

Citogenética de las hemopatías malignas en la era de la secuenciación

Cytogenetics of malignant hemopathies in the sequencing era

Kalia Lavaut Sánchez^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-6906-2259>

¹Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

* Autor para la correspondencia: rhematologia@infomed.sld.cu

RESUMEN

Las neoplasias hematológicas se caracterizan por un gran número y complejidad de alteraciones genéticas, desde la formación de genes de fusión a partir de translocaciones e inversiones cromosómicas hasta mutaciones génicas y alteraciones epigenéticas que han permitido la identificación de nuevos oncogenes y genes supresores de tumores responsables de su etiología. Al abordar el estudio genético de las leucemias se utilizan múltiples técnicas como la citogenética convencional, citogenética molecular (hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), esta última con una mayor sensibilidad, especificidad y rapidez que permiten el diagnóstico, la estratificación pronóstica y seguimiento de la enfermedad. Las técnicas anteriores se integran con técnicas de biología molecular, secuenciación génica, entre otras, que permiten el hallazgo de nuevos marcadores genéticos con una mejor caracterización de las hemopatías malignas y la posibilidad del desarrollo de nuevos fármacos específicos que actúen sobre la diana molecular. El objetivo fue revisar la utilidad de la citogenética y la secuenciación génica en el estudio de la leucemia mieloide aguda y la leucemia linfocítica crónica. Ante las ventajas, desventajas y limitaciones de estas técnicas genéticas es necesario utilizarlas de forma complementaria y nunca excluyente.

Palabras clave: citogenética; hibridación *in situ* por fluorescencia; secuenciación génica.

ABSTRACT

Hematological neoplasms are characterized by a large number and great complexity of genetic disorders, from the formation of fusion genes after chromosomal translocations and inversions to

gene mutation and epigenetic disorders that have permitted the identification of new oncogenes and tumor-suppressing genes responsible for their etiology. When addressing the genetic study of leukemias, multiple techniques are used, such as conventional cytogenetics, molecular cytogenetics, and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), the latter having the higher degree of sensitivity, specificity and speed, which allow diagnosis, prognostic stratification and follow-up of the disease. The previous techniques are integrated with molecular biology techniques, gene sequencing, among others, which allow discovery of new genetic markers with better characterization of malignant hemopathies and the possibility of developing new specific drugs against the molecular target. The objective was to review the usefulness of cytogenetics and gene sequencing in the study of acute myeloid leukemia and chronic lymphocytic leukemia. Given the advantages, disadvantages and limitations of these genetic techniques, it is necessary to use them in as complementary but never exclusive management ways.

Keywords: cytogenetics; fluorescence *in situ* hybridization; gene sequencing.

Recibido: 12/04/20

Aceptado: 29/07/20

Introducción

En las leucemias, el número y complejidad de las alteraciones genéticas pueden incrementarse durante la evolución de la enfermedad. Sin embargo, a diferencia de otras neoplasias que están mayormente asociadas con mutaciones génicas, variaciones en el número de copias (delección o amplificación) y pérdida de la heterocigosidad; las hemopatías malignas se caracterizan además por la formación de genes de fusión a partir de translocaciones cromosómicas, inversiones e inserciones.⁽¹⁾

Debido a las diferentes ventajas y desventajas de las disímiles técnicas en el estudio genético de las neoplasias hematológicas se recurre a la utilización de varios métodos, desde la citogenética hasta la secuenciación, para una mejor y completa caracterización genética de los pacientes.

Novell y Hungerford⁽²⁾ en 1960 describieron el cromosoma Filadelfia como la primera alteración cromosómica(AC) adquirida, relacionada con una neoplasia hematológica. Posteriormente Janet Rowley⁽³⁾ evidencia de que esta AC era resultado de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22.

Desde esa fecha hasta la actualidad múltiples son las alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas descritas en las leucemias, lo cual ha permitido la identificación de genes modificados que codifican proteínas con un importante papel en la alteración de diversas funciones celulares tales como apoptosis, control del ciclo celular, regulación del crecimiento y diferenciación celular.⁽¹⁾

La ventaja de la citogenética convencional radica en la detección de AC numéricas y estructurales en un mismo estudio, aunque presenta limitaciones. En primer lugar, es necesario que existan células en división (para lo cual debe ser bloqueada la división celular en metafase), además, posee baja resolución (10 Mb), las pequeñas deleciones y translocaciones crípticas pueden no ser detectadas y obtenerse bandas cromosómicas poco definidas.

Para superar las desventajas de la citogenética convencional, actualmente se dispone de técnicas de citogenética molecular como la hibridación genómica comparativa (CGH), la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH, por sus siglas en inglés). Esta última se puede realizar tanto en células en metafase como en interfase; con una alta sensibilidad, especificidad y rapidez en los resultados. Por lo que se considera una herramienta más en el estudio de las neoplasias hematológicas.⁽⁴⁾

Los estudios citogenéticos se complementan con otras técnicas moleculares, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) con posterior análisis por electroforesis que proporciona un resultado cualitativo, la PCR en tiempo real que posibilita cuantificar y no requiere de electroforesis, el estudio del perfil de expresión génica múltiple mediante micromatrices (microarrays), la secuenciación de Sanger, y la secuenciación de próxima generación (NGS, por sus siglas en inglés), que permiten una mejor caracterización genética de las leucemias.

El proceso de secuenciación del genoma humano evolucionó a lo largo del tiempo. Frederick Sanger inició, en 1977, el campo de la genómica con el desarrollo de la secuenciación del ADN por el método de terminación de cadenas, conocida como secuenciación de primera generación o de Sanger. Este método por ser el primero es considerado, en algunos casos, el método de referencia (*gold standard*) de la secuenciación. Posteriormente los métodos de secuenciación de próxima generación, son capaces de secuenciar cantidades enormes de ADN a una velocidad mucho mayor y a menor costo. Revolucionó el conocimiento y permitió la identificación de

mutaciones somáticas en genomas de pacientes con cáncer que no habían sido identificadas previamente con técnicas como la secuenciación génica dirigida o la citogenética.⁽⁵⁾

Todas las técnicas de secuenciación masiva de próxima generación constan de los siguientes pasos: preparación del templado (molde de ADN a secuenciar), preparación de los clones de cada fragmento de ADN (*clusters*), secuenciación propiamente dicha y análisis de datos.

La leucemia mieloide aguda (LMA) y linfocítica crónica (LLC) son hemopatías malignas con una gran heterogeneidad genética, con presencia de múltiples alteraciones cromosómicas y moleculares, cuyo conocimiento permite la estratificación pronóstica en los pacientes.

El objetivo fue revisar la utilidad de la citogenética y la secuenciación génica en el estudio de la LMA y la LLC.

Análisis y síntesis de la información

Leucemia mieloide aguda

En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) del año 2016 de las neoplasias hematológicas, juegan un papel protagónico los rearrreglos cromosómicos específicos.⁽⁶⁾ Además, grupos cooperativos clínicos, como el Grupo Europeo para el estudio de la leucemia incluyen al cariotipo como componente fundamental de evaluación pronóstica para la LMA y los síndromes mielodisplásicos (SMD).⁽⁷⁾

Aunque se reporta que el 40-50 % de los pacientes con LMA pueden tener un cariotipo normal.⁽⁸⁾ La identificación de las alteraciones citogenéticas en la LMA al debut brinda una importante información pronóstica, pues permite estratificar a los pacientes en diferentes grupos. Los pacientes que presentan alteraciones citogenéticas como: cariotipos complejos, monosomía 5/del(5q), monosomía 7/del(7q) o alteraciones de 3q muestran una supervivencia global menor, así como mayor recaída de la enfermedad.

Además, se pueden aplicar tratamientos específicos, tales como ácido trans-retinoico (ATRA) en los pacientes con translocación t(15;17)(q22;q21) y altas dosis repetitivas de citarabina en pacientes con t(8;21)(q22;q22) o inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22).

En años recientes, las mutaciones en diferentes genes (NPM1, CEBPA, FLT3) han sido incorporadas en la estratificación de riesgo de la LMA. Los pacientes con cariotipo normal y mutación en NPM1, sin mutación en FLT3 o con mutaciones bialélicas en CEBPA presentan

pronóstico favorable, la presencia de la duplicación interna en tándem del gen FLT3 o de mutaciones en TP53 confieren un pronóstico adverso.

Los estudios muestran evidencias de interacción entre algunas alteraciones somáticas y rearrreglos cromosómicos específicos. En el caso de los pacientes con LMA y translocación t(8;21), las mutaciones en el gen KIT son más comunes que en otros subtipos de LMA, lo cual está relacionado con una mayor recaída de la enfermedad y menor supervivencia.^(8,9) Con la NGS se han identificado muchas otras mutaciones con significación pronóstica, como mutaciones puntuales, inserciones y deleciones pequeñas.^(10,11)

En la actual era de la secuenciación, ¿la citogenética pudiera no ser imprescindible en el estudio de las leucemias? En publicación revisada, *Kuo FC* y otros¹² realizan una comparación entre el cariotipo y la NGS, al evaluar pacientes con neoplasias mieloides al debut, en el seguimiento durante el tratamiento y en el momento de la recaída. Ellos refieren que el cariotipo brinda información numérica y estructural, mientras que la NGS solo información numérica en algunos casos. Por ejemplo, en el cariotipo se puede observar el intercambio de fragmento cromosómico entre 12p y 21q, en el cual no hay ni ganancia ni pérdida, con el análisis de esa misma muestra por NGS no se mostrará ningún cambio. Además, el cariotipo identifica múltiples clones que muestran o no alguna alteración común, en contraste la NGS solo identifica alteraciones numéricas que muestran una fracción significativa (mayor del 30 %) de las células dentro de la muestra. La citogenética mediante la técnica de banda G presenta baja resolución, aunque puede detectar fácilmente la alteración de un brazo o segmento cromosómico, pero no detectar cambios crípticos mientras los paneles de NGS presentan una resolución a nivel de exón o gen. En los cariotipos complejos, en los cuales estén presentes muchos marcadores cromosómicos, es difícil determinar el origen cromosómico de estas alteraciones, esto se soluciona con la NGS, aunque en esta última no puede diferenciarse un genoma trisómico o tetrasómico de un genoma disómico, pues miden los números de copias en términos relativos y no absolutos, lo cual es fácilmente distinguible en el cariotipo.

Las translocaciones estructurales que están descritas en la clasificación de la OMS de las neoplasias hematológicas generalmente son eventos precoces que pueden ser detectadas por el cariotipo al debut de la enfermedad y rara vez se adquieren durante la evolución de la leucemia. Por lo que es poco probable que el análisis cariotípico después del diagnóstico inicial revele información adicional, si las pruebas de panel de NGS en serie no detectó evolución clonal. Sin

embargo, las pruebas en serie que utilizan paneles NGS pueden descubrir la aparición de nuevas mutaciones y posibles objetivos para la terapia, así como evaluar cambio en el número de copias que pueden ser clínicamente significativos. Ante las ventajas y desventajas de ambas técnicas, los autores concluyen que es recomendable la utilización de ambos métodos durante la evaluación diagnóstica inicial en aquellos pacientes con sospecha de neoplasia mieloide, y sugieren que la NGS es la mejor elección en el seguimiento durante la evaluación del tratamiento.⁽¹²⁾ Aunque afirman que, cuando se detecta un cambio significativo mediante la prueba del panel NGS en el curso clínico de la enfermedad es prudente realizar un análisis citogenético de seguimiento, tanto para confirmar las sospechas de alteraciones numéricas como para proporcionar una resolución unicelular y evaluar mejor la heterogeneidad clonal.

Otros autores también informan la integración de técnicas citogenéticas y moleculares para el diagnóstico y la estratificación de riesgo de los pacientes con leucemia mieloide aguda.^(6,7)

Leucemia linfocítica crónica (LLC)

Herling y otros publicaron en la revista *Blood* el primer estudio clínico prospectivo que integra los aspectos clínicos, datos de laboratorio, resultados citogenéticos y de la NGS para el análisis pronóstico de los pacientes con LLC. Los investigadores demostraron que la complejidad del cariotipo es un factor pronóstico independiente para la supervivencia de los pacientes.⁽¹³⁾

El estudio por FISH de la LLC incluye sondas para la detección de la del(13q14), trisomía 12, pérdida del gen *ATM* por la del(11q22.3) y del gen *TP53* por la del(17p13.1), al menos una de estas cuatro alteraciones se identifica en el 80 % de los pacientes. Lo cual permite la estratificación de los pacientes en pronóstico favorable (del 13q como única alteración), riesgo intermedio (trisomía 12) y pronóstico desfavorable (pérdida de los genes *ATM* y *TP53*) caracterizado por una rápida progresión de la enfermedad, resistencia al tratamiento y baja supervivencia.^(14,15)

Con el estudio molecular por NGS, *Herling* y otros describen por primera vez que las mutaciones en el protooncogén *KRAS* y *POT1* (protección de telómeros 1) afectan la respuesta al tratamiento, así como la supervivencia después de la quimioinmunoterapia.⁽¹³⁾

En los pacientes con aumento en la frecuencia de la mutación *KRAS* que no responden a la quimioinmunoterapia, los autores proponen que los mismos puedan beneficiarse con el tratamiento de pequeñas moléculas inhibidoras que se dirigen a los componentes de la vía de la proteína quinasa activada, una importante ruta de señalización del receptor de células B.⁽¹³⁾

En el caso de los pacientes con mutaciones en POT1 estos se asociaron a más baja supervivencia, este dato ha sido reportado en un solo estudio de pacientes con LLC. ⁽¹⁶⁾ POT1 es una proteína que forma parte del complejo proteico que participa en la protección de los telómeros y la regulación de la actividad de las telomerasas. Por lo que es posible que las mutaciones en ese gen puedan conducir a la inestabilidad genómica e impulsar la tumorigénesis. Además, se identifican mutaciones en seis genes no reportadas anteriormente que están involucrados en la respuesta al daño del ADN, lo cual puede contribuir a la inestabilidad genómica en la LLC.⁽¹³⁾

La integración y no la exclusión de varias tecnologías en los algoritmos diagnósticos de las hemopatías malignas proporciona una mejor estratificación de riesgo, monitorizar la enfermedad y la aplicación de terapéuticas específicas.

Referencias bibliográficas

1. De Braekeleer E, Douet-Guilbert N, De Braekeleer M. Genetic diagnosis in malignant hemopathies: from cytogenetics to next-generation sequencing. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(2):127-9.
2. Nowel PC, Hungerford DA. Chromosome studies on normal and leukemic leucocytes. *J Natl Cancer Inst.* 1960;25:85-109.
3. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243:290-3.
4. Jehan Z, Uddin S, Al-Kuraya. *In-Situ* Hybridization as a Molecular Tool in Cancer Diagnosis and Treatment. *Current Medicinal Chemistry.* 2012;19:3730-8.
5. Mordoh A. Secuenciación masiva de ADN: la próxima generación. *Dermatol Arg.* 2019;25(1):2-8.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016;127(20):2391-406. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
7. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 2017;129:424-47.

8. Weinberg OK, Sohani AR, Bhargava P, Nardi V. Diagnostic Work-up of Acute Myeloid Leukemia. *Am J Hematol.* 2017;92(3):317-21.
9. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2006;24:3904-11. doi:10.1200/JCO.2006.06.9500
10. Shin SY, Lee ST, Kim HJ, Cho EH, Kim JW, Park S, et al. Mutation profiling of 19 candidate genes in acute myeloid leukemia suggests significance of DNMT3A mutations. *Oncotarget.* 2016;7(34):54825-37. doi: 10.18632/oncotarget.10240
11. Northrup V, Maybank A, Carson N, Rahmeh T. The Value of Next-Generation Sequencing in the Screening and Evaluation of Hematologic Neoplasms in Clinical Practice. *Am J Clin Pathol.* 2020; 153(5):639-45. doi: 10.1093/ajcp/aqz203.
12. Kuo FC, Steensma DP, Dal Cin P. Conventional Cytogenetics for Myeloid Neoplasms in the Era of Next-Generation-Sequencing. *Am J Hematol.* 2017;92(3):227-9.
13. Herling CD, Klaumünzer M, Rocha CK, Altmüller J, Thiele H, Bahlo J, et al. Complex karyotypes and *KRA* and *POT1* mutations impact outcome in CLL after chlorambucil-based chemotherapy or chemoimmunotherapy. *Blood.* 2016;128(3):395-404. doi: 10.1182/blood-2016-01-691550
14. Dubuc AM, Davids MS, Pulluqi M, Pulluqi O, Hoang K, Hernandez-Sánchez JM, et al. FISH in the dark: How the combination of FISH and conventional karyotyping improves the diagnostic yield in CpG-stimulated Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL). *Am J Hematol.* 2016;91(10):978-83. doi: 10.1002/ajh.24452
15. Abruzzo LV. Synergy: karyotypes and mutations in CLL. *Blood* 2016;128(3):319-20.
16. Ramsay AJ, Quesada V, Foronda M, Conde L, Martínez-Trillo A, Villamour N, et al. *POT1* mutations cause telomere dysfunction in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2013;45(5):526-30. doi: org/10.1038/ng.2584.

Conflicto de intereses

La autora no declara conflicto de intereses.