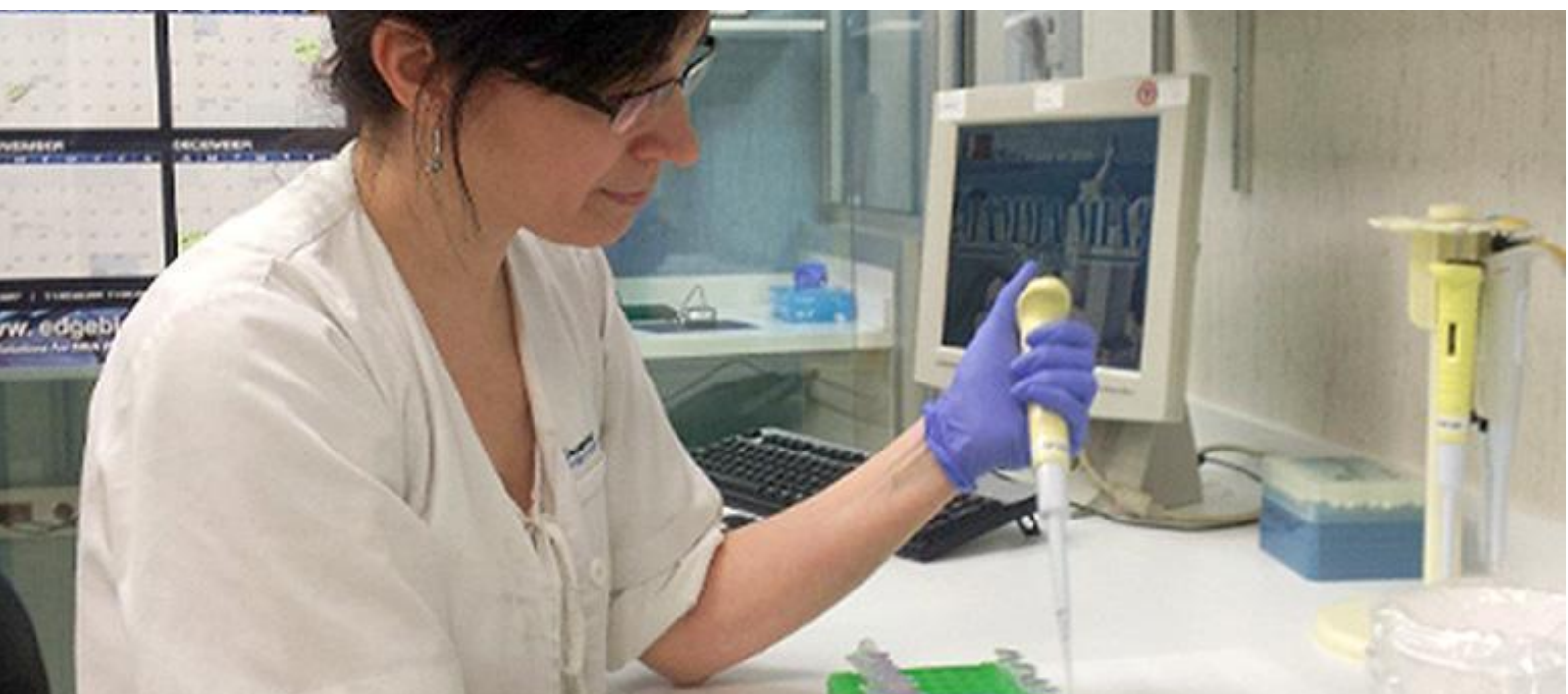




# Proyecto CRIS de Leucemias MLL

Investigadora: Dra. Mireia Camós  
Centro: Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona.



## Introducción

Las leucemias agudas pediátricas son los tumores más frecuentes durante la infancia. En concreto las leucemias MLL (*Mixed Lineage Leukemia*) son un tipo de leucemia muy agresiva en niños. Si bien durante los últimos años se han producido mejoras en la identificación de sus diferentes tipos y se ha avanzado en la elección de tratamientos, lo cierto es que muchos pacientes padecen una forma de alto riesgo y fallecen a causa de la enfermedad.

Una parte fundamental para elegir mejor los tratamientos consiste en identificar el máximo de características de los tumores para clasificar a los pacientes según su pronóstico, es decir, clasificarlos en grupos con mayor o menor riesgo de recaída. Otros tipos de cáncer se caracterizan por presentar una gran cantidad y diversidad de alteraciones a nivel genético, lo que ayuda a su clasificación y a identificar posibles dianas terapéuticas. Sin embargo, comparadas con otros tumores en adultos, las leucemias en niños presentan muy pocas alteraciones en el ADN. Esto es aún más acusado en las denominadas leucemias MLL. Estas leucemias se caracterizan por tener alterado el gen MLL (de *Mixed Lineage Leukemia*, por tener capacidad de presentarse en cualquier linaje



celular), y ser muy frecuentes en lactantes (el 80% de las leucemias de lactantes tienen este gen alterado).

En el caso de las leucemias MLL la clave reside no tanto en el número de mutaciones añadidas sino en cómo se produce la alteración de este gen. La mayoría de las veces lo que ocurre es que un fragmento de este gen se rompe y se une o inserta en otro gen diferente, lo que altera su función (estas alteraciones se denominan translocaciones). Estos genes a los que se une MLL se denominan *partners* y son los nuevos compañeros de viaje del gen MLL. En función de este *partner*, las leucemias se comportan de manera diferente, con mayor o menor agresividad y diferente pronóstico, y es aquí donde se abre una puerta para clasificar mejor a los pacientes y buscar estrategias de tratamiento más personalizadas.

## El proyecto

El grupo de la doctora Camós y su equipo es pionero en el estudio de las leucemias MLL y del papel que juegan las alteraciones biológicas tanto en el pronóstico como en el tratamiento de estos niños. A lo largo de su evolución, este grupo de investigación ha hecho hincapié en diferentes aspectos de estas enfermedades en forma de dos proyectos que mostramos a continuación.

### Parte 1 del Proyecto: Estudio epigenético de las leucemias MLL

Como comentábamos anteriormente, a diferencia de otros tipos de cáncer las leucemias infantiles presentan un número bajo de alteraciones genéticas. No obstante, existen otro tipo de modificaciones que quizás pueden explicar las diferencias entre los pacientes y ayudar a comprender y tratar mejor a cada paciente. Estamos hablando de las alteraciones epigenéticas. La epigenética se refiere a todos los procesos que tienen que ver con cómo, cuándo y dónde se lee la información contenida en el ADN (no tanto con el contenido y la estructura del ADN, que es lo que estudia la genética). Entre las moléculas que controlan la lectura del ADN encontramos:

- Un grupo de proteínas denominadas histona deacetilasas (HDACs), que controlan qué zonas del ADN están accesibles para su lectura y cuáles no.
- Unos fragmentos muy pequeños de material genético denominados microRNAs (miRNAs). De la biblioteca del ADN normalmente se extraen libros de instrucciones (denominados RNA), para hacer proteínas, que son las que realizan las funciones celulares. Los microRNAs son capaces de impedir que se utilicen estos libros de instrucciones.

El estudio combinado de miRNAs y HDACs puede ser muy relevante por varias razones:

- Nos permite conseguir un conocimiento mucho más profundo de este tipo de enfermedades.
- Puede permitir identificar mejores biomarcadores que permitan predecir mejor la evolución de los pacientes.
- Permitirá realizar en el futuro nuevos estudios para generar terapias más personalizadas.

Para este estudio se han utilizado muestras de médula ósea de pacientes pediátricos de varios hospitales, incluyendo el Sant Joan de Déu, Vall d'Hebrón y el Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid. Se incluyeron tanto pacientes lactantes como pacientes de hasta 18 años, para estudiar las posibles diferencias en la agresividad de estas leucemias en diferentes grupos de edad.

### Parte 2: Estudio de la enfermedad mínima residual por nuevas técnicas genéticas:

Uno de los grandes retos de las leucemias infantiles es el correcto diagnóstico y el seguimiento de los pacientes a lo largo del tiempo tras administrarles los tratamientos por si quedan células tumorales que puedan llevar a una recaída (lo que se denomina Enfermedad Residual Medible o ERM).

Actualmente los métodos diagnósticos y de seguimiento de la enfermedad tienen algunas limitaciones:

1. No son capaces de identificar con precisión todos los reordenamientos y alteraciones del gen MLL y por lo tanto los diagnósticos pueden ser imprecisos.
2. Los seguimientos de la ERM no son lo suficientemente sensibles y eficaces, y en un porcentaje de



casos pueden no detectar la presencia de células tumorales. Esto es un problema, porque se detecta la recaída más tarde de la cuenta y esto lleva a un mayor riesgo para el paciente.

Por lo tanto, se necesitan nuevos métodos para mejorar tanto el diagnóstico como el seguimiento. El objetivo de este proyecto consiste en utilizar técnicas de última generación para detectar e identificar de forma completa el 100% de los reordenamientos del gen *MLL*, y utilizar técnicas de seguimiento más sensibles, que permitan detectar niveles de células tumorales muy bajos.

El grupo de la Dra. Camós ha planteado utilizar dos aproximaciones:

- Targeted Locus Amplification (TLA): Se trata de una técnica especial que permite identificar cualquier modificación del gen *MLL*, incluso si se trata de alguno no descrito. La identificación de los cambios en *MLL* puede permitir hacer un seguimiento más preciso e individualizado, y buscar específicamente las células con este cambio. En los casos en los que la TLA no permita identificar cuál es el reordenamiento, se utilizarán otras técnicas avanzadas para detectarlas, como las técnicas de RNA-Seq.
- Confirmación de Biomarcadores de leucemias *MLL*: Se ha documentado en un estudio que los pacientes que tienen determinados reordenamientos de *MLL* tienen aumentados los niveles de ciertos genes (Por ejemplo, *RET*, *PPP1R-27*, *CCL23*, *SCUBE1* o *PHACTR3*). La actividad elevada de estos genes al diagnóstico podría estar relacionada con el comportamiento celular algunos tipos de leucemias *MLL*. En caso de confirmarse estos datos, podríamos medir la actividad de estos genes para saber si el paciente está evolucionando mejor o peor.

## Avances recientes

### Resultados de la Parte 1:

En el estudio de las HDACs se han realizado avances muy importantes. En primer lugar, se ha visto que en este tipo de leucemias hay dos genes (*HDAC9* y *MEF2D*) que se detectan más en pacientes con leucemia, independientemente de la edad y linaje de la leucemia (con linaje nos referimos a si es una leucemia mieloide o linfocitoide). Además, se ha podido relacionar un incremento de los niveles de *HDAC9* con un peor pronóstico.

Estos resultados pueden tener un papel importante en el desarrollo de futuras terapias dirigidas. Los futuros tratamientos contra estas HDACs se podrían utilizar como un soporte de las terapias habituales, para incrementar su efectividad.

El estudio de los miRNAs concluido, y ha aportado unos resultados fantásticos. Tras un profundo y exhaustivo procesamiento y análisis, que ha requerido sobreponerse a un buen número de dificultades técnicas, el equipo de la Dra. Camós ha analizado microRNAs de 110 pacientes con leucemias agudas del Hospital Sant Joan de Déu y otros hospitales españoles. Entre estos pacientes, hay 39 muestras de pacientes con leucemias mieloides, 17 de pacientes con leucemias linfoblástica aguda T, 53 con leucemia linfoblástica aguda B y una leucemia aguda de linaje ambiguo, de los cuales, 32 presentaban reordenamientos del gen *MLL*. Se trata de un número de muestras muy alto, tratándose de leucemias infantiles y, por tanto, enfermedades raras.

El análisis ha generado gran cantidad de datos que muestran que, según las características de la leucemia de cada paciente, algunos miRNAs están aumentados y otros disminuidos. Estos datos muestran que gracias a los miRNA se puede identificar en los pacientes una especie de huella dactilar, lo que se denomina una firma: según el estado de 24 microRNAs específicos se puede distinguir qué pacientes van a tener una enfermedad muy agresiva o van a tener un mejor pronóstico. Estas firmas y resultados han sido validados y contrastados utilizando un enorme conjunto de datos de muestras de 447 pacientes.

No solamente eso, sino que también han observado que algunos pacientes con los mismos reordenamientos o



alteraciones genéticas presentan combinaciones diferentes de miRNAs y pronósticos diferentes. Esto es una prueba de que no es suficiente con la información que obtenemos del ADN para determinar el pronóstico del paciente y saber cómo evolucionará, sino que necesitamos combinar esa información con los datos epigenéticos, como los de los miRNA.

Estos fantásticos resultados han sido publicados en el prestigioso *British Journal of Haematology*, y también han sido presentados como comunicación oral en el Congreso Internacional de Oncología Pediátrica 2022, organizado por la International Society of Pediatric Oncology (SIOP).

La razón del impacto de estos datos radica en que abren la puerta a conseguir su aplicabilidad en la práctica clínica:

1. El análisis de los microRNAs puede permitir distinguir y clasificar mejor a los pacientes, para conseguir diagnósticos mucho más precisos que los actuales.
2. La tecnología actual es capaz de medir con métodos asequibles los diferentes microRNAs, y se puede implementar de manera relativamente sencilla en la práctica clínica habitual.
3. Predecir el pronóstico del paciente es fundamental para actuar de manera más rápida, adaptar la terapia y anticiparse a la enfermedad. Es un paso más en la dirección de la medicina personalizada.

Finalmente, la combinación de los datos de miRNAs y HDACs con los datos genéticos y de seguimiento de los pacientes ha generado una inmensa base de datos que están analizando continuamente, y tiene el potencial de aportar conclusiones muy relevantes.

### **Resultados de la Parte 2:**

En cuanto a las herramientas para mejorar el seguimiento de los pacientes, el equipo ha realizado durante el último año avances muy significativos.

Para poder hacer un seguimiento adecuado debemos identificar exactamente el tipo de reordenamiento y el partner del gen *MLL*. Para ello, el equipo de la Dra. Camós ha puesto en práctica una innovadora estrategia, un flujo de trabajo para aplicar diferentes técnicas de diagnóstico para cada paciente con reordenamiento del gen *MLL*.

1. En primer lugar, se realizará un análisis inicial de los pacientes, en el que se buscarán los reordenamientos del gen *MLL* con técnicas convencionales ya implantadas en el diagnóstico.
2. Para realizar un estudio más en detalle de los pacientes con leucemia MLL se realizará:
  - a. TLA en los pacientes de los que se haya podido extraer una muestra de suficiente calidad.
  - b. Si la TLA no identifica la alteración precisa o si la muestra no es lo suficientemente abundante o de calidad suficiente, se realizarán otras técnicas (como la denominada RNA-Seq), para confirmar o descartar definitivamente la presencia de alteraciones en el gen *MLL*.
3. Una vez se ha identificada la alteración particular de cada niño, se pueden diseñar sondas de detección específicas para identificar a las células tumorales de ese paciente concreto, de manera personalizada. Eso permite aplicar las técnicas más específicas y de precisión para comprobar si esas células tumorales persisten, se eliminan o aumentan.

Desde el inicio del proyecto, se han podido analizar muestras de 60 pacientes. Aunque a varios de estos pacientes se les pudo determinar el partner usando técnicas habituales, el equipo de la Dra. Camós ha analizado las muestras de 41 pacientes con leucemias MLL mediante la novedosa técnica denominada TLA. Gracias a esta técnica se pudo lograr identificar dónde se había movido el gen *MLL* con mucha precisión en la mayoría de estos 41 pacientes. Sin embargo, en unos pocos pacientes la técnica de TLA no consiguió identificar el reordenamiento específico del paciente.

No obstante, es imprescindible saber con seguridad cómo se ha dañado el ADN en el 100% de los pacientes



infantiles, cómo se ha reorganizado el genoma, para poder tener un diagnóstico adecuado y poder desarrollar herramientas que nos permitan seguir a los pacientes con mucha precisión. Por eso el equipo de la Dra. Camós ha dedicado un gran esfuerzo a implementar una nueva técnica, denominada RNAseq que permite detectar el reordenamiento con gran eficacia. Se basa en utilizar y analizar de forma global el ARN de los pacientes, que como decíamos en la introducción equivale a los volúmenes de instrucciones que se extraen de la biblioteca del ADN. No son técnicas sencillas, ya que el ARN es una molécula que se degrada con facilidad al manipularla, lo que acarrea gran cantidad de dificultades técnicas.

El equipo ha realizado numerosos experimentos para poner a punto el RNAseq: el aislamiento del ARN de los pacientes, las técnicas para leerlo y, lo que es más importante, las herramientas de análisis bioinformático para extraer las conclusiones. Para esto último han adaptado 5 procedimientos distintos y los han fusionado en un procedimiento propio de análisis, con mayor capacidad de detectar las alteraciones que llevan a las leucemias MLL. De hecho, han podido demostrar que este método es capaz de detectar reordenamientos y *partners* que no se han podido detectar con ninguna otra técnica utilizada hasta el momento. Este método es una herramienta muy muy útil para la detección de las leucemias MLL, por lo que los resultados han sido publicados este año en una revista científica internacional (doi: 10.3389/fmolb.2023.1141310).

Una vez identificado cuál es el reordenamiento de cada paciente, el objetivo del proyecto consiste en desarrollar métodos de seguimiento muy precisos que permitan detectar con alta sensibilidad las células tumorales, a lo largo de la evolución del paciente. Así sabremos de forma temprana si el paciente está progresando y hay que actuar. En este momento las investigadoras ya están terminando de poner a punto la técnica de detección. Estas técnicas se basan en la denominada qPCR, un método que permite detectar cantidades muy pequeñas de un material genético determinado.

Para poner a punto la técnica han buscado muestras de 18 pacientes a los que se les hubiese extraído muestras en 3 momentos diferentes de su enfermedad, tratamiento y seguimiento. A estas muestras se les ha extraído el ARN, y se están preparando los experimentos para poder iniciar las primeras pruebas de este método de seguimiento.

Globalmente, el objetivo de esta estrategia al completo es identificar con el máximo de precisión el 100% de los pacientes con reordenamientos del gen MLL, y lograr un seguimiento más sensible y eficaz de la enfermedad del paciente. Esto facilitará las decisiones terapéuticas, mejorará el tiempo de reacción frente a potenciales recaídas y en última instancia mejorará la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.