

Identificación de alteraciones cromosómicas en pacientes con leucemia aguda linfoide por citogenética molecular

Mónica Sierra Martínez,* Patricia Pérez Vera,** Jorge Cruz Rico,*** Mario García Gómez,****
María Dolores Vergara *****

RESUMEN

La hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) es una metodología molecular que facilita la identificación de alteraciones numéricas y estructurales en interfase. El conocer el tipo de aberración cromosómica (AC) en el diagnóstico de pacientes con leucemia aguda linfoide (LAL), permite evaluar el pronóstico, asesoramiento terapéutico y supervivencia.

En este trabajo se detectaron AC en pacientes adultos con LAL por medio de FISH (sin tener estudio citogenético previo); se incluyeron 25 pacientes con LAL, con un intervalo de edad de 18-52 años, referidos al Hospital Juárez de México de 1996 al año 2000. Para la identificación de AC se utilizaron las sondas ADN α -satélite de los cromosomas 8, 18 y 21 y los genes BCR y ABL (Vysis, Downer Grove IL, USA). La frecuencia de alteraciones numéricas observadas fue del 32% (8/25), correspondiendo a la hiperdiploidía 24% (6/25) y a la hipodiploidía 8% (2/25). La fusión BCR/ABL fue del 16%, asociándose con cambios numéricos en 75% de los casos. Con esta metodología se pudieron detectar alteraciones hasta en 50% de los casos perdidos, siendo una herramienta importante de apoyo para la citogenética tradicional.

Palabras clave: Leucemia aguda linfoide, FISH, aberraciones cromosómicas, BCR/ABL.

ABSTRACT

The fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a molecular methodology facility structural and numerical aberration in interphase can be identified. To know the chromosome aberration (CA) type for the diagnosis in patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) let is to evaluate the prognosis, therapeutic advising and survival.

In this research, CA in adults patient with ALL were detected FISH method; (without prior cytogenetic study) from the year 1996 to the 2000, twenty five patients with ALL diagnosis, the age range was of 18-52, referred of Hospital Juárez de México were included in the research: For the identification, probe α -satellite of chromosomes 8, 18, and 21 and the BCR and ABL genes were used.

The frequency of numerical abnormalities were performed of 32% (8/25), the hyperdiploidy correspond to 24% (8/25) and the hypodiploidy at 8% (2/25). The fusion BCR/ABL was of

* M. en C. Laboratorio de Genética. División de Investigación del Hospital Juárez de México, SSA.

** M. en C. Laboratorio de Genética Humana, Instituto Nacional de Pediatría, SSA.

*** Jefe del Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México, SSA.

**** Coordinador de la Atención Médica Hospitalaria DINO, IMSS.

***** Jefe del Laboratorio de Genética. División de Investigación del Hospital Juárez de México, SSA.



16%, associated with numerical changes of 75% the cases. With this methodology can be identified, up to in 50% of the lost cases, can be detected, being now, this methodology an important support tool for traditional cytogenetic.

Key words: acute lymphoblastic leukemia, FISH, aberration chromosome, BCR/ABL.

INTRODUCCIÓN

En México la leucemia aguda se considera un problema de salud pública, ya que ocupa el cuarto lugar de mortalidad de todas las neoplasias malignas, siendo la segunda causa principal de muerte entre los menores de 25 años.¹

La clasificación citomorfológica más ampliamente utilizada para la leucemia aguda es la del grupo Francés-American-Británico (FAB), que distingue dos grupos según el tipo celular involucrado: leucemia aguda mieloides (LAM) y leucemia aguda linfoide (LAL).^{2,3} En cuanto al tratamiento se ha demostrado que las LAL tienen mejor respuesta, hoy en día, cerca del 85% de los pacientes pediátricos es "curado", en contraste con los adultos que sólo del 20 al 40% tienen una supervivencia libre de enfermedad mayor de tres años, por lo que es este grupo de mayor edad al que se considera de alto riesgo.^{4,5}

Existen factores pronóstico o de riesgo en estos padecimientos que influyen en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia de los pacientes, como son: 1) edad; 2) cuenta de leucocitos; 3) morfología; 4) sexo; 5) inmunofenotipo, y 6) estudio citogenético. En particular, este último factor ha contribuido al entendimiento de la leucemogénesis, permitiendo conocer los genes involucrados en este proceso con alto valor diagnóstico, pronóstico, evolución de la enfermedad y en el ase-soramiento terapéutico.⁶⁻⁸

Cerca del 80% de los pacientes con este tipo de enfermedad presentan alteraciones citogenéticas, sin embargo, 33% tienen cromosomas de mala calidad o carecen de metáfases para realizar el análisis, estas limitaciones han llevado a plantear métodos alternativos para la identificación de las alteraciones citogenéticas como es la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), este método permite analizar alteraciones en células que no están proliferando, en muestras de material escaso o de mala calidad.⁹⁻¹² Con base en estos antecedentes, se planteó el presente trabajo con el objetivo principal de identificar por el método FISH alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en pacientes adultos con LAL.

PACIENTES Y MÉTODO

Pacientes. Se incluye un grupo de 25 pacientes con padecimiento de LAL *de novo* y vírgenes de tratamiento quienes fueron referidos al Servicio de Genética del Hospital Juárez de México, durante el periodo de 1996 al 2000. Los casos fueron diagnosticados en el Servicio de Hematología de acuerdo con los criterios de clasificación del grupo Franco-American-Británico (FAB) de LAL subtipos L₁ y L₂.

Citogenética. Todas las muestras fueron de médula ósea, los núcleos que se analizaron para la FISH se procesaron con el método para obtención de cromosomas por técnica directa según Hozier y Linquist,¹³ el paquete celular se almacenó a 2 °C hasta su uso. La FISH se realizó por la técnica descrita por Chase, *et al.*¹⁴ Para el estudio de alteraciones numéricas se utilizaron las sondas de ADN α-satélite (centroméricas) de los cromosomas 8 y 18, y la secuencia única del cromosoma 21 (21q22.13-q22.2). Para la identificación del cromosoma filadelfia (Ph) o t(9;22) se utilizó la sonda de los genes BCR/ABL (Vysis, Downer Grove IL, USA).

Se analizaron 2000 núcleos por paciente para las sondas 8, 18 y 21. En el caso del Ph se observaron 1000 células por paciente. Las señales fueron analizadas en un microscopio de epifluorescencia BH2 Olympus; se utilizaron cinco controles, células obtenidas de sangre periférica de donadores sanos con cariotipo normal y edad de 30 años, para obtener el valor basal de aneuploidía (promedio de células anormales más tres veces la desviación estándar) o de fusión génica para las sondas utilizadas.

RESULTADOS

Las características clínicas, de laboratorio y la respuesta al tratamiento de la población estudiada se informan en el cuadro 1. Se observó disminución en la frecuencia de LAL a mayor edad, el intervalo de edad fue de 18 a 52 años con una media de 27.04 años, la mayoría de los pacientes se encontraba en el grupo de edad de 18 a 30 años (72%), sólo un paciente fue ma-

Cuadro 1. Características clínicas iniciales y respuesta al tratamiento de pacientes con LAL.

Edad (años)	
Media	27.04
Rango	18-52
Grupo de edad (%)	
18-20	44
21-30	28
31-40	16
41-50	8
> 51	4
Sexo (M/F)	15/10
Clasificación FAB L1/L2	2/23
Respuesta al tratamiento (%)	
RC	40
RP	24
*Defunción	24
?	12
Cuenta de leucocitos (X10 ³ /μL)	
Media	27.57
Rango	0.53-78.33
> 50,000	6 (20%)
Hemoglobina (g/dL)	
Media	7.33
Rango	2.3-12.35
Plaquetas (x10 ³ /μL)	
Media	40.8
Rango	6.5-145
Deshidrogenasa láctica (U/L)	
Media	783.7
Rango	228-1565
% de blastos (media)	
SP	69
MO	92

* Fallecen durante el tratamiento de inducción a la remisión, SP = sangre periférica, MO = médula ósea, RC = remisión completa, RP = remisión parcial, ? = se desconocen datos.

yor de 51 años. Con respecto a la proporción de sexos, 60% de los casos fueron masculinos y 40% femenino, el subtipo predominante de LAL fue el subtipo L₂ (92%).

El rango en la cuenta de leucocitos (X10³μL) fue de 0.73 a 78.68, con una media de 27.57, 20% de los pacientes tuvieron una cuenta mayor de 50 000.

En el cuadro 2 se muestra el análisis de las sondas 8 y 18 de los pacientes con LAL, se observa que 36% (9/25) presentó una frecuencia de aneuploidía mayor (en

uno o en ambos cromosomas) que el valor basal calculado, cuando se aplicó la prueba estadística de χ^2 ($p < 0.05$) sólo 32% (8/25) fueron significativos, esta misma prueba se aplicó en el cromosoma 21.

Mientras que para la secuencia única del cromosoma 21 (Cuadro 3), 12% (3/25) de los pacientes mostró alteración en este cromosoma (casos 7, 20 y 25), de los cuales, sólo en un paciente (caso 7) se observó que tenía esta alteración independiente de los otros dos cromosomas analizados, identificándose además 12% de trisomía y 7% de tetrasomía, considerando este resultado estadísticamente significativo ($p < 0.05$).

En la identificación de la t(9;22) se observó que 24% (6/25) de los pacientes (casos 2, 7, 9, 10, 14 y 17) presentaban alguna alteración en los loci BCR y/o ABL, de los que 16% (4/25) mostró la fusión génica BCR/ABL (Cuadro 4), de los cuales 75% (3/4) fue en el punto de rompimiento menor (m-BCR/ABL) y el resto en el punto de rompimiento mayor (M-BCR/ABL). El rango en el porcentaje de fusión génica BCR/ABL fue del 50 al 67%, 75% de los pacientes con Ph⁺ se asociaron con alteraciones numéricas.

Por otro lado, cuando se llevó a cabo el análisis de la fusión génica BCR/ABL se observaron alteraciones adicionales en la ganancia de los loci BCR, ABL o ambos (Cuadro 5).

Finalmente dos pacientes no mostraron la fusión génica BCR/ABL, sin embargo, uno de ellos (caso 2) presentó la ganancia del locus ABL en 4.5% (ABLX3), esto indica aparentemente una trisomía 9, además de presentar una trisomía para el cromosoma 8.

En el cuadro 6 se muestran el resumen de los pacientes que fueron portadores de una o más alteraciones simultáneamente.

DISCUSIÓN

En México, desde el punto de vista citogenético, existen muy pocos informes de LAL en pacientes adultos, debido a la baja frecuencia con la que se presenta esta patología.

Las sondas de ADN (α -satélite o secuencia única) utilizadas para la identificación de alteraciones numéricas se seleccionaron con base en los cromosomas involucrados, con mayor frecuencia en este tipo de enfermedad de acuerdo con los informes de la literatura.^{15,16} En este estudio no se estableció que las alteraciones numéricas observadas en los pacientes fueran de pronóstico favorable, debido a que 24% de los pacientes



Cuadro 2. Análisis de los cromosomas 8 y 18 a doble color en interfase de pacientes con LAL.

Núm. Caso	cromosoma 8				cromosoma 18			
	1	2	3	4	1	2	3	4
1	1	99	0	0	1	98	1	0
2	2	60	*38	0	0	97	3	0
3	0	99	1	0	1	99	0	0
4	0	99	1	0	0	99	1	0
5	1	97	2	0	1	99	0	0
6	1	99	0	0	0	99	1	0
7	1	99	0	0	0	100	0	0
8	1	98	1	0	1	99	0	0
9	0	98	1	1	0	29	*70	*1
10	0	99	1	0	0	100	0	0
11	0	99	1	0	0	99	1	0
12	1	76	*23	0	2	96	2	0
13	0	100	0	0	1	99	0	0
14	1	98	1	0	1	98	1	0
15	0	100	0	0	0	100	0	0
16	0	98.7	0	*1.3	0	98.7	0	*1.3
17	*9	90	1	0	*12	88	0	0
18	1	99	0	0	2	98	0	0
19	1	99	0	0	1	99	0	0
20	0	100	0	0	0	78	*22	0
21	0	100	0	0	1	99	0	0
22	1	99	0	0	1	98	1	0
23	1	99	0	0	1	99	0	0
24	1	99	0	0	0	100	0	0
25	0	75	*25	0	0	78	*22	0

Valor basal % = 1.6 y 1.7 monosomía (8 y 18), VB = 2.0 y 1.4 trisomía (8 y 18). * estadísticamente significativo con χ^2 p < 0.05 N = 2000

fallece durante el tratamiento de inducción a la remisión y en 12% se les realiza el diagnóstico y abandonan el tratamiento. En aquellos pacientes en los que se alcanza la primera remisión, en su gran mayoría son atendidos en otras instituciones como IMSS o ISSSTE, por lo que no es posible realizar el seguimiento lo que conlleva al desconocimiento de la supervivencia.

La t(9;22) en pacientes adultos con LAL se presenta con una frecuencia que varía del 17 al 40% de los casos estudiados, en los que el pronóstico es desfavorable,^{17,18} los portadores de esta translocación alcanzan la remisión pero tienen recaídas tempranas y fallecen en pocos meses.

Existen otras translocaciones informadas para este tipo de padecimiento como son: t(12;21), t(1;19), t(8;14), con impacto en el pronóstico, aunque su frecuencia es baja en adultos.¹⁹

Con la metodología aplicada en el estudio se pudieron identificar cambios cromosómicos en 50% de los casos, de pacientes que no tenían resultado citogenético, permitiendo una aproximación al comportamiento de la clona leucémica que es de gran utilidad en el pronóstico y asesoramiento terapéutico.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados muestran una gran similitud con las frecuencias de las reportadas en la literatura. Con respecto a la t(9;22) ésta se observó en 16% de los pacientes, porcentaje dentro del rango reportado en la literatura mundial; cabe destacar que el cromosoma Ph se incrementa con la edad y el grupo de edad estudiada con mayor frecuencia fueron los pacientes de 18-30 años, lo cual podría explicar la baja



Cuadro 3. Análisis del cromosoma 21q22.13-q22.2 en interfase de pacientes con LAL.

No. Caso	Porcentaje de señales por núcleo					
	1	2	3	4	5	6
1	0	100	0	0	0	0
2	0	99	0	1	0	0
3	0	99	1	0	0	0
4	0	100	0	0	0	0
5	1	99	0	0	0	0
6	0	100	0	0	0	0
7	1	80	*12	*7	0	0
8	1	99	0	0	0	0
9	0	100	0	0	0	0
10	0	100	0	0	0	0
11	0	100	0	0	0	0
12	0	100	0	0	0	0
13	1	99	0	0	0	0
14	0	99	1	0	0	0
15	0	100	0	0	0	0
16	1	99	0	0	0	0
17	0	100	0	0	0	0
18	1	99	0	0	0	0
19	0	99	1	0	0	0
20	0	20	*79	1	0	0
21	1	98	1	0	0	0
22	0	100	0	0	0	0
23	1	98	1	0	0	0
24	1	99	0	0	0	0
25	1	68	5	*11	*15	*1

Valor basal % = 3.4 monosomía, 2.8 trisomía, 0.6 tetrasomía.

* Estadísticamente significativo con χ^2 p < 0.05 N = 2000.

Cuadro 4. Análisis de la fusión génica BCR/ABL en interfase de pacientes con LAL.

Núm. caso	% de células con fusión BCR/ABL	% de células normales
1	0	0
*2	0.3	99.7
3	0	0
4	0	0
5	0	0
6	0	0
7	M-bcr/abl 50	50
8	0	0
*9	0	0
*10	m-bcr/abl 32.8	67.2
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	m-bcr/abl 39.5	60.5
15	0	0
16	0	0
17	m-bcr/abl 59.5	40.5
18	0	0
19	0	0
20	0	0
21	0	0
23	0.1	99.9
24	0	0
25	0	0

* Pacientes que mostraron cambios en los loci BCR/ABL, M bcr/abl = punto de rompimiento mayor; m-bcr/abl = punto de rompimiento menor; N = 1000.

Cuadro 5. Cambios adicionales en los loci BCR/ABL en pacientes con LAL.

No. caso	Núm. de señales BCR y ABL	Cambios cromosómicos
2	ABLX3, BCRX2	+9 (4.5%)
9	ABLX3BCRX3	+9, +22 (3%)
10	ABLX2, BCRX2, ABL CON BCRX1 ABLX3, BCRX3, ABL CON BCRX2 ABLX3, BCRX2 ABLX3, BCRX3	t(9;22) (21%) +der(22) t(9;22) (12%) +9 (7%) +9, +22 (4%)



Cuadro 6. Resumen de los cambios cromosómicos que presentan los pacientes con LAL.

Núm. caso	Alteraciones cromosómicas asociadas					
2	+8 38%	+9 4.5%	+18 3%			
7	+21 12%	+21, +21 4%			M-BCR/ABL 50%	
9	+9, +22 3%	+18 70%	+18, +18 1%			
10	+9 7%	+9, +22 4 %			m-BCR/ABL 21%	+der 22 12 %
12	+8 23%	+18 2%				
14					m-BCR/ABL 39.5%	
16	+8 1.3%	+18 1.3%				
17	-8 10%	-18 2%			m-BCR/ABL 59.5%	
20	+18 22%	+21 79%				
25	+8 25%	+18 22%	+21 5%	+21, +21 11%	+21, +21, +21 15%	+21, +21, +21, +21 1%

frecuencia observada con respecto a otros trabajos publicados.

Finalmente, consideramos que es necesario incrementar el número de sondas utilizadas en el análisis de alteraciones numéricas, para poder identificar aquellos pacientes que son portadores de hiperdiploidía alta (mayor de 51 cromosomas), así como también, es necesario incluir otro tipo de alteraciones estructurales como las translocaciones t(1;19), t(4;11) que también son importantes en el pronóstico.

REFERENCIAS

- RHNM. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México. 1996. Secretaría de Salud.
- Bernácer B, Sánchez F, Vecilal R, Lillo L. Leucemias agudas linfoblásticas. Hematología 1985; 11: 502-11.
- Heim S, Mitelman F. Acute lymphoblastic leukemia. En: Cancer cytogenetic. 2nd. ed. New York: Wiley-Lis; 1995. P. 141-60.
- Copelan E, McGuire E. The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. Blood 1995; 585: 1151-68.
- Perentesis J. Why is age such important independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia? Leukemia 1997; 11 (Suppl 4): 4-7.
- Campbell L, Michael P, White J, Matthews J. Prognostic implications of karyotype in 159 newly diagnosed adult patients with acute lymphoblastic leukemia. Blood 1995; (Suppl 1) 86: 678.
- Secker-Walker L, Prentice H, Durrant J, Richards S, Hall E, Harrison G. Cytogenetic adds independent prognostic information in adults with acute lymphoblastic leukemia on MR trial UKALL XA. Br J Haematol 1997; 96: 601-13.
- Faderl S, Kantarjian H, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetics abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. Blood 1998; 9: 3995-4019.



9. Moorman A, Clark R, Farrell D. Probe for hidden hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom Cancer* 1996; 16: 40-5.
10. Heerema A, Argyropoulos G, Weetman, Tricot T, Secker-Walker M. Interphase *in situ* hybridization reveals minimal residual disease in early remission and return of the diagnostic clone in karyotypically normal relapse of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1992; 7: 537-43.
11. Lempert C, Kafko M, Scalise A, Najfeld V. The value of interphase fluorescence *in situ* hybridization in the study of patients with lymphoproliferative disorders: Further evidence for a higher sensitivity of detecting chromosomes 7 y 8 aneuploidy. *Cancer Genet Cytogenet* 1998; 105: 193-7.
12. Jarosová M. Double fusion signal BCR/ABL, detected by FISH on chromosomes 9 y 22 in child with ALL. *Leukemia* 2000; 14: 1319-21.
13. Hozier J, Linquist L. Banded Karyotypes from bone marrow: A clinical useful approach. *Human Genet* 1980; 53: 205-9.
14. Chase A, Grand F, Zhang J, Blackett N, Goldman J, Gordon M, *et al.* Factors influencing the false positive and rates of BCR-ABL FISH. *Genes Chromosom Cancer* 1997; 18: 246-55.
15. Ankathil R, Geeth N, Ramani P, Gangadharan V, Rajasekharan P, Krishnan N. Clinical implications of cytogenetic classification in adult acute lymphoblastic leukemia patients. *J Cancer Res Clin Oncol* 1996; 122: 370-8.
16. GFCH. Groupe Francais de Cytogenétique Hématologique. Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: Correlations with hematologic finding and outcome. A collaborative study of the groupe français de cytogenétique hématologique. *Blood* 1996; 87: 3135-42.
17. Annino L, Ferrari A, Cedrone M. Adult Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: Experience of treatment during a ten-year period. *Leukemia* 1994; 8: 664-7.
18. Cortés E, Kantarjian H. Acute lymphoblastic leukemia. *Cancer* 1995; 76: 2393-417.
19. Secker-Walter. *Chromosomes and genes in acute lymphoblastic leukemia*. Chapman and Hall; New York: 1995. p. 167.

Solicitud de sobretiros:

M en C Mónica Sierra Martínez
Av. Instituto Politécnico Nacional No. 5160
Col. Magdalena de las Salinas
Deleg. Gustavo A. Madero
07360 México, D. F.
Tel.: 5747-7560 ext. 484
Fax: 5747-7601
E-mail: hjmmn@icqmail.com

Recibido: 3 de septiembre de 2001.

Aceptado: 21 de septiembre de 2001.