

Identificación de la frecuencia de t(14;18)(q32;q12) y correlación con el gen de fusión *Bcl-2/IgH* en pacientes con linfoma folicular: *Mexican Hematology Study Group (MHSG)*

Rosa María Arana-Trejo,^{*,***,****} Gregorio Ignacio-Ibarra,^{*,***,****} Severiano Baltazar-Arellano,^{****,1}
Francisco Tripp-Villanueva,^{2,6} Lucía Flores-Peredo,^{*} Enrique Báez-de la Fuente,^{****,1}
Silvia Rivas-Vera,^{****,3} Oscar Garcés,^{****,4} Luis Solís-Anaya,^{****,5} Jorge Duque,^{****,6} Pety Rodríguez- Castillo^{****,7}

RESUMEN

Antecedentes: el linfoma folicular se caracteriza por presentar la t(14;18)(q32;q21) que fusiona los genes *Bcl-2/IgH*. Su incidencia tiene variaciones geográficas, étnicas o relacionadas con la técnica de detección.

Objetivo: evaluar la frecuencia de presentación de *Bcl-2/IgH* por PCR anidado y su correlación con el cariotipo en pacientes con linfoma folicular, para considerarse una prueba diagnóstica auxiliar.

Material y método: estudio retrospectivo efectuado en 137 pacientes con linfoma folicular con edad media de 56 años (límites 24 y 80), 63 femeninas y 74 masculinos. El cariotipo se realizó por citogenética convencional en médula ósea o sangre periférica.

Resultados: resultaron viables 71/137 muestras (52%). La incidencia observada de la t(14;18) fue baja (6.6%) comparada con la reportada en la bibliografía (30-60%). La sensibilidad del cariotipo fue baja (18%), pero con alta especificidad (100%). El estudio de *Bcl-2/IgH* se realizó en ADN amplificado por PCR anidado y fue positivo en 90/137 (66%) con rupturas en la región *MBR+* en 75/90 (83.3%) y en *mcr+* 15 casos (16.6%).

Conclusiones: la incidencia del rearrreglo *Bcl-2/IgH* coincide con los reportes de la bibliografía y la distribución de las rupturas en *Bcl-2* es alta para *mcr* (16.6%) y se asemeja a los reportes de Argentina y Estados Unidos. La sensibilidad y especificidad del PCR para *Bcl-2/IgH* fueron 80 y 86%, respectivamente, lo que lo hace útil al diagnóstico y para usarse durante los seguimientos en pacientes con linfoma folicular.

Palabras clave: t(14;18) / *Bcl-2/IgH* / linfoma folicular.

ABSTRACT

Identification of the frequency of t(14;18)(q32;q12) and correlation with the Bcl-2/IgH fusion in patients with follicular lymphoma. Experience of the Mexican Hematology Study Group

Background: Follicular Lymphoma (LF) is characterized by the presence of a t(14;18)(q32;q21) and that fusion of the genes *Bcl-2/IgH*; whose incidence presented variations geographical, ethnics and/or related to the technical of detections.

Objective: Evaluate frequency of presentation of *Bcl-2/IgH* by nested PCR and their correlation with karyotype in patients with LF; to be considered as a test to help of diagnoses.

Material and method: Retrospective study on 137 patients with LF were included, with median age 56 years (rank 24 to 80), 63 females and 74 males.

Results: Karyotype was made by conventional cytogenetics in bone marrow and/or peripheral blood, but only 71/137 samples were viable (52%) and the incidence observed of t(14;18) were low (6.6%), compared with literature (30-60%); so the sensitivity of karyotype (18%) is low, although with high specificity (100%). The study of *Bcl-2/IgH* was made in DNA amplified by nested PCR and was positive in 90/137 (66%) with breakpoints in the region *MBR+* in 75/90 (83.3%) and in *mcr+* 15 cases (16.6%).

Conclusion: The incidence of rearrangements *Bcl-2/IgH* it agrees with the reports of literature and the distribution of the breakpoints in *Bcl-2* is high for *mcr* (16.6%) and it is resembled the reports of Argentina and USA. The sensitivity and specificity of the PCR for *Bcl-2/IgH* they were 80 and 86% respectively, which makes useful to the diagnosis and to be used during the evolution in patients with LF.

Key words: t(14;18), *Bcl-2/IgH*, Follicular lymphomas.

* Laboratorio de Análisis de Oncohematología, SC.

** Servicio de Genética, Hospital General de México OD.

*** Departamento Hematología, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS. México, DF.

**** Mexican Hematology Study Group (MHSG)

1 Unidad Médica de Atención Especializada número 25, IMSS. Monterrey, NL.

2 HE Centro Médico Nacional La Raza, IMSS. México, DF.

3 Instituto Nacional de Cancerología, SSA.

4 Centro Médico de Occidente, IMSS. Guadalajara, Jal.

5 Hospital General Regional número 1 Carlos McGregor, IMSS. México, DF.

6 Hospital General Regional y Banco de Sangre, SSA. Chihuahua, Chih.

7 Unidad Médica de Atención Especializada, IMSS Puebla.

Correspondencia: Dra. Rosa María Arana Trejo. Iaoht2004@prodigy.net.mx, aranat@prodigy.net.mx

Recibido: abril 2011. Aceptado: mayo 2011.

Este artículo debe citarse como: Arana-Trejo RM, Ignacio-Ibarra G, Baltazar-Arellano S, Tripp-Villanueva F, Flores-Peredo L y col. Identificación de la frecuencia de t(14;18)(q32;q12) y correlación con el gen de fusión *Bcl-2/IgH* en pacientes con linfoma folicular: Mexican Hematology Study Group (MHSG). Rev Hematol Mex 2011;12(2):68-72.

El linfoma folicular lo padecen, en Occidente, aproximadamente, 22-35% de los pacientes con linfoma no-Hodgkin, aunque existe una variación geográfica en su distribución; en México se ha reportado una incidencia de 15%, con edad promedio de presentación a los 55 años.^{1,2} El linfoma folicular es el más frecuente del grupo de bajo grado o indolentes; es una neoplasia de estirpe B, de origen centrogerminal, compuesta por una mezcla de centrocitos y centroblastos que se clasifican en grados histológicos 1-2 y 3a (indolentes) y 3b (de comportamiento agresivo). Sobreexpresan la proteína BCL-2 dentro del folículo en 85-90% de los casos, lo que los diferencia de la hiperplasia folicular.^{1,3}

La sobreexpresión de BCL-2 se asocia con la translocación t(14;18)(q32;q22)⁵; este rearreglo cromosómico genera la fusión del gen *Bcl-2* (*gen de leucemia-linfoma-2 de células-B*) en 18q22 con uno de los segmentos J_H del gen de cadenas pesadas de inmunoglobulinas en 14q32 (IgH). La detección de la t(14;18) o *Bcl-2/IgH* es una de las pruebas auxiliares de diagnóstico del linfoma folicular que representa un marcador de actividad tumoral; sin embargo, su incidencia también presenta variaciones étnicas, geográficas y principalmente factores relacionados con la técnica de estudio.⁵⁻¹⁰ La frecuencia de identificación de la t(14;18) o *Bcl-2/IgH* también se relaciona con la infiltración de la médula ósea. Al diagnóstico varía de 40 a 70% y un tercio de los pacientes con médula ósea infiltrada está en estadios bajos, sin síntomas. El diagnóstico de linfoma folicular se establece de una adenopatía periférica; por eso identificar la t(14;18) o *Bcl-2/IgH* en la médula ósea implicaría que existe infiltración y podría ser un auxiliar de la estadificación y complementar el pronóstico que hasta el momento es clínico de acuerdo al FLIPI (*Follicular Lymphoma International Prognostic Index*).^{1,4}

La t(14;18) puede estudiarse por citogenética convencional y FISH (*hibridación in situ con fluorescencia*) en tejido linfático o médula ósea y el gen de fusión *Bcl-2/IgH* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en cualquier tejido. Cada una de estas técnicas tiene sus ventajas y limitaciones. El cariotipo puede detectar las variantes de la t(14;18) y otras alteraciones cromosómicas, pero es muy laborioso y requiere tejido fresco o médula ósea en el estudio basal, además de que el bajo número de metafases tumorales puede dar falsos negativos. El FISH tiene una alta frecuencia de detección de la t(14;18) porque puede usarse tejido fresco o fijado en parafina y médula ósea,

pero tiene la desventaja que hay que revisar gran número de células (300-400 núcleos en interfase); además, las sondas tienen un alto costo en México.⁸⁻¹⁰

La detección de los genes de fusión *Bcl-2/IgH* por PCR es más barata y menos laboriosa que las técnicas mencionadas, además de ofrecer mayor sensibilidad en la detección que ayuda cuando hay bajos niveles de células del linfoma en la médula ósea o SP o en ambas. La mayor desventaja del PCR es que no puede detectar todas las variantes en los puntos de ruptura de los genes de fusión que se expanden en el gen *Bcl-2*. Los principales puntos de rompimiento que se identifican por PCR son en la región mayor (**MBR**) del exón 3 de *Bcl-2* (80% de los casos); la región menor (**mcr**) a 30kb del locus *Bcl-2* (aproximadamente 15% de los casos) y la ruptura en la región intermedia (**icr**) localizada a 18kb de *Bcl-2* (aproximadamente 10% de los casos).^{8,9,10}

Este estudio evalúa la frecuencia de presentación de los genes de fusión *Bcl-2/IgH* por PCR y su correlación con el cariotipo en pacientes con linfoma folicular; y la posibilidad de considerarla una prueba diagnóstica auxiliar.

MATERIAL Y MÉTODO

Se estudiaron pacientes con diagnóstico de linfoma folicular *de novo* captados entre los años 2000 a 2004, procedentes de siete centros hospitalarios del país. El diagnóstico se corroboró por dos hematopatólogos de acuerdo con los criterios de la WHO y REAL.^{1,3} El tratamiento clínico de los pacientes se efectuó con base en los esquemas de su institución de procedencia o de acuerdo con el protocolo del Grupo Mexicano de Estudio de la Hematología (MHSG, *Mexican Hematology Study Group*).

Cariotipo: se realizó en muestras de médula ósea o sangre periférica procesadas por técnica directa o cultivo habitual y analizadas con bandeo GTG. Se revisaron de 20-30 metafases y los resultados se reportaron de acuerdo con la nomenclatura citogenética vigente en esas fechas (ISCN, 2005).¹³

Estudio molecular de *Bcl2-IgH*: se realizó en ADN genómico extraído por el método salino y orgánico de muestras de médula ósea o sangre periférica y amplificado por PCR simple y anidado para las rupturas en MBR y *mcr* de *Bcl-2*. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y se tiñeron con bromuro de etidio; los controles de amplificación fueron el gen *B-actina* y la línea celular DoHH2 (positiva para MBR+). Se

usaron como controles negativos 20 muestras de sangre periférica de individuos sanos con cariotipo normal. Se realizó secuenciación directa de los productos de PCR anidado de seis casos (tres pacientes con linfoma folicular y tres controles sanos), para corroborar el rearreglo de los genes de fusión [*Bcl-2/IgH*] y descartar un producto de recombinación del gen *Igh*.¹⁴

Estadística: se realizó estadística descriptiva de las variables cualitativas y para probar si el cariotipo y el estudio molecular por PCR pueden detectar t(14;18) o el rearreglo *Bcl-2/IgH*. Se realizaron pruebas de sensibilidad y especificidad. La sensibilidad se calculó por la relación entre VP/VP+FN [VP=verdadero positivo, FN=falso negativo], la especificidad como VN/FP+VN [VN=verdadero negativo y FP=falso positivo]. El valor predictivo positivo (VPP) y negativo (VPN) se calculó como: VP/VP+FP y VN/VN+FN; respectivamente. Además, se determinó el índice de correlación de Spearman entre el cariotipo convencional y PCR para *Bcl-2/IgH* con $\alpha=0.05$.

RESULTADOS

Se recibieron 143 muestras de pacientes con linfoma folicular, y sólo 137 se evaluaron para los estudios de cariotipo o molecular. La edad media fue 56 años (límites 24 y 80) y la distribución por género fue de: 66 femeninos (46%) y 77 masculinos (54%). Muestras de médula ósea 103 (72%) y sangre periférica 36 (25%), en cuatro (3%) no se determinó la fuente.

La incidencia de la t(14;18)(q32;q22) por citogenética convencional fue baja (6.6%) comparada con la reportada en la bibliografía (30-60%); sin embargo, sólo fueron viables 71/137 muestras (52%) [Figura 1]. En el análisis por tipo de muestra de médula ósea o SP, el cariotipo sólo fue positivo en muestras de médula ósea y normal o no valorable en SP.

El estudio molecular del rearreglo *Bcl-2/IgH* mediante el ensayo de PCR anidado fue positivo en 90/137 (66%); 75 en muestra de médula ósea y 15 en sangre periférica con una diferencia estadística significativa entre las dos fuentes [χ^2 de 22.55, $p<0.001$]. Sólo en cinco casos se analizaron ambos tejidos de médula ósea y SP y no hubo diferencias en el tamaño del producto de PCR amplificado, que fue *MBR*⁺ [Figura 2].

Los 20 controles sanos tuvieron cariotipo normal y las amplificaciones por PCR fueron negativas en 16 y positivas

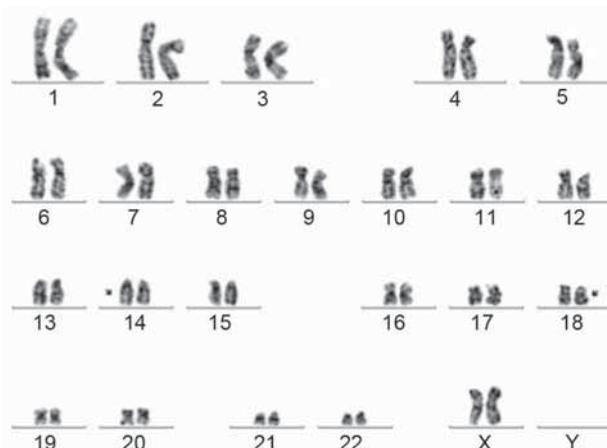


Figura 1. Cariotipo de un paciente con linfoma folicular y la t(14;18) (q32;q22)

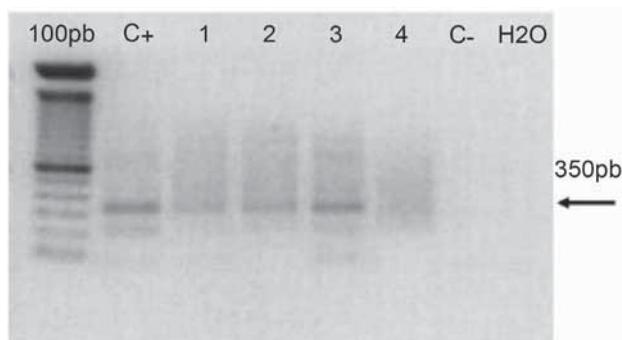


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa del PCR del rearreglo *Bcl-2/IgH* con ruptura en la región MBR. 100pb, marcador peso molecular, C+ línea celular DoHH2 (MBR+), 1-3 pacientes MBR+, 4 paciente negativo, C- DNA individuo sano, H2O, control de reacción sin DNA.

en cuatro; de estos últimos se secuenciaron tres casos y se obtuvieron sólo secuencias del gen *Igh* con ausencia de *Bcl-2*, indicando recombinación *in vitro* en el ensayo de PCR anidada.

La distribución de rupturas en *Bcl-2* fue mayor para la región *MBR*⁺ en 75 (83.3%) y en *mcr*⁺ en 15 casos (16.6%), detectadas en todos por PCR anidado.

Los resultados obtenidos de la secuenciación del PCR anidado de *Bcl-2/IgH* y la comparación con la secuencia de línea germinal correspondiente de tres pacientes, dos con *MBR*⁺ y uno en *mcr*⁺; fueron específicas y mostraron rupturas en *MBR* y los segmentos *J_H4* y *J_H6* del gen *Igh* con secuencias N' insertadas de 9 y 12pb, respectivamente. En tanto que en el paciente con ruptura en la región

mcr de *Bcl-2* el segmento insertado fue de 12pb en J_H6 (Cuadro 2).¹⁴

La Rho de Sperman entre cariotipo y PCR fue de 0.172; sensibilidad y especificidad para el cariotipo fue de 18 y 100% respectivamente y para PCR de 86 y 80%, respectivamente. Los valores VPP y VPN para cariotipo 100 y 32% y para PCR 95 y 48%, respectivamente (Cuadro 1).

DISCUSIÓN

Los reportes de la bibliografía han demostrado una variación de la frecuencia de presentación del linfoma folicular en las diferentes poblaciones y, por lo tanto, una incidencia diferente de la t(14;18) o del rearreglo *Bcl-2/IgH* por citogenética/FISH y PCR, respectivamente.

En este estudio se analiza la incidencia y correlación de la t(14;18) detectada por citogenética convencional con el rearreglo *Bcl-2/IgH* estudiado por PCR simple y anidado. Encontramos que la incidencia de la t(14;18) por citogenética convencional fue muy baja (6.6%) que correlaciona con una baja sensibilidad del cariotipo (18%) aunque con alta especificidad (100%); como era de esperarse por la naturaleza de la t(14;18); sin embargo, hay que considerar que las muestras fueron de médula ósea y no de tejido linfático que es más representativo de la patología. Este bajo índice de detección podría mejorarse con la aplicación de FISH para la identificación de la t(14;18), en células en interfase; sin embargo, el alto costo de la prueba lo deja

fuera del alcance de la mayoría de nuestras instituciones de salud en México.

La incidencia del rearreglo *Bcl-2/IgH* fue de 66%, porcentaje que está dentro de los rangos reportados para la población de América Latina, Asia y Europa (50-70%) y para la población de EUA es mayor de 70%. La distribución de los sitios de ruptura en MBR y *mcr* (83.3 y 16.6% respectivamente) está dentro de las incidencias generales para *MBR* (80%); pero en *mcr* es alta y se asemeja más a los reportes de Argentina y Estados Unidos (>10%).^{3,4} También debemos considerar que los pacientes negativos para el rearreglo *Bcl-2/IgH* pueden tener puntos de ruptura en regiones diferentes a las amplificadas con los oligonucleótidos usados en esta serie para *MBR* y *mcr*.

Para el estudio de *Bcl-2/IgH* se usan varios métodos basados en PCR, pero las estrategias de PCR semianidado y anidado confieren la mayor sensibilidad de detección hasta mil veces más que la PCR simple convencional. La especificidad del PCR para la identificación de *Bcl-2/IgH* es del 80% (por la prueba positiva de 4/20 controles sanos), por lo que habrá que aumentar la cantidad de controles sanos para determinar la frecuencia real del valor predictivo negativo. La secuenciación de estos casos descartó el rearreglo *Bcl-2/IgH*, ya que se identificó una recombinación *in vitro* en el ensayo de PCR anidada, por lo que se sugiere para disminuir los falsos positivos que cada muestra sea analizada por duplicado en dos corridas de PCR independientes (en días, equipos y analistas diferentes cuando sea posible).

Cuadro 1. Relación entre sensibilidad y especificidad para el cariotipo y el estudio molecular por PCR de *Bcl-2/IgH*

Prueba	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	Valor predictivo positivo (VPP) (%)	Valor predictivo negativo (VPN) (%)	Eficacia (%)
Cariotipo	18%	100%	100%	32%	41%
PCR <i>Bcl-2/IgH</i>	86%	100%	80%	48%	85%

Cuadro 2. Análisis molecular de las secuencias de los puntos de ruptura de los genes de fusión *Bcl-2/IgH* de tres pacientes con LF

Paciente	Punto de ruptura <i>Bcl-2</i>	Secuencias N' pb insertada	Punto de ruptura IgH
P1	3132-MBR	CGAGAAGCT (9)	959068-J _H 4
P2	3114-MBR	AG (2)	960072-J _H 6
P3	932-MCR	CGTCAGTCGATGACTGACCCACCTAACGACTACGGT (37)	960090-J _H 6

Las secuencias se compararon con las reportadas con los números de acceso M14745 para *Bcl-2* y X97051 para IgH.

El valor predictivo positivo alto del cariotipo lo hace una herramienta útil, si no se cuenta con FISH o PCR o ambas. La prueba de PCR, por su alto valor predictivo negativo, puede descartar la enfermedad en la médula ósea.

En conclusión el estudio citogenético tiene una baja sensibilidad y debe acompañarse por el estudio molecular de *Bcl-2/IgH*. La alta frecuencia del rearreglo de los genes de fusión lo hace útil al diagnóstico y para ser utilizado en el seguimiento como marcador de enfermedad residual mínima, pero se recomienda que las muestras sean de nódulo linfático o médula ósea. En el futuro es necesario evaluar las aplicaciones clínicas. Cuando el rearreglo se detecte en la médula ósea puede considerarse una prueba de extensión de la enfermedad y el paciente en estadio IV, con afectación medular.

REFERENCIAS

1. Tan D, Homing S. Follicular Lymphoma: clinical features and treatment. Hematol Oncol Clin N Am 2008;22:863-882.
2. Ignacio G, Tripp F, Rodriguez P, Martínez MA, et al. Non Hodgkin lymphoma (NHL) distribution and clinical characteristic in a Mexican Registry with high frequency of T-cell NHL: a descriptive study on behalf of Mexican Hematology Study Group (MHSG). Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2007;110:4407.
3. Harris L, Jaffe S, Stein H, et al. A Revised European-American classification of lymphoid neoplasms a proposal from the International Lymphoma Study Group. Blood, 1994; 84(5):1361-1392.
4. Solal-Celigny P, Roy P, Colombat P, et al. Follicular lymphoma International Prognostic Index. Blood 2004;104:1258-1265.
5. Wilkins BS. Molecular genetics analysis in the assessment of lymphomas. Curr Diag Pathology 2004;10:351-359.
6. Johnson P, Swinbank K, MacLennan S, y col. Variability of polymerase chain reaction detection of the *Bcl-2-IgH* translocation in an international multicentre study. Ann Oncology 1999;13:1349-1354.
7. Aster JC, Longtine JA. Detection of *Bcl2* rearrangement in follicular lymphoma. Am J Pathol 2002;160:759-763.
8. Noriega MF, DeBrasi C, Narbaitz M, Slavutsky I. Incidence of *Bcl-2* gene rearrangements in Argentinean non-Hodgkin lymphoma patients: increased frequency of breakpoints outsider of MBR and MCR. Blood Cell Mol Diseases 2004;32:232-239.
9. Ismail SI, Sughayer MA, Al-Quadan TF, Qaqish BM, Tarawneh MS. Frequency of t(14;18) in follicular lymphoma patients: geographical or technical variation. Int J Lab Haemat 2009;31:535-543.
10. Igbal S, Jenner M, Summer K, y col. Reliable detection of clonal *IgH/Bcl2* MBR rearrangement in follicular lymphoma: methodology and clinical significance. Br J Haematology 2004;124:325-328.
11. Johnson P. Polymerase Chain Reaction for detection of the t(14;18) translocation in lymphomas. In: Cotter FE. Methods in Molecular Medicine, Molecular Diagnosis of Cancer. Humana Press New Jersey: 1997; 63-74.
12. Radojkovic M, Ristic S, Colovic M, Cemericic MV, Krstolica K. Molecular characteristics and prognostic significance of *Bcl-2/IgH* gene rearrangement in Serbian follicular lymphoma patients. Neoplasma 2008; 55(5):421-427.
13. ISCN (2005), An International System for Human Cytogenetic Nomenclature, Mitelman F (ed). S. Karger, Basel, 2005.
14. www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore