

## Patrones de hibridación del gen de fusión BCR/ABL1 en pacientes cubanos con leucemia

Hybridization patterns of BCR / ABL1 gen in cuban patients with leukemia

Norbelys Hernández Aguilar, Kalia Lavaut Sánchez, Vera Ruiz Moleón

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

---

### RESUMEN

**Introducción:** la leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por la presencia de la translocación t(9;22) que resulta en la formación del gen de fusión BCR/ABL1. En ocasiones esta alteración genética puede asociarse con delecciones en secuencias del cromosoma 9 derivativo y otras variantes que no se observan con la citogenética convencional, pero pueden ser detectadas mediante la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH).

**Objetivo:** describir los patrones de hibridación en pacientes positivos a la t(9;22) a partir de la introducción de la técnica de FISH para el estudio de las leucemias en Cuba.

**Métodos:** se estudiaron muestras de sangre medular de 36 pacientes con LMC y ocho con leucemia linfoblástica aguda (LLA), en el Instituto de Hematología e Inmunología. Se empleó la sonda *LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion*.

**Resultados:** entre los pacientes con LMC, dos muestras resultaron no útiles para el diagnóstico y 18 fueron positivas para el BCR-ABL1, una de ellas mostró un patrón de hibridación atípico. Todas las muestras de pacientes con LLA resultaron negativas. En un paciente con impresión diagnóstica de LMC BCR-ABL1 negativo, se observó un patrón de señales que sugiere trisomía del cromosoma 9.

**Conclusiones:** la incorporación de la técnica de FISH para el estudio del transcripto BCR/ABL1 en pacientes con LMC y LLA permitió detectar su presencia y la existencia de patrones de señales atípicos, los que pudieran no ser detectables mediante la citogenética convencional y tener significación pronóstica.

**Palabras clave:** gen de fusión BCR/ABL1, hibridación *in situ* fluorescente, patrones de señales de hibridación.

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Chronic myeloid leukemia (CML) is characterized by the t(9;22) translocation resulting in the formation of BCR/ABL1 fusion gen. Sometimes this genetic alteration can be associated to deletions in sequences of derivative chromosome 9 and other variants detected by fluorescence in situ hybridization (FISH) technique.

**Objective:** To describe hybridization patterns in patients positive to t(9;22) after the introduction of FISH at the leukemia study in Cuba.

**Methods:** The bone marrow samples of 36 patients with diagnosis of CML and eight patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) were studied at the Cytogenetics Laboratory of the Institute of Hematology and Immunology. The BCR/ABL Dual Color Dual Fusion probe was used.

**Results:** The sample of two CML patients were non-useful for diagnosis and 18 were t(9;22) positive, one with an atypical pattern of signals. All the ALL patients were negative. In one negative CML patient was observed a pattern of signals suggestive of trisomy 9.

**Conclusions:** Incorporation of FISH for the BCR/ABL1 transcript study in CML and ALL patients allowed us to detect its presence and the existence of different patterns of signals which could be no detectable by conventional cytogenetic and could have prognostic significance.

**Keywords:** BCR/ABL1 fusion gene, fluorescence in situ hybridization, hybridization signal patterns.

---

## INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa crónica producida por la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22, la t(9;22)(q34;q11). Esta alteración genera un cromosoma 22 derivativo denominado cromosoma Filadelfia (Ph, por su nombre en inglés) que está presente en el 95 % de los pacientes con LMC. Por esta razón, constituye un marcador diagnóstico para la enfermedad. A nivel molecular, producto de la t(9;22) se forma el gen de fusión BCR/ABL1 (del inglés: break point cluster region - Abelson leukemia) que codifica para la proteína quimérica homónima p<sup>BCR-ABL1</sup>. Dicha proteína adquiere acción tirosina quinasa constitutiva<sup>1</sup>.

El cromosoma Ph, también aparece en el 5 % de los pacientes pediátricos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y entre el 15 a 30 % de los pacientes adultos con esa misma enfermedad<sup>2</sup>. En la leucemia mieloide aguda se observa en alrededor del 2 % de los pacientes<sup>3</sup>.

La citogenética convencional es la técnica más utilizada para el diagnóstico del cromosoma Ph. Sin embargo, en ocasiones la mala morfología de los cromosomas, la no obtención de metafases o la presencia de alteraciones crípticas (aproximadamente en el 5 % de los pacientes) imposibilita realizar el diagnóstico con el empleo de dicha técnica. Los avances tecnológicos permitieron desarrollar la técnica de hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, siglas en inglés). Esta es una técnica molecular que utiliza sondas *locus*-específico que hibridan en una región específica del ADN (ácido desoxirribonucleico). Dicha hibridación es detectable, mediante fluorescencia, independientemente de que los núcleos estén en metafase o interfase.

La sonda *LSI BCR/ABL1 Dual Color Dual Fusion* (DCDF) abarca los puntos de ruptura cromosómicas implicados en la t(9;22). Cada cromosoma de interés (el 9 y el 22), se marca con un fluorocromo diferente y genera un patrón de hibridación típico en aquellas células positivas a la translocación. Las variaciones en este patrón de hibridación incluyen, entre otras, delecciones submicroscópicas en el cromosoma 9 derivativo (en la región centromérica al punto de ruptura del gen ABL o en la región telomérica al punto de ruptura del gen BCR, o ambas), así como ganancia de un cromosoma Ph lo que genera patrones atípicos de hibridación.<sup>3</sup>

El presente trabajo describe los patrones de señales de hibridación observados con el uso de la sonda LSI BCR/ABL1 DCDF mediante la técnica de FISH en pacientes con diagnóstico de LMC y LLA a partir de la introducción de esta técnica en el Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba.

## MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo, de tipo transversal para describir los patrones de hibridación en muestras de sangre medular. Se estudiaron 44 pacientes, 36 de ellos con impresión diagnóstica de LMC y 8 pacientes pediátricos con LLA. Todas las muestras se recibieron en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología entre julio de 2014 y abril de 2015.

Para el estudio de la t(9;22) mediante la técnica de FISH se utilizó la sonda comercial LSI BCR/ABL1 DCDF.

### Preparación de las muestras

Las muestras se cultivaron a través de técnica de citogenética convencional. Tras el periodo de cultivo (24 horas), las muestras se extendieron en láminas portaobjetos y se evaluó la calidad de la preparación en microscopio de contraste de fase.

### Pretratamiento de las extensiones

Las extensiones se sometieron a pretratamiento en solución 2XSSC (NaCl/Citrato de Sodio) a 37°C, durante 30 min. Posteriormente se deshidrataron mediante lavados sucesivos en etanol al 70, 85 y 100 % (v/v), durante 2 min cada lavado.

### Hibridación y detección

En cada extensión se aplicaron 10 µL de la sonda *LSI BCR/ABL1 DCDF*. Posteriormente, las láminas se cubrieron con cubreobjetos y se sellaron con cemento de goma. Las láminas así preparadas, se ubicaron en un sistema de desnaturización e hibridación de ADN (S-96 Quanta Biotech, qCycler).

La desnaturización se realizó a 72°C durante 2 min, seguido del paso de hibridación, en cámara húmeda, a 37°C por 18 horas. Al día siguiente se retiraron los cubreobjetos y se hicieron dos lavados consecutivos para eliminar la hibridación excedente. El primer lavado se realizó en 70 mL de 0.4X SSC/0.3 % NP-40 a 72°C durante 2 min y el segundo en 70 mL de 2X SSC/0.1 % NP-40 a temperatura ambiente (25°C) durante 30 s.

En todos los casos se utilizó la tinción de contraste DAPI para la identificación de las señales de hibridación en los núcleos celulares en interfase.

### Análisis

Las señales de hibridación se analizaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51. Los núcleos donde el marcaje era evidente se seleccionaron para el conteo de las señales. Se descartaron los que aparecían superpuestos o con un marcaje débil.

En cada muestra se analizaron entre 100 y 200 núcleos. Según la bibliografía consultada, el resultado se consideró positivo cuando la alteración cromosómica estuvo presente en más del 10 % de los núcleos observados<sup>4, 5</sup>.

Cada cromosoma (en la región de interés) se marcó con un fluorocromo diferente, el cromosoma 9 en rojo (R), y el cromosoma 22 en verde (V). En las células negativas, el patrón normal de hibridación muestra dos señales rojas (2R) y dos señales verdes (2V) separadas e independientes, correspondientes a cada par cromosómico. Por su parte, las células positivas con un patrón típico de hibridación muestran una señal R y una V independientes (cromosomas 9 y 22 normales respectivamente), además de dos señales de fusión rojo-verde o amarilla (2A) (cromosomas 9 y 22 derivativos). Pueden aparecer otros patrones de señales que se consideran atípicos<sup>16</sup>.

### Captura y procesamiento de imágenes

Se utilizó el programa *Olympus Micro DP-BSW* para la captura, procesamiento y análisis de las imágenes. De cada imagen se guardó una versión como evidencia. Los resultados se expresaron de acuerdo a la nomenclatura ISCN (del inglés: *International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*) de 2013.

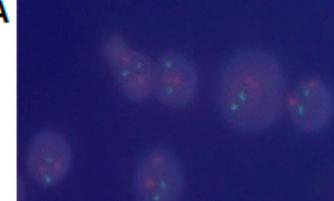
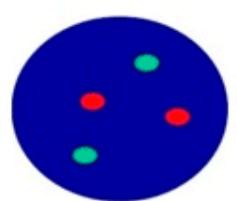
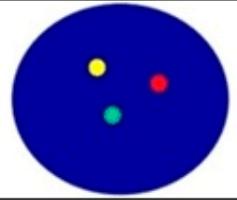
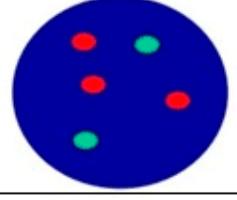
## RESULTADOS

Del total de 44 estudios realizados, dos fueron no útiles para el diagnóstico, debido a que no se obtuvo hibridación o que resultó muy débil.

De las 42 muestras útiles marcadas con la sonda *LSI BCR/ABL1 DCDF*, ocho correspondían a pacientes pediátricos con LLA y en todas se observó un patrón normal de hibridación (2R 2V), por lo que resultaron negativos a la *t(9;22)* (*Fig. 1A*).

Las 34 muestras restantes correspondieron a pacientes con impresión diagnóstica de LMC. De ellas, 18 resultaron positivas lo cual representó el 52,9 %; de las que 17 (94,4 %) mostraron un patrón típico de hibridación 2A 1R 1V (Fig. 1B), mientras que en una se observó un patrón atípico 1A 1R 1V (Fig. 1C).

En un paciente con LMC, negativo a la t(9;22), se observaron dos patrones de señales: el normal 2R 2V y un patrón 3R 2V (Fig. 1D) que se pudiera interpretar como una trisomía del cromosoma 9 o al menos tres copias de la región 9q34.

CÉLULAS EN INTERFASE	DIAGRAMA	PATRÓN
A		2R 2V
B		2A 1R 1V
C		1A 1R 1V
D		3R 2V

**Fig. 1.** Patrones de hibridación BCR/ABL1 observados en células en interfase con el empleo la sonda *LSI BCR/ABL1 DCDF*.

R: señal roja (cromosoma 9), V: señal verde (cromosoma 22),  
A: señal amarilla ( fusión de los cromosomas 9 y 22).

- A)** 2R 2V (patrón normal): cromosomas 9 y 22 normales;
- B)** 2A 1R 1V (patrón positivo típico): dos derivativos de los cromosomas 9 y 22, un cromosoma 9 normal y un cromosoma 22 normal;
- C)** 1A 1R 1V (patrón positivo atípico): el derivativo del cromosoma 22, un cromosoma 9 normal y un cromosoma 22 normal;
- D)** 3R 2V (patrón negativo a la t(9;22)): tres cromosomas 9 y dos cromosomas 22.

## DISCUSIÓN

La aplicación de la técnica de FISH permitió definir la presencia de la t(9;22), lo que facilitó el diagnóstico diferencial entre la LMC y otras neoplasias mieloproliferativas Ph negativas.

El porcentaje de positividad encontrado resultó inferior al reportado por otros autores.<sup>5,6</sup> Esta diferencia puede deberse a que estuvieron incluidos pacientes que presentaron trombocitosis y leucocitosis al debut, cuyos estudios de citogenética convencional fueron no útiles. Por lo que no existía un criterio certero del diagnóstico antes de considerar el estudio del BCR-ABL1 por FISH.

Numerosos estudios reportan una incidencia de 71 a 88 % de patrones típicos de hibridación<sup>6-10</sup>. En nuestro estudio se obtuvo un porcentaje mayor (94,4 %), lo que puede deberse al pequeño tamaño de la muestra.

La sonda LSI BCR/ABL1 DCDF permite detectar la presencia de una segunda señal de fusión originada por el gen químérico ABL1/BCR en 9q34. Cuando solo existe una señal de fusión, como se observó en una de las muestras (Fig. 1C), se reporta que existe una delección en el cromosoma 9 derivativo (en la región 5' del punto de ruptura ABL1 del cromosoma 9, así como la región 3' del punto de ruptura BCR del cromosoma 22). Esan et al. reportaron que este patrón aparece en el 10 a 15 % de los pacientes<sup>7</sup>. Se trata de una delección submicroscópica que no puede identificarse mediante la citogenética convencional. Este patrón atípico también se puede observar, con menor frecuencia, cuando se pierde el cromosoma 9 derivativo<sup>10</sup>. Existe controversia en cuanto a la implicación pronóstica de este patrón. Diferentes estudios lo asocian a un pronóstico desfavorable en todas las fases de la LMC<sup>11,12</sup>. Sin embargo, estudios recientes muestran que este efecto adverso puede desaparecer en los pacientes en fase crónica bajo terapia con imatinib<sup>13,14</sup>.

Se plantea que la delección y la t (9;22) pueden ocurrir al mismo tiempo, como primer y único paso. Se ha demostrado que la delección no se adquiere durante el progreso de la enfermedad sino que tiende a ser constante durante su curso. La mayor probabilidad de que ocurra la delección en esta región pudiera deberse a la presencia de gran cantidad de regiones *alu* repetitivas<sup>15</sup>.

El patrón de hibridación 3R 2V (Figura 1D) en forma de mosaico, sugiere la presencia de tres copias del cromosoma 9 o al menos de la región 9q34. Varios autores han reportado con anterioridad este patrón de señales pero con la presencia de la t(9;22) en otra línea celular<sup>6,10</sup>, a diferencia del caso que se presenta que fue negativo para esta translocación.

Con el empleo de la sonda LSI BCR/ABL1 DCDF en la técnica de FISH, además del patrón típico de hibridación del gen de fusión BCR/ABL1, es posible identificar patrones atípicos que pueden tener implicación pronóstica. La posibilidad de identificar patrones atípicos, positivos o no al BCR-ABL1, que no se observan mediante la citogenética convencional, remarca la importancia de la técnica de FISH para el estudio de estas y otras entidades hematológicas.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Comert M, Baran Y, Saydam G. Changes in molecular biology of chronic myeloid leukemia in tyrosine kinase inhibitor era. *Am J Blood Res.* 2013; 3(3): 191-200.
2. Cetin Z, Yakut S, Karadogan I, Kupesiz A, Timuragaoglu A, Salim O et al. Aberrations of chromosomes 9 and 22 in acute lymphoblastic leukemia cases detected by ES-fluorescence *in situ* hybridization. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012 May; 16(5): 318-23.
3. Lee DS, Lee YS, Yun YS, Kim YR, Jeong SS, Lee YK et al. A Study on the Incidence of *ABL* Gene Deletion on Derivative Chromosome 9 in Chronic Myelogenous Leukemia by Interphase Fluorescence *In Situ* Hybridization and Its Association With Disease Progression. *Genes Chromosomes Cancer.* 2003 Jul; 37(3):291-9.
4. Espinet B, Salido M, Solé F. Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones. Utilidad de la citogenética en el estudio de las neoplasias. Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular. Servei de Patologia. Hospital de Mar de Barcelona. (citado junio 30,2015).Disponible en:  
[http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso\\_Largo\\_Patologia\\_Molecular/Citogenetica\\_molecular.PDF](http://www.seapcongresos.com/2005/Cursos/Curso_Largo_Patologia_Molecular/Citogenetica_molecular.PDF).
5. Solé F. Bases técnicas del FISH. Servei de Patologia. Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular Hospital del Mar. Barcelona. (citado junio 30,2015) (Disponible en: [https://www.seap.es/c/document\\_library/get\\_file?uuid=065873b3-02a9-452f-9b49-605a3ebcbddd&groupId=10157](https://www.seap.es/c/document_library/get_file?uuid=065873b3-02a9-452f-9b49-605a3ebcbddd&groupId=10157))
6. Jardan C, Jardan D, Coriu D, Severin E. Atypical patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in patients with chronic myeloid leukemia. *Revista Română de Medicină de Laborator.* 2012 Sept; 20(3/4):255-63.
7. Esan OA,Senft JR, Wenger SL. Patterns of BCR/ABL Gene Rearrangements in Chronic Myeloid Leukemia with Complex t(9;22) Using Fluorescence *In Situ* Hybridization (FISH). *J Assoc Genet Technol.* 2012; 38(1):5-7.
8. Primo D, Tabernero MD, Rasillo A, Sayagués JM, Espinosa AB, Chillón MC et al. Patterns of BCR/ABL gene rearrangements by interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in BCR/ABL+ leukemias: Incidence and underlying genetic abnormalities. *Leukemia.* 2003 Jun; 17(6):1124-9.
9. Jiang H, Xue YQ, Pan JL, Zhang J, Dai HP, Wu YF et al. The different signal patterns of two FISH probes in the FISH detection of Ph- positive leukemia and their significance clinical. *Zhonghua Yi Xue Chuan Xue Za Zhi.* 2010 Apr; 27(2):166-70.
10. Jain PP, Parihar M, Ahmed R, Abraham A, Vishwabandya A, George B et al. Fluorescence *in situ* hybridization patterns of BCR/ABL1 fusion in chronic myelogenous leukemia at diagnosis. *Indian J Pathol Microbiol.* 2012 Sept; 55 (3):347-51.
11. Wu W, Li JY, Shen YF, Cao XS, Qiu HR, Xu W. The prognostic significance of derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi.* 2007, 46(5): 386-8.

12. Vaz de Campos MG, Montesano FT, Rodríguez MM, Chauffaille M de L. Clinical implications of der (9q) deletions detected through dual-fusion fluorescence in situ hybridization in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 Oct; 178(1):49-56.
13. Quintás-Cardama A, Kantarjian H, Shan J, Jabbour E, Abruzzo LV, Verstovsek S, et al. Prognostic impact of deletions of derivative chromosome 9 in patients with chronic myelogenous leukemia treated with nilotinib or dasatinib. *Cancer.* 2011 Nov; 117(22): 5085-93.
14. Castagnetti F, Testoni N, Luatti S, Marzocchi G, Mancini M, Kerim S et al. Deletions of the derivative chromosome 9 do not influence the response and the outcome of chronic myeloid leukemia in early chronic phase treated with imatinib mesylate GINEMA CML working party analysis. *J Clin Oncol.* 2010; 28:2748-54.
15. Lim TH, Tien SL, Lim P, Lim A. The incidence and patterns of BCR/ABL rearrangements in Chronic Myeloid Leukaemia (CML) using fluorescence in situ Hybridisation (FISH). *An Acad Med Singapore.* 2005 Oct; 34(9):533-8.

Recibido: julio 09, 2015.

Aceptado: noviembre 21, 2015.

*Lic. Norbelys Hernández Aguilar. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, La Habana, CP 10800, CUBA. Tel (537) 643 8695, 8268.  
Email: [rchematologia@infomed.sld.cu](mailto:rchematologia@infomed.sld.cu)*