

FRECUENCIAS DE LOS REARREGLOS CROMOSÓMICOS Y GENÉTICOS

EN LEUCEMIAS AGUDAS EN POBLACIÓN ECUATORIANA DE ALTURA

Dr. César Paz-y-Miño ^(a), Biol. Alejandro Cabrera ^(a,b), Ing. Emilia Vázquez ^(a,c), Biol. Andrés López-Cortés ^(a), Biol. María José Muñoz ^(a), Biol. Bernardo Castro ^(a,b), Dra. Ligia Ocampo ^(d), Mtr. María Eugenia Sánchez ^(a).

(a) Instituto de Investigaciones Biomédicas. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad de las Américas. Quito - Ecuador.

(b) Escuela de Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito - Ecuador.

(c) Escuela de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Américas. Quito - Ecuador

(d) Laboratorio de Genética. SOLCA. Quito - Ecuador.

RESUMEN

Introducción.- Estudios genéticos de varias enfermedades en población ecuatoriana demuestran variabilidad genotípica con respecto a frecuencias observadas en otras partes del mundo. Las Leucemias Agudas son un tipo de leucemia bastante agresiva, que se presentan principalmente en grupos de edades bajas. Para determinar un eficiente tratamiento y conseguir pronosis favorables, es importante conocer la frecuencia de las translocaciones y la expresión de los genes quiméricos involucrados en esta neoplasia.

Materiales y Métodos.- Se trató de un estudio prospectivo, realizado desde 1996 hasta el 2009 que incluyó pacientes diagnosticados con leucemia aguda, provenientes del Hospital Oncológico de SOLCA y del Hospital de Niños Baca Ortiz, de la ciudad de Quito, Ecuador. Para los análisis citogenéticos se utilizó bandeado mediante técnica GTG. Para los análisis moleculares se realizó extracción de ARN, y PCR para los genes quiméricos BCR-ABL, MLL-AF4, AML-ETO y CBF β -MYH11.

Resultados.- De un total de 666 casos diagnosticados el 66.4% tuvo Leucemia Linfocítica Aguda y el 33.6% Leucemia Mieloide Aguda. En los niños diagnosticados con Leucemia Mieloblástica Aguda se encuentran diferencias significativas en las translocaciones t(15;17)(q21;q11), t(8;21)(q22;q22) y la inversión 16 (p13;q22). Al agrupar por grupos de edades se encuentran diferencias

ABSTRACT

Introduction.- Genetic studies of various diseases in Ecuadorian population show a genotypic variability in comparison with frequencies observed in other parts of the globe. The Acute Leukemia is an aggressive type of leukemia that occurs primarily in groups of patients in early childhood. In order to determine an effective treatment and to obtain a favorable prognosis is important to know the frequency of the translocations and the expression of chimeric genes involved in this cancer.

Materials and Methods.- 666 patients diagnosed with Acute Leukemia were analyzed between 1996 and 2009 from Oncological Hospital SOLCA and Children Hospital Baca Ortiz, from Quito, Ecuador. For the cytogenetic analysis, GTG banding technique was performed; for the molecular analysis, RNA isolation and PCR for chimeric genes (BCR-ABL, MLL-AF4, AML-ETO and CBF β -MYH11) were performed.

Results.- From 666 cases we found 66,4% of Acute Lymphocytic Leukemia and 33,6% of Acute Myeloid Leukemia. In children diagnosed with Acute Myeloid Leukemia, significant differences were found in the t(15;17)(q21;q11), t(8;21)(q22;q22) translocations and the 16 (p13;q22) inversion. Highly significant differences were found in the Acute Myeloid Leukemia incidence per age groups. In patients with Acute Lymphoid Leukemia, the t(9;22) (q34;q11) translocation is the most frequent. There were not

CORRESPONDENCIA:

César Paz-y-Miño M.D. D.B. - Instituto de Investigaciones Biomédicas Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de las Américas Dirección: Av. Granados E12-41 y Colimes, Quito - Ecuador - Teléfono: (593-2) 3981000 - E-mail: cpazymino@udla.edu.ec

altamente significativas en este tipo de leucemia. En pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda, la translocación t(9;22) (q34;q11) es la más frecuente. No se registraron casos t(1;19)(q23;p13) en pacientes de 21 a 50 años; mientras que la t(4;11) (q21;q23) se presentó en frecuencias muy bajas.

Conclusiones.- Se observa variaciones entre las frecuencias encontradas en este estudio con investigaciones realizadas previamente. Las variaciones entre frecuencias revisadas y frecuencias encontradas pueden ser ocasionadas por una diferente constitución genética de la población estudiada debido a que los individuos pertenecen a una población mestiza, además de la influencia de factores externos y ambientales,

Palabras clave.- Leucemia Linfoblástica Aguda, Leucemia Mieloblástica Aguda, translocaciones.

INTRODUCCIÓN

Los estudios genéticos realizados en diversas enfermedades en población ecuatoriana han demostrado que existe variación en las frecuencias genéticas obtenidas al compararlas con las del resto del mundo. Esto se debe a que la muestra de la población analizada, en este caso mestiza, tiene una diferente constitución genética con respecto a otras poblaciones americanas, europeas y asiáticas.¹⁻³

El cáncer es la tercera causa de muerte en el Ecuador (12,5% de las muertes totales) y las leucemias en Quito representan el 5,4% de la totalidad de las neoplasias registradas. Las Leucemias Agudas (LA) representan el 71% de todos los casos de leucemias en el Ecuador, siendo más frecuentes que las crónicas.⁴ Para facilitar la determinación de tratamientos y obtener una buena prognosis es importante conocer detalladamente la frecuencia de cada tipo de translocación presente en población ecuatoriana afecta, ya que con un adecuado esquema quimioterapéutico se consiguen remisiones de hasta el 80% en Leucemias Agudas.⁵ En este trabajo se analizaron translocaciones identificadas en Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA) y en Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), con el objetivo de comparar estas frecuencias con otras estudiadas en población mundial. Varias alteraciones son observadas en LMA siendo las más representativas: t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q21;q11) e inv 16⁶; mientras que en LLA son: t(9;22) (q34;q11) y t(1;19)(q23;p13).^{2,7}

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio consistió en un diseño prospectivo.

found cases of t(1;19)(q23;p13) in patients between 21 and 50 years old, however the t(4;11)(q21;q23) was found in low frequencies .

Conclusions.- Variations were found between the frequencies obtained in this study and prior investigations. These variations may occur because of the different genetic constitution for the studied group since individuals come from a mixed population, including the influence of external and environmental factors.

Key words.- Acute Lymphoid Leukemia, Acute Myeloid Leukemia, translocations.

Se analizaron casos diagnosticados con LA provenientes del Hospital Oncológico SOLCA y del Hospital de Niños Baca Ortiz. Los datos recogidos datan desde 1996 hasta el 2009. El cariotipaje de los individuos se realizó mediante la cosecha de cultivos de sangre periférica y médula ósea, extensión, tinción simple de placas y bandeado mediante la técnica GTG, siguiendo los protocolos modificados y estandarizados en el laboratorio.⁸ El diagnóstico e identificación de los cariotipos analizados se lo realizó a través del software Cytovision de Applied Imaging Corporation.

En los análisis moleculares, se siguió el protocolo de Chomczynski y Sacchi para la extracción de ARN⁹. Se realizó una PCR – transcriptasa reversa y el ADNc resultante se lo amplificó para su análisis genético. Los cebadores utilizados en la PCR fueron seleccionados para los genes quiméricos BCR-ABL [t(9;22)], MLL-AF4 [t(4;11)], PML-RAR α [t(15;17)], AML-ETO [t(8;21)] y CBF β -MYH11 (inv 16). Con respecto al análisis estadístico, se aplicó la prueba de chi cuadrado (χ^2) a un nivel de significancia de 0,05 y 0,001, para determinar posibles diferencias significativas entre los datos obtenidos en nuestro laboratorio y los datos registrados en la bibliografía.

RESULTADOS

De un total de 666 casos con diagnóstico de Leucemia Aguda, el 66,4% correspondió a LLA y el 33,6% a LMA.

El 54,5% de pacientes diagnosticados con LMA presentó un cariotipo normal y resultados negativos en pruebas moleculares para los genes quiméricos descritos en la metodología, mientras que en el 19,2% de pacientes remitidos al laboratorio no se encontraron metafases (Tabla 1).

Tabla 1. Frecuencias genotípicas encontradas en la población ecuatoriana afecta con LMA

	Sin edades		
	Alteraciones estudiadas	Porcentaje (%)	Total (n = 224)
LMA ^a (n = 224) 33.6%	t(9;22)(q34;q11)	4,9	11
	t(15;17)(q21;q11)	1,3	3
	t(8;21)(q22;q22)	2,7	6
	inv ^b 16	1,3	3
	Otras translocaciones	8,5	19
	Cariotipo normal	54,5	122
	Sin metafases	19,2	43
	Mosaico	7,6	17

^a LMA: Leucemia Mieloide Aguda; ^b inv 16: inversión 16

En niños y adultos se encuentran diferencias significativas en las translocaciones t(8;21) (q22;q22) ($p < 0,05$) y la Inv(16)(p13;q22) ($p < 0,05$), dando frecuencias más bajas en la población bajo estudio. La t(15;17)(q21;q11) presentó diferencias estadísticas en el grupo de adultos ($\chi^2 = 12,07$; $p < 0,001$), mas no al correlacionarla con el grupo de 0 a 20 años ($\chi^2 = 3,57$; $p > 0,05$). La incidencia de todas las translocaciones en personas mayores de 50 años no presenta mayor variación (Tabla 2).

Tabla 2. Alteraciones comunes en pacientes con LMA observadas por grupos de edades.

Alteración Citogenética	Niños 0 - 20 Años			Adultos 21 - 50 Años			> 50 Años	
	FB ^a (6,10)	FPE ^b	p valor	FB ^a (6,10)	FPE	p valor	FB ^a (6,10)	FPE
t(15;17)(q21;q11)	7%	2,1%	$p > 0,05$	15%	1,1%	$p < 0,001$	<1%	0%
t(8;21)(q22;q22)	12%	4,3%	$p < 0,05$	5-8%	1,1%	$p < 0,05$	<1%	2,6%
Inv(16)(p13;q22)	12%	1,1%	$p < 0,05$	10%	2,2%	$p < 0,05$	<1%	0%

^a FB: Frecuencias bibliografía; ^b FPE: Frecuencias pacientes Ecuatorianos

Diferencias altamente significativas se presenta en la incidencia de LMA por grupos de edades, teniendo que el 41,9% de individuos de 0 a 20 años en población ecuatoriana presenta este tipo de leucemia ($p < 0,001$); 41% en grupos de 21 a 50 años ($p < 0,001$), y un porcentaje mucho más bajo en pacientes mayores de 50 años ($p < 0,001$) (Tabla 3).

Tabla 3. Frecuencias de población ecuatoriana con LMA por grupos de edades.

Edades	0 - 20 Años	21 - 50 años	> 50 Años
LMA Total bibliografía ⁽¹¹⁾	6,3%	13,1%	80,6%
Total LMA ^a estudiadas	41,96%	41,07%	16,96%
p valor	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

^a LMA: Leucemia Mieloide Aguda

En LLA, la translocación t(9;22) (q34;q11) es la más frecuente en este estudio, dando diferencias estadísticas en adultos ($\chi^2 = 9,78$; $p < 0,05$). No se registraron casos de pacientes con t(1;19)(q23;p13) en edades entre 21 a 50 años; mientras que la t(4;11) (q21;q23) se presentó en frecuencias demasiado bajas en ambos grupos, dando diferencias de $p < 0,001$ en el grupo de niños, y $p < 0,05$ en el grupo de adultos (Tabla 4).

Tabla 4. Alteraciones observadas por grupos de edades en pacientes con LLA.

Alteración Citogenética	Niños 0 - 21 Años			Adultos 21 - 50 Años		
	FB ^a (12)	FPE ^b	p valor	FB ^a (6,10,12)	FPE	p valor
t(9;22)(q34;q11)	3 - 5%	3,41%	$p > 0,05$	25 - 30%	10,8%	$p < 0,05$
t(1;19)(q23;p13)	5%	2,9%	$p > 0,05$	5 - 7%	0%	-
t(4;11)(q21;q23)	8%	0,0%	$p < 0,001$	10%	1,4%	$p < 0,05$

^a FB: Frecuencias bibliografía; ^b FPE: Frecuencias pacientes Ecuatorianos

La t(1;19)(q23;p13) se presentó en el 2,04%, y la t(4;11)(q21;q23) en el 0,45% del total de afectados a LLA.

Se encuentra un gran porcentaje de pacientes con LMA y cariotipos normales (Tabla 5).

Tabla 5. Frecuencias de los análisis citogenéticos encontrados en pacientes con LLA.

	Alteraciones Observadas	Sin edades	
		Porcentaje (%)	Total de muestras
LLA ^a (n=442) 66.4%	t(9;22)(q34;q11)	4,75	21
	t(1;19)(q23;p13)	2,04	9
	t(4;11)(q21;q23)	0,45	2
	Otras translocaciones	14,25	63
	Cariotipo normal	62,22	275
	Sin Metafases	11,99	53
	Complejo	4,30	19

^a LLA: Leucemia Linfoide Aguda

DISCUSIÓN

Durante las últimas décadas importantes avances científicos se han dado en el campo de la epidemiología, genética, características moleculares y biológicas de las Leucemias, y en general del cáncer. Mediante una intensificación terapéutica y mejoras en técnicas de diagnóstico y tratamiento para dicha enfermedad, se ha llegado a tener una tasa de supervivencia de hasta el 50% en niños y jóvenes con LMA⁶. Por eso es importante diagnosticar de manera temprana y efectiva, y conocer en qué frecuencia esta neoplasia se presenta en población ecuatoriana.

Se observa variaciones entre las frecuencias encontradas en este estudio con investigaciones realizadas previamente.

La t(15;17)(q21;q11), t(8;21)(q22;q22) y la inversión (16) (p13;q22) son las translocaciones más frecuentes en niños y adultos jóvenes menores a 50 años de edad con LMA.^{6, 15} Dentro de la población ecuatoriana afecta con LMA, la frecuencia disminuye con respecto a la esperada, siendo en pacientes de 0 a 20 años mucho mayor que las frecuencias reportadas y en adultos mayores a 50, la frecuencia de las translocaciones analizadas es mucho menor.¹⁵

Las LMA son el tipo de leucemias más comunes dentro de una población adulta (mayores a 55 años), y su incidencia se incrementa con la edad. La incidencia en personas menores a 65 años es de 1.6 por cada 100.000 habitantes, mientras que para adultos mayores a 65 años es de 13.7 por cada 100.000 habitantes.¹⁶ Los resultados obtenidos en este estudio demuestran una variación marcada, teniendo que las frecuencias más altas se presentan en los grupos de edades menores (de 0 a 20 años) y decrecen conforme el grupo de edad aumenta (al contrario de la constante en publicaciones internacionales).¹¹

La leucemia es el cáncer más común encontrado en niños y las LLA son las predominantes en este grupo.⁶

Cuando la evaluación se hizo sin tomar en consideración las translocaciones inmersas en la enfermedad y se agruparon a los individuos por edades, se observan diferencias estadísticas al comparar frecuencias, pero se mantiene la tendencia con respecto a la bibliografía¹⁵. El grupo de edad más bajo (0 a 20 años) es el que más casos presenta de LLA y conforme aumenta la edad, disminuye la prevalencia de este tipo de leucemia (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencias de población ecuatoriana afecta con LLA por grupos de edades.

Edades	0 - 20 Años	21 - 55 años	> 50 años
LLA ^a Bibliografía ⁽¹¹⁾	61,0%	22,8%	16,2%
LLA Estudiadas	79,41%	16,74%	3,85%
<i>p</i> valor	<i>p</i> < 0,001	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,001

^a LLA: Leucemia Linfocitoide Aguda

El cromosoma filadelfia se encuentra en el 25 – 30% de adultos que padecen de esta enfermedad.² Es la anomalía citogenética más frecuente en este

tipo de leucemia en población adulta, siendo p190 la proteína expresada, aunque en este estudio su incidencia es menor que la esperada (10,8%) ($\chi^2=9,78$; $p < 0,05$) (Tabla 4).

La expresión de la t(4;11)(q21;q23) en todos los casos analizados de LLA es baja o nula.

Cada individuo es genéticamente diferente a otro, y por lo tanto puede presentar diferentes respuestas a los factores ambientales en el que se desenvuelve. Los cambios y rearrreglos moleculares en su mayoría son adquiridos y los factores ambientales pueden inducir a cambios celulares y daño en el ADN provocando leucemias u otros tipos de cáncer.

Entre los factores ambientales que pueden inducir alteraciones cromosómicas se encuentra la exposición a desechos industriales altamente tóxicos, exposición en zonas contaminadas por un alto tránsito vehicular al igual que el uso sin control de ciertos medicamentos y la exposición a ciertos pesticidas.^{18,19} Todos estos factores pudieron influir en las diferencias de las frecuencias génicas encontradas.

Un gran porcentaje de pacientes con LMA y LLA (54,5% y 62,2% respectivamente) presentaron un cariotipo normal y resultados negativos en pruebas moleculares para los rearrreglos discutidos anteriormente. Muchas otras proteínas quiméricas, no amplificadas en este estudio, están relacionadas con esta enfermedad y no lograron ser identificadas.⁶

Se realizaron cariotipos en pacientes que se encontraban en tratamiento o recibiendo medicamento, por lo que al momento de realizar el análisis citogenético no se obtuvieron metafases. Los medicamentos o los tratamientos recibidos ocasionan que las células no se dividan de forma adecuada por lo que no es posible obtener una metafase al momento de realizar éstos estudios. Esto se dio en el 19,2% de los casos de LMA y en el 11,9% de LLA.

CONCLUSIONES

Las variaciones entre frecuencias revisadas y frecuencias encontradas en este estudio pueden ser ocasionadas por una diferente constitución genética de la población estudiada. Se observan diferencias en las frecuencias de los genes quiméricos presentes en las leucemias debido a que los individuos pertenecen a una población mestiza. Hay que tener en cuenta que las interacciones genéticas y ambientales juegan un rol importante en el desarrollo de neoplasias.

Bibliografía

- 1.- Paz-y-Miño C, Pérez JC, Burgos R, Dávalos MV, Leone PE. The $\Delta F508$ mutation in Ecuador, South America. *Hum Mutat.* 1999;14:348–350.
- 2.- Paz-y-Miño C, Burgos R, Morillo S, Santos JC, Fiallo B, Leone P. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;132:65–67.
- 3.- Paz-y-Miño C, Arévalo M, Muñoz MJ, Leone P. CYP1A1 genetic polymorphisms in Ecuador, South America. *Dis Markers.* 2005;21:57-59.
- 4.- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). Anuario de estadísticas Vitales, Nacimientos y Defunciones. Ecuador; 2005.
- 5.- Corral F, Cueva P, Yépez J. Registro Nacional de Tumores, Solca, Quito, Convenio Solca/ MPS/ INEC. Epidemiología del Cáncer en Quito y en otras Regiones del Ecuador. 12va ed. Quito; 2004.
- 6.- Giles F, Keating A, Goldstone A, Avivi I, Willman C, Kantarjian H. Acute Myeloid Leukemia. *Am Soc Hematol Educ Program.* 2002;1:73-110.
- 7.- Hunger S, Galili N, Carrol A, Crist W, Link M, Cleary M. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood.* 1991;77:687-693.
- 8.- Paz-y-Miño C, Dávalos M, Sánchez ME, Arévalo M, Leone P. Should gaps be included in chromosomal aberration analysis? Evidence based on the comet assay. *Mutat Res.* 2002;516:57-61.
- 9.- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162:156-159.
- 10.- Faderl S, Kantarjian H, Talpaz M, Estrov Z. Clinical Significance of Cytogenetic Abnormalities in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* 1998;91:3995-4019.
- 11.- Labardini J. Leucemia Mieloblástica Aguda. De la biología al Tratamiento. *Gac Med Mex.* 2001;137:37–43.
- 12.- Friedman AD. Leukemogenesis by CBF oncoproteins. *Leukemia.* 1999;13:1932–1942.
- 13.- Greaves M. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet.* 1997;349:344-349.
- 14.- Sinner PJ, Cerhan JR, Folsom AR, Ross JA. Positive association of farm or rural residence with acute myeloid leukemia incidence in a cohort of older women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14:2446-2448.
- 15.- Surveillance Epidemiology and End Results [<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>]. U.S. National Institutes of Health; [actualizada 29 mayo 2009; citada 15 agosto 2009]. Disponible en: <http://seer.cancer.gov>.
- 16.- Liroy PJ. Exposure analysis and assessment for low risk cancer agents. *Int J Epidemiol.* 1990; 19:53-61.
- 17.- Raaschou-Nielsen O, Groupen O, Hertel O, Thomsen BL, Olsen JH. Air pollution from traffic at the residence of children with cancer. *Am J Epidemiol.* 2001;153: 433-443.
- 18.- Paz-y-Miño C, Sánchez ME, Arévalo M, Muñoz MJ, Witte T, Oleas G, et al. Evaluation of DNA damage in a Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genet Mol Biol.* 2007;30:1-5.
- 19.- Faderl S, Jeha S, Kantarjian HM. The biology and therapy of adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer.* 2003;1,98:1337-1354.