Revista Médica del Hospital General de México

Volumen *Volume* 66 Número *Number* 4 Octubre-Diciembre *October-December* 2003

Artículo:

Seguimiento citogenético y molecular en pacientes con leucemia mieloide crónica y trasplante alogénico de médula ósea

Derechos reservados, Copyright © 2003:
Sociedad Médica del Hospital General de México, AC

Otras secciones de este sitio:

- Índice de este número
- Más revistas
- Búsqueda

Others sections in this web site:

- *Contents of this number*
- *More journals*
- *Search*

Medigraphic.com

Artículo original

Trabajo de investigación

REVISTA MEDICA DEL
HOSPITAL GENERAL
DE MEXICO, S.S.

Vol. 66, Núm. 4 • Oct.-Dic. 2003
pp 198 - 202

Seguimiento citogenético y molecular en pacientes con leucemia mieloide crónica y trasplante alogénico de médula ósea

Elizabeth Ruiz Sánchez,* Edith Falcón Ramírez,* Enrique Gómez Morales, Gregorio Ignacio Ibarra,*** Elizabeth Sánchez Valle,** Luis Solís Anaya,*** Susana Kofman,* Rosa María Arana Trejo***

RESUMEN

La t(9;22)(q34;q11) constituye el marcador genético de la leucemia mieloide crónica y ocasiona un gen quimérico *BCR/ABL* que constituye un marcador para el monitoreo de enfermedad mínima residual después de trasplante de médula ósea. La técnica de RT-PCR ha sido ampliamente usada para el monitoreo de MDR postrasplante de médula ósea en leucemia mieloide crónica. Nosotros reportamos el seguimiento citogenético y molecular de 15 pacientes con leucemia mieloide crónica y trasplante alogénico de médula ósea. Todos los pacientes fueron positivos por citogenética y RT-PCR para el cromosoma Ph+ y el rearreglo BCR/ABL antes del trasplante. En el seguimiento, diez casos están en remisión completa (RC) y son negativos para el transcrito BCR/ABL por más de 12 meses. Cinco pacientes fueron positivos durante el seguimiento para BCR/ABL; tres de ellos tuvieron recurrencia de la enfermedad, uno falleció por recaída y el otro recibió infusión de linfocitos del donador como medida de soporte y actualmente está en remisión completa. Nosotros concluimos que el análisis citogenético es de valor limitado e insuficiente en el monitoreo postrasplante de médula ósea; en cambio el RT-PCR proporciona información más precisa de la carga tumoral residual en leucemia mieloide crónica postrasplante de médula ósea. El significado pronóstico de la detección BCR/ABL cualitativa puede ser complementada con ensayos cuantitativos como el RT-PCR competitivo y de esta forma beneficiar a los pacientes con una intervención terapéutica oportuna.

Palabras clave: Leucemia mieloide crónica, enfermedad mínima residual, trasplante de médula ósea, cromosoma Filadelfia.

ABSTRACT

The genetic hallmark of chronic myelogenous leukemia (CML) is the t(9;22)(q34;q11), this gene fusion leads to the expression of chimeric BCR/ABL messenger RNA (mRNA), this marker is an attractive target for monitoring minimal residual disease (MDR) after bone marrow transplantation (BMT). The RT-PCR assays has become widely used for monitoring MDR after BMT for CML. We reported the cytogenetic and molecular findings in follow-up samples from 15 CML patients undergoing BMT. All 15 patients investigated before BMT by cytogenetic and RT-PCR were positive for Ph1 chromosome and BCR/ABL transcripts. Ten patients in complete remission presented for >12 month BCR/ABL transcript negative and karyotype normal. In five patients the RT-PCR nested for BCR/ABL were positive, three developed disease recurrence, one died by relapse, the other case with BCR/ABL+ for >12 months received donor lymphocyte infusion (DLI), then he has complete remission. We concluded that cytogenetic analysis is limited and insufficient in the monitoring of BMT and the RT-PCR provide reliable information on residual tumor burden in CML patients with BMT. The prognostic significance of a qualitative BCR/ABL can be refined by quantitative assays and this may target patients who would benefit from early intervention therapeutic.

Key words: *Chronic myelogenous leukemia, minimal residual disease, bone marrow transplantation, Philadelphia chromosome.*

* Servicio de Genética, Hospital General de México y Facultad de Medicina, UNAM
** Hematología, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS.
*** Hematología, Hospital Regional Núm. 1 Gabriel Mancera, IMSS.

INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por presentar el cromosoma Filadelfia (Ph[1]) producto de la t(9;22)(q34;q11). La consecuencia molecular de este rearreglo es la formación del gen híbrido: *BCR/ABL*.[1,2] En LMC se producen dos tipos del gen fusionado, dependiendo del punto de ruptura y son *b2a2* y *b3a2*; la mayoría de los pacientes expresan uno u otro tipo, pero en 7% de los casos se pueden observar ambas formas.[3]

El grado de reducción en la carga tumoral después de la terapia es un factor pronóstico importante en pacientes con LMC. Esta respuesta al tratamiento es medida en tres modalidades: 1) remisión hematológica, cuando la cuenta celular y el tamaño del bazo retornan a la normalidad; 2) respuesta citogenética es definida por la proporción de células con cromosoma Ph+ y 3) remisión molecular es la proporción del gen *BCR/ABL*, del transcrito o de la proteína quimérica, dependiendo del método de detección usado. El análisis citogenético ha sido considerado el estándar de oro para evaluar la respuesta al tratamiento; sin embargo, requiere de médula ósea y es, por tanto, un método invasivo. Además de requerir células en metafase, la sensibilidad del cariotipo es de 1 en 100, por lo tanto su aplicación al estudio de pacientes con trasplante de médula ósea (TMO) es limitada. En cambio, el monitoreo molecular puede ser realizado en sangre periférica, siendo el RT-PCR la técnica más sensible con una detección de una célula *BCR/ABL+* en 1,000,000 células normales.[4-8]

Después del TMO alogénico a menudo los pacientes tienen niveles bajos del transcrito *BCR/ABL* durante los primeros tres meses; esto debido a células residuales resistentes al régimen de acondicionamiento. Se ha reportado que los pacientes en los que la cantidad del rearreglo *BCR/ABL* se incrementa progresivamente y persiste por más de seis meses postrasplante de médula osea (pos-TMO) tendrán invariablemente recaída.[7-10] La detección oportuna del aumento del transcrito *BCR/ABL* permite la aplicación de medidas terapéuticas de soporte como la infusión de linfocitos del donador, tratamiento con interferones e inhibidores de tirocincinasas, como el imatinib.

En este estudio reportamos el seguimiento citogenético y del rearreglo *BCR/ABL* por RT-PCR en 15 pacientes con LMC postrasplante alogénico de médula ósea y correlacionamos con la evolución clínica.

PACIENTES Y MÉTODOS

Pacientes: Se estudiaron en el Servicio de Genética en colaboración con dos hospitales del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), 15 pacientes con LMC sometidos a TMO alogénico en busca de enfermedad residual por técnicas citogenéticas y de RT-PCR. Los quince casos tenían LMC en fase crónica y recibieron TMO alogénico de un donador HLA histocompatible. El promedio de edad fue 39 años (rango: 28-57), 11 hombres y cuatro mujeres; el tiempo de seguimiento pos-TMO fue de seis a 18 meses. El régimen de acondicionamiento fue busulfán-ciclofosfamida en todos los pacientes. En dos casos, el donador fue de sexo opuesto al del paciente, por lo que en su seguimiento citogenético se reporta como quimerismo mixto del donador y del paciente.

Métodos: Se trabajó con muestras de médula ósea y/o sangre periférica; el cariotipo se realizó por las técnicas habituales y análisis con bandeo GTG.[11,12] Se determinó el porcentaje de metafases con cromosoma Ph+ y se define la respuesta citogenética como: completa (0% Ph1), menor (35-90% Ph+) y nula (90-100% Ph+).[1,2]

La extracción de ARN fue por el método de Chomczynski[13], la síntesis de ADNc fue con transcriptasa reversa y la eficiencia de la reacción se valoró amplificando los genes *ABL* y *BCR* como controles internos.[7,14] El tipo de rearreglo *BCR/ABL* se identificó por PCR múltiple (multiplex) y anidado (*nested*). En dos casos se realizó cuantificación con PCR competitivo usando diluciones seriadas de un competidor homólogo del tipo de transcrito *BCR/ABL* de concentración conocida. Se identificó el punto de titulación (punto en el cual el competidor y la muestra problema se encuentran en la misma concentración); mediante análisis densitométrico en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.[7,14]

En los casos con persistencia del transcrito *BCR/ABL* en dos determinaciones seriadas y/o más de 30% de cromosoma Ph+ en el cariotipo por consenso clínico, se consideró para la infusión de linfocitos del donador y cuando el cariotipo presentó alteraciones secundarias al Ph+ se comenzó tratamiento con quimioterapia e interferón.

medigraphic.com

RESULTADOS

Los resultados obtenidos del estudio citogenético y por RT-PCR se incluyen en el *cuadro I*. En el cariotipo pre-TMO todos los pacientes tenían t(9;22) en diferentes porcentajes de 60 a 100% y sólo dos pa-

cientes (casos 3 y 14) tenía alteraciones adicionales al Ph+. En el estudio molecular del rearreglo *BCR/ABL* fue positivo en todos los casos por RT-PCR anidado con transcritos tipo b3a2 en nueve y b2a2 en seis *(Figura 1)*.

De los quince casos estudiados, 10 se encuentran en remisión completa (RC) con más de 12 meses de seguimiento. Dos pacientes fallecieron, uno a los 18 meses pos-TMO por neumonía y el otro a los seis meses por enfermedad injerto contra huésped; cabe señalar que este último era *BCR/ABL* positivo. Tres casos (13,14 y 15) tuvieron recaída hematológica con persistencia del cromosoma Ph+ y alteraciones adicionales, indicando evolución a fase blástica; actualmente reciben tratamiento con quimioterapia e interferón. En los casos 2 y 11 el donador fue de sexo opuesto al del paciente y en el seguimiento citogenético presentaron quimerismo mixto (QM) con presencia de metafases XX y XY; en el resto de los casos el donador fue del mismo sexo que el paciente.

Uno de los diez enfermos que están en remisión completa (caso 8) a los 18 meses pos-TMO continúa positivo para el rearreglo *BCR/ABL* con cariotipo nor-

Cuadro I. Seguimiento citogenético y molecular por RT-PCR de los pacientes con leucemia mieloide crónica y trasplante de médula ósea alogénico.

Caso	*Ph´ y BCR/ABL pre-TMO*	*3 meses pos-TMO*	*6 meses pos-TMO*	*9-12 meses pos-TMO*	*> 18 meses pos-TMO*	*Estatus clínico*
1	Ph+ (60%) B3a2+	XY BCR/ABL-		XY BCR/ABL-		RC
2	Ph+(100%) B3a2+	QM BCR/ABL-	QM BCR/ABL-	QM BCR/ABL-		RC
3	Ph+(100%)/AS B2a2+		XY BCR/ABL-	XY BCR/ABL-	XY BCR/ABL-	RC
4	Ph+ (100%) B2a2+	XY BCR/ABL-		XY BCR/ABL-		RC
5	Ph+ (100%) B3a2+	Ph+ (95%) B3a2+	XX BCR/ABL-	XX BCR/ABL-		RC
6	Ph+ (38%) B2a2+	Ph+ (75%) B2a2+	XY B2a2+	XY BCR/ABL-		RC
7	Ph+ (100%) B3a2+	XX BCR/ABL-	XX BCR/ABL-			RC
8*	Ph+ (100%) B2a2+	XX B2a2+*		XX B2a2+*	XX B2a2+*	RC
9*	Ph+(80%) b3a2+	Ph+ (40%) B3a2+*	XY B3a2+*	Infusión LD	XY BCR/ABL-	RC
10	Ph+(100%) B3a2+	Ph+(30%) B3a2+	Ph+(20%) B3a2+	XX BCR/ABL-		RC
11	Ph+ (100%) B2a2+	QM BCR/ABL-	QM BCR/ABL-	QM BCR/ABL-	QM BCR/ABL-	Falleció Neumonia
12	Ph+ (81%) B2a2+	NV B2a2+	XY B2a2+			Falleció EICH
13	Ph+ (90%) B3a2+	Ph+ (10%) B3a2+	Ph+ (50%) B3a2+	Ph+ (60%)/AS B3a2+	Tratamiento Ara-C/INF	Recaída
14	Ph+(80%)/AS B3a2+	Ph+ (20%) B3a2+	XY B3a2+	NV B3a2+	Ph+(50%)/AS B3a2+	Recaída Trat. INF
15	Ph+(80%) B3a2+		Ph+(80%)/AS B3a2+			Recaída Fase blástica

* Casos con RT-PCR competitivo. *Abreviaturas y simbología:* TMO = Trasplante de médula ósea. NV = Cariotipo no valorable. Ph+(%) = Porcentaje de metafases con t(9;22). AS = Alteraciones secundaras al Ph´. QM = Quimerismo mixto (células del donador y paciente). ILD = Infusión de linfocitos del donador. RC = Remisión completa. EICH = Enfermedad injerto contra huésped.

edigraphic.com

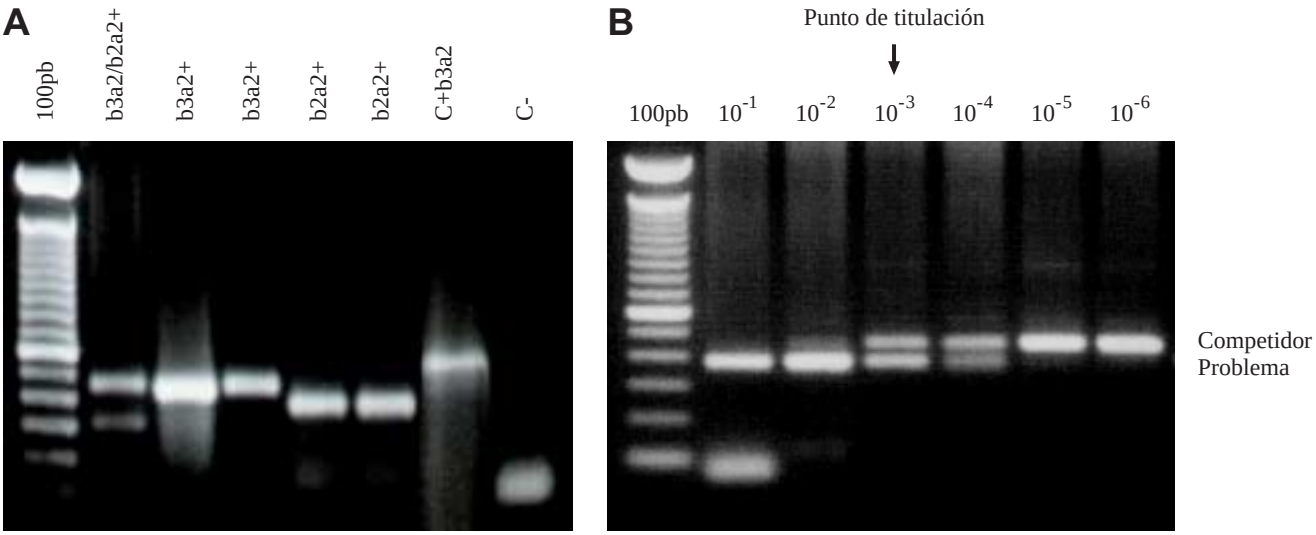

Figura 1. *RT-PCR anidado (**A**) y competitivo (**B**) del rearreglo BCR/ABL de pacientes con LMC.*

mal. Se cuantificó el número de transcritos por RT-PCR competitivo y no se encontró aumento a los seis, 12 y 18 meses de seguimiento, por lo que continúa en vigilancia clínica y molecular. El caso 9, a los seis meses pos-TMO, continuaba positivo el rearreglo molecular y por RT-PCR competitivo se demostró aumento de 1.3 x 10^2 a 2 x 10^5 copias del transcrito/ µg ARN. Por tal motivo, se infundieron linfocitos del donador a los 12 meses y a los tres meses de la infusión el rearreglo *BCR/ABL* fue negativo y el paciente está en remisión completa.

La prevalencia de positividad del rearreglo *BCR/ABL* por RT-PCR a los seis meses pos-TMO fue de 53% (ocho de 15 casos); de éstos, la mitad presentaron recaída hematológica. Esta recaída clínica fue precedida por la presencia de alteraciones secundarias al Ph1 en el cariotipo. En dos casos con cariotipo normal, el rearreglo se negativizó en las siguientes determinaciones y los pacientes están en remisión completa. En los otros dos se cuantificaron los niveles del transcrito *BCR/ABL* por RT-PCR competitivo (Número de copias por µg ARN) en dos determinaciones y uno presentó aumento (caso 9) y en el otro (caso 8) los niveles disminuyeron.

DISCUSIÓN

Los estudios citogenéticos para detectar Ph+ son un reflejo de las células de médula ósea que se están dividiendo cuando se realizó el estudio; mientras que el RT-PCR es una medida del transcrito *BCR/ABL* a nivel del ARNm y, por lo tanto, del grado de expresión de las células leucémicas. Otra ventaja del estudio molecular para evaluar MDR pos-TMO es el poder estudiar muestras de sangre periférica con la misma sensibilidad que el estudio en médula ósea, pero menos agresivo para el paciente. Aunque el RT-PCR anidado es el método más sensible para detectar MDR pos-TMO, es una técnica cualitativa y, considerando que el 54% de nuestros pacientes pos-TMO son *BCR/ABL* positivos durante los primeros seis meses, se requiere estimar la cantidad de enfermedad residual en los casos positivos. El RT-PCR competitivo, a pesar de ser una técnica semicuantitativa, proporciona información suficiente en la toma de decisiones terapéuticas de la enfermedad mínima residual pos-TMO. Es una metodología alternativa, cuando no se cuenta con la tecnología de vanguardia totalmente cuantitativa como el PCR de tiempo real.

De los resultados presentados podemos ver que el cariotipo tiene un gran valor en el diagnóstico de la enfermedad y en la valoración de la eficacia del tratamiento por el porcentaje de metafases con Ph+. Sin embargo, observamos que en TMO su valor es limitado; siendo útil para evaluar quimerismo cuando el donador es de sexo opuesto al del paciente y cuando aparecen alteraciones secundarias para predecir recaída como en los casos 13, 14 y 15.

El estudio molecular del rearreglo *BCR/ABL* por RT-PCR es de mucha utilidad para evaluar recurrencia de la enfermedad pos-TMO, porque es altamente sensible. Sin embargo, es necesario que se hagan determinaciones seriadas mínimo cada tres meses

durante el primer año pos-TMO; un resultado positivo durante este tiempo no necesariamente es indicio de recurrencia, pueden ser células residuales. De ahí la importancia del seguimiento periódico durante el primer año del trasplante y, cuando la persistencia del rearreglo continúa, definitivamente sólo la cuantificación del transcrito puede definir si se trata de recaída o de células residuales.

Por lo anterior, consideramos que el estudio molecular del rearreglo *BCR/ABL* en pacientes con LMC pos-TMO es necesario para predecir recurrencia de la enfermedad. La variante cuantitativa del PCR puede dar información más precisa para la predicción de recaída pos-TMO y sugerimos que se realice cuando hay persistencia del rearreglo *BCR/ABL* positivo siempre en muestras seriadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O´Brien S, Kurzrock R, Kantarjian H. The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999; 341: 164-172.
2. Melo J. The diversity of *BCR/ABL* fusion protein and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88: 2375-2384.
3. Arana RM, Ruiz E, Ignacio G, Baez E, Gomez E, Castro M et al. *BCR/ABL* p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Clin Lab Haem* 2002; 24: 145-150.
4. Hochhaus A, Weisser A, LaRosee P, Emig M et al. Detection and quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 998-1005.
5. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, Hehlman R, Goldman J, Cross N. Monitoring the efficiency of interferon therapy in chronic myelogenous leukemia patients by competitive polymerase chain reaction. *Leukemia* 1997; 11: 541-544.
6. Hochhaus A. Detection and quantification of leukemia specific rearrangements. In: Boultwood J, Fidler C (eds). *Molecular analysis of cancer*. New Jersey: Humana Press, 2002; 67-96.
7. Kidd V, Lion T. Debate round table: appropiate controls for RT-PCR. *Leukemia* 1997 11:871-881.
8. Bagg A. Chronic myeloid leukemia: a minimalistic view of post-therapeutic monitoring. *J Molecular Diag* 2002; 4: 1-10.
9. Cross N, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of *BCR/ABL* transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood* 1993; 82: 1929-1936.
10. Wang L, Bagg A, Pear W, Nowell P, Hess L. Chronic myelogenous leukemia: Laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes & Cancer* 2001, 32: 97-111.
11. Junis JJ, Sawyer JR, Ball DW. The characterization of high resolution G banded chromosomes of man. *Chromosoma* 1978; 67:293-307.
12. Czepulkowski BH, Bhatt B, Rooney DE. Basic techniques for the preparation and analysis of chromosomes from bone marrow and leukaemic blood. In: Rooney DE, Czepulkowski BH (eds). *Human cytogenetics.* Oxford: IRL Press, 1992; 1-26.
13. Chomczynski P, Sachi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 1987; 162: 156-159.
14. Cross N. Detection of *BCR/ABL* in hematological malignancies by RT-PCR. In: Cotter F (ed). *Molecular diagnosis in cancer.* New Jersey: Humana Press, 1996; 24-36.

Dirección para correspondencia:

Rosa María Arana Trejo
Servicio de Genética
Hospital General de México
Dr. Balmis núm. 148
Col. Doctores
06726 México D.F. 06726
Email: aranat@prodigy.net.mx
rmaranat@servidor.unam.mx

edigraphic.com