



Citogenómica en leucemia linfoblástica aguda

Juan Carlos Bravata-Alcántara,* Sonia Chávez-Ocaña,** Mónica Sierra-Martínez***

RESUMEN

En leucemia linfoblástica aguda (LLA) se reportan varios tipos de alteraciones cromosómicas que tienen valor pronóstico bien conocido, estas alteraciones permiten valorar la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Actualmente la citogenómica permite conocer el comportamiento de las leucemias con el uso de los microarreglos de alta densidad, ya que se ha observado que se tiene mayor detección. Con los microarreglos se pueden detectar pérdidas que están muy relacionadas clínicamente con genes como: *CDKN2A/B*, *ETV6*, *PAX5* y *IKZF1*, que se asocian con la expresión y regulación de genes que contribuyen a una transformación neoplásica en la hematopoyesis y se localizan en células de tipo B. Los avances tecnológicos de las plataformas de microarreglos han permitido tener más conocimientos para entender los procesos de leucemogénesis, para realizar blancos terapéuticos, y ofrecer una medicina personalizada. Pero aún falta comprender mecanismos que permitan identificar por qué existen diferencias del origen y frecuencia de las alteraciones cromosómicas entre niños y adultos.

Palabras clave: Leucemia, alteraciones cromosómicas, microarreglos.

ABSTRACT

In acute lymphoblastic leukemia (ALL), various types of chromosomal alterations with prognostic value are reported well known, these changes allow us to evaluate the response to treatment and survival. Cytogenomics currently allows to know the behavior of leukemias using high-density microarrays, as it has been observed that higher detection. With microarrays can detect losses that are closely related genes as clinically; *CDKN2A/B*, *ETV6*, *PAX5* and *IKZF1*, which are associated with the expression and regulation of genes that contribute to neoplastic transformation in hematopoiesis and are located in cells of type B. With these technological advances in microarray platforms, we have allowed more knowledge to understand the processes of leukemogenesis, for therapeutic targets, and deliver personalized medicine. But we still need to understand mechanisms that allow us to identify why there are differences in the origin and frequency of chromosome abnormalities among children and adults.

Key words: Leukemia, chromosomal alterations, microarrays.

INTRODUCCIÓN

La alteración citogenética que se detectó por primera vez y que estaba directamente asociada a padecimientos hematológicos fue el cromosoma Filadelfia (Ph^+) o $t(9;22)$, asociada a la leucemia granulocítica crónica (LGC). Por la citogenética y la biología molecular se dilucidó que en estos sitios de rompimiento se encontraban genes implicados directamente en varios procesos que regulan el ciclo celular, procesos hematopoyéticos y oncogenes, por lo que

ha permitido realizar incluso terapias dirigidas al tipo de alteración cromosómica relacionada, como en el caso de la leucemia promielocítica aguda (PML), que la terapia consiste en dosis de ácido retinoico. Para el caso de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se han reportado varios tipos de alteraciones cromosómicas que tienen valor pronóstico ya bien conocidas, estas alteraciones permiten valorar la respuesta al tratamiento y la supervivencia. Sin embargo, una de las grandes limitaciones es la resolución, ya que sólo permite diagnosticar alteraciones por arriba de

* Alumno de la Maestría en Ciencias de la Salud, IPN. Adscrito al Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Hospital Juárez de México..

** Médico Especialista en Genética, Servicio de Genética.

*** Investigadora en Ciencias Médicas, Laboratorio de Genética y Diagnóstico Molecular, Hospital Juárez de México.



5Mb, con el advenimiento de la tecnología de los microarreglos para citogenética, permite detectar alteraciones hasta en Kb, lo que abre las puertas al conocimiento de las bases de la leucemogénesis, para el entendimiento y predicción en las fallas al tratamiento, encontrar nuevos marcadores que puedan ser integrados en el diagnóstico y la generación de blancos terapéuticos.

La LLA se caracteriza por la acumulación de células linfoides malignas en la médula ósea y en muchos casos en sangre periférica. Esta enfermedad es heterogénea, desde el punto de vista morfológico y citogenético, además de ser frecuente en la edad pediátrica, aunque también se presenta en adultos con menor frecuencia.

Incidencia y epidemiología

La LLA ocurre con mayor frecuencia durante la primera década de vida, pero su frecuencia vuelve a aumentar en personas mayores, siendo una enfermedad agresiva que presenta un comportamiento diferente al descrito en los niños; en la actualidad, cerca de 90% de los sujetos menores de 15 años logran remisión completa (RC) y 70% se cura de la enfermedad. A pesar del progreso en el tratamiento de las enfermedades hematológicas malignas, los adultos con LLA tienen tasas de RC de 75% y una supervivencia libre de enfermedad (SLE) a largo plazo que no supera 30%.¹

Clasificación y factores pronósticos

La clasificación de la LLA se hace a través de la morfología, citoquímica e inmunofenotipo de los linfoblastos de sangre periférica y médula ósea.² De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) otro parámetro que se debe utilizar para la clasificación y pronóstico es el cariotipo o estudio citogenético, ya que con este tipo de estudio podemos detectar grupos de riesgo de acuerdo con el tipo de alteración (Cuadro 1). Alrededor de 40 a 50% de niños y adultos con LLA tienen alteraciones cromosómicas; éstas pueden ser de tipo numérico (hiperdiploidia o hipodiploidia) y estructural, siendo la más frecuente las translocaciones. En la figura 1 se muestran los subtipos citogenéticos, y su frecuencia en niños y adultos jóvenes.³

Estas alteraciones pueden ser detectadas por citogenética clásica, citogenética molecular (hibridación *in situ* con fluorescencia, FISH) y biología molecular (RT-PCR).

Últimamente han surgido nuevas metodologías más sofisticadas que muestran de manera más detallada el comportamiento de las leucemias, por ejemplo, técnicas basadas en microarreglos, que se pueden observar a nivel de variantes genómicas, con una detección mayor.

Cuadro 1. Alteraciones numéricas y estructurales en la LLA: frecuencia y valor pronóstico en niños y adultos.

Alteración cromosómica	Genes asociados	Tipo celular asociado	Frecuencia (%)	Niños	Pronóstico clínico	Adultos	Frecuencia (%)	Pronóstico clínico
Hiperploidia alta	-		23-30		Favorable	7-8		Favorable Intermedio
Hipodiploidia	-		6		Favorable intermedio	7-8		Adversa
t(12;21)(p13;q22) t(9;22)(q34;q11.2) t(4;11)(q21;q23)	ETV6-RUNX1 (TEL-AML1) BCR-ABL1 MLL-AFF1(AF4)	Pre-B Pre-B común Pro-B	22-26 1-3 1-2		Favorable Adversa Adversa	0-4 11-29 4-9		No determinada Adversa Adversa
t(1;19)(q23;p13.3)	E2A-PBX1	Pre-B común	1-6		Favorable intermedio	1-3		Favorable
Cariotipo normal			31-42		Relativamente favorable	15-34		Relativamente favorable

Fuente: Tomado y modificado de Mrozek y col. (2009).³

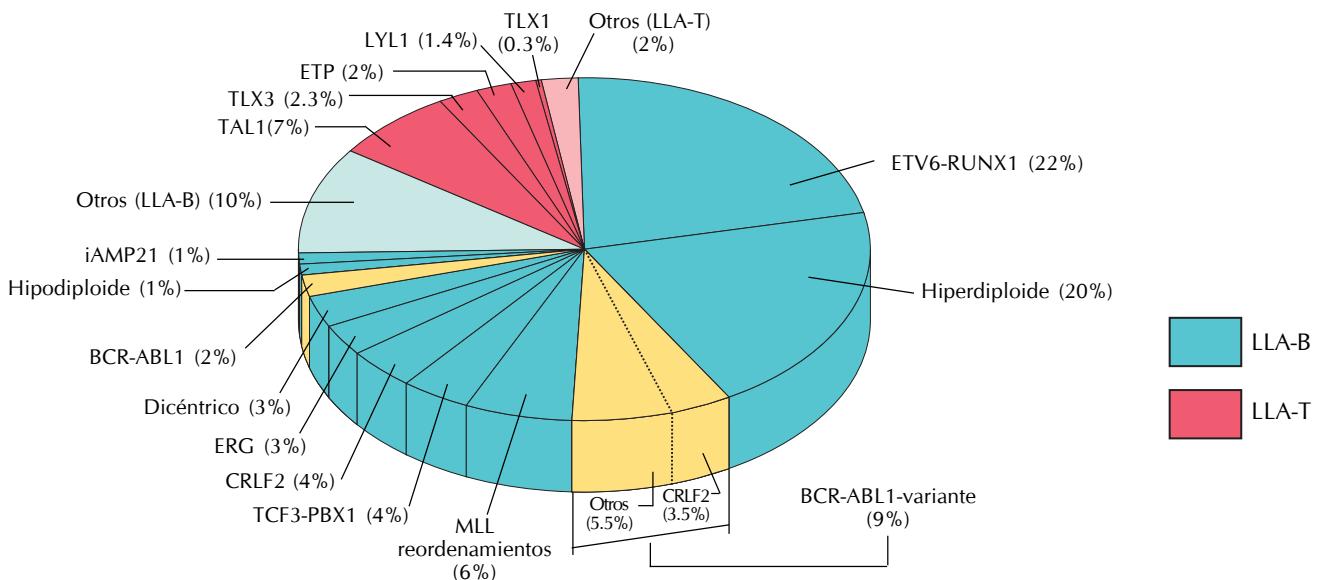


Figura 1. Subtipos citogenéticos en LLA. Tomado y modificado de: Mullighan (2012).⁴

MICROARREGLOS

El proyecto Genoma Humano arrojó gran cantidad de información y de anotaciones sobre el genoma humano; sin embargo, conocer la función de cada una de las secuencias identificadas es un campo en el que aún se trabaja de forma activa, y una de las técnicas que se han utilizado para facilitar la identificación y la clasificación de estas secuencias son los arreglos en una matriz, la cual es una técnica de biología molecular por medio de la cual es posible inmovilizar en un plato material genético conocido y luego hibridarlo con material genético marcado para estudio.

En 1994 Affymetrix (compañía de biotecnología californiana) desarrolló, por medio de técnicas fotolitográficas, arreglos de ADN de alta densidad.⁵

Arreglos de menor tamaño se idearon ulteriormente constituyendo los microarreglos de ADN o CHIPS. Los microarreglos modernos pueden contener aproximadamente 20,000-30,000 genes, lo cual hace posible que en un único microarrreglo se pueda estudiar todo el genoma de especies como la humana, en platos o losas de 1 a 2 cm². Los microarreglos constituyen un importante avance, ya que permiten evaluar en un espacio reducido la expresión de un gran número de genes.⁶

Microarreglos de ADN

Los arreglos de ADN son placas de vidrio, nylon o silicona, compuestas por pozos de 100-300 mm, en las cuales cientos o miles de secuencias de genes se inmovilizan. El

material genético fijado a la base puede ser ADN, ADN complementario (ADNc) u oligonucleótidos.⁷

El proceso de los microarreglos basado en la hibridación utiliza moléculas de ácidos nucleicos (ADN, ADNc u oligonucleótidos) que funcionan como sondas y se hibridan con ácidos nucleicos complementarios provenientes de la muestra en estudio, los cuales han sido marcados por diferentes métodos.⁸

Los blancos están marcados con material fluorescente (Cy3, Cy5 o biotina) que luego puede ser detectado mediante fotoimagen o escáner de fluorescencia.

La alta reproducibilidad de los experimentos con oligonucleótidos permite comparaciones precisas de las señales generadas usando muestras hibridadas en diferentes arreglos.

Microarreglos que detectan ganancias y pérdidas de genes (pérdida de heterocigosidad y número en copias variables)

Ciertas pérdidas o ganancias cromosómicas están relacionadas con la progresión del cáncer y los patrones de estos cambios son importantes para establecer un pronóstico clínico. Con el uso de microarreglos y el análisis de sus resultados se podría predecir cuáles regiones cromosómicas contienen genes que inicien y mantienen procesos tumorales. Los resultados pueden ser visualizados en diagramas jerárquicos referidos como modelos en árbol de progresión del tumor.⁹

La técnica de microarreglos de hibridación genómica comparativa permite visualizar ganancias y pérdidas o cam-

bios en el número de copias de un gen particular involucrado en determinada patología.¹⁰

En este tipo de microarreglos se usan grandes porciones de ADN genómico que sirven como ADN inmovilizado en el plato y cada punto o spot de ese ADN representa una región cromosómica conocida. La mezcla a hibridar contendrá ADN genómico marcado, proveniente de tejido enfermo y tejido sano.

Si el número de copias del gen de interés están aumentadas, una gran cantidad de ADN de la muestra se hibridará en los puntos o spots del microarreglo que representan el gen involucrado, mientras que al utilizar muestra proveniente de tejido sano sólo un pequeño número se hibridará en el mismo punto. Dicha diferencia en la cantidad de material hibridado podrá reflejarse en fluorescencias distintas y así será detectado por el escáner y por los programas de lectura.

Citogenómica

Para conocer el comportamiento de las leucemias se recomienda el uso de los microarreglos de alta densidad, ya que se ha observado que se tienen mayor detección, debido a que se pueden llegar a detectar hasta alteraciones < 5 Mb, en comparación con el cariotipo.¹¹ Simons y col. (2011) analizaron 60 casos, encontrando una tasa de detección en función en el número de copias en 90%, mientras que en el cariotipo sólo se encontraron en 61% de alteraciones, además se encontró que por microarreglos se pueden detectar pérdidas < 5 Mb y estas pérdidas están muy relacionadas clínicamente con genes como: CDKN2A/B, ETV6, PAX5 y IKZF1,¹² los cuales están asociados con la expresión y regulación de genes que contribuyen a una transformación neoplásica en la hematopoyesis y se localizan en células de tipo B.¹³

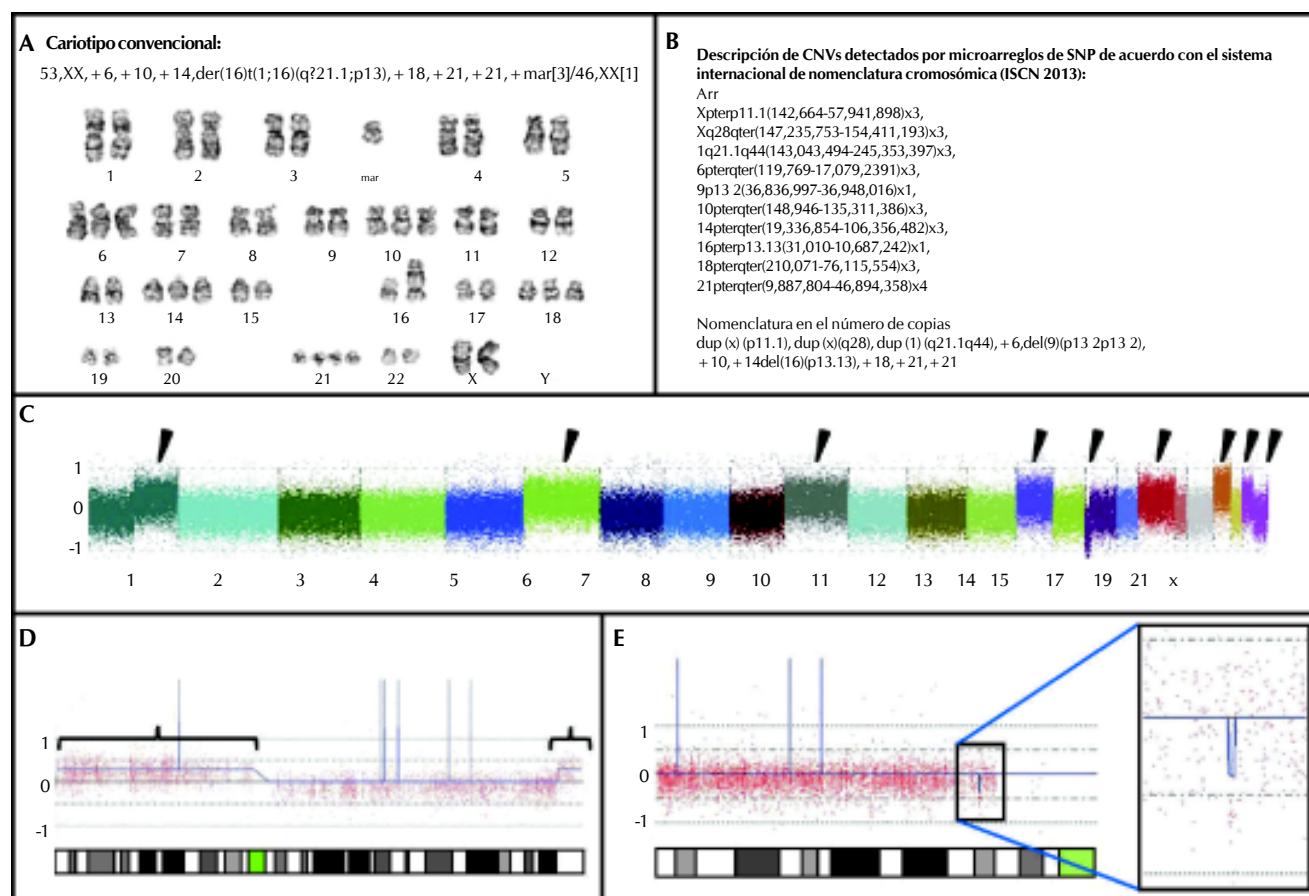


Figura 2. Análisis del microarreglo comparado con la citogenética convencional. Tomado y modificado de: Simons y col. (2010).¹³

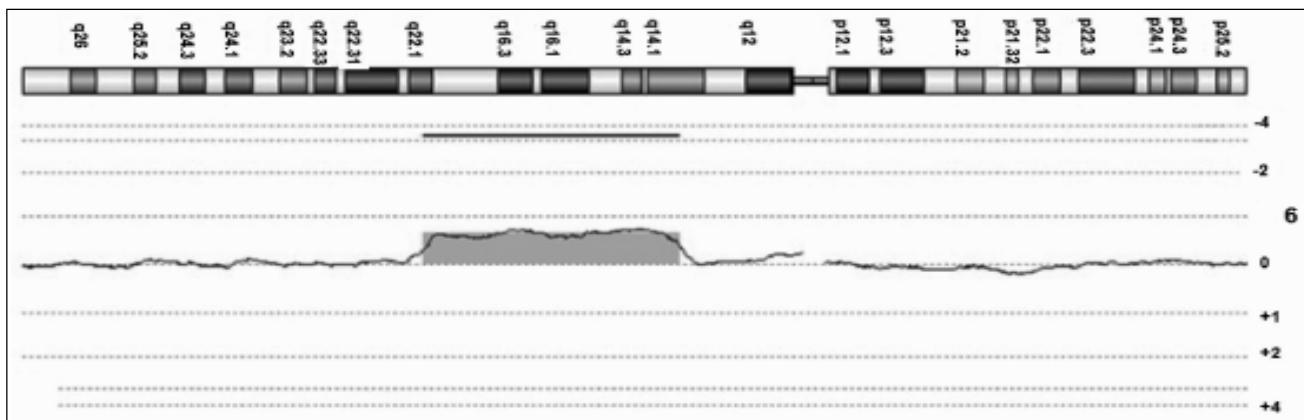


Figura 3. Deleción en el cromosoma 6q14.1 ~ q22.1 región. Tomado y modificado de: Yasar y col. (2010).¹⁷

Por otro lado, Okamoto y col. (2010) realizaron un estudio donde compararon 75 pacientes con LLA en edad adulta y 399 pacientes pediátricos, la población de estudio era asiática y caucásica; para hacer el análisis se utilizaron microarreglos de polimorfismos, donde se reportaron alteraciones crípticas y submicroscópicas (microdelecciones) que por citogenética clásica estos pacientes presentaron un cariotipo normal. Dando como resultados que con los microarreglos se observaron alteraciones como: delecciones, duplicaciones y pérdida de la heterocigosisidad; asimismo, se observó que la mayoría de estas alteraciones ya estaban reportadas previamente en pacientes pediátricos con LLA.¹⁴ Asimismo, las alteraciones encontradas específicamente fueron: delección de 3p14.2 (FHIT), 5q33.3 (EBF), 6q, 9p21.3 (CDKN2A/B), 9p13.2 (PAX5), 13q14.2 (RB1) y 17q11.2 (NF1). Finalmente se encontró que pueden presentarse alteraciones en los cromosomas 9, 6, 12, y su aportación más relevante fue la participación del gen IKAROS, el cual sólo se observó en edad pediátrica, además de que juega un papel importante en la pronóstico de la enfermedad.¹⁵

Yasar y col. (2010) realizaron un estudio retrospectivo en el que por medio de microarreglos de CGH analizaron 20 muestras de LLA, *de novo* ($n = 17$) y con diagnóstico con recaída ($n = 3$) y 20 pacientes con leucemia mieloide aguda (AML) y con diagnóstico de recaída ($n = 1$).

Los autores observaron que los microarreglos serían una herramienta con la cual se pueden encontrar alteraciones a nivel críptico, hasta en 95%, en comparación con la citogenética convencional, que puede llegar a tener menor porcentaje¹⁶ (Figura 2).

En la figura 2A se observa un cariotipo hiperdiploide de 53 cromosomas, con el cual este reporte tiene alteraciones estructurales, pero lo más importante que se observa es que se encuentra un marcador de origen desconocido. La figura 2B muestra el reporte en el número de copias varia-

bles (CNV) y se observan duplicaciones en el cromosoma X y cromosoma 6. Las figuras 2C-2E muestran el análisis de los sitios exactos de ganancias y pérdidas; es importante mencionar que después de realizar el análisis se encontró que el marcador reportado por citogenética convencional era parte del cromosoma 6 (Figura 3).¹⁷

CONCLUSIONES

Los avances tecnológicos de las plataformas de microarreglos han permitido tener más conocimientos para entender los procesos de leucemogénesis, realizar blancos terapéuticos, y ofrecer una medicina personalizada. Pero aún faltan por comprender mecanismos que permitan identificar por qué existen diferencias del origen y frecuencia de las alteraciones cromosómicas entre niños y adultos.

REFERENCIAS

1. Hoelzer D, Thiel E, Loeffler H, Bodenstein H, Plaumann L, Buchner T, Urbanitz D, et al. Intensified therapy in acute lymphoblastic and acute undifferentiated leukemia in adults. *Blood* 1984; 64(1): 38-47.
2. Del Vecchio L, Di Noto R, Lo Pardo C, Schiavone EM, Vacca C, Ferrara F, Rotoli B. Immunological classification of acute leukemias: comments on the EGIL proposals. *Leukemia* 1996; 10(11): 1832-3.
3. Mrozek K, Harper DP, Aplan PD. Cytogenetics and molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2009; 23(5): 991-1010.
4. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *ASH Education Program Book* 2012; 2012(1): 389-96.
5. Cook SA, Rosenzweig A. DNA microarrays: implications for cardiovascular medicine. *Circ Res* 2002; 91(7): 559-64.



6. Aitman TJ. DNA microarrays in medical practice. *BMJ* 2001; 323(7313): 611-5.
7. Schulze A, Downward J. Navigating gene expression using microarrays—a technology review. *Nature cell biology* 2001; 3(8): E190-e195.
8. Copland JA, Davies PJ, Shipley GL, Wood CG, Luxon BA, Urban RJ. The use of DNA microarrays to assess clinical samples: the transition from bedside to bench to bedside. *Recent progress in hormone research* 2003; 58: 25-53.
9. Xu X, Johnson EB, Leverton L, Arthur A, Watson Q, Chang FL, Raca G, Laffin JJ. The advantage of using SNP array in clinical testing for hematological malignancies—a comparative study of three genetic testing methods. *Cancer Genetics* 2013; 206(9-10): 317-26.
10. Laskowska J, Szczepanek J, Styczynski J, Tretyn A. Array comparative genomic hybridization in pediatric acute leukemias. *Pediatr Hematol Oncol* 2013; 30(8): 677-87.
11. Kuiper RP, Schoenmakers EF, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, Hoogerbrugge PM. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia* 2007; 21(6): 1258-66.
12. Medeiros BC. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 2009; 360(17): 1787. Author reply: 1787-8.
13. Simons A, Stevens-Kroef M, El Idrissi-Zaynoun N, van Gessel S, Weghuis DO, van den Berg E, Waanders E, et al. Microarray-based genomic profiling as a diagnostic tool in acute lymphoblastic leukemia. *Genes, Chromosomes Cancer* 2011; 50(12): 969-81.
14. Kawamata N, Ogawa S, Seeger K, Kirschner-Schwabe R, Huynh T, Chen J, Megrabian N, et al. Molecular allelokaryotyping of relapsed pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Int J Oncol* 2009; 34(6): 1603-12.
15. Okamoto R, Ogawa S, Nowak D, Kawamata N, Akagi T, Kato M, Sanada M, et al. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2010; 95(9): 1481-8.
16. Calasanz MJ, Cigudosa JC. Molecular cytogenetics in translational oncology: when chromosomes meet genomics. *Clin Transl Oncol* 2008; 10(1): 20-9.
17. Yasar D, Karadogan I, Alanoglu G, Akkaya B, Luleci G, Salim O, Timuragaoglu A, et al. Array comparative genomic hybridization analysis of adult acute leukemia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 2010; 197(2): 122-9.

Solicitud de sobretiros:

Mónica Sierra-Martínez
 Investigadora en Ciencias Médicas
 División de Investigación
 Hospital Juárez de México
 Av. Instituto Politécnico Nacional, Núm. 5160
 Col. Magdalena de las Salinas
 C.P. 07760, México, D.F.
 Correo electrónico: sierrammtz@gmail.com