

Técnicas de Citogenética aplicadas a los Síndromes Linfoproliferativos

Autores: Dr. José Espinoza P.*, Dra. Esperanza Vizcarra R. *, Dr. José Francisco Tomás M.*, Dr. Miguel Cedeño V.**
* Servicio de Hematología y Hemoterapia, Sección de Citogenética Molecular, Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid

**Médico-Residente de Onco-Hematología
ION - SOLCA, Guayaquil - Ecuador

Introducción

La transformación de una célula linfoide normal en una célula neoplásica viene condicionada por la aparición de determinadas alteraciones citogenéticas específicas, sin que sea posible su eliminación por parte del organismo, y cuyos distintos mecanismos moleculares condicionan una gran heterogeneidad clínica y biológica.

Cada una de estas alteraciones genéticas se suele asociar a un tipo de síndrome linfoproliferativo e implica un mecanismo molecular como la activación de determinados protooncogenes y genes supresores que actúan a nivel del ciclo celular favoreciendo la proliferación ó bien bloqueando la muerte celular programada: apoptosis. Así, las translocaciones presentes en los linfomas suelen afectar al gen de las cadenas pesadas ó ligeras de las inmunoglobulinas que es está yuxtapuesto a otro gen, generalmente encargado de la producción de una proteína, desregulación de este gen y finalmente sobreexpresión de la proteína producto del mismo. Un segundo tipo de translocación origina la fusión de dos genes, dando lugar a un ARN y a una proteína quimérica con capacidad de transformación neoplásica. El tercer mecanismo citogenético es la aparición de deleciones cromosómicas, que implica la pérdida de genes supresores tumorales ó con función reguladora sobre otros genes, como son el p53 ó el p16.

El mayor conocimiento adquirido en los últimos años, tanto del sistema inmune como de la cinética del ciclo celular, y el desarrollo de métodos inmunopatológicos, nos han permitido una más precisa identificación y clasificación de los procesos linfoides. La aplicabilidad e interpretación de las técnicas de genética molecular: FISH, SKY y CGH, tema de esta revisión, así como los métodos de biología molecular: PCR convencional, PCR transcriptasa reversa, PCR en tiempo real, Southern Biot.

Correspondencia y separatas:

Dr. José Espinoza P.
Servicio de Hematología, Fundación Jiménez Díaz,
Universidad Autónoma de Madrid
Av. Reyes Católicos, 2 Ciudad Universitaria
Telf.: 5441600 - 28040 Madrid.
E-mail: jespinozap@aehh.org

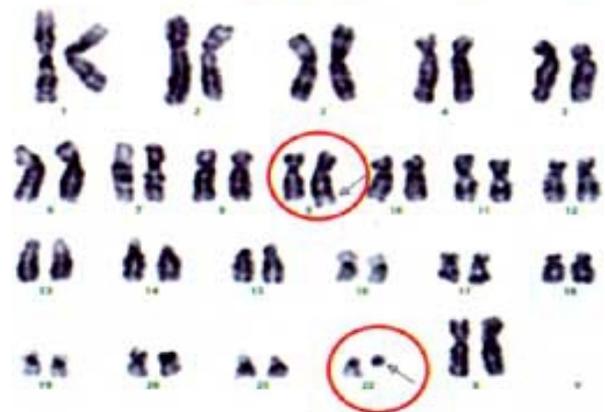
© Los derechos de autor de los artículos de la revista Oncología pertenecen a la Sociedad de Lucha contra el Cáncer SOLCA. Sede Nacional, Guayaquil - Ecuador

TÉCNICAS DE ESTUDIO GENÉTICO APLICADAS A LOS LINFOMAS

Citogenética convencional

Aunque es una técnica laboriosa y rutinaria que requiere personal experimentado, el análisis citogenético mediante técnicas de bandedo mantiene su vigencia en oncohematología desde su introducción en 1970; consiste en el estudio de los cromosomas presentes en la metafase de la célula neoplásica, obtenidos tras el cultivo de células de médula ósea, sangre periférica, ganglio linfático, líquido pleural, peritoneal, ó piel con infiltración tumoral. Esta técnica permite detectar alteraciones cromosómicas en el 80% de los LNH. Los problemas que podemos encontrar son aquellos procesos con un bajo índice mitótico, p.e. LLC, para lo cual puede ser de aplicabilidad la asociación de mitógenos que facilitarán la obtención de metafases. Es bastante común el hallazgo de cariotipos complejos, es decir, múltiples alteraciones asociadas a la alteración primaria, en cuyo caso la complementariedad con técnicas adicionales y de biología molecular serán de gran utilidad.

Ph : der(22)t(9;22)(q34.1;q11.21)



En la Fig.1 Observamos la distribución convencional de los cromosomas en siete grupos, según el tamaño de los cromosomas y la ubicación del centrómero. Se detecta una translocación entre los cromosomas 9 y 22 t(9;22) característica de la LMC.



Fluorescencia con hibridación in situ (FISH)

Es una técnica basada en la hibridación de una sonda de ADN marcada con una sustancia fluorescente sobre su secuencia complementaria del genoma celular presente en el ADN nuclear de células en interfase ó metafase sobre una extensión en un portaobjetos, y su posterior captación y análisis mediante una cámara adaptada al microscopio de fluorescencia, a través de un sistema de digitalización óptica. Existen diferentes clases de sondas, cada una con una diferente aplicación: sondas locus-específicas que hibridan regiones particulares de un cromosoma; sondas centroméricas generadas de secuencias encontradas en los centrómeros del cromosoma, especialmente útiles para la detección de monosomías, trisomías y otras aneuploidias. Por último, las sondas que "pintan" el cromosoma entero, útiles para caracterizar básicamente cromosomas "marker" (cromosomas reordenados de origen desconocido).



La mayor ventaja de esta técnica es que permite el análisis, tanto en interfase como en metafase, de las alteraciones previamente conocidas que determinan el diagnóstico de una determinada patología, y adicionalmente permite realizar su seguimiento y control de Enfermedad Mínima Residual. Es una técnica rápida y que permite el análisis de una gran cantidad de células en un corto período de tiempo, con alta sensibilidad y especificidad. Las limitaciones radican principalmente en que se encuentra restringida a aquellas anomalías que pueden ser detectadas con las sondas actualmente disponibles, requiere un microscopio de fluorescencia y un sistema de análisis de imágenes relativamente costoso.

Hibridación FISH Interpretación: t(9;22)

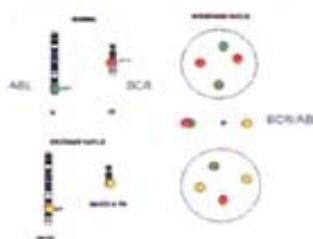


Fig. 2A Representación esquemática de las sondas y su respectiva señal de hibridación, en los correspondientes locus cromosómicos normales, así como el producto de fusión en el cromosoma Filadelfia representando la t(9;22)

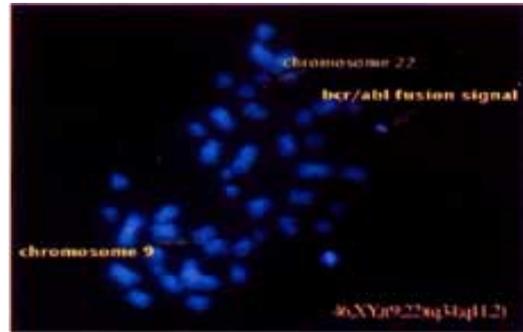


Fig. 2B Un núcleo celular con una señal normal doble (verde) correspondiente a los brazos cortos del cromosoma 9 y otra (rojo) correspondientes al cromosoma 22, y una señal de fusión, amarilla, mezcla del rojo y verde correspondiente a la translocación 9;22

Hibridación genómica comparada (CGH)

Es una técnica que combina el FISH y la citogenética convencional para detectar amplificaciones ó deleciones cromosómicas. A diferencia de la citogenética estándar, no requiere de cultivo celular. Compara el genoma de la célula tumoral con el de una célula normal, permitiendo detectar amplificaciones/ganancias y deleciones/pérdidas de regiones cromosómicas dentro del genoma tumoral comparando la intensidad de la señal de hibridación. Comprende la hibridación simultánea del test genómico patológico y el ADN de referencia a la metafase del cromosoma diana normal, cada uno marcado con un fluorocromo diferente. Comparando la relativa intensidad de los dos fluorocromos a lo largo de la longitud de cada cromosoma diana podremos detectar variaciones en el número de copias de ADN entre el test y los genomas de referencias. Debido a que la CGH puede medir solo diferencias en el número de copias, aquellos reordenamientos no asociados con pérdidas ó ganancias de material genético (translocaciones balanceadas) no son detectables.

A pesar de esto último, la CGH ha contribuido mucho en el conocimiento de alteraciones genómicas en leucemias y linfomas, definiendo imbalances genómicos previamente no conocidos que han permitido la identificación de un número de genes que tienen un papel fundamental en la biología de su respectivo tipo tumoral.

CGH

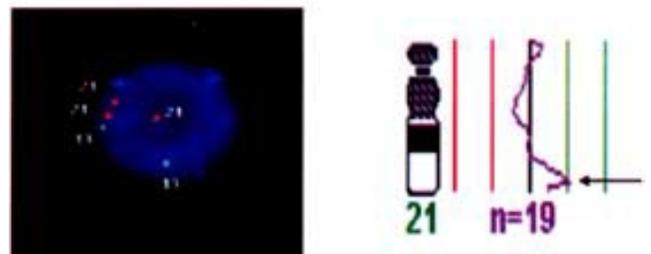


Fig 3A Un ejemplo de análisis por CGH. Por FISH se detecta una trisomía 21. Observamos el correspondiente perfil de ratio de fluorescencia a lo largo del ideograma del cromosoma 21 (n= número de cromosomas analizados). Las regiones color verde representan ganancias genómicas.



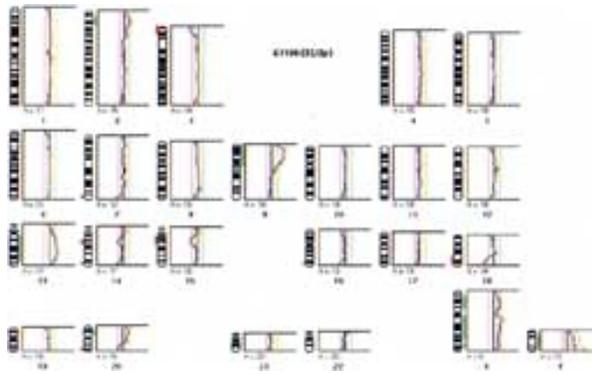


Fig. 3B Otro ejemplo de un análisis de CGH de los 23 cromosomas.

Hibridación in situ multicolor espectral (SKY)

Esta técnica comprende el marcaje simultáneo de todos los cromosomas, cada uno con una diferente y única combinación de colores fluorescentes que se obtiene a partir de cinco colores primarios; el sistema espectral entonces mide toda la gama de luz visible emitido por la muestra a fin de adquirir una imagen espectral de los cromosomas. Finalmente el software analiza el resultado de la imagen espectral y emite una imagen donde obtenemos una metafase y un cariotipo cuyo cada par de cromosomas aparece con un distinto y específico color. Esto nos permite identificar fácilmente el origen de material cromosómico adicional, las translocaciones y componentes de cromosomas "marker" puesto que los cromosomas anormales aparecerán multicoloreados. Sus limitaciones son el elevado costo del equipo de análisis, y el requerimiento de células en metafase.

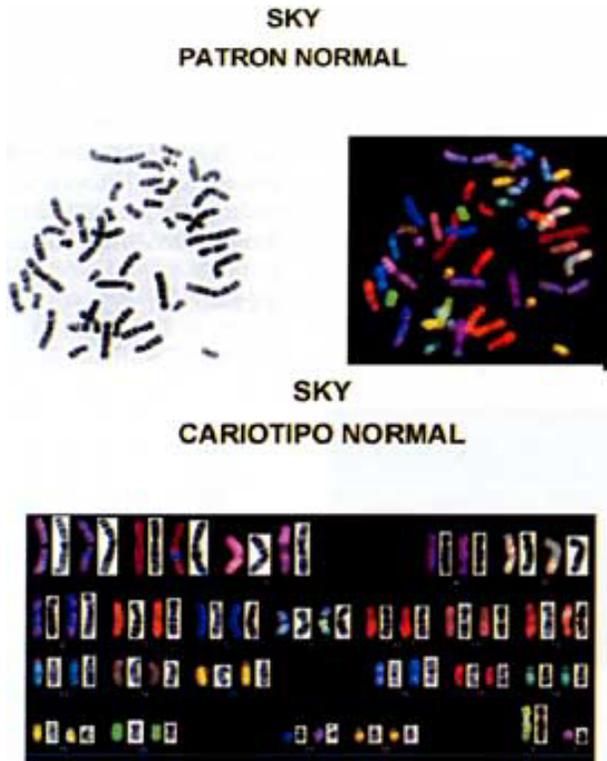


Fig. 4 A Se observa una metafase aparentemente normal.

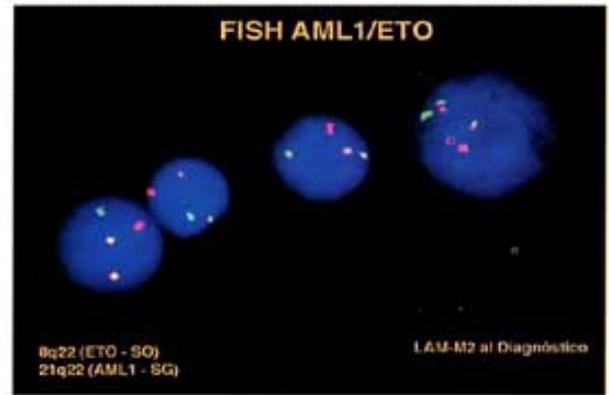
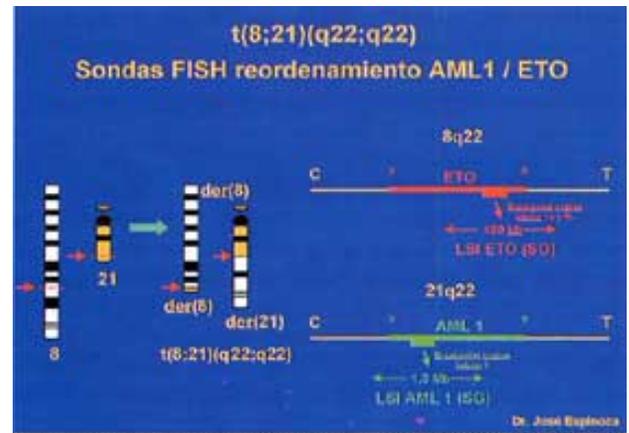


Fig. 4 B y C El tratamiento digitalico luego de la incubación con las sondas cromosómicas y la respectiva adquisición espectral.



Fig.4 D Se observa la adquisición de un color diferente para cada uno de los 23 pares de cromosomas, donde se detecta una translocación entre los cromosomas 12 y 14

PRINCIPALES ALTERACIONES ASOCIADAS A PROCESOS LINFOPROLIFERATIVOS DETECTADAS POR CITOGENÉTICA MOLECULAR

Linfoma de Burkitt y la t(8;14)(q24;q11): gen c-MYC

Esta translocación se detecta en aproximadamente en el 85% de los LNH tipo Burkitt, y que a nivel molecular se caracteriza

por la fusión del oncogén c-MYC ubicado en el brazo largo, banda 24, del cromosoma 8 (8q24), con el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgH, localizado en 14q32. Existen dos variantes de esta entidad, t(8;22)(q24q11) y t(2;8)(p11;q24) en cuyo caso la fusión del oncogén c-MYC es con los genes reguladores de las cadenas ligeras kappa y lambda respectivamente, y que se detectan aproximadamente en el 15% de los casos. El producto de este gen es un poderoso estímulo en el mecanismo de la proliferación celular así como en el mecanismo de la apoptosis, y como resultado de estas translocaciones la influencia de las secuencias reguladoras de los genes de las inmunoglobulinas origina una sobreexpresión del c-MYC que provoca una proliferación descontrolada de las células tumorales.

La correcta identificación de esta translocación, bien a nivel cromosómico convencional ó molecular es indispensable en el diagnóstico del Linfoma de Burkitt, dada la agresividad pero a su vez alta probabilidad de respuesta a los protocolos terapéuticos actuales. La citogenética convencional detecta fácilmente esta translocación, dado el alto índice mitótico de esta neoplasia, existiendo comercialmente sondas FISH para cada una de las translocaciones, permitiendo un diagnóstico con certeza en un plazo de 8 a 24 horas.

Linfoma folicular y la t(14;18): gen BCL2

La t(14;18)(q32;q21) se detecta hasta en el 90% de los linfomas foliculares, e inclusive en el 20 a 30% de los linfomas B difusos de células grandes, probablemente siendo esta última entidad de origen en la célula del centro folicular. En esta translocación el gen bcl-2 es yuxtapuesto al gen IgH, quedando bajo la influencia del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina, lo que origina la desregulación del bcl-2, cuyo producto la proteína u oncogén bcl-2, que originalmente actúa inhibiendo la apoptosis, desencadena una supervivencia anómala de las células linfomatosas.

El análisis por citogenética convencional es útil cuando existe una evidente infiltración de médula ósea, así como en el estudio ganglionar. Se dispone de sondas FISH para bcl-2 ó IgH, útiles tanto en el diagnóstico como seguimiento clínico por su aplicabilidad en metafases como núcleos en interfase.

Linfoma del manto y la t(11;14): gen BCL1

En algunas series, la t(11;14)(q13;q32) se ha identificado hasta en el 95% de casos de Linfoma del manto, así como en otras neoplasias linfoproliferativas como la LLC prolinfocítica, mieloma, y LLC-B. En esta translocación, el gen bcl-1 (también llamado PRAD1, ciclina D1) ubicado en el locus 11q13 se yuxtapone al gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas originando la desregulación de la proteína ciclina D1. Esta proteína actúa como "checkpoint" en la transición de la fase G₁ a la fase S del ciclo celular, y cuya sobreexpresión altera la regulación del ciclo celular.

Esta entidad es reconocida como tal a partir de las nuevas clasificaciones REAL, OMS, ya que anteriormente se interpretaban como linfomas de origen folicular y crecimiento difuso, formas atípicas de LLC, ó linfomas linfoblásticos del adulto, lo que ha permitido un abordaje terapéutico y evaluación pronostica más específica. Constituyen un 7-10% de todos los LNH, afectando sobretodo a individuos adultos de entre 55-60 años de media, y se diagnostican en estadios avanzados (III, IV),

probablemente por la gran tendencia a la afectación extraganglionar.

Linfoma difuso de células grandes de estirpe B: gen BCL6

Las translocaciones de la banda 3q27, donde se localiza el locus del gen bcl-6, se detecta en el 15 a 25% de los LDCGB. El bcl-6 es conocido como un gen promiscuo debido al gran número de partners con los que se ha detectado su fusión (2p12[Ig kappa]; 4p13; 5q31; 8q24; 11q13; 11q23; y 22q11[Ig lambda]). Codifica un factor de transcripción que es desregulado como resultado de las translocaciones. Debido a su localización telomérica, su reconocimiento por citogenética convencional es muy difícil, y sus múltiples "cromosomas partners" impiden el diseño de múltiples primers u oligonucleótidos cebadores específicos para cada cromosoma yuxtapuesto impidiendo el análisis por PCR de forma rutinaria, para lo cual es muy útil el empleo de sondas FISH para bcl-6.

Desde el punto de vista clínico los LDCGB se caracterizan por una presentación extranodal, y la detección de bcl-6 ha sido relacionado con un relativo buen pronóstico.

Linfoma anaplásico de células grandes CD30: t(2;5) gen NMP/ ALK

Esta es una entidad clínica plenamente definida por la clasificación REAL, y cuya t(2;5) (p23;q35) genera la proteína p80 con gran implicación tumoral. Esta translocación fusiona los genes ALK localizado en 2p23 y NMP ubicado en 5q35. Su detección tiene implicaciones diagnóstico-terapéuticas puesto que se presenta en pacientes jóvenes y con pronóstico favorable.

Leucemia linfática crónica/linfoma linfocítico de células pequeñas de células B

Numerosas alteraciones genéticas son comunes a estas dos entidades. La alteración cariotípica más común en la LLC-B así como en la LLCP-B, es la trisomía del cromosoma 12, presente en aproximadamente 25% de los casos, lo cual suele estar asociado con progresión de la enfermedad y corta supervivencia. Junto con el cariotipo convencional, el análisis mediante FISH es de gran utilidad al permitir detectar hasta un 30% de trisomías.

La delección 13q14 es una anomalía frecuente, clínicamente relacionada con linfocitosis moderada, morfología típica y evolución favorable; combinando citogenética y FISH esta alteración se puede llegar a detectar hasta en el 30% de los casos. Otra alteración genética de interés constituye la delección 11q22-23, presente en el 20% de los casos aproximadamente de LLC, asociada a pacientes jóvenes, gran linfadenopatía, y rápida progresión de la enfermedad.

Delecciones ó mutaciones del gen p53(17p13) se detectan en el 10-15% de los casos de LLC-B, estando asociada esta anomalía con mal pronóstico y progresión de la enfermedad, con presencia de morfología atípica, alto índice de proliferación y enfermedad avanzada.

Bibliografía

- Arnold A, Cossman J, Bakhshi A, et al. Immunoglobulin-gene rearrangements as unique clonal markers in human lymphoid neoplasms. N Engl J Med. 1983;309:1593-1599



- Cossman J, Uppenkamp M, Sundeen J, et al. Molecular genetics and the diagnosis of lymphoma. *Arch Pathol Lab Med.* 1988;112:117-127
- Dalla-Favera R, Ye BH, Cattoretti G, et al. BCL-6 in diffuse large-cell lymphomas. *Import Adv Oncol.* 1996;9:139-148
- Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al. ALK1 lymphoma: clinicopathologic findings and outcome. *Blood.* 1999;93:2697-2706
- Gozzetti A, Le Beau M. Fluorescence In Situ Hybridization; Uses and Limitations. *Semin Hematol.* 2001; 37: 320-333
- Horsman DE, Gascoyne RD, Coupland RW, Coldman AJ, Adomat SA. Comparison of cytogenetic analysis, Southern analysis, and polymerase chain reaction for the detection of t(14;18) in follicular lymphoma. *Am J Clin Pathol.* 1995;103:472-478
- Katz RL, Gu J, Pasco-Miller L, Zhang HZ, Caraway N, Medeiros LJ. Detection of cyclin D1 translocation by fluorescence-in-situ hybridization (FISH) is highly specific and sensitive in the diagnosis of mantle cell lymphoma. *Mod Pathol.* 1999;12:46A
- Kluijn PhM, Schuurin E. FISH and related techniques in the diagnosis of lymphoma. *Cancer Surv.* 1997;30:3-20
- Lichter P, Joos S., et al: Comparative Genomic Hybridization: Uses and Limitations. *Semin Hematol.* 2001; 37: 348-357
- Luthra R, Pugh WC, Waasdorp M, et al. Mapping of genomic t(2;5)(p23;q35) breakpoints in patients with anaplastic large cell lymphoma by sequencing long-range PCR products. *Hematopathol Mol Hematol.* 1998;11:173-183
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma. *Science.* 1994; 1281-1284
- Pelicci P-G, Knowles DM, Arlin ZA, et al. Multiple monoclonal B cell expansions and c-myc oncogene rearrangements in acquired immune deficiency syndrome-related lymphoproliferative disorders: implications for lymphomagenesis. *J Exp Med.* 1986;164:2049-2060
- Reed JC. Bcl-2: prevention of apoptosis as a mechanism of drug resistance. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1995;9:451-473
- Reuke WN, Abernathy EC, Tsongalis GJ. Molecular diagnosis of B- and T-cell lymphomas: fundamental principles and clinical applications. *Clin Chem.* 1997;43:1814-1823
- Schröck E, Padilla-Nash H: Spectral Karyotyping and Multicolor Fluorescence In Situ Hybridization reveal New Tumor-Specific Chromosomal Aberrations. *Semin Hematol.* 2001; 37: 334-347
- Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce C. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985;228:1440-1443
- Turner GE, Ross FM, Krajewski AS. Detection of t(14;18) in British follicular lymphoma using cytogenetics, Southern blotting and polymerase chain reaction. *Br J Hematol.* 1995;89:223-225
- Vaandrager JW, Schurring W, Zwikstra E, et al. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multi-color DNA fiber fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 1996;88:1177-1182