA o LMA. Se observó un 6% de muertes durante la fase

---

de inducción y un 18% de muertes en remisión completa. Catorce pacientes presentaron recaída de la enfermedad y 11 (32% del total) de ellos permanecen en remisión completa. Como era de esperar, no se encontró ninguna asociación entre la respuesta al tratamiento y evolución de los pacientes y el gen compañero de fusión involucrado en los rearreglos, lo que concuerda con los resultados publicados en el análisis del protocolo Interfant-99 (Pieters et al., 2007) donde se demuestra que en estos casos de leucemias todas las anomalías *MLL* confieren mal pronóstico, sin diferencias estadísticamente significativas para los diferentes genes de fusión.

Con respecto a la cuantificación de la EMR por PCR en tiempo real utilizando los rearreglos de Ig/TCR como blanco molecular, es sabido que es un potente predictor de los resultados en el tratamiento de LLA. Esta útil herramienta para la determinación de la EMR en la mayoría de los casos de leucemias pediátricas, puede no ser aplicable a los pacientes infantiles debido a la falta de rearreglos de Ig/TCR o a la presencia de rearreglos de Ig/TCR incompletos o de baja complejidad. Los rearreglos también pueden completarse o ser editados durante el tratamiento, dando lugar a resultados falsos negativos en la cuantificación de la EMR. Este hecho podría estar probablemente relacionado con la inmadurez de blastos leucémicos con *MLL-r* (Darlow et al., 2005). La caracterización de la secuencia de fusión a nivel genómico permite el diseño de *primers* específicos que reconozcan en cada paciente la secuencia de fusión del clon leucémico. B. Considerando la alta frecuencia de rearreglos de *MLL* de la población de infantiles, los genes de fusión constituyen un excelente blanco molecular para la determinación de la EMR por varias razones, debido a que son específicos de cada clon leucémico, son estables en el tiempo, y permiten evaluar la respuesta a la terapia en los casos de pacientes con clones sin rearreglos de Ig/TCR.

### 5.3. DETECCIÓN DE REARREGLOS INFRECIENTES POR RT-PCR

A partir de los resultados obtenidos mediante LDI-PCR, se observó que 7 (58%) de los 12 casos analizados con diagnóstico de LMA (FAB-M5) presentaron traslocaciones que involucraban al gen *MLLT10*. De ellos, mediante el empleo de la técnica de FISH se detectaron 6, pero sólo 1 había sido detectado por el estudio citogenético convencional de bandeó G.

Por otro lado, cuando se analizó el caso #1 por LDI-PCR no fue posible la detección del rearreglo de *MLL* en forma directa, pero sabiendo que los resultados mostraban una fuerte asociación entre LMA-M5 y la presencia del rearreglo *MLL-MLLT10*, se decidió realizar la búsqueda del rearreglo por RT-PCR, obteniéndose un resultado positivo.

En este paciente no ha sido posible detectar el gen de fusión *MLL-MLLT10*, seguramente debido a que el sitio de fusión podría encontrarse muy alejado de los sitios de restricción de la enzima *BamHI*. No obstante, cuando se realizó la búsqueda de rearreglos recíprocos mediante LDI-PCR, se encontró el rearreglo *SVIL-MLL* y no el esperado *MLLT10-MLL*. El gen *SVIL* se encuentra ubicado en el brazo pequeño del cromosoma 10, en 10p11, por lo cual es factible pensar en una alteración que involucre a *MLL* (11q23), *MLLT10* (banda 10p12) y *SVIL* (10p11)<sub>2</sub> con pérdida o recombinación del material genético.

Estos resultados, sumado a la falta de disponibilidad de la sonda en varias oportunidades, condujeron a la incorporación de la búsqueda del transcrito de fusión *MLL-MLLT10* al *screening* de LMA por RT-PCR en la en nuestro laboratorio. A tal fin se realizó la puesta a punto de dicha técnica de RT-PCR en las etapas iniciales de este trabajo de tesis.

La puesta a punto de la PCR para la detección de los transcritos de fusión *MLL-MLLT4*, *MLL-MLLT6*, *MLL-MLLT11* y *MLL-BTBD18* permitió ampliar el panel de búsqueda de las alteraciones de *MLL* en el laboratorio. Estas determinaciones no fueron incorporadas al *screening* de rutina de leucemias debido a su baja frecuencia, pero son realizadas con la finalidad de certificar el hallazgo de estas alteraciones infrecuentes, cuando las mismas son sospechadas debido a la observación de alteraciones citogenéticas en el bandeo G que involucran a las bandas cromosómicas en las que se encuentran ubicados estos genes.

#### **5.4. DETERMINACIÓN DE LA EMR MEDIANTE REARREGLOS DE MLL**

En el contexto del presente trabajo de tesis se sentaron las bases para la determinación de la EMR por PCR en tiempo real en los pacientes en los cuales se detectan alteraciones de *MLL*. Dicha puesta a punto resultó laboriosa y dificultosa. Los principales problemas hallados fueron: En primer lugar, para la PCR en tiempo real se decidió utilizar los PPE junto con la química de monitoreo basada en *SYBR Green*. La utilización de este fluoróforo como sistema de detección es más económica que las sondas específicas, sin embargo presenta varias desventajas, una de la más importante es que la señal emitida no siempre es específica, porque el fluoróforo emite independientemente de la identidad del amplicón del ADN obtenido. Por esta razón es necesario verificar la especificidad de la señal detectada, analizar la curva de disociación y comprobar que la señal de fluorescencia obtenida se deba sólo a la amplificación del blanco. En los experimentos ensayados se observó que la inespecificidad detectada en algunos casos imposibilitó realizar la correcta cuantificación de la EMR. Si bien cuando se ensayaron los PPE a través de PCR convencional se obtuvo en todos los casos una única banda, al analizar las curvas de

RQ-PCR se observó señal inespecífica en los controles que contenían un *pool* de ADN. También se observó que en varios casos en el CST ocurrió amplificación. Al analizar la curva de *melting* en estos casos donde la única fuente de ADN es la de los *primers*, se atribuyó esa señal a la formación de dímeros de PPE debido a su bajo  $T_m$ .

A pesar de la alta inespecificidad detectada en algunos casos, en el análisis de las curvas de *melting* se encontró que el  $T_m$  de la señal específica fue marcadamente diferente al de la señal inespecífica, pudiendo ser diferenciadas con facilidad. Sin embargo, al graficar el incremento de la fluorescencia ( $\Delta R_n$ ) en función de cada ciclo de PCR de las diluciones decimales seriadas ambas señales se superponen imposibilitando obtener una curva estándar que permita la correcta cuantificación.

La detección de señal inespecífica en las curvas de RQ-PCR que no fue encontrada en la PCR convencional puede ser atribuida a la sensibilidad de la técnica, ya que la señal inespecífica, en la mayoría de los casos, comenzó a ser evidenciada entre la dilución  $5 \cdot 10^{-4}$  y  $10^{-4}$ . Por otro lado, la inespecificidad detectada en este rango de diluciones disminuye notablemente el rango cuantitativo.

Los rearrreglos de *MLL* encontrados en este trabajo involucraron, en su gran mayoría (88,2%), a secuencias intrónicas. Estas secuencias cercanas al sitio de ruptura contienen numerosas repeticiones de un mismo nucleótido o repeticiones de una misma estructura nucleotídica, que si bien dificultó y limitó las posibilidades de diseño de PPE, no lo imposibilitó. Uno de los requisitos fundamentales de cada uno de los *primers* que compone el juego de PPE, es que reconozca la secuencia específica del gen blanco que se requiera detectar. Este requisito fue evaluado por alineamiento de secuencias mediante el programa BLAST y en todos los casos se obtuvo un alto porcentaje de especificidad. No obstante, el hecho de que los rearrreglos ocurran en secuencias



intrónicas en la práctica y con *SYBR Green* resulta muy difícil no detectar cierto grado de inespecificidad.

Una posible solución a este problema es utilizar sondas marcadas con fluoróforos, que si bien tienen un mayor costo comercial, de acuerdo con la bibliografía permiten solucionar el problema de la inespecificidad y obtener resultados con alta sensibilidad.

Uno de los inconvenientes que se presentan en la utilización del sistema de sondas en la determinación de la EMR por rearrreglos de *MLL* en los infantes es el económico, debido a que se debe disponer de una sonda por paciente y este hecho representa un costo muy oneroso para nuestra salud pública. Por otro lado, resulta importante que tener en cuenta que los pacientes infantes desarrollan complicaciones relacionadas a la leucemia o con la toxicidad del tratamiento y que en la mayoría de los casos provoca la muerte del paciente (reflejado en las curvas de sobrevida de los infantes). El hecho de la rápida evolución de la enfermedad junto con las complicaciones relacionadas, provoca que muchas veces los infantes no lleguen con vida a los tiempos de control de tratamiento donde debería ser evaluada la EMR. Por estas razones, no parece probable que en caso de detectar enfermedad mínima residual pudiera intensificarse el tratamiento, sino más bien debería enfocarse a disminuir la intensidad del mismo en aquellos pacientes con EMR indetectable.

Debe tenerse en cuenta que sería muy beneficioso para este grupo de pacientes profundizar en la búsqueda de nuevos factores pronósticos para adecuar el tratamiento y así disminuir el porcentaje de pacientes que fallecen antes de llegar a ser evaluada la EMR en los puntos del control del tratamiento.

## 5.5. ANALISIS DE LAS SECUENCIAS DE FUSIÓN DE LOS REARREGLOS RECÍPROCOS

En los 9 casos en los que se buscaron los rearreglos de *MLL* en forma directa y recíproca, excluyendo al caso #1 y #19 por encontrarse sólo el rearreglo recíproco, al analizar la zona de la secuencia de fusión se encontró que la fusión puede ocurrir con secuencias anteriores o posteriores al punto de ruptura. A partir de la base bibliográfica, lo esperado era encontrar en todos los casos que la fusión ocurra con secuencias posteriores. Interesantemente, esto ocurrió en 6 de los casos analizados, mientras que en 3 casos ocurrió lo opuesto. La fusión ocurrió en secuencias de ADN anteriores al sitio de ruptura. Probablemente existan traslocaciones con microdeleciones que no pueden ser observadas por las técnicas citogenéticas, las cuales a veces ocurren en *MLL* (casos # 5, 17, 20, 21 y 22) y a veces en el compañero de fusión (casos #6, #14, #16 y #29)

Al analizar las secuencias de fusión de los 34 casos estudiados por LDI-PCR se observó que entre la secuencia del sitio de ruptura de *MLL* y la secuencia de fusión de su compañero existían nucleótidos que no pertenecen a ninguno de los dos genes involucrados. Si bien la presencia de estos nucleótidos no puede ser explicada con certeza, se sabe que el mecanismo de ruptura y fusión de los genes podría involucrar diferentes enzimas que adicionen estos nucleótidos para la enmienda de la hebra de ADN una vez que se separa producto de la ruptura, sin necesidad de utilizar una secuencia molde. Otra posibilidad podría ser que se utilice como molde el transcrito primario de cada gen ya aún que contiene la secuencias intrónicas y de esta manera explicar el hecho de encontrar estas secuencias repetidas en ambos derivados.

## 5.6. REARREGLOS DE Ig/TCR EN LEUCEMIA AGUDA CON ALTERACIONES EN MLL

La detección de los rearrreglos de Ig/TCR se realizó a 17 de los 34 pacientes con diagnóstico de LLA y alteraciones del *MLL*. La búsqueda de este tipo de rearrreglos es un procedimiento realizado generalmente en los pacientes con diagnóstico de LLA en el laboratorio de Hematología y Oncología del Hospital, con la finalidad de ser utilizados para la cuantificación de la EMR. Dado que este tipo de estudios se encuentran estandarizados para el seguimiento de EMR de pacientes con LLA, en el presente trabajo de tesis se excluyó de esta determinación a los pacientes con diagnóstico de LMA y alteraciones del *MLL*. Se han descrito casos de LMA con rearrreglos de Ig/TCR, pero su baja frecuencia hace que no sean un blanco molecular muy buscado. El hallazgo de al menos 1 rearrreglo en 13 de los 17 pacientes explica que este tipo de estudios constituya una herramienta sin la utilidad y aplicabilidad suficiente para el seguimiento de los pacientes con leucemias con *MLL* anormal, debido a que los protocolos para la determinación de la EMR establece como requisito la posibilidad de contar con al menos 2 rearrreglos para el seguimiento óptimo de estos casos, considerando que en el seguimiento de estos pacientes se ha observado el fenómeno de evolución clonal, con la consiguiente pérdida de los mismos. Teniendo en cuenta ese requisito, el número de pacientes factibles de ser analizados para EMR el seguimiento se limita a 4 (23,5%).

En la mayoría de los casos en que se encontraron rearrreglos de Ig correspondieron a linfoblastos de LLA en estadio madurativo Pre-B (47,8%). Si bien, el estadio de maduración del linfocito B en el que expresa la cadena pesada es el Pre-B y el de la cadena ligera es el B maduro, en los casos analizados se encontró que de los 5 casos en los que se han detectados rearrreglos de las cadenas ligeras 1 correspondía a estadio Pro-

B. Los Linfocitos Pro-B tienen 2 etapas, el Pro-B temprano en el que se establece el primer rearrreglo del ADN entre los segmentos génicos D-J en los dos cromosomas de la cadena pesada (H), y luego la etapa de Pro-B tardía donde se recombina el segmento variable (V) con el producto recombinado de los segmentos D-J. Podría especularse que este blasto se encontraría en su tránsito madurativo a estadios más maduros pero manteniendo marcadores de inmadurez consecuencia del asincronismo madurativo. Es posible observar en leucemias este asincronismo madurativo.

Este hallazgo de rearrreglos en los casos de LLA con estadios de maduración más avanzados en la ontogenia B, apoya la idea de que en las LLA con alteraciones del *MLL*, que son más frecuentemente Pro-B, pueden no haber logrado generar dichos rearrreglos al momento del desarrollo del evento leucemogénico.

En la determinación de los rearrreglos del TCR se encontró que en el 47% de los casos analizados tenían al menos un rearrreglo en los genes que codifican para este receptor. Este resultado demuestra que los linfocitos B rearrreglan los genes del TCR a pesar de no expresarlos, probablemente debido a su detención en la maduración en una fase en la cual existe actividad de las proteínas que constituyen la maquinaria de recombinación génica V(D)J. Como era de esperar en el caso de la leucemia con fenotipo T correspondiente a un paciente de 2,1 años de edad, se encontró que los blastos tenían rearrreglado los genes de los 3 tipos de genes TCR: *beta*, *gamma* y *delta*.

En los casos en que se encontraron rearrreglos de Ig/TCR, la mayoría de los pacientes tenían menos de 6 meses de edad, con mayor frecuencia de rearrreglos completos de IGH con blastos en estadio madurativo Pre-B. Mientras que la mayoría de los pacientes con LLA en estadio Pro-B se encontró que predominan los rearrreglos incompletos. Este

resultado era el esperado debido a que es razonable que a mayor estadio madurativo mayor cantidad de rearrreglos completos.

El hallazgo del predominio de rearrreglos de *IGH* completos en la población de infantes no coincide con los datos publicados en bibliografía internacional (Jansen et al., 2007) donde se describe que los infantes con LLA menor de 6 meses presentan un patrón de Ig/TCR inmaduro caracterizado por alta prevalencia de rearrreglos *IGH* incompletos esto puede ser debido al pequeño tamaño de la cohorte analizada, pero si coincide con la baja frecuencia de rearrreglos completos de los genes *IGH*, *IGK* y *TCRD* en Pro-B.

### **5.7. REARRREGLOS DE MLL EN LEUCEMIAS B MADURAS**

Las leucemias agudas generalmente muestran una buena correlación entre morfología, inmunofenotipo y alteraciones citogenéticas o moleculares. La ocurrencia de anomalías de *MLL* en LLA con fenotipo B maduro sin morfología FABL3 es claramente un hallazgo inusual y debe ser reportado y revisado con el fin de lograr una mejor comprensión de estos casos.

En la Tabla 27 se muestran resumidas las características de 14 casos publicados hasta la actualidad referidos como "LLA B madura", los cuales presentaban morfología FAB-L1-L2, con rearrreglos del gen *MLL* y sin anomalías en *c-myc* obtenidos del análisis de los reportes en la literatura. Esta descripción difiere de la clásica morfología FAB-L3 con anomalías en *c-myc*, que es la comúnmente observada durante la fase leucémica del linfoma de Burkitt o de otros linfomas B maduros no Hodgkin (LNH). Nueve de los 14 casos descriptos presentaron la t(9;11)(p21-22;q23), 1 con el rearrreglo molecular *MLL-MLLT10* detectado por técnicas de biología molecular, 1 con la t(x;11)(q13;q23)

---

generando el transcrito de fusión *MLL-FOXO4* y en 3 casos se detectaron anomalías de *MLL* sólo por FISH.

En cuanto al inmunofenotipo, 9 casos mostraron restricción de Ig de cadena liviana lambda y 5 de cadena kappa. CD10 fue expresado en 3 pacientes mientras que la enzima TdT fue detectada en dos casos, y solamente en un caso la expresión CD34 fue positiva. En 8 de los casos fue expresado el CD20, mientras que todos ellos expresaron CD19, IgM citoplasmática e Ig de superficie.

En este trabajo de tesis se describen 3 casos adicionales de LLA B madura en pediatría recién diagnosticados que muestran la misma asociación de hallazgos inmunofenotípicos y moleculares. Estos nuevos casos presentados, muestran una masiva infiltración de la médula ósea y mala respuesta al tratamiento, como se observa comúnmente en los infantes con LLA y *MLL-r*.

La translocación t(9;11) y t(10;11) con sus respectivas transcripciones de fusión *MLL-MLLT3* y *MLL-MLLT10* se asocian con mayor frecuencia a la LMA, tanto en infantes como en pacientes pediátricos mayores de 1 año, mientras que la t(4;11) y la t(11;19) o sus transcritos de fusión *MLL-AFF1* y *MLL-MLLT1* son los rearrreglos recurrentes más frecuentemente encontrados en LLA de infantes (Borkhardt et al., 2002). Interesantemente, como se muestra en la Tabla 27.

El análisis de los 3 pacientes con LLA B madura estudiados en este trabajo de tesis mostró dos casos de LLA con cariotipo complejo, uno de los cuales presentó una ins(10;11)(p12;q23q13) y otro con el rearrreglo *MLL-MLLT1*. No hemos encontrado en la literatura otros casos de LLA pediátrica con fenotipo B maduro y expresión del transcrito *MLL-MLLT1* o la correspondiente alteración a nivel genómico.

En cuanto al perfil inmunofenotípico, encontramos una expresión variable de antígenos de inmadurez: el caso #1 expresó todos ellos, el caso #2 fue TdT negativo, pero positivo para CD34 y parcialmente positivo para CD10, mientras que el marcador del estadio B maduro CD20 estuvo presente en 2 casos, siendo en uno de ellos parcialmente expresado. Comparando el inmunofenotipo de los 3 pacientes incluidos en este estudio con los casos reportados previamente en bibliografía internacional, la presencia de los antígenos de inmadurez pareciera ser más frecuente en nuestros pacientes, quizás pueda deberse a la edad de los pacientes, o bien a la pequeña cantidad de casos analizados. Por otra parte, y coincidiendo con los casos publicados, donde se observa un predominio de restricción de la cadena liviana lambda, los pacientes presentados en este trabajo mostraron también restricción de cadena lambda. En nuestra experiencia con el "clásico" LNH con fenotipo B maduro (Hospital Garrahan, n= 105 casos pediátricos, datos no publicados) encontramos igual distribución en la restricción de la cadena kappa y lambda y la presencia de expresión de CD20 en todos ellos. Con respecto a la presencia de antígenos de inmadurez en esta cohorte de pacientes con LNH, 4 de 34 pacientes analizados eran CD34 positivo, 49 de 72 expresaron CD10 y sólo 1 de 40 casos analizados expresaron TdT. Es de destacar que en este grupo inusual de pacientes, encontramos un perfil de expresión de antígeno específico basado en la restricción de cadena ligera y en la expresión de antígenos de inmadurez, al compararlos con otras LLA B maduras con alteraciones en *c-myc*.

Por otra parte, este grupo también se diferencia de los casos de LLA de precursor B con rearrreglos del *MLL*, cuyos blastos muestran mayormente un fenotipo Pro-B o con muy poca frecuencia B común o estadio Pre-B, con la expresión de antígenos mieloides y NG2. Por lo tanto, a pesar de la pequeña cantidad de casos, este conjunto de pacientes parece presentar un patrón inmunofenotípico característico.

Es importante destacar la importancia de la aplicación de todas las técnicas disponibles destinadas a alcanzar un diagnóstico completo de la LLA, con el fin de identificar a estos casos inusuales de esta patología. En el caso de este grupo particular de LLA B maduras con alteraciones de *MLL*, que no presentan una morfología característica de LLA B madura, la clave para la detección de los mismos es la realización de un panel completo de marcación del inmunofenotipo por citometría de flujo, con la finalidad de definir claramente el estadio de maduración de los blastos, más allá de las características clínicas del paciente y de la morfología de los blastos.

Teniendo en cuenta que las traslocaciones de *MLL* pueden implicar a 79 genes asociados con más de 121 rearrreglos diferentes descritos (Meyer et al., 2013), los estudios de FISH son cruciales al momento del diagnóstico con el fin de identificar las anomalías de *MLL* al comienzo del tratamiento. Sin embargo, como la técnica de FISH no cumple con la sensibilidad adecuada para la determinación de la EMR, es fundamental realizar estudios moleculares, citogenéticos y de citometría de flujo para el diagnóstico preciso y el seguimiento de los pacientes.

En sériolos pacientes incluidos en esta serie, la elección del tratamiento se basó en todos los casos, en la edad del paciente al momento del diagnóstico y el *status* del gen *MLL*. Por esta razón, los 3 pacientes fueron tratados con el protocolo para infantes (Interfant-99) (Pieters et al., 2007). Sin embargo, el resultado obtenido en estos casos fue pobre. De los tres casos descritos, 2 presentaron recaídas tempranas de la enfermedad a 4 y 21 meses desde su diagnóstico y sólo 1 de ellos ha finalizado el tratamiento y permanece vivo y libre de enfermedad a 33 meses desde su diagnóstico.

De los 14 casos publicados anteriormente, solo existen datos sobre el tratamiento administrado en 9 de ellos. De 4 casos tratados en base al protocolo Interfant-99, tres



recayeron, mientras que de 5 tratados con diferentes Protocolos, se observaron 2 recaídas.

Teniendo en cuenta los malos resultados obtenidos en general, en este grupo de pacientes, se podría especular que este subtipo especial de leucemias necesita un esquema de quimioterapia diferente al actual. Posiblemente una intensificación de la fase inicial del tratamiento, similar a la utilizada en los protocolos de LNH, seguida de una fase de mantenimiento con bloques de altas dosis de quimioterapia similares a los usados para LLA de alto riesgo podría ser efectiva para evitar la recaída de la enfermedad.

El resultado del estudio de estos casos resulta valioso para entender a este tipo de leucemia, además, debido a que la mejor estrategia de tratamiento para estos casos aún no es clara, los datos aportados en esta tesis pueden ayudar al planteo de nuevos esquemas quimioterápicos más eficaces.

**Tabla 27.** *Principales características inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares encontradas en todos los casos publicados de LLA B maduro con MLL-r.*

Nota: En el formato electrónico esta tabla se muestra al final del capítulo de discusión por motivos de formato

RC: Remisión completa; MPE: Muerte por la enfermedad; ND: no disponible; TCC (transplante de células de cordón), Rec (recaída), ESA (Enfermedad sistémica por adenovirus), TCCNR (transplante de sangre de cordón dador no relacionado), IA (Infección por adenovirus), Test (testicular), BFM (protocolo derivado del BFM), 2<sup>nd</sup> QT (segunda línea de quimioterapia), HE (hepatoesplénica) MO: médula ósea. \*\* La alteración en MLL fue observada en la recaída. El cariotipo al momento del diagnóstico (DX) fue normal. El estudio de FISH no fue realizado. 1- (Tsao et al., 2004). 2- (Frater et al., 2004). 3- (Blin et al., 2008). 4- (Behm et al., 1995). 5- (Lorenzana et al., 1991). 6- Li et al., 2003). 7- [Hsi (abstract) Society of Hematopathology / European Association of Hematopathology Workshop Pediatric hematopathology cases]. 8- [Lorsbach (abstract) Society of Hematopathology / European Association of Hematopathology Workshop Pediatric hematopathology cases]. 9- (Lim et al., 2012).

## 5.8. MLL Y LEUCEMIAS AGUDAS CON CAMBIOS DE LINAJE

Se han observado casos de LLA Pre-B con alteración en *MLL* que sufrieron cambios de linaje de LLA a LMA, particularmente al linaje monocítico (Rossi et al., 2012). Uno de los 34 casos analizados por LDI-PCR en el presente trabajo de tesis presentó cambio de linaje (caso #21). Probablemente este cambio de linaje pudo haber sido producto de la selección causada por la quimioterapia aplicada durante la inducción. Este cambio de linaje corresponde a un paciente con diagnóstico de LALA (mieloide y B), en el que podría descartarse el hecho de que sea una segunda enfermedad maligna debido a que el paciente presentó el cambio de linaje al final de la etapa de inducción, ósea un tiempo muy cercano al diagnóstico. Para poder afirmar esta suposición, sería conveniente determinar si este blasto presenta el mismo rearrreglo *MLL-AFF1* a nivel genómico confirmando la presencia de la misma población de blastos, ya que al momento del diagnóstico no presentó ningún rearrreglo de Ig/TCR. Otra posibilidad, podría ser que el cambio de linaje sea debido a la reprogramación de la célula pluripotente maligna.

Con respecto a los cambios de linaje en las leucemias con fenotipo B maduro, y teniendo en cuenta la existencia de 1 solo caso de 14 descriptos que cambió de LLA a LMA (Tabla 27), se podría sugerir que este evento en particular es poco frecuente en estos casos con fenotipo B maduro y alteraciones en *MLL*. Ninguno de nuestros casos analizados que recayó presentó cambio de linaje. Aunque hay que tener en cuenta que recayeron durante las primeras fases del tratamiento. En nuestra experiencia, el cambio de linaje en LLA Pre-B con *MLL-r* ocurre en aproximadamente el 10% de los casos (HPG, datos no publicados).

## 5.9. MUTACIONES DEL GEN FLT3

Las mutaciones *FLT3*-ITD son relativamente infrecuentes en los pacientes infantiles con LMA o LLA. De las 33 muestras con material disponible para la búsqueda de estas mutaciones del grupo de infantiles en ninguna se detectó este tipo de mutaciones, mientras que la situación fue diferente para la búsqueda de mutaciones *FLT3*-TKD, las cuales fueron detectadas en aproximadamente el 15% de los pacientes estudiados con leucemias con rearrreglos de *MLL*.

Las mutaciones en *FLT3*, ya sean *FLT3*-ITD o *FLT3*-TKD, han sido asociadas a mal pronóstico en pacientes pediátricos con LMA, aunque no existen datos contundentes que asocien estas mutaciones con mal pronóstico en infantiles, posiblemente debido a que se trata de un tipo de leucemia poco frecuente, y a que su pronóstico en general es pobre, por lo cual es difícil identificar subpoblaciones en este grupo de leucemias. Por otro lado, hay que tener en cuenta si bien en los infantiles con LLA la frecuencia de estas mutaciones también es baja, es más frecuente la sobreexpresión del receptor FLT3 en estado germinal (Armstrong et al., 2002).

La detección de las mutaciones en *FLT3* permitió identificar a 5 pacientes de los 33 analizados que no serían candidatos a responder a la terapia con nuevas drogas inhibidoras de FLT3 y plantea la posibilidad de realizar la búsqueda de estas mutaciones a todos los infantiles para poder relacionarla con la sobrevida de los pacientes. También sería conveniente evaluar el nivel de expresión de FLT3 germinal en los pacientes infantiles a fin de ampliar el conocimiento que se tiene sobre este tipo de leucemia tan agresiva.

La posibilidad de evaluar el nivel de expresión de FLT3, junto con la determinación de las mutaciones en el gen, permitirá aportar más evidencias que justifiquen o no, la re-

definición de los grupos de riesgo o que permita aportar datos para evaluar si estas alteraciones podrían ser consideradas como factor de mal pronóstico en estos pacientes.

En los resultados encontrados se observó que de los 5 pacientes que presentaban *FLT3*-TKD, 3 recayeron y murieron por complicaciones de la enfermedad.

El análisis de las mutaciones de *FLT3* en este trabajo de tesis, a pesar de realizarse con cohorte pequeña, muestra la necesidad de buscar otros factores pronóstico que permitan una mejor estratificación de los pacientes infantiles y así adecuar la terapia a administrar o buscar otras acciones terapéuticas que permitan la mejor evolución de los pacientes.

Por otra parte, la detección de estas mutaciones permite su empleo en el seguimiento de los pacientes con leucemias que han sido trasplantados, a través de la identificación y cuantificación de los transcritos de *FLT3* mutados por RQ-PCR, o seguimiento de la EMR utilizando como blanco molecular la secuencia mutada. En el primero de los casos hay que tener en cuenta que se trabaja que un material poco estable como es el ARNm, el cual depende de la expresión del transcrito. Ambas desventajas pueden llevar a resultados falsos negativos cuando el paciente se encuentra sometido a la terapia, ya que muchas veces durante la misma el clon leucémico puede entrar en “estado de quiescencia” donde no hay transcripción génica pero la presencia del clon es real. En el segundo caso, la aplicación presenta algunas desventajas respecto la de la utilización de los rearrreglos de Ig/TCR o genes de fusión, como por ejemplo el hecho de que estas mutaciones no son específicas del paciente, como se puede observar en los resultados de este trabajo.

## 5.10. MUTACIONES DEL GEN *GATA-1*

Las patologías hematológicas asociadas a las mutaciones del gen *GATA-1* se presentan en una edad temprana y por ello se especula que estas alteraciones se originarían intra-útero, en algún momento del desarrollo fetal. También concuerda con esta teoría el hallazgo de hepatomegalia, observada en todos los casos de MAT analizados al momento del diagnóstico, ya que el hígado cumple un rol primordial durante la hematopoyesis fetal.

La presencia de la trisomía del cromosoma 21 en los pacientes con síndrome de Down es considerada como el primer evento o alteración genética, predisponiendo a las células hematopoyéticas a la adquisición de mutaciones en el gen *GATA-1* que explicarían la aparición del síndrome de MAT, aunque se desconoce la fisiopatogenia de la remisión espontánea observada.

Los estudio de las mutaciones en *GATA-1* en nuestra población de pacientes fue reportada en 2013 (Mansini et al., 2013). Las mutaciones en *GATA-1* fueron detectadas en todos los pacientes con diagnóstico de MAT analizados. Con respecto a uno de los pacientes descritos con diagnóstico de MAT que remitió espontáneamente y 9 meses más tarde desarrolló LMCA, si bien hemos comprobado la existencia de la misma mutación en *GATA-1* en ambas muestras, el análisis citogenético muestra la adquisición de nuevas anomalías por parte del clon leucémico. Estos hallazgos fortalecen la teoría de que ambos cuadros involucren a la misma población de células hematopoyéticas y sugiere que la evolución de MAT a LMCA sería consecuencia de la adquisición de mutaciones adicionales.

El hecho de no haber encontrado mutaciones en *GATA-1* en uno de los pacientes con LMCA no implica su ausencia, debido a que nuestra búsqueda fue acotada al exón 2 y

---

sus secuencias intrónicas flanqueantes, zona en la cual se describieron la mayoría de las mutaciones publicadas. Sin embargo, en series con mayor número de pacientes han sido descritas mutaciones en el intrón 1 y en el exón 3 en el 4% de los casos (Alford et al. 2011).

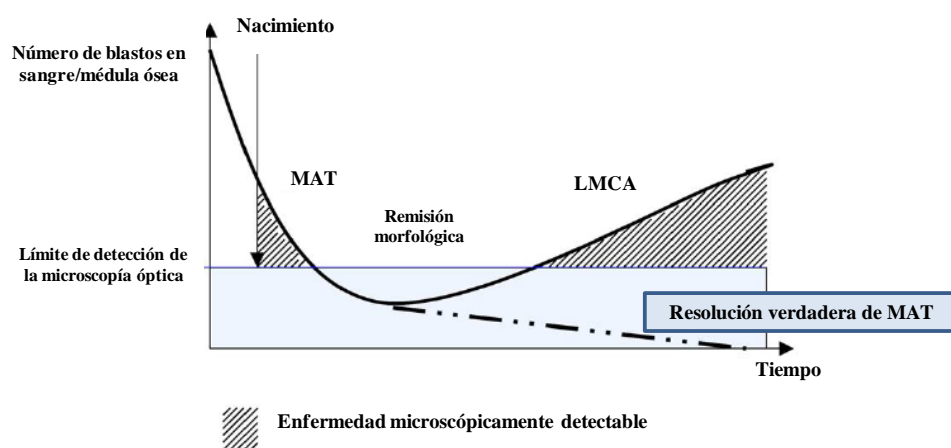
La presencia de mutaciones en *GATA-1* esta descrita como propia de las proliferaciones de megacarioblastos de infantes con SD ya que no hemos detectado mutaciones en ninguno de los grupos de pacientes estudiados adicionalmente. No obstante, otros autores describen casos esporádicos que contradicen estos hallazgos. Rainis y colaboradores detectaron la misma mutación en *GATA1* en dos gemelos monocigóticos sin SD que posteriormente desarrollaron LMCA cuyos blastos habían adquirido la trisomía 21 (Rainis et al., 2003). Por otro lado, Hama y colaboradores han publicado la detección de mutación en *GATA-1* en uno de 12 pacientes sin SD con LMCA (Hama et al., 2011). Considerando los hallazgos de nuestro estudio y los reportes de la bibliografía internacional, resultaría de interés realizar el estudio de las mutaciones en *GATA-1* en muestras de pacientes sin SD con diagnóstico de LMCA para conocer su frecuencia y analizar su posible significado clínico.

El SD se caracteriza por presentar elevados niveles de estrés oxidativo producto del incremento en el número de copias de genes ubicados en cromosoma 21 (Irizarry y Hyman, 2003; Pallardó et al., 2006). El desequilibrio de las especies reactivas de oxígeno en las células causa daño oxidativo en el ADN pudiendo ser clave para la adquisición de mutaciones en los infantes con SD, los cuales presentan deficiencia en los mecanismos de reparación del ADN (Raji y Rao, 1998).

Estos resultados dieron como resultado el primer trabajo realizado en Argentina en una institución pública, en el que se caracterizaron las mutaciones de *GATA-1* en pacientes



con SD y diagnóstico de MAT y/o LMCA. Si bien la población estudiada en el presente trabajo es pequeña, la frecuencia de mutaciones encontrada coincide con la publicada por otros grupos de investigación en bibliografía internacional (Groet et al., 2003; Kanezaki et al., 2010; Alford et al., 2011). La alta frecuencia de mutaciones encontrada en neonatos con SD y MAT sugeriría la conveniencia de investigar su presencia en todos los neonatos con SD a fin de individualizar a aquellos pacientes con riesgo aumentado de presentar MAT y/o LMCA, los cuales deberían ser controlados clínicamente en forma más rigurosa respecto a aquellos neonatos con SD que no las presentan. Además, la evaluación seriada de las mutaciones detectadas permitiría monitorear los pacientes con MAT para comprobar la cinética de desaparición del clon preleucémico y predecir en forma temprana una eventual progresión a LMCA (Figura 46).



**Figura 46.** Hipótesis de la cinética de los blastos como parámetro pronóstico en los recién nacidos con SD. Luego del nacimiento el diagnóstico de MAT es realizado en base a estudios citológicos de los extendidos de sangre periférica (área sombreada de la izquierda). La remisión morfológica es alcanzada en la mayoría de los casos luego de que el clon descienda por debajo del umbral de sensibilidad de la detección microscópica. En la mayoría de los casos el clon continúa disminuyendo (línea de trazos). En algunos casos los blastos de la MAT persisten a nivel submicroscópico (línea continua) y tras la adquisición de mutaciones adicionales dan lugar a la aparición de la LMCA (área sombreada a la derecha). De acuerdo con esta hipótesis, las mutaciones GATA-1 específicas del clon pueden ser utilizadas para determinar la cinética de desaparición de los blastos de la MAT y para estimar el riesgo de posterior desarrollo de LMCA en recién nacidos con DS y diagnóstico de MAT. (Adaptado de Hitzler J. y Zipursky A., 2005)

Algunos autores plantean evaluar la posibilidad de administrar medidas de prevención en estos pacientes, como por ejemplo la administración preventiva de bajas dosis de quimioterapia (Al-Ahmari et al., 2006). Sin embargo, este tipo de medidas es muy cuestionada actualmente debido a los efectos adversos de la quimioterapia, ya que no se ha demostrado eficacia de este tipo de medidas y a que, en caso de desarrollar el cuadro, estos pacientes presentan en general muy buena respuesta al tratamiento quimioterápico con buenas probabilidades de sobrevida.

Desde nuestro punto de vista, el tratamiento de la MAT en pacientes con SD debería ser reservado para los casos que se presenten con complicaciones clínicas que ponen en riesgo la vida del paciente; tanto aquellas que se asocian con el alto recuento leucocitario como aquellas que se presenten con compromiso orgánico por fenómenos fisiopatológicos inherentes a la patología.

Es importante considerar la edad de presentación del cuadro clínico, que constituye un dato relevante para realizar el diagnóstico diferencial entre MAT y LMCA, debido a que el 80% de los casos de MAT resuelven espontáneamente antes de los 3 primeros meses de vida sin necesidad de tratamiento. Si bien el diagnóstico de MAT se basa en características clínicas y hematológicas del paciente, y fundamentalmente en la evolución a la remisión espontánea del paciente, la certificación de la presencia de mutaciones en *GATA-1* por técnicas de biología molecular podría en un futuro considerarse diagnóstico de MAT en aquellos pacientes con SD sin manifestaciones clínicas y/o hematológicas.

Por otro lado, las mutaciones en *GATA-1* por ser específicas del clon megacariocítico, por ser marcadores clonales estables en el tiempo y por poder ser detectadas con una sensibilidad de  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  posibilitan su utilización como blanco molecular para la

determinación de la EMR (Hitzler et al., 2003; Mundschau et al., 2003; Rainis et al., 2003; Pine et al., 2005).

El presente trabajo ha permitido confirmar la alta frecuencia publicada para las mutaciones en *GATA-1* en los neonatos con SD y MAT y/o LMCA. El conocimiento de estas mutaciones contribuirá a una mejor comprensión de los mecanismos leucemogénicos asociados a estas patologías en los niños con SD, lo cual favorecerá la detección de potenciales blancos terapéuticos para futuras estrategias de tratamiento.

**Tabla 27.** Principales características inmunofenotípicas, citogenéticas y moleculares encontradas en todos los casos publicados de LLA B maduro con MLL-r.

Ref.	Edad/Sexo	FAB	Alteración citogenética molecular	CD10	CD34	TdT	CD20	cIgM	sIg	Tratamiento	Evolución
1	4m/M	L1-L2	t(9;11)(p21;q23)	N	N	N	ND	+/-	+/lambda	Interfant-99	RC/Rec cambio de linaje/MPE
1	8a/F	L1-L2	t(9;11)(p21;q23)	N	N	N	+/-	+	+/lambda	Interfant-99	RC/TCC/Rec/PPE
2	11m/F	L1-L2	MLL FISH+	N	ND	N	+/-	ND	+/kappa	COG-P9407	RC 4m
3	13m/F	L1-L2	46,xx[14].ish t(9;11)(p21;q23)	N	N	N	ND	+	+/kappa	BFM+FRALLE 2000	CRC/36m EMR negative
3	23m/F	L1-L2	46,XX[4]/46,XX t(9;11)(p21-22;q23)[12]	N	N	N	+	+	+/lambda	Grupo C LMB 89 trial	RC/Rec en SNC,HE y MO/2 <sup>da</sup> línea de QT /ISA/falleció
3	8m/M	L1-L2	46,XY[10].ish t(9;11)(p22;q23)[15]	N	N	N	N	+	+/kappa	Interfant -99	RC/Rec en testiculos/2 <sup>da</sup> línea de QT + TCCNR/IA/falleció
3**	16m/F	L1-L2	Dx: 46, XX[30] Rec: 46,XX,t(9;11)(p22;q23)[30]	P	N	N	P	P	+/kappa	BFM+EORTC 02	RC/Rec en MO y SNC/2 <sup>da</sup> línea de QT COPRAL/RC 52m
4	5m/M	L1-L2	46,XX[20].ish add(11)(q23)[20] BM: MLL-MLLT10	N	N	N	p	p	+/lambda	Interfant-99	RC 46m
5	ND/ND	L1	t(9;9)(9;11)(p24;q22;p21;q23)	ND	ND	P	ND	P	+/lambda	ND	RC
6	8a/F	L1	t(9;11)(p21-22;q23)	N	ND	P	P	P	+/lambda	ND	MPE/9 meses
7	12m/F	L1	11q23 FISH+	N	N	N	P	ND	+/lambda	CCG ALL protocolo 91	RC 4 m
8	5m/F	ND	11q23FISH+	N	P	N	N	P	+/lambda	ND	RC/3,5 a
9	12m/F	L1	t(9;11)(p22;q23)	P	N	N	P	P	+/lambda	ND	ND
10	6s/F	L1	46,XX,t(X;11)(q13;q23)	P	N	N	ND	P	+/kappa	Protocolo para Precursor B de LLA	muerte por sepsis a la 5 <sup>ta</sup> semana de la terapia de inducción

RC: Remisión completa; MPE: Muerte por la enfermedad; ND: no disponible; TCC (transplante de células de cordón), Rec (recaída), ESA (Enfermedad sistémica por adenovirus), TCCNR (transplante de sangre de cordón dador no relacionado), IA (Infección por adenovirus), Test (testicular), BFM (protocolo derivado del BFM), 2<sup>nd</sup> QT (segunda línea de quimioterapia), HE (hepatoesplénica) MO: médula ósea. \*\* La alteración en MLL fue observada en la recaída. El cariotipo al momento del diagnóstico (DX) fue normal. El estudio de FISH no fue realizado. 1- (Tsao et al., 2004). 2- (Frater et al., 2004). 3- (Blin et al., 2008). 4- (Behm et al., 1995). 5- (Lorenzana et al., 1991). 6- Li et al., 2003). 7- [Hsi (abstract) Society of Hematopathology / European Association of Hematopathology Workshop Pediatric hematopathology cases]. 8- [Lorsbach (abstract) Society of Hematopathology / European Association of Hematopathology Workshop Pediatric hematopathology cases]. 9- (Lim et al., 2012).

## 6. Conclusiones

### 6. CONCLUSIONES

1. Se logró la puesta a punto de la técnica de LDI-PCR en el laboratorio de biología molecular del Servicio de Hematología y Oncología del Hospital de Pediatría Garrahan.
2. La incorporación de la técnica LDI-PCR para la detección de alteraciones en el gen *MLL* permitió ampliar la disponibilidad de las técnicas de diagnóstico existentes en nuestro hospital y en nuestro país; no sólo aplicable al estudio de la población de infantes sino que también para los pacientes pediátricos en general.
3. La implementación de la LDI-PCR para la caracterización de los rearrreglos del gen *MLL* en nuestro hospital logró complementar la técnica de caracterización de los rearrreglos de *Ig/TCR* utilizada en nuestro servicio, permitiendo ampliar la detección de nuevos blancos moleculares para la determinación de la EMR, especialmente en aquellos pacientes que no presentan rearrreglos de *Ig/TCR*.
4. A partir de los resultados obtenidos mediante LDI-PCR se amplió el panel de *screening* de leucemia aguda por RT-PCR en nuestro hospital, siendo de fundamental importancia en los casos de LA donde no se dispongan de los resultados de los estudios citogenéticos.
5. La LDI-PCR permitió detectar un nuevo compañero de fusión de *MLL* nunca antes descrito contribuyendo al conocimiento internacional sobre leucemias de infantes con rearrreglos de *MLL*.
6. Se sentaron las bases para la realización de la determinación de la EMR utilizando los rearrreglos de *MLL*. En una siguiente etapa deberá evaluarse la posibilidad de ser realizada

con sondas marcadas ya que el empleo de *SYBR Green* como sistema de detección no es una buena opción, debido a que generalmente los rearreglos ocurren en secuencias intrónicas con repeticiones frecuentes lo que dificulta la obtención de adecuada especificidad y rango cuantitativo.

7. La detección de mutaciones en el gen *FLT3* permitió identificar un grupo de pacientes que son candidatos a la administración de terapia con inhibidores de FLT3. Por lo que la aplicación sistemática de la búsqueda de estas mutaciones en los infantes permitirá personificar más eficazmente la terapia de tratamiento.

8. El estudio de la frecuencia y características de las mutaciones en el gen *GATA-1* en los pacientes con SD con diagnóstico de MAT y/o LMCA permitió confirmar la alta frecuencia de estas mutaciones en esta población, permitiendo identificar un grupo muy particular de pacientes con SD que tiene riesgo incrementado a desarrollar LMCA.

9. Si bien el diagnóstico de MAT se basa en características clínicas y hematológicas del paciente, y fundamentalmente en la evolución a la remisión espontánea del paciente, la demostración de la presencia de mutaciones en *GATA-1* por técnicas de biología molecular podría en un futuro considerarse diagnóstico de MAT en aquellos pacientes con SD sin manifestaciones clínicas y/o hematológicas.

10. La caracterización de las mutaciones en *GATA-1* y la evaluación seriada permitiría monitorear a los pacientes con MAT evaluando la cinética de desaparición del clon preleucémico y predecir en forma temprana una eventual progresión a LMCA.



## 7. Resumen

## 7. RESUMEN

Las leucemias agudas de infantes (niños menores de 1 año) (LAI) constituyen una entidad única, con características biológicas y clínicas particulares que requieren de un tratamiento individualizado. Presentan frecuentemente alteraciones genéticas que involucran al gen *MLL*, cuya presencia las define como un grupo de pobre pronóstico. Las alteraciones en *MLL* pueden ser estudiadas mediante bandeo G, hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), transcripción reversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) o PCR inversa de larga distancia (LDI-PCR), entre otras. Cada técnica posee ventajas y desventajas, siendo complementarias para la correcta caracterización de dichas alteraciones. Además, la evaluación de la respuesta al tratamiento incluye la determinación de la enfermedad mínima residual (EMR) mediante técnicas altamente sensibles como la citometría de flujo y PCR en tiempo real (RQ-PCR), que utiliza secuencias “blanco” específicas del clon leucémico. En la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se utiliza como blanco las secuencias V-(D)-J de los rearrreglos de los genes de *Ig/TCR*. Sin embargo, su utilidad es limitada en los infantes, ya que muchas de ellas no presentan rearrreglos. La alta incidencia de rearrreglos de *MLL* que presentan las LAI, permite utilizar como blanco para cuantificar la EMR la secuencia de fusión del rearrreglo a nivel genómico, caracterizada por LDI-PCR.

El principal objetivo de este trabajo de tesis fue desarrollar una minuciosa caracterización molecular de las LAI, incluyendo el estudio por LDI-PCR, para incorporar una nueva herramienta diagnóstica.

La puesta a punto e implementación de la LDI-PCR permitió identificar blancos moleculares para la determinación de la EMR. Permitted además detectar un nuevo compañero de fusión de *MLL* nunca antes descrito, y poner a punto la detección

mediante RT-PCR de nuevos rearrreglos, ampliando el *screening* empleado en el laboratorio para el diagnóstico de LA.

En cuanto a la determinación de EMR utilizando los rearrreglos de *MLL* se observó la necesidad de emplear sondas marcadas como sistema de detección, debido a dificultades para lograr especificidad y adecuado rango cuantitativo mediante el empleo de *SYBR Green* relacionadas con las características de las secuencias involucradas.

Uno resultados más importantes y prometedor de este trabajo de tesis es que se estableció que las secuencias de fusión de ADN específicas de cada paciente pueden ser utilizadas como blanco molecular para seguimiento de la EMR por técnicas de PCR cuantitativas. Los alelos de fusión génica son marcadores más confiables para los estudios de EMR que los rearrreglos de Ig/TCR, debido a su estabilidad clonal. Se obtuvieron datos positivos para el diagnóstico de alteraciones del gen *MLL* en 34 pacientes con LA, a través del estudio de LDI-PCR. En todos ellos se identificó y caracterizó por secuenciación al menos un alelo de fusión de *MLL*.

Este es el primer estudio realizado en Argentina, en una institución pública estableciendo que el uso de estos marcadores para la determinación de EMR contribuirá a la mejor estratificación, mejor adecuación del tratamiento y resultados de los pacientes infantes con leucemia aguda.

También se describen 3 nuevos casos infrecuentes de leucemia linfoblástica B madura con morfología FAB L1 o L2 y que corresponden a infantes con rearrreglos del gen *MLL*. Teniendo en cuenta los malos resultados obtenidos en conjunto, se podría especular que este grupo de pacientes necesita un esquema de quimioterapia diferente al actual. Los datos aportados en esta tesis pueden contribuir a plantear nuevos esquemas quimioterápicos más eficaces.

Adicionalmente, se analizaron las mutaciones del gen *FLT3* en LAI y se demostró que el 15% del total de pacientes estudiados presentó mutaciones del tipo TKD. Este resultado sugiere que es conveniente estudiar estas mutaciones en todos los pacientes infantiles con LA a fin de identificar a aquellos pacientes que responderían a la terapia con nuevas drogas inhibitoras de FLT3.

Con respecto al estudio de las mutaciones en *GATA-1* en infantes con Síndrome de Down (SD) y mielopoyesis anormal transitoria (MAT) y/o leucemia megacarioblástica aguda (LMCA), se detectaron mutaciones en *GATA-1* en todos los pacientes analizados. Uno de los pacientes con diagnóstico de MAT remitió espontáneamente y 9 meses más tarde desarrolló LMCA. Se detectó la existencia de la misma mutación en *GATA-1* en ambas muestras (MAT y LMCA), el análisis citogenético mostró la adquisición de nuevas anomalías por parte del clon leucémico. Estos hallazgos fortalecen la teoría de que ambos cuadros involucran a la misma población de células hematopoyéticas y sugiere que la evolución de MAT a LMCA sería consecuencia de la adquisición de mutaciones adicionales. Este estudio de las mutaciones del gen *GATA-1*, es el primer estudio realizado en la Argentina, en el que se caracterizaron estas mutaciones en pacientes con SD y MAT y/o LMCA. La alta frecuencia de mutaciones detectada sugeriría la conveniencia de investigar su presencia en todos los neonatos con SD a fin de individualizar a aquellos con mayor riesgo de presentar MAT y/o LMCA, quienes deberían recibir un control clínico más riguroso, con la finalidad de realizar un diagnóstico precoz que evite las complicaciones del cuadro agudo. Además, la evaluación seriada de las mutaciones detectadas permitiría monitorear a los pacientes con MAT para comprobar la cinética de desaparición del clon preleucémico y/o predecir tempranamente una eventual progresión a LMCA.

Finalmente, este trabajo de tesis tiene su foco en las alteraciones moleculares de los infantes, tanto las anormalidades del gen *MLL*, *FLT3* y mutaciones de *GATA-1*, con la finalidad de lograr un mejor conocimiento de esta población de pacientes y desarrollar las técnicas necesarias para su estudio.

## 8. Bibliografía

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed M., Sternberg A., Hall G., Thomas A., Smith O., O'Marcaigh A., Wynn R., Stevens R., Addison M., King D., Stewart B., Gibson B., Roberts I., Vyas P., 2004. Natural history of GATA1 mutations in Down syndrome. Clinical observations, interventions, and therapeutic trials. *Blood* 103, 2480-2489.
- Al-Ahmari A., Shah N., Sung L., Zipursky A., Hitzler J., 2006. Long-term results of an ultra low-dose cytarabine-based regimen for the treatment of acute megakaryoblastic leukaemia in children with Down síndrome. *British Journal of Haematology* 133, 646-648.
- Alford KA., Reinhardt K., Garnett C., Norton A., Böhmer K., von Neuhoff C., Kolenova A., Marchi E., Klusmann JH., Roberts I., Hasle H., Reinhardt D., Vyas P., 2011. International Myeloid Leukemia-Down Syndrome Study Group. Analysis of GATA1 mutations in Down syndrome transient myeloproliferative disorder and myeloid leukemia. *Blood* 118, 2222-2238.
- Alonso CN., Rubio PL., Luppó S., Medina A., Gallego MS., Scopinaro MJ., Felice MS., 2007. Nuevos blancos terapéuticos en leucemia aguda pediátrica: caracterización de las mutaciones del gen FLT3. *Medicina Infantil* 14, 116-123.
- Alonso CN., Meyer C., Gallego MS., Rossi JG., Mansini AP., Rubio PL., Medina A., Marschalek R., Felice MS., 2010. BTBD18: A novel MLL partner gene in an infant with acute lymphoblastic leukemia and inv(11)(q13;q23). *Leuk Res.* 34, 294-296.
- Armstrong SA., Staunton JE., Silverman LB., Pieters R., den Boer ML., Minden MD., Sallan SE., Lander ES., Golub TR., Korsmeyer SJ., 2002. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet.* 30, 41-47.
- Arcasoy MO., Gallagher PG., 1995. Hematologic disorders and nonimmune hydrops fetalis. *Semin Perinatol.* 19, 502-515.
- Attarbaschi A., Mann G., König M., Steiner M., Strehl S., Schreiberhuber A., Schneider B., Meyer C., Marschalek R., Borkhardt A., Pickl WF., Lion T., Gadner H., Haas OA., Dworzak MN., 2006. Mixed lineage leukemia-rearranged childhood pro-B and CD10-negative pre-B acute lymphoblastic leukemia constitute a distinct clinical entity. *Clin Cancer Res.* 12, 2988-2994.
- Baba Y., Pelayo R., Kincade PW., 2004. Relationships between hematopoietic stem cells and lymphocyte progenitors. *Trends Immunol.* 25, 645-649.
- Baccarani M., Pane F., Saglio G., 2008. Monitoring treatment of chronic myeloid leukemia. *Haematologica* 93, 161-166.
- Basso G., Veltroni M., Valsecchi MG., Dworzak MN., Ratei R., Silvestri D., Benetello A., Buldini B., Maglia O., Masera G., Conter V., Arico M., Biondi A., Gaipa G., 2009. Risk of relapse of childhood acute lymphoblastic leukemia is predicted by flow cytometric measurement of residual disease on day 15 bone marrow. *J Clin. Oncol.* 27, 5168-5174.

- Behm FG, Head DR, Pui CH et al., 1995. B precursor ALL with unexpected expression of surface immunoglobulin (Sig) mu and lambda (abstract). *Lab Invest* 72: A-613, 106a.
- Behm FG., Smith FO., Raimondi SC., Pui CH., Bernstein ID., 1996. Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemias with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL gene rearrangements. *Blood* 87, 1134-1139.
- Bené MC., Castoldi C., Knapp W., Ludwig W., Matutes E., Orfao A., van't Veer, 1995. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. (EGIL). *Leukemia* 9, 1783-1766.
- Bertrand FE., Vogtenhuber C., Shah N., LeBien TW., 2001. Pro-B-cell to pre-B-cell development in B-lineage acute lymphoblastic leukemia expressing the MLL/AF4 fusion protein. *Blood* 98, 3398-3405.
- Biondi A., Cimino G., Pieters R., Pui CH., 2000. Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96, 24-33.
- Biondi A., Rizzari C., Valsecchi MG., De Lorenzo P., Aricò M., Basso G., Locatelli F., Lo Nigro L., De Rossi G., Masera G., 2006. Role of treatment intensification in infants with acute lymphoblastic leukemia: results of two consecutive AIEOP studies. *Haematologica* 91, 534-537.
- Birch JM., Blair V., 1992. The epidemiology of infant cancers. *Br J Cancer Suppl.* 18, 2-4.
- Bitoun E., Oliver PL., Davies KE., 2007. The mixed-lineage leukemia fusion partner AF4 stimulates RNA polymerase II transcriptional elongation and mediates coordinated chromatin remodeling. *Hum. Mol. Genet* 16, 92-106.
- Blin N, Méchinaud F., Talmant P., Garand R., Boutard P., Dastugue N., McIntyre EA., Harousseau JL., Avet-Loiseau H., 2008. Mature B-cell lymphoblastic leukemia with MLL rearrangement: an uncommon and distinct subset of childhood acute leukemia. *Leukemia.* 22, 1056-1059.
- Borkhardt A., Wuchter C., Viehmann S., Pils S., Teigler-Schlegel A., Stanulla M., Zimmermann M., Ludwig WD., Janka-Schaub G., Schrappe M., Harbott J., 2002. Infant acute lymphoblastic leukemia Mcombined cytogenetic, immunophenotypical and molecular analysis of 77 cases. *Leukemia* 16, 1685-1690.
- Borowitz MJ., Bene M-C., Harris NL., Porwit A., Matutes E., 2008. Acute leukemias of ambiguous lineage. In: Swerdlow SH., Campo E., Harris NL., Jaffe ES., Pileri SA., Thiele J., et al., WHO Press, 4 th edition. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues., Switzerland, p. 150–155.
- Bresnick EH., Lee HY., Fujiwara T., Johnson KD., Keles S., 2010. GATA Switches as Developmental Drivers. *Journal of Biological Chemistry* 285, 31087-31093.



- Bresters D., Reus AC., Veerman AJ., van Wering ER., van der Does-van den Berg A., Kaspers GJ., 2002. Congenital leukaemia: the Dutch experience and review of the literature. *Br J Haematol.* 117, 513-524.
- Brock HW., van Lohuizen M., 2001. The Polycomb group: no longer an exclusive club? *Curr Opin Genet Dev.* 11, 175-181.
- Broeker PL., Super HG., Thirman MJ., Pomykala H., Yonebayashi Y., Tanabe S., Zeleznik-Le N., Rowley JD., 1996. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 87, 1912-1922.
- Buckley JD., Robison LL., Swotinsky R., Garabrant DH., LeBeau M., Manchester P., Nesbit ME., Odom L., Peters JM., Woods WG., et al., 1989. Occupational exposures of parents of children with acute nonlymphocytic leukemia: a report from the Children's Cancer Study Group. *Cancer Res.* 49, 4030-4037.
- Buckley JD., Robison LL., Swotinsky R., Garabrant DH., LeBeau M., Manchester P., Nesbit ME., Odom L., Peters JM., Woods WG., Hammond GD., 1989. Occupational exposures of parents of children with acute nonlymphocytic leukemia: a report from the Children's Cancer Study Group. *Cancer Res.* 49, 4030-4037.
- Buckley JD., 1992. The aetiology of cancer in the very young. *Br J Cancer Suppl.* 18, 8-12.
- Bueno C., Montes R., Martin L., Prat I., Hernandez MC., Orfao A., Menendez P., 2008. NG2 antigen is expressed in CD34+ HPCs and plasmacytoid dendritic cell precursors: is NG2 expression in leukemia dependent on the target cell where leukemogenesis is triggered? *Leukemia* 22, 1475-1478.
- Burmeister T, Molke T, Meyer C, Lachmann N, Schwartz S, Friedrichs B, Beyer J, Blau IW, Lohm G, Tietze-Bürger C, Marschalek R, Uharek L., 2012. Molecular monitoring of minimal residual disease in two patients with MLL-rearranged acute myeloid leukemia and haploidentical transplantation after relapse. *Exp Hematol Oncol.* 1, 1-10.
- Burmeister T., Meyer C., Gröger D., Hofmann J., Marschalek R., 2015. Evidence-based RT-PCR methods for the detection of the 8 most common MLL aberrations in acute leukemias. *Leuk Res.* 39, 242-247.
- Campana D., Coustan-Smith E., 2002. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol.* 15, 11-19.
- Campana D., Coustan-Smith E., 2004. Minimal residual disease studies by flow cytometry in acute leukemia. *Acta Haematol.* 112, 8-15.
- Campana D., 2004. Minimal residual disease in acute leukemia. *Am J Clin Pathol.* 122, S47-57.

- Campana D., 2012. Should minimal residual disease monitoring in acute lymphoblastic leukemia be standard of care? *Curr Hematol Malig Resp.* 7, 170-177.
- Campbell M., Cabrera ME., Legues ME., Ridge S., Greaves M., 1996. Discordant clinical presentation and outcome in infant twins sharing a common clonal leukaemia. *Br J Haematol.* 93, 166-169.
- Cantor AB., Orkin SH., 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* 21, 3368-3376.
- Cao F., Li X., Hiew S., Brady H., Liu Y., Dou Y., 2009. Dicer independent small RNAs associate with telomeric heterochromatin. *RNA* 15, 1274-1281.
- Chomczynski P., 1993. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-537.
- Chapiro E., Delabesse E., Asnafi V., Millien C., Davi F., Nugent E., Beldjord K., Haferlach T., Grimwade D., Macintyre EA., 2006. Expression of T-lineage-affiliated transcripts and TCR rearrangements in acute promyelocytic leukemia: Implications for the cellular target of t(15;17). *Blood* 108, 3484-3493.
- Chessells JM., 1992. Leukaemia in the young child. *Br J Cancer Suppl.* 18, S54-S57.
- Chessells JM., Harrison CJ., Watson SL., Vora AJ., Richards SM., 2002. Medical Research Council Working Party on Childhood Leukaemia. Treatment of infants with lymphoblastic leukemia: results of the UK Infant Protocols 1987-1999. *Br J Haematol.* 117, 306-314.
- Cho YW., Hong T., Hong S., Guo H., Yu H., Kim D., Guszczynski T., Dressler GR., Copeland TD., Kalkum M., Ge K., 2007. PTIP associates with MLL3- and MLL4-containing histone H3 lysine 4 methyltransferase complex. *J Biol Chem.* 282, 20395-20406.
- Cnattingius S., Zack MM., Ekblom A., Gunnarskog J., Kreuger A., Linet M., Adami HO., 1995. Prenatal and neonatal risk factors for childhood lymphatic leukemia. *J Natl Cancer Inst. J Natl Cancer Inst.* 87, 908-14.
- Corbett A., Osheroff N., 1993. When good enzymes go bad: conversion of topoisomerase II to a cellular toxin by antineoplastic drugs. *Chem. Res Toxicol.* 6, 585-597.
- Cosgrove MS., Patel A., 2010. Mixed lineage leukemia: a structure-function perspective of the MLL1 protein. *FEBS J.* 277, 1832-1842.
- Creutzig U., Zimmermann M., Bourquin JP., Dworzak MN., Kremens B., Lehrnbecher T., von Neuhoff C., Sander A., von Stackelberg A., Schmid I., Starý J., Steinbach D., Vormoor J., Reinhardt D., 2012. Favorable outcome in infants with AML after intensive first- and second-line treatment: an AML-BFM study group report. *Leukemia* 26, 654-661.

- Daser A., Rabbitts TH., 2004. Extending the repertoire of the mixed-lineage leukemia gene MLL in leukemogenesis. *Genes Dev.* 18, 965-974.
- De Sarrasqueta P., Bilisky P., Martín H., 1991. Mortalidad de niños y adolescentes (1-19 años) en la Ciudad de Buenos Aires en 1988. *Archivos Argentinos de Pediatría* 89, 303-318.
- Diller L., Li F., 1998. Epidemiology of Cancer in Childhood in: Nathan and Oski's (5<sup>th</sup> ed.), *Hematology of Infancy and Childhood*. publicado por W. B. Saunders Company, Philadelphia, USA, pp1071-1077.
- Dou Y., Milne TA., Ruthenburg AJ., Lee S., Lee JW., Verdine GL., Allis CD., Roeder RG., 2006. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 713-719.
- Dördelmann M., Reiter A., Borkhardt A., Ludwig WD., Götz N., Viehmann S., Gadner H., Riehm H., Schrappe M., 1999. Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94, 1209-1217.
- Dworzak MN., Gaipa G., Ratei R., Veltroni M., Schumich A., Maglia O., Karawajew L., Benetello A., Pötschger U., Husak Z., Gadner H., Biondi A., Ludwig WD., Basso G., 2008. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom.* 74, 331-340.
- Echlin-Bell DR., Smith LL., Li L., Strissel PL., Strick R., Gupta V., Banerjee J., Larson R., Relling MV., Raimondi SC., Hayashi Y., Taki T., Zeleznik-Le N., Rowley JD., 2003. Polymorphisms in the MLL breakpoint cluster region (BCR). *Hum Genet.* 113, 80-91.
- Elia L., Mancini M., Moleti L., Meloni G., Buffolino S., Krampera M., De Rossi G., Foà R., Cimino G., 2003. A multiplex reverse transcriptase-polymerase chain reaction strategy for the diagnostic molecular screening of chimeric genes: a clinical evaluation on 170 patients with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 88, 275-279.
- Estable MC., Naghavi MH., Kato H., Xiao H., Qin J., Vahlne A., Roeder RG., 2002. MCEF, the newest member of the AF4 family of transcription factors involved in leukemia, is a positive transcription elongation factor-b-associated protein. *J Biomed Sci.* 9, 234-245.
- Ferster A., Bertrand Y., Benoit Y., Boilletot A., Behar C., Margueritte G., Thyss A., Robert A., Mazingue F., Souillet G., et al., 1994. Improved survival for acute lymphoblastic leukaemia in infancy: the experience of EORTC-Childhood Leukaemia Cooperative Group. *Br J Haematol.* 86, 284-290.
- Finlay JL., Borchering W., 1998. Acute B-lymphoblastic leukemia with L1 morphology: a report of two pediatric cases. *Leukemia* 2, 60-62.

- Fong CT., Brodeur GM., 1987. Down's syndrome and leukemia: epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 28, 55-76.
- Ford AM., Ridge SA., Cabrera ME., Mahmoud H., Steel CM., Chan LC., Greaves M., 1993. In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 363, 358-360.
- Frankel LS., Ochs J., Shuster JJ., Dubowy R., Bowman WP., Hockenberry-Eaton M., Borowitz M., Carroll AJ., Steuber CP., Pullen DJ., 1997. Therapeutic trial for infant acute lymphoblastic leukemia: the Pediatric Oncology Group experience (POG 8493). *J Ped Hematol Oncol.* 19, 35-42.
- Frater JL., Batanian JR., O'Connor DM., Grosso LE., 2004. Lymphoblastic leukemia with mature B-cell phenotype in infancy. *J Pediatr Hematol Oncol.* 26, 672-677.
- Gagnon G., Childs CC., LeMaistre A., Keating M., Cork A., Trujillo JM., Nellis K., Freireich E., Stass SA., 1989. Molecular Heterogeneity in Acute Leukemia Lineage Switch. *Blood* 74, 2088-2095.
- Gessner A., Thomas M., Castro PG., Büchler L., Scholz A., Brümmendorf TH., Soria NM., Vormoor J., Greil J., Heidenreich O., 2010. Leukemic fusion genes MLL/AF4 and AML1/MTG8 support leukemic self-renewal by controlling expression of the telomerase subunit TERT. *Leukemia* 24, 1751-1759.
- Gill Super HJ., Rothberg PG., Kobayashi H., Freeman AI., Diaz MO., Rowley JD., 1994. Clonal, nonconstitutional rearrangements of the MLL gene in infant twins with the acute lymphoblastic leukemia: in utero chromosome rearrangement of 11q23. *Blood* 83, 641-644.
- Greaves M., Childhood Leukaemia. *BMJ* 324, 283-287.
- Groet J., McElwaine S., Spinelli M., Rinaldi A., Burtscher I., Mulligan C., Mensah A., Cavani S., Dagna-Bricarelli F., Basso G., Cotter FE., Nizetic D., 2003. Acquired mutations in GATA1 in neonates with Down's syndrome with transient myeloid disorder. *Lancet* 361, 1617-1620.
- Hama A., Muramatsu H., Makishima H., Sugimoto Y., Szpurka H., Jasek M., O'Keefe C., Takahashi Y., Sakaguchi H., Doisaki S., Shimada A., Watanabe N., Kato K., Kiyoi H., Naoe T., Kojima S., Maciejewski JP., 2011. Molecular lesions in childhood and adult acute megakaryoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology* 156, 316-325.
- Harrison CJ., Hills RK., Moorman AV., Grimwade DJ., Hann I., Webb DK., Wheatley K., de Graaf SS., van den Berg E., Burnett AK., Gibson BE., 2010. Cytogenetics of childhood acute myeloid leukemia: United Kingdom Medical Research Council Treatment trials AML 10 and 12. *J Clin Oncol.* 28, 2674-2681.
- Harvey RC., Mullighan CG., Wang X., Dobbin KK., Davidson GS., Bedrick EJ., Chen IM., Atlas SR., Kang H., Ar K., Wilson CS., Wharton W., Murphy M., Devidas M., Carroll AJ.,

- Borowitz MJ., Bowman WP., Downing JR., Relling M., Yang J., Bhojwani D., Carroll WL., Camitta B., Reaman GH., Smith M., Hunger SP., Willman CL., 2010. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood* 116, 4874-4884.
- Hayakawa F., Towatari M., Kiyoi H., Tanimoto M., Kitamura T., Saito H., Naoe T., 2000. Tandem-duplicated *Flt3* constitutively activates *STAT5* and *MAP* kinase and introduces autonomous cell growth in *IL-3*-dependent cell lines. *Oncogene* 19, 624-631.
- Hess JL., 2004. *MLL*: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. *Trends Mol Med.* 10, 500-507.
- Hilden JM., Dinndorf PA., Meerbaum SO., Sather H., Villaluna D., Heerema NA., Mc Glennen R., Smith FO., Woods WG., Salzer WL., Johnstone HS., Dreyer Z., Reaman GH., Children's Oncology Group, 2006. Analysis of prognostic factors of acute lymphoblastic leukemia in infants: report on CCG 1953 from the Children's Oncology Group. *Blood* 108, 441-451.
- Hitzler J., Zipursky A., 2005. *GATA 1* mutations as clonal markers of minimal residual disease in acute megakaryoblastic leukemia of Down syndrome- a new tool with significant potential applications. *Leuk. Res.* 29, 1239-1240.
- Hou YH., Srour EF., Ramsey H., Dahl R., Broxmeyer HE., Hromas R., 2005. Identification of a human B-cell/myeloid common progenitor by the absence of *CXCR4*. *Blood* 105, 3488-3492.
- Hrusák O., Porwit-MacDonald A., 2002. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* 16, 1233-1258.
- Hsi (abstract) Society of Hematopathology / European Association of Hematopathology Workshop Pediatric hematopathology cases.
- Hsieh JJ., Ernst P., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Korsmeyer SJ., 2003. Proteolytic cleavage of *MLL* generates a complex of N- and C-terminal fragments that confers protein stability and subnuclear localization. *Mol Cell Biol* 23, 186-194.
- Hunger SP., McGavran L., Meltesen L., Parker NB., Kassenbrock CK., Bitter MA., 1998. Oncogenesis in utero: fetal death due to acute myelogenous leukaemia with an *MLL* translocation. *Br J Haematol.* 103, 539-542.
- Hutter C., Attarbaschi A., Fischer S., Meyer C., Dworzak M., König M., Marschalek R., Mann G., Haas OA., Panzer-Grümayer ER., 2010. Acute monocytic leukemia originating from *MLL-MLLT3*-positive pre-B cells. *Br J Haematol.* 150, 621-623.
- Imataki O., Ohnishi H., Yamaoka G., Arai T., Kitanaka A., Kubota Y., Kushida Y., Ishida T., Tanaka T., 2010. Lineage switch from precursor B cell acute lymphoblastic leukemia to acute monocytic leukemia at relapse. *Int J Clin Oncol.* 15, 112-115.

- Irizarry MC., Hyman BT., 2003. Brain isoprostanes: a marker of lipid peroxidation and oxidative stress in AD. *Neurology* 61, 436-437.
- Isaacs Jr H., 2003. Fetal and neonatal leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 25, 348-361.
- Ishii E., Oda M., Kinugawa N., Oda T., Takimoto T., Suzuki N., Kosaka Y., Ohara A., Ogawa A., Ishii M., Sakata N., Okamura T., Koike K., Kojima S., Horibe K., Mizutani S., 2006. Features and outcome of neonatal leukemia in Japan: experience of the Japan infant leukemia study group. *Pediatr Blood Cancer* 47, 268-272.
- Takita J., Motomura A., Koh K., Ida K., Taki T., Hayashi Y., Igarashi T., 2009. Acute megakaryoblastic leukemia in a child with the MLL-AF4 fusion gene. *Eur J Haematol.* 83, 149-53.
- Jansen MW., Corral L., van der Velden VH., Panzer-Grümayer R., Schrappe M., Schrauder A., Marschalek R., Meyer C., den Boer ML., Hop WJ., Valsecchi MG., Basso G., Biondi A., Pieters R., van Dongen JJ., 2007. Immunobiological diversity in infant acute lymphoblastic leukemia is related to the occurrence and type of MLL gene rearrangement. *Leukemia* 21, 633-641.
- Kanezaki R., Toki T., Terui K., Xu G., Wang R., Shimada A., Hama A., Kanegane H., Kawakami K., Endo M., Hasegawa D., Kogawa K., Adachi S., Ikeda Y., Iwamoto S., Taga T., Kosaka Y., Kojima S., Hayashi Y., Ito E., 2010. Down syndrome and GATA1 mutations in transient abnormal myeloproliferative disorder: mutation classes correlate with progression to myeloid leukemia. *Blood* 116, 4631-4638.
- Kawamoto H., 2006. A close developmental relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends Immunol.* 27, 169-175.
- Kaye SA., Robison LL., Smithson WA., Gunderson P., King FL., Neglia JP., 1991. Maternal reproductive history and birth characteristics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 68, 1351-1355.
- Kidd V., Lion T., 1997. Debate round-table. Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia* 11, 871-881.
- Kiyoi H., Towatari M., Yokota S., Hamaguchi M., Ohno R., Saito H., Naoe T., 1998. Internal tandem duplication of the FLT3 gene is a novel modality of elongation mutation which causes constitutive activation of the product. *Leukemia* 12, 1333-1337.
- Krivtsov AV., Feng Z., Armstrong SA., 2009. Transformation from committed progenitor to leukemia stem cells. *Ann NY Acad Sci.* 1176, 144-149.
- Lahortiga I., Cools J., 2006. Cryptic chromosomal aberrations waiting to be discovered. *Leukemia* 20, 210-211.

- Li S. y Lew G., 2003. Is B-lineage acute lymphoblastic leukemia with a mature phenotype and 11 morphology a precursor B-lymphoblastic/lymphoma or Burkitt leukemia/lymphoma? *Arch Pathol Lab Med.* 127, 1340-1344.
- Libura M., Asnafi V., Tu A., Delabesse E., Tigaud I., Cymbalista F., Bennaceur-Griscelli A., Villarese P., Solbu G., Hagemeijer A., Beldjord K., Hermine O., Macintyre E., 2003. FLT3 and MLL intragenic abnormalities in AML reflect a common category of genotoxic stress. *Blood* 102, 2198-2204.
- Lim L., Chen KS., Krishnan S., Gole L., Ariffin H., 2012. Mature B-cell acute lymphoblastic leukaemia associated with a rare MLL-FOXO4 fusion gene. *Br J Haematol.* 157, 651.
- Liu H., Cheng EH., Hsieh JJ., 2007. Bimodal degradation of MLL by SCFSkp2 and APCCdc20 assures cell cycle execution: a critical regulatory circuit lost in leukemogenic MLL fusions. *Genes Dev.* 21, 2385-2398.
- Lorenzana AN., Rubin CM., Le Beau MM., Nachman J., Connolly P., Subramanian U., Johnson FL., McKeithan TW., 1991. Immunoglobulin gene rearrangements in acute lymphoblastic leukemia with the 9;11 translocation. *Genes Chromosomes Cancer.* 3, 74-77.
- Lorsbach (abstract) Society of Hematopathology / European Association of Hematopathology Workshop Pediatric hematopathology cases.
- Mahmoud HH., Ridge SA., Behm FG., Pui CH., Ford AM., Raimondi SC., Greaves MF., 1995. Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute lymphoblastic leukemia in monozygotic twins. *Med Pediatr Oncol.* 24, 77-81.
- Malik S., Bhaumik SR., 2010. Mixed lineage leukemia: histone H3 lysine 4 methyltransferases from yeast to human. *FEBS J.* 277, 1805-1821.
- Mansini AP., Rubio PL., Rossi JG., Gallego MS., Medina A., Zubizarreta PA., Felice MS., Alonso CN., 2013. Mutation characterization in the GATA-1 gene in patients with Down's Syndrome diagnosed with transient abnormal myelopoiesis or acute megakaryoblastic leukemia. *Arch Argent Pediatr.* 111, 532-536.
- Marschalek R., Greil J., Löchner K., Nilson I., Siegler G., Zweckbronner I., Beck JD., Fey GH., 1995. Molecular analysis of the chromosomal breakpoint and fusion transcripts in the acute lymphoblastic SEM cell line with chromosomal translocation t(4;11). *Br J Haematol.* 90, 308-320.
- Marschalek R., Nilson I., Löchner K., Greim R., Siegler G., Greil J., Beck JD., Fey GH., 1997. The structure of the human ALL-1/MLL/HRX gene. *Leuk Lymphoma* 27, 417-428.
- Martin D., Orkin S., 1990. Transcriptional activation and DNA binding by the erythroid factor GF-1/NF-E1/Eryf 1. *Genes Dev.* 4, 1886-1898.

- Martin ME., Milne TA., Bloyer S., Galoian K., Shen W., Gibbs D., Brock HW., Slany R., Hess JL., 2003. Dimerization of MLL fusion proteins immortalizes hematopoietic cells. *Cancer Cell* 4, 197-207.
- Meshinchi S., Alonzo TA., Stirewalt DL., Zwaan M., Zimmerman M., Reinhardt D., Kaspers GJ., Heerema NA., Gerbing R., Lange BJ., Radich JP., 2006. Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML. *Blood* 108, 3654-3661.
- Merika M., Orkin S., 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3999-4010.
- Meyer C., Schneider B., Reichel M., Angermueller S., Strehl S., Schnittger S., Schoch C., Jansen MW., van Dongen JJ., Pieters R., Haas OA., Dingermann T., Klingebiel T., Marschalek R., 2005. Diagnostic tool for the identification of MLL rearrangements including unknown partner genes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 449-454.
- Meyer C., Schneider B., Jakob S., Strehl S., Attarbaschi A., Schnittger S., Schoch C., Jansen MW., van Dongen JJ., den Boer ML., Pieters R., Ennas MG., Angelucci E., Koehl U., Greil J., Griesinger F., Zur Stadt U., Eckert C., Szczepanski T., Niggli FK., Schäfer BW., Kempinski H., Brady HJ., Zuna J., Trka J., Nigro LL., Biondi A., Delabesse E., Macintyre E., Stanulla M., Schrappe M., Haas OA., Burmeister T., Dingermann T., Klingebiel T., Marschalek R., 2006. The MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 20, 777-784.
- Meyer C. y Marschalek R., 2009a. LDI-PCR: identification of known and unknown gene fusions of the human MLL gene. *Methods Mol Biol.* 538, 71-83.
- Meyer C., Kowarz E., Hofmann J., Renneville A., Zuna J., Trka J., Ben Abdelali R., Macintyre E., De Braekeleer E., De Braekeleer M., Delabesse E., de Oliveira MP., Cavé H., Clappier E., van Dongen JJ., Balgobind BV., van den Heuvel-Eibrink MM., Beverloo HB., Panzer-Grümayer R., Teigler-Schlegel A., Harbott J., Kjeldsen E., Schnittger S., Koehl U., Gruhn B., Heidenreich O., Chan LC., Yip SF., Krzywinski M., Eckert C., Möricke A., Schrappe M., Alonso CN., Schäfer BW., Krauter J., Lee DA., Zur Stadt U., Te Kronnie G., Sutton R., Izraeli S., Trakhtenbrot L., Lo Nigro L., Tsaour G., Fehina L., Szczepanski T., Strehl S., Ilencikova D., Molkentin M., Burmeister T., Dingermann T., Klingebiel T., Marschalek R., 2009b. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia* 23, 1490-1499.
- Meyer C., Hofmann J., Burmeister T., Gröger D., Park TS., Emerenciano M., Pombo de Oliveira M., Renneville A., Villarese P., Macintyre E., Cavé H., Clappier E., Mass-Malo K., Zuna J., Trka J., De Braekeleer E., De Braekeleer M., Oh SH., Tsaour G., Fehina L., van der Velden VH., van Dongen JJ., Delabesse E., Binato R., Silva ML., Kustanovich A., Aleinikova O., Harris MH., Lund-Aho T., Juvonen V., Heidenreich O., Vormoor J., Choi WW., Jarosova M., Kolenova A., Bueno C., Menendez P., Wehner S., Eckert C., Talmant P., Tondeur S., Lippert E., Launay E., Henry C., Ballerini P., Lapillone H., Callanan MB., Cayuela JM., Herbaux C., Cazzaniga G., Kakadiya PM., Bohlander S., Ahlmann M., Choi JR., Gameiro P., Lee DS., Krauter J., Cornillet-Lefebvre P., Te Kronnie G., Schäfer BW., Kubetzko S., Alonso CN., zur



- Stadt U., Sutton R., Venn NC., Izraeli S., Trakhtenbrot L., Madsen HO., Archer P., Hancock J., Cerveira N., Teixeira MR., Lo Nigro L., Möricke A., Stanulla M., Schrappe M., Sedék L., Szczepanski T., Zwaan CM., Coenen EA., van den Heuvel-Eibrink MM., Strehl S., Dworzak M., Panzer-Grümayer R., Dingermann T., Klingebiel T., Marschalek R., 2013. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 27, 2165-2176.
- Milne TA., Briggs SD., Brock HW., Martin ME., Gibbs D., Allis CD., Hess JL., 2002. MLL Targets SET Domain Methyltransferase Activity to Hox Gene Promoters. *Mol Cell* 10, 1107-1117.
- Milne TA., Hughes CM., Lloyd R., Yang Z., Rozenblatt-Rosen O., Dou Y., Schnepf RW., Krankel C., Livolsi VA., Gibbs D., Hua X., Roeder RG., Meyerson M., Hess JL., 2005a. Menin and MLL cooperatively regulate expression of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102, 749-754.
- Milne TA., Martin ME., Brock HW., Slany RK., Hess JL., 2005b. Leukemogenic MLL Fusion Proteins Bind across a Broad Region of the Hox a9 Locus, Promoting Transcription and Multiple Histone Modifications. *Cancer Res.* 65, 11367-11374.
- Montecino-Rodriguez E., Leathers H., Dorshkind K., 2001. Bipotential B-macrophage progenitors are present in adult bone marrow. *Nat Immunol.* 2, 83-88.
- Montecino-Rodriguez E., Dorshkind K., 2002. Identification of B/macrophage progenitors in adult bone marrow. *Semin Immunol.* 14, 371-376.
- Moreno F., 2001. Registro Oncopediátrico Hospitalario Argentino (ROHA). Resultados 2000-2008. Tercera Edición, Fundación Kaleidos, Buenos Aires, Argentina.
- Mori H., Colman SM., Xiao Z., Ford AM., Healy LE., Donaldson C., Hows JM., Navarrete C., Greaves M., 2002. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99, 8242-8247.
- Nakao M., Yokota S., Iwai T., Kaneko H., Horiike S., Kashima K., Sonoda Y., Fujimoto T., Misawa S., 1996. Internal tandem duplication of the FLT3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 10, 1911-18.
- Newton A., Mackay J., Crossley M., 2001. The N-terminal Zinc Finger of the Erythroid Transcription Factor GATA-1 Binds GATC Motifs in DNA. *J. Biol. Chem.* 276, 35794-35801.
- Ozeki K., Kiyoi H., Hirose Y., Iwai M., Ninomiya M., Kodera Y., Miyawaki S., Kuriyama K., Shimazaki C., Akiyama H., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Ueda R., Ohno R., Emi N., Naoe T., 2004. Biologic and clinical significance of the FLT3 transcript level in acute myeloid leukemia. *Blood* 103, 1901-1908.

- Pal S., Cantor AB., Johnson KD., Moran TB., Boyer ME., Orkin SH., Bresnick EH., 2004. Coregulator-dependent facilitation of chromatin occupancy by GATA-1. *PNAS*. 101, 981-985.
- Pallardó FV., Degan P., d'Ischia M., Kelly FJ., Zatterale A., Calzone R., Castello G., Fernandez-Delgado R., Dunster C., Lloret A., Manini P., Pisanti MA., Vuttariello E., Pagano G., 2006. Multiple evidence for an early age pro-oxidant state in Down syndrome patients. *Biogerontology* 7, 211-220.
- Pallisgaard N., Hokland P., Riishøj DC., Pedersen B., Jørgensen P., 1998. Multiplex Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction for Simultaneous Screening of 29 Translocations and Chromosomal Aberrations in Acute Leukemia. *Blood* 92, 574-588.
- Patel A., Dharmarajan V., Cosgrove MS., 2008a. Structure of WDR5 bound to Mixed Lineage Leukemia Protein-1 peptide. *J Biol Chem*. 283, 32158-32161.
- Patel A., Vought V., Dharmarajan V., Cosgrove MS., 2008b. A conserved arginine containing motif crucial for the assembly and enzymatic activity of the Mixed Lineage Leukemia protein-1 core complex. *J Biol Chem*. 283, 32162-32175.
- Patel A., Dharmarajan V., Vought VE., Cosgrove MS., 2009. On the mechanism of multiple lysine methylation by the human mixed lineage leukemia protein-1 (MLL1) core complex. *J Biol Chem*. 284, 24242-24256.
- Pieters R., 2003. Biology and treatment of infant leukemias. In: Pui CH., *Treatment of acute leukemias: new directions for clinical research*. Humana Press., Totowa, NJ, USA, pp. 61-73.
- Pieters R., Schrappe M., De Lorenzo P., Hann I., De Rossi G., Felice M., Hovi L., LeBlanc T., Szczepanski T., Ferster A., Janka G., Rubnitz J., Silverman L., Stary J., Campbell M., Li CK., Mann G., Suppiah R., Biondi A., Vora A., Valsecchi MG., 2007. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet* 370, 240-250.
- Pine SR., Guo Q., Yin C., Jayabose S., Levendoglu-Tugal O., Ozkaynak MF., Sandoval C., 2005. GATA1 as a new target to detect minimal residual disease in both transient leukemia and megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Leuk Res*. 29, 1353-1356.
- Pui CH., Raimondi SC., Murphy SB., Ribeiro RC., Kalwinsky DK., Dahl GV., 1987. An analysis of leukemic cell chromosomal features in infants. *Blood* 69, 1289-1293.
- Pui CH., Relling M., Downing J., 2004. Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 350, 1535-1548.
- Rainis L., Bercovich D., Strehl S., Teigler-Schlegel A., Stark B., Trka J., Amariglio N., Biondi A., Muler I., Rechavi G., Kempinski H., Haas OA., Izraeli S., 2003. Mutations in exon 2 of

- GATA1 are early events in megakaryocytic malignancies associated with trisomy 21. *Blood* 102, 981-986.
- Raji NS., Rao KS., 1998. Trisomy 21 and accelerated aging: DNA-repair parameters in peripheral lymphocytes of Down's syndrome patients. *Mech Ageing Dev.* 100, 85-101.
- Ratei R., Basso G., Dworzak M., Gaipa G., Veltroni M., Rhein P., Biondi A., Schrappe M., Ludwig WD., Karawajew L., AIEOP-BFM-FCM-MRD-Study Group, 2009. Monitoring treatment response of childhood precursor B-cell lymphoblastic leukemia in the AIEOP-BFM-ALL 2000 protocol with multiparameter flow cytometry: predictive impact of early blast reduction on the remission status after induction. *Leukemia* 23, 528-534.
- Reaman GH., Sposto R., Sensel MG., Lange BJ., Feusner JH., Heerema NA., Leonard M., Holmes EJ., Sather HN., Pendergrass TW., Johnstone HS., O'Brien RT., Steinherz PG., Zeltzer PM., Gaynon PS., Trigg ME., Uckun FM., 1999. Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *J Clin Oncol.* 17, 445-455.
- Reindl C., Bagrintseva K., Vempati S., Schnittger S., Ellwart JW., Wenig K., Hopfner KP., Hiddemann W., Spiekermann K., 2006. Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML. *Blood* 107, 3700-3707.
- Richkind KE., Loew T., Meisner L., Harris C., Wason D., 1998. Identical cytogenetic clones and clonal evolution in pediatric monozygotic twins with acute myeloid leukemia: presymptomatic disease detection by interphase fluorescence in situ hybridization and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* 20, 264-267.
- Ringrose L., Paro R., 2004. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and trithorax group proteins. *Annu Rev Genet.* 38, 413-443.
- Robison LL., Buckley JD., Daigle AE., Wells R., Benjamin D., Arthur DC., Hammond GD., 1989. Maternal drug use and risk of childhood nonlymphoblastic leukemia among offspring. An epidemiologic investigation implicating marijuana (a report from the Children's Cancer Study Group). *Cancer* 63, 1904-1911.
- Ross JA., Davies SM., Potter JD., Robison LL., 1994. Epidemiology of childhood leukemia, with a focus on infants. *Epidemiol Rev.* 16, 243-270.
- Ross JA., Perentesis JP., Robison LL., Davies SM., 1996. Big babies and infant leukemia: a role for insulin like growth factor-1? *Cancer Causes Control* 7, 553-559.
- Ross JA., Potter JD., Shu XO., Reaman GH., Lampkin B., Robison LL., 1997. Evaluating the relationships among maternal reproductive history, birth characteristics, and infant leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Ann Epidemiol.* 7, 172-179.

- Ross JA., Robison LL., 1997. MLL rearrangements in infant leukemia: is there a higher frequency in females? *Leuk Res.* 21, 793-795.
- Ross JA., 1998. Maternal diet and infant leukemia: a role for DNA topoisomerase II inhibitors? *Int. J. Cancer Suppl.* 11, 26-28.
- Rossi JG., Bernasconi AR., Alonso CN., Rubio PL., Gallego MS., Carrara CA., Gutter MR., Eberle SE., Cocce M., Zubizarreta PA., Felice MS., 2012. Lineage switch in childhood acute leukemia: An unusual event with poor outcome. *Am. J. Hematol.* 87, 890-897.
- Rowley J., 2008. Chromosomal translocations: revisited yet again. *Blood* 112, 2183-2189.
- Ruthenburg AJ., Wang W., Graybosch DM., Li H., Allis CD., Patel DJ., Verdine GL., 2006. Histone H3 recognition and presentation by the WDR5 module of the MLL1 complex. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 704-712.
- Sakaki H., Kanegane H., Nomura K., Goi K., Sugita K., Miura M., Ishii E., Miyawaki T., 2009. Early lineage switch in an infant acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol.* 90, 653-655.
- Sansone R., Negri D., 1992. Cytogenetic features of neonatal leukemias. *Cancer Genet Cytogenet.* 63, 56-61.
- Schneider B., Drexler HG., Macleod RA., 2011. Molecular breakpoint analysis of chromosome translocations in cancer cell lines by Long Distance Inverse-PCR. *Methods Mol Biol.* 731, 321-332.
- Schnittger S., Schoch C., Dugas M., Kern W., Staib P., Wuchter C., Löffler H., Sauerland CM., Serve H., Büchner T., Haferlach T., Hiddemann W., 2002. Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease. *Blood* 100, 59-66.
- Schwartz S., Rieder H., Schlager B., Burmeister T., Fischer L., Thiel E., 2003. Expression of the human homologue of rat NG2 in adult acute lymphoblastic leukemia: close association with MLL rearrangement and a CD10(-)/CD24(-)/CD65s(+)/CD15(+) B-cell phenotype. *Leukemia* 17, 1589-1595.
- Setchell KD., Zimmer-Nechemias L., Cai J., Heubi JE., Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet.* 1997; 350, 23-27.
- Severson RK., Buckley JD., Woods WG., Benjamin D., Robison LL., 1993. Cigarette smoking and alcohol consumption by parents of children with acute myeloid leukemia: an analysis within morphological subgroups--a report from the Childrens Cancer Group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2, 433-439.
- Shaffer LG., Slovak ML., Campbell LJ., 2009. ISCN: an international system for human cytogenetic nomenclature. S. Karger, Basel, Switzerland.

- Shende A., Festa RS., Wedgwood JF., Lanzkowsky P., 1988. A paediatric case of a TdT positive B-cell acute lymphoblastic leukemia (B-ALL) without Burkitt Characteristics. *Br J Haematol.* 70, 129-130.
- Shilatifard A., 2008. Molecular implementation and physiological roles for histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation. *Curr Opin Cell Biol.* 20, 341-348.
- Shivdasani RA., 2001. Molecular and transcriptional regulation of megakaryocyte differentiation. *Stem Cells* 19, 397-407.
- Shu XO., Ross JA., Pendergrass TW., Reaman GH, Lampkin B, Robison LL, 1996. Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a children's cancer group study. *J Natl Cancer Inst.* 88, 24-31.
- Silverman LB., McLean TW., Gelber RD., Donnelly MJ., Gilliland DG., Tarbell NJ., Sallan SE., 1997. Intensified therapy for infants with acute lymphoblastic leukemia: results from the Dana Farber Cancer Institute Consortium. *Cancer* 80, 2285-2295.
- Slany RK., 2009. The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* 94, 984-993.
- So CW., Lin M., Ayton PM., Chen EH., Cleary ML., 2003. Dimerization contributes to oncogenic activation of MLL chimeras in acute leukemias. *Cancer Cell* 4, 99-110.
- Southall SM., Wong P., Odho Z., Roe SM., Wilson JR., 2009. Structural basis for the recruitment of additional factors for MLL1 SET domain activity and recognition of epigenetic marks. *Mol Cell* 33, 181-191.
- Song JJ., Kingston RE., 2008. WDR5 interacts with mixed lineage leukemia (MLL) protein via the histone H3-binding pocket. *J Biol Chem.* 283, 35258-35264.
- Spector LG., Xie Y., Robison LL., Heerema NA., Hilden JM., Lange B., Felix CA., Davies SM., Slavin J., Potter JD., Blair CK., Reaman GH., Ross JA., 2005. Maternal diet and infant leukemia: the DNA topoisomerase II inhibitor hypothesis: a report from the children's oncology group. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14, 651-655.
- Spiekermann K., Bagrintseva K., Schoch C., Haferlach T., Hiddemann W., Schnittger S., 2002. A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia. *Blood* 100, 3423-3425.
- Stary J., Zimmermann M., Campbell M., Castillo L., Dibar E., Donska S., Gonzalez A., Izraeli S., Janic D., Jazbec J., Konja J., Kaiserova E., Kowalczyk J., Kovacs G., Li CK., Magyarosy E., Popa A., Stark B., Jabali Y., Trka J., Hrusak O., Riehm H., Masera G., Schrappe M., 2014. Intensive chemotherapy for childhood acute lymphoblastic leukemia: results of the randomized intercontinental trial ALL IC-BFM 2002. *J Clin Oncol.* 32, 174-184.

- Steward MM., Lee JS., O'Donovan A., Wyatt M., Bernstein BE., Shilatifard A., 2006. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol.* 13, 852-854.
- Stirewalt DL., Kopecky KJ., Meshinchi S., Engel JH., Pogosova-Agadjanyan EL., Linsley J., Slovak ML., Willman CL., Radich JP., 2006. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 107, 3724-3726.
- Strick R., Strissel PL., Borgers S., Smith SL., Rowley JD., 2000. Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and may contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97, 4790-4795.
- Sullivan MP., Pullen DJ., Crist WM., Brecher M., Ramirez I., Sabio H., Borowitz MJ., Head DR., Cerezo L., Shuster JJ., et al., 1990. Clinical and biological heterogeneity of childhood B-cell acute lymphoblastic leukemia: implications for clinical trials. *Leukemia* 4, 6-11.
- Swerdlow S., Campo E., Lee Harris N., Jaffe ES., Pileri SA., Stein H., Thiele J., Vardiman JW., 2008. *The WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* 4th ed. International Agency for Research on Cancer (IARC) press, Lyon, France.
- Szczepanski T., Willemse MJ., Kamps WA., van Wering ER., Langerak AW., van Dongen JJ., 2001. Molecular discrimination between relapsed and secondary acute lymphoblastic leukemia: Proposal for an easy strategy. *Med Pediatr Oncol.* 36, 352-358.
- Szczepanski T., 2007. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia?. *Leukemia* 21, 622-626.
- Thiede C., Steudel C., Mohr B., Schaich M., Schäkel U., Platzbecker U., Wermke M., Bornhäuser M., Ritter M., Neubauer A., Ehninger G., Illmer T., 2002. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 99, 4326-4335.
- Trievel RC., Shilatifard A., 2009. WDR5, a complexed protein. *Nat Struct Mol Biol.* 16, 678-680.
- Tsao L., Draoua HY., Osunkwo I., Nandula SV., Murty VV., Mansukhani M., Bhagat G., Alobeid B., 2004. Mature B-cell acute lymphoblastic leukemia with t(9;11) translocation: a distinct subset of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Mod Pathol.* 17, 832-839.
- Tse KF., Mukherjee G., Small D., 2000. Constitutive activation of FLT3 stimulates multiple intracellular signal transducers and results in transformation. *Leukemia* 14, 1766-1776.
- Turner MC., Wigle DT., Krewski D., 2010. Residential Pesticides and Childhood Leukemia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Environ Health Perspect.* 118, 33-41.
- van der Burg M., Poulsen TS., Hunger SP., Beverloo HB., Smit EME., Vang-Nielsen K., Langerak AW., van Dongen JJM., 2004. Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 18, 895-908.

- van der Linden MH., Valsecchi MG., De Lorenzo P., Möricke A., Janka G., Leblanc TM., Felice M., Biondi A., Campbell M., Hann I., Rubnitz JE., Stary J., Szczepanski T., Vora A., Ferster A., Hovi L., Silverman LB., Pieters R., 2009. Outcome of congenital acute lymphoblastic leukemia treated on the Interfant-99 protocol. *Blood* 114, 3764-3768.
- van der Velden VH., Hochhaus A., Cazzaniga G., Szczepanski T., Gabert J., van Dongen JJ., 2003a. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia* 17, 1013-1034.
- van der Velden VH., Szczepanski T., Wijkhuijs JM., Hart PG., Hoogeveen PG., Hop WC., van Wering ER., van Dongen JJ., 2003b. Age-related patterns of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in precursor-B-ALL: implications for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 17, 1834-1844.
- van der Velden VH., Brüggemann M., Hoogeveen PG., de Bie M., Hart PG., Raff T., Pfeifer H., Lüschen S., Szczepanski T., van Wering ER., Kneba M., van Dongen JJ., 2004. TCRB gene rearrangements in childhood and adult precursor-B-ALL: frequency, applicability as MRD-PCR target, and stability between diagnosis and relapse. *Leukemia* 18, 1971-1980.
- van der Velden VHJ., de Bie M., van Wering ER., van Dongen JJM., 2006. Immunoglobulin light chain gene rearrangements in precursor-B-acute lymphoblastic leukemia: characteristics and applicability for the detection of minimal residual disease. *Haematologica* 91, 679-682.
- van der Velden VH., Cazzaniga G., Schrauder A., Hancock J., Bader P., Panzer-Grumayer ER., Flohr T., Sutton R., Cave H., Madsen HO., Cayuela JM., Trka J., Eckert C., Foroni L., Zur Stadt U., Beldjord K., Raff T., van der Schoot CE., van Dongen JJ., European Study Group on MRD detection in ALL (ESG-MRD-ALL), 2007. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia* 21, 604-611.
- van Dongen JJ., Macintyre EA., Gabert JA., Delabesse E., Rossi V., Saglio G., Gottardi E., Rambaldi A., Dotti G., Griesinger F., Parreira A., Gameiro P., Díaz MG., Malec M., Langerak AW., San Miguel JF., Biondi A., 1999. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13, 1901-1928.
- van Dongen JJ., Langerak AW., Brüggemann M., Evans PA., Hummel M., Lavender FL., Delabesse E., Davi F., Schuurin E., García-Sanz R., van Krieken JH., Droese J., González D., Bastard C., White HE., Spaargaren M., González M., Parreira A., Smith JL., Morgan GJ., Kneba M., Macintyre EA., 2003. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257-2317.

- Wasserman R., Galili N., Ito Y., Reichard BA., Shane S., Rovera G., 1992. Predominance of fetal type DJH joining in young children with B precursor lymphoblastic leukemia as evidence for an in utero transforming event. *J Exp Med.* 176, 1577-1581.
- Webb D., Roberts I., Vyas P., 2007. Haematology of Down syndrome. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 6, 503-507.
- Wechsler J., Greene M., McDevitt MA., Anastasi J., Karp JE., Le Beau MM., Crispino JD., 2002. Acquired mutations in GATA1 in the megakaryoblastic leukemia of Down syndrome. *Nat Genet.* 32, 148-152.
- Wertelecki W., Mantel N., 1973. Increased birthweight in leukemia. *Pediatr Res.* 7, 132-138.
- Westergaard T., Andersen PK., Pedersen JB., Olsen JH., Frisch M., Sørensen HT., Wohlfahrt J., Melbye M., 1997. Birth characteristics, sibling patterns and acute leukemia risk in childhood: a population-based cohort study. *J Natl Cancer Inst.* 89, 939-947.
- Winick NJ., McKenna RW., Shuster JJ., Schneider NR., Borowitz MJ., Bowman WP., Jacaruso D., Kamen BA., Buchanan GR., 1993. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol.* 11, 209-217.
- Wuchter C., Harbott J., Schoch C., Schnittger S., Borkhardt A., Karawajew L., Ratei R., Ruppert V., Haferlach T., Creutzig U., Dörken B., Ludwig WD., 2000. Detection of acute leukemia cells with mixed lineage leukemia (MLL) gene rearrangements by flow cytometry using monoclonal antibody 7.1. *Leukemia* 14, 1232-1238.
- Wysocka J., Swigut T., Milne TA., Dou Y., Zhang X., Burlingame AL., Roeder RG., Brivanlou AH., Allis CD., 2005. WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* 121, 859-872.
- Xu G., Nagano M., Kanezaki R., Toki T., Hayashi Y., Taketani T., Taki T., Mitui T., Koike K., Kato K., Imaizumi M., Sekine I., Ikeda Y., Hanada R., Sako M., Kudo K., Kojima S., Ohneda O., Yamamoto M., Ito E., 2003. Frequent mutations in the GATA-1 gene in the transient myeloproliferative disorder of Down syndrome. *Blood* 102, 2960-2968.
- Yamamoto Y., Kiyoi H., Nakano Y., Suzuki R., Kodera Y., Miyawaki S., Asou N., Kuriyama K., Yagasaki F., Shimazaki C., Akiyama H., Saito K., Nishimura M., Motoji T., Shinagawa K., Takeshita A., Saito H., Ueda R., Ohno R., Naoe T., 2001. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3. *Blood* 97, 2434-2439.
- Yeazel MW., Buckley JD., Woods WG., Ruccione K., Robison LL., 1995. History of maternal fetal loss and increased risk of childhood acute leukemia at an early age: a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 75, 1718-1727.
- Yeoh EJ., Ross ME., Shurtleff SA., Williams WK., Patel D., Mahfouz R., Behm FG., Raimondi SC., Relling MV., Patel A., Cheng C., Campana D., Wilkins D., Zhou X., Li J., Liu H., Pui CH.,



- Evans WE., Naeve C., Wong L., Downing JR., 2002. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell* 1, 133-143.
- Yokoyama A., Wang Z., Wysocka J., Sanyal M., Aufiero DJ., Kitabayashi I., Herr W., Cleary ML., 2004. Leukemia proto-oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol.* 24, 5639-5649.
- Zeisig DT., Bittner CB., Zeisig BB., García-Cuellar MP., Hess JL., Slany RK., 2005. The eleven-nineteen-leukemia protein ENL connects nuclear *MLL* fusion partners with chromatin. *Oncogene* 24, 5525-5532.
- Zheng R., Blobel GA., 2010. GATA Transcription Factors and Cancer. *Genes & Cancer* 1, 1178-1188.