

Análisis mutacional de p53 en la leucemia linfoblástica T

Josep F. Nomdedéu, Isabel Badell^a, Camino Estivill, Elisabeth del Río^b, Jorge Sierra y Montserrat Baiget^b

Departamentos de Hematología, ^aPediatría y ^bGenética.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

FUNDAMENTO: Para valorar la frecuencia de mutaciones de p53 en la leucemia linfoblástica aguda T se analizan las muestras obtenidas en nuestro hospital durante un período de 9 años.

PACIENTES Y MÉTODO: Se estudiaron 32 muestras correspondientes a 27 pacientes mediante SSCP radiactivo.

RESULTADOS: Se identificó una mutación en heterozigosis en el codón 273 en un niño en tercera recaída. La mutación se hizo dominante con desaparición del alelo normal en una muestra obtenida tras haber recibido un protocolo de rescate.

CONCLUSIONES: Las mutaciones de p53 son poco frecuentes la leucemia linfoblástica aguda T.

Palabras clave:
Leucemia linfoblástica aguda T; Linfoma p53.

Mutational analysis of p53 in T-acute lymphoblastic leukemia

BACKGROUND: p53 mutations were analysed in a consecutive series of patients with T-ALL from one hospital over a period of 9 years.

PATIENTS AND METHOD: Thirty two samples from 27 patients with T-ALL were included in the study. Exons 5-9 were analysed using SSCP.

RESULTS: A mutation at codon 273 was identified in a child in third relapse. The mutated clone became dominant in a sample obtained one month following a course of salvage chemotherapy.

CONCLUSION: p53 mutations are not frequent in T-ALL even in patients at relapse.

Med Clin (Barc) 2000; 115: 573-575

Correspondencia: Dr. Josep F. Nomdedéu.
Departament d'Hematología.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M. Claret, 167.
08025 Barcelona.

Correo electrónico: jnomdedeu@santpau.es

Recibido el 22-5-2000; aceptado para su publicación el 26-9-2000

Las leucemias y los linfomas linfoblásticos T se originan por transformaciones neoplásicas de los precursores linfoides T. Las células leucémicas presentan fenotipos semejantes a los diferentes estadios celulares de los linfocitos T. Las leucemias linfoblásticas agudas T (LAL-T) aparecen sobre todo en jóvenes, con un predominio en varones y cursan con afección del SNC y ensanchamiento mediastínico. Las lesiones moleculares que con más frecuencia se encuentran en este tipo de leucemias corresponden a translocaciones cromosómicas que afectan al receptor de célula T (7q35 β o 14q11 αδ). Sin embargo, no se ha caracterizado ninguna lesión molecular con implicaciones pronósticas.

La inactivación de p53 es rara en LAL-B y LAL-T pediátricas en el momento del diagnóstico (< 3%)¹. Sin embargo, en alguna serie se ha descrito una frecuencia del 25% de mutaciones en pacientes con LAL-T en recaída, lo que sugiere que la adquisición de mutaciones de p53 podría contribuir al desarrollo de resistencia a la quimioterapia y progresión de la enfermedad¹. En el presente trabajo hemos analizado de forma retrospectiva un grupo consecutivo de pacientes con LAL-T para determinar la presencia de mutaciones de p53 tanto en el momento del diagnóstico como en las sucesivas recaídas.

Pacientes y método

Se incluyeron en el estudio todos aquellos pacientes diagnosticados de leucemia o linfoma linfoblástico (LL) T en el Hospital de la Santa Creu i Sant Pau durante los años 1991 a 1999. En los casos en que fue posible se analizaron las muestras en el momento del diagnóstico y en la recaída. Los criterios diagnósticos y el perfil inmunofenotípico se establecieron siguiendo criterios convencionales. El porcentaje de células tumorales siempre fue mayor al 30% determinado por técnicas de citofluorometría.

Se analizaron 32 muestras correspondientes a 27 pacientes. En 21 casos el diagnóstico fue de LAL mientras que en 6 se trataba de LL. Diecisésis muestras se obtuvieron en el momento del diagnóstico y 16 muestras en recaída. En 4 pacientes se pudieron estudiar muestras al diagnóstico y en la recaída.

Estudios moleculares

El ADN se obtuvo de la médula ósea o de otras muestras infiltradas utilizando métodos convencionales.

El SSCP se efectuó siguiendo el método descrito por Gaidano et al² con algunas modificaciones³. La PCR se realizó con 100 ng de ADN genómico, 30 pmol de cada cebador (exones 5, 6, 7, 8 y 9), 2,5 μM dNTP, 1 μCi de ³²P-dCTP (Amersham Ltd., Amersham place, Buckinghamshire, Reino Unido) actividad específica, 3.000 Ci/mmol, 10 mM Tris-HCl (pH 8,8), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 7% DMSO, 0,5 U AmpliTaq polimerasa (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, EE.UU.) en un volumen final de 50 μl. El programa de PCR empleado consistió en 30 ciclos de desnaturación (94 °C), hibridación (las temperaturas de hibridación fueron optimizadas para cada exón) y extensión (72 °C) efectuados en un termociclador (DNA Thermal Cycler; Perkin-Elmer). La reacción final se mezcló con formamida. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 min, enfriadas en hielo e inmediatamente cargadas (5 μl) en un gel de acrilamida al 6% y Tris-borato-EDTA (TBE) con un 10% de glicerol. La electroforesis de los geles se realizó durante 12-15 h a temperatura ambiente. Los geles se analizaron por autorradiografía. Posteriormente, se secuenciaron las muestras que presentaron un patrón de migración anormal en el SSCP utilizando el secuenciador Abi-Prism 310 (Perkin-Elmer, Foster City, EE.UU.).

Resultados

Se observó un predominio de varones respecto a las mujeres (21/6). Los pacientes tenían edades entre 3 y 52 años. En 29 muestras no se detectaron bandas anormales de migración en el SSCP. En una muestra, correspondiente al paciente 9, se observó un polimorfismo común (codón 213 [CGA → CGG], 10% de los alelos en nuestro medio) en el exón 6⁴. Las dos muestras con SSCP anormal correspondían al paciente 24 y fueron obtenidas con el intervalo de un mes. La banda anormal se encontraba en heterozigosis en la primera muestra siendo claramente dominante en la segunda (fig. 1). La secuenciación reveló una mutación en el codón 273 CGT → TGT (Arg → Cys). Se trataba de un paciente en tercera recaída que fue remitido a nuestro centro desde otro hospital para valorar la realización de un trasplante alogénico. El inmunofenotipo leucémico era: CD3(cito)+ TdT+ CD4+ CD10+ CD2+ CD7+ CD45+ CD5+ CD1+. El niño recibió un protocolo de rescate al que no respondió presentando persistencia de infiltración blástica (muestras 1 y 8 de la figura 1) con notable incremento de la forma mutada. En los 4 pacientes estudiados en el diagnóstico y en la recaída no se detecta-



Fig. 1. Análisis mutacional de p53 en la leucemia linfoblástica aguda T. Izquierda: SSCP radiactivo exón 8. Los carriles 1 y 8 corresponden al paciente 24. La muestra 8 se obtuvo en primer lugar, y en la 1 se puede observar predominio de la forma de migración anormal correspondiente al alelo mutado. Carriles 2, 3 y 6: controles +. Carriles 4, 5 y 7: controles normales. Derecha: secuenciación del exón 8 utilizando el cebador reverso G -> A (●).

ron cambios en el SSCP indicativos de mutación.

Estos hallazgos en muestras consecutivas y no seleccionadas indican que la frecuencia de mutaciones de p53 en muestras en recaída en nuestro medio es del 6,6% (1/15 pacientes) mientras que en total es del 3,7% (un paciente de 27).

Discusión

El gen de p53 que se localiza en el cromosoma 17, banda p13, se encuentra mutado o delecionado en una amplia variedad de tumores humanos incluyendo el cáncer de colon, de pulmón, de mama y osteosarcomas. La presencia de mutaciones en p53 se asocia a resistencia a la

quimioterapia en casi todos los tumores, siendo una excepción el linfoma de Burkitt^{1-3,5,9}. Aunque en líneas celulares del LAL-T la presencia de mutaciones de p53 alcanza el 50%¹, la presencia de mutaciones en pacientes diagnosticados *de novo* es rara. Sin embargo, en un estudio efectuado en pacientes en recaída, el 24% presentaban mutaciones de p53⁵. En nuestro estudio, que incluía tanto niños como adultos, la frecuencia ha sido mucho menor y se acerca más a los datos de Felix et al⁹, que en 11 casos de LAL sólo encontraron uno con mutación. Wada et al⁷ analizaron 48 casos de LAL-T y no encontraron tampoco ningún caso mutado. En cuanto al procedimiento empleado, el porcentaje de células tumorales

necesario para que el método de SSCP pueda detectar mutaciones se cifra en un 5-10%. La infiltración tumoral en nuestras muestras, siempre superior a este porcentaje, no significa una limitación metodológica.

La localización más frecuente de las mutaciones en p53 *in vivo* afecta a los aminoácidos que intervienen en la unión con el ADN. Esta unión se puede alterar debido a: a) mutaciones en los aminoácidos que se unen directamente al ADN (mutaciones de contacto), incluidas en este grupo las mutaciones en los residuos Arg en los codones 248 y 273, y b) mutaciones estructurales o de soporte, localizadas en la zona de unión pero no en residuos de aminoácidos con unión directa. La mutación encontrada en nuestro paciente corresponde al primer tipo. Las mutaciones en el codón 273 presentan un efecto transdominante, es decir, que la proteína p53 mutada se puede unir a la proteína p53 normal e inhibir su función. La mayor parte de las mutaciones de p53 corresponden a transiciones de G:C a A:T en dinucleótidos CpG (20). Esta secuencia es particularmente susceptible a sufrir mutaciones por deamianaciones de 5-metilcitosina. Hasta el momento no se ha encontrado ninguna correlación entre la localización de la mutación y el fenotipo tumoral. Incluso para mutaciones en el mismo codón los efectos biológicos son diferentes, dependiendo del tipo de cambio, como lo de-

TABLA 1

Características de los pacientes incluidos en el estudio

Caso	Sexo	Edad (años)	Diagnóstico	Inmunofenotipo	Muestra	Tratamiento	Evolución
1	V	17	LAL-L1	CD2+ CD1+ CD5+ CD7+ CD3+ CD34+ TdT+	MO(D)	QT + TAPH	RC, 8 años
2	V	19	LL	CD7+ CD8+ CD4+ CD5+ CD9+ CD1+ CD34+	G(D)	QT + TAPH	Recaída, † 10 meses
3	V	13	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD7+ CD34+ CD3+ CD9+	MO(D)	QT + TAPH	RC, 7 años
4	M	29	LAL-L1	CD7+ CD5+	MO(R)	QT + TAPH	Recaída, † 3 meses
5	M	10	LAL-L1	CD4+ CD5+ CD7+ CD1+ CD3+ CD8+ CD9+	MO(R)	QT + TAPH	Recaída, † 2 meses
6	V	25	LAL-L1	CD2+ CD3+ CD4+ CD5+ CD7+ CD8+ CD3(cito)+	MO(D)	QT + TAPH	RC, 6 años
7	V	28	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD33+ CD7+ CD3+ CD5+ CD34+ CD13	MO(D)	QT + TMO	RC, 7 años
9	M	12	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD10+ CD7+ CD4+ CD3(cito)+ TdT+	MO(D), MO(R)	QT + TAPH	Recaída, † 1 mes
10	V	28	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD10+ CD7+ CD4+ CD3(cito)+ TdT+	MO(R)	QT + TMO	RC, 6 años
11	M	18	LL	CD2+ CD5+ CD7+ CD3+ CD1+ TdT+	MO(R)	QT + TAPH	Recaída, † 18 meses
12	V	9	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD7+ CD4+ CD3(cito)+ TdT+	MO(D)	QT	RC, 5 años
13	V	6	LL	CD5+ CD2+ CD10+ CD7+ CD3+ CD4+ CD8+ CD1+ CD3(cito)+ TdT+	LP(D) MO (R)	QT + TAPH	RC, 5 años
14	V	19	LL	CD2+ CD5+ CD7+	MO(R)	QT + TAPH	Recaída, † 7 meses
15	V	22	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD10+ CD7+ CD4+ CD8+ CD1+ CD3(cito)+ TdT+	MO(D)	QT	† 4 meses. Toxicidad
16	V	3	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD10+ CD7+ CD4+ CD8+ CD1+ CD3(cito)+ TdT+	MO(D)	QT	RC, 4 años
17	V	15	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD7+ CD34+ CD4+ CD13+ CD1+ CD3(cito)+ TdT+	MO(D)	QT + TMO	EICH
18	V	21	LAL-L1	CD2+ CD5+ CD7+ CD4+ CD3+ CD1+ CD3(cito)+ TdT+	MO(D), G(R)	QT	Recaída, † 2 meses
19	V	16	LL	CD2+ CD7+ CD45+ CD5+ CD4+ CD8+ CD1+ CD3+ CD10+ CD3(cito)+ TdT+	MO(R)	QT + TMO	RC, 2 años
20	M	52	LAL-L2	CD3(cito)+ CD33+ CD7+ CD45+ TdT+	MO(D), MO(R)	QT	Recaída, † 4 meses
21	V	3	LL	CD3(cito)+ CD34+ CD10+ CD7+ CD45+ CD5+ CD13+	MO(R)	QT + TAPH	Recaída, † 3 meses
22	V	9	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD34+ CD7+ CD45+ CD13+ CD5+	MO (D)	QT + TAPH	RC 1 año
23	V	4	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD34+ CD2+ CD7+ CD3+ CD1+ CD5+	MO (R)	QT + TMO	RC, 1 año
24	V	21	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD34+ CD33+ CD7+ CD45+ CD13+ CD56+	MO(R)	QT + TAPH+ TMO	† 10 meses, EICH
25	V	7	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD4+ CD10+ CD2+ CD7+ CD45+ CD5+ CD1+	MO(R), MO(R)	QT	Recaída, † 8 meses
26	V	11	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD34+ CD2+ CD7+ CD45+ CD13+ CD5+ CD8+	MO(D)	QT + TAPH	Recaída, 12 meses
27	V	42	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD2+ CD10+ CD7+ CD45+ CD1+ CD5+ CD 8+ CD4+ CD3+	MO(D)	QT	† 1 mes. Toxicidad
28	M	34	LAL-L1	CD3(cito)+ TdT+ CD8+ CD4+ CD3+	Tumor(R)	QT + TMO	† 2 meses, EICH

G: ganglio; MO: médula ósea; D: diagnóstico; R: recaída; QT: quimioterapia; TAPH: trasplante autólogo precursores hematopoyéticos; TMO: trasplante alógénico de médula ósea; EICH: enfermedad injerto contra huésped. LAL: leucemia linfoblástica aguda; V: varón; M: mujer. †: fallecido.

muestran estudios de mutagénesis experimental realizados con diferentes mutantes en el codón 273. Diccianni et al⁵, en 12 casos de LAL-T en recaída, encontraron que en 3 pacientes la mutación de p53 se encontraba en el codón 135. Además, en 4 de los 8 casos totales la mutación se encontraba en homozigosis indicando un predominio clonal.

Los hallazgos presentados en este trabajo sugieren que a pesar de que las mutaciones de p53 no son frecuentes en LAL-T, puede estar indicado su estudio en casos de mala evolución. La inactivación de p53 por otros mecanismos (amplificación de mdm2, metilación del promotor, etc.), la presencia de mutaciones en zonas intrónicas y la investigación de la inactivación de p16 podría mejorar la estratificación molecular de las LAL-T¹⁰.

Agradecimiento

Este estudio se ha realizado gracias a una beca FIS (97/1118).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Imamura J, Miyoshi I, Koeffler P. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 84: 2412-2421.
- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, Inghirami G, Neri A, Newcomb EW et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5413-5417.
- Nomdedéu JF, Lete I, Baiget M, Lasa A, Estivill C, Rubiol E et al. Mutational analysis of p53 in 16 cases of acute lymphoblastic leukemia and Burkitt's lymphoma. *Haematologica* 1997; 82: 550.
- Serra A, Gaidano GL, Revello D, Guerrasio A, Ballerini P, Dalla Favera R, Saglio G. A new TaqI polymorphism in the p53 gene. *Nucl Acid Res* 1992; 20: 928.
- Diccianni MB, Yu J, Hsiao S, Mukherjee S, Shao LE, Yu AL. Clinical significance of p53 mutations in relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994; 84: 3105-3112.
- Marks DJ, Kurz BW, Link MP, Ng E, Shuster JJ, Lauer SJ et al. High incidence of potential p53 inactivation in poor outcome childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Blood* 1996; 87: 1155-1161.
- Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993; 82: 3163-3169.
- Yeargin J, Yu AL, Gjerset R, Bogart M, Haas M. p53 mutation in acute T cell lymphoblastic leukemia is of somatic origin and is stable during establishment of T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *J Clin Invest* 1993; 91: 2111-2117.
- Felix CA, Wasserman R, Lange BJ, Brown DL, Nau MM, Cole DE et al. Differentiation stages of childhood acute lymphoblastic leukemias with p53 mutations. *Leukemia* 1994; 8: 963-967.
- Kawamura M, Ohnishi H, Guo SX, Sheng XM, Minegishi M, Hanada K et al. Alterations of the p53, p21, p16, p15 and RAS genes in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res* 1999; 23; 115-126.