

## Técnicas utilizadas en el estudio de las cromosomopatías y del cáncer. Aplicaciones clínicas.

El análisis cromosómico ha proporcionado un conocimiento básico de los cambios genéticos responsables de las cromosomopatías y, en el caso del cáncer, de los procesos que suceden durante la transformación maligna de las células tumorales. En el cáncer, durante las últimas décadas, se han descrito un número de alteraciones cromosómicas recurrentes y frecuentemente asociadas con subtipos tumorales particulares. Además, estas aberraciones citogenéticas han contribuido a establecer en muchos casos el pronóstico de la enfermedad y, en algunos, incluso indicar tratamientos específicos. Por todo ello, muchas decisiones terapéuticas están basadas en estos hallazgos genéticos. A los estudios citogenéticos convencionales desarrollados en la década de los setenta, se han añadido en los últimos años otras metodologías que han permitido mejorar la sensibilidad y la especificidad de los hallazgos citogenéticos. Estas técnicas son derivadas de la hibridación "in situ" fluorescente (HISF). Las más usadas han sido la hibridación genómica comparada (HGC) y la HISF multicolor (HISF-M) o SKY, que junto con la PCR, han supuesto una auténtica revolución tanto en el diagnóstico citogenético de las cromosomopatías como de los tumores en general (Tabla 1).

### 1. Citogenética Convencional

En la actualidad, el análisis de los cromosomas es obligatorio en el estudio de la sangre en el caso de las alteraciones genéticas constitucionales y de la médula ósea o tumores en los procesos oncológicos. La muestra que se cultiva en los estudios citogenéticos puede proceder de cualquier tejido: sangre, médula ósea, líquido amniótico, ganglio, bazo, masas tumorales o efusiones tumorales. Las condiciones de cultivo varían en relación con el tipo de tejido que se pretende analizar y con el diagnóstico de sospecha de la enfermedad. Una vez cultivada, se procede a la recolección de los cromosomas y posteriormente estos se tiñen adoptando el patrón característico de bandeado cromosómico. Finalmente, las metafases son analizadas mediante un sistema de captura y procesamiento de imágenes (Figura 1).

Tabla 1. Características y aplicaciones de las técnicas de Citogenética Molecular.

Técnica	Costo	Tipo de muestra	Uso	Sensibilidad	Tipo de alteración
Citogenética Convencional	Bajo	Fresca, estéril	Metafase	Baja	Cualquiera
HISF	Medio	Fresca o archivada	Interfase Metafase	Alta	Depende de la sonda
HGC	Medio	Archivada (ADN)		Baja	Ganancias y Pérdidas
HISF-M SKY	Alto	Mitosis previas	Metafase	Baja	Todas menos inversiones

### 2. Hibridación "In Situ" Fluorescente

La hibridación "in situ" fluorescente (HISF) consiste en la detección de secuencias de ADN (sondas) previamente marcadas con fluorescencia sobre cromosomas o núcleos celulares fijados sobre un portaobjetos, usando para ello un microscopio de fluorescencia. A diferencia de la citogenética convencional, la mayoría de las técnicas de HISF no precisan de células tumorales en división, por lo que es de gran ayuda en el estudio de muestras en las que no se han obtenido metafases. Además puede aplicarse directamente sobre células extendidas de sangre periférica o médula ósea, improntas de tejido en fresco o congelado, y tejido seccionado y parafinado. Tras la hibridación en núcleos en interfase o en metafase es posible observar la presencia de alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales. Esta metodología se usa cada vez más en el diagnóstico de las hemopatías que tienen una alteración característica, y también es de extraordinaria importancia en el estudio de las alteraciones cromosómicas en el líquido amniótico y en la sangre

de los enfermos en los que se sospecha la existencia de una alteración cromosómica y en los que no se han podido obtener metafases.

### 2.1. Sondas utilizadas en la HISF

En la actualidad, se dispone de un gran número de sondas para el estudio de las alteraciones genéticas frecuentes en las cromosopatías, en enfermedades genéticas que se asocian con microdeleciones y en las neoplasias. Estas sondas están marcadas directamente con fluorocromos, lo que facilita su uso y permite una detección rápida y eficaz de las alteraciones numéricas y de las ganancias, pérdidas o reordenamientos de genes tanto en metafase como en interfase celular. Las sondas utilizadas en la HISF se pueden clasificar en:

- Sondas centroméricas que varían de un cromosoma a otro. Estas sondas permiten identificar alteraciones de tipo numérico, especialmente monosomías y trisomías y otras aneuploidías.
- Sondas que hibridan simultáneamente con múltiples secuencias del cromosoma y se denominan sondas de pintado cromosómico. Sólo pueden utilizarse en metafases y sirven para detectar alteraciones estructurales (traslocaciones, cromosomas marcadores, derivados, etc.) difíciles de identificar con la citogenética convencional.
- Sondas que hibridan con una única secuencia de ADN. Estas sondas permiten sobre todo detectar reordenamientos estructurales de genes o regiones cromosómicas concretas. Para poder utilizarlas es necesario conocer a priori la región candidata a estudiar en cada patología. Sus aplicaciones son: a) la detección de traslocaciones cromosómicas; b) el estudio de pérdidas de genes concretos, y c) el estudio de genes que se amplifican. (Figura 2)

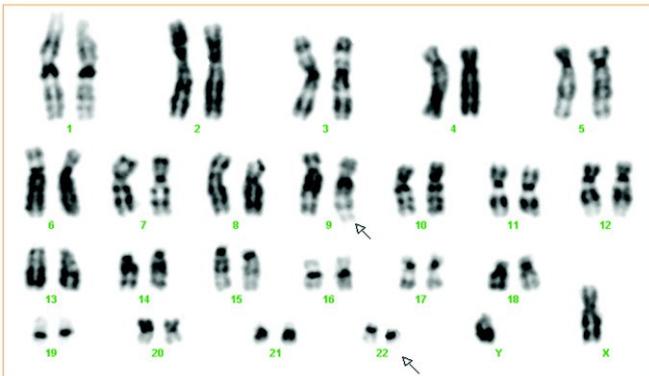


Figura 1

### 2.2. Usos y limitaciones de la HISF

En la actualidad, la HISF es una metodología ampliamente utilizada en los laboratorios de Citogenética. Son indudables los beneficios que puede aportar al conocimiento de las alteraciones genéticas subyacentes en algunas enfermedades (Tabla 2). Sin embargo, presenta algunos inconvenientes que están reflejados en la Tabla 3.

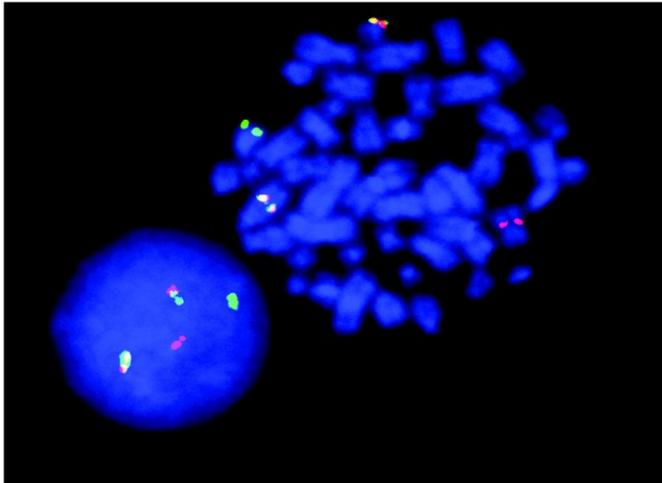


Figura 2. HISF. t(11;14) en linfoma del manto

### 3. Hibridación Genómica Comparada

En la hibridación genómica comparada (HGC) se produce la hibridación competitiva del ADN tumoral y ADN normal (ambos marcados con dos fluorocromos diferentes) frente a cromosomas normales. La HGC ha sido la primera técnica combinada de citogenética e hibridación "in situ" fluorescente que ha permitido realizar un análisis global del genoma. Puesto que las alteraciones en el número de copias de ADN de determinadas regiones tienen una gran importancia en la patogenia del cáncer, esta técnica ha despertado gran interés en el estudio de las neoplasias. La HGC ha sido utilizada de forma más amplia en el estudio de los tumores sólidos que de las neoplasias hematológicas, entre otras razones, por la dificultad que entraña obtener mitosis en los tumores sólidos, y porque los reordenamientos no recíprocos y las amplificaciones genéticas se dan con más frecuencia en ellos que en las neoplasias hematológicas. No obstante, puesto que la HGC no requiere metafases de las células tumorales y no está afectada por la selección clonal inherente a los cultivos celulares, ha motivado también estudios relevantes en las hemopatías malignas (Figura 3).

Tabla 2. Aplicaciones de las técnicas de hibridación “in situ” fluorescente.

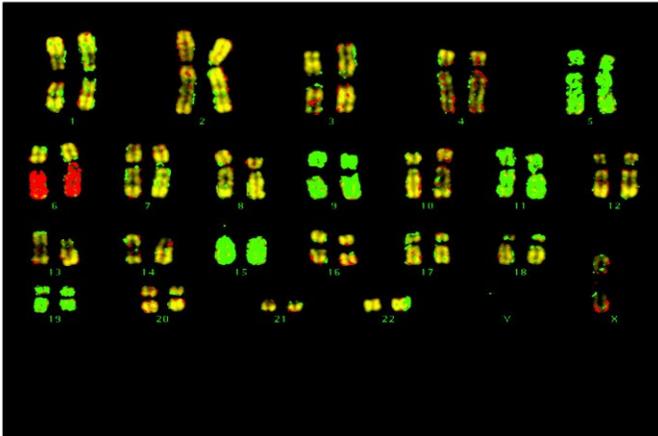
- Detección de alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales
- Mapeo de alta resolución de las alteraciones citogenéticas
- Esclarecimiento de cromosomas marcadores
- Identificación de la estirpe de la célula neoplásica
- Monitorización de la enfermedad residual tras tratamiento
- Identificación de los clones celulares después del trasplante

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de Citogenética Molecular.

	Ventajas	Inconvenientes
HISF	No requiere células en división Rapidez Análisis de un gran número de células Alta sensibilidad y especificidad Aplicable a muestras almacenadas	Necesidad de sondas específicas Limitaciones en parafina
HGC	Pequeña cantidad de ADN No requiere células en división Permite estudiar material archivado Analiza todo el genoma	Sólo detecta ganancias y pérdidas Infiltración tumoral > 50% No permite cuantificación No detecta ganancias < 4-5 Mb No detecta pérdidas < 10-20 Mb
HISF-M SKY	Información de todos los cromosomas Muy útil para descifrar cariotipos complejos Identifica cromosomas derivativos y adicionales	Células en división No detecta inversiones Resolución > 500-1500 Kb

#### 4. Hibridación “In Situ” Multicolor

La hibridación “in situ” multicolor (HISF-M) y el SKY pintan, mediante combinaciones de fluorocromos, cada uno de los cromosomas humanos de diferentes colores. Estas técnicas han supuesto una verdadera revolución en el análisis de los cariotipos complejos y de los enfermos que presentan alteraciones que no pueden ser descifradas por métodos convencionales. Aunque se han aplicado a varios tumores su uso en la rutina aún está por establecerse. El elevado costo que suponen sus equipos y las sondas que utilizan restringen su aplicación, por el momento, al ámbito de la investigación (Figura 4).



**Figura 3. HGC en un caso de mieloma múltiple**

De todo lo expuesto se puede concluir que las técnicas de estudio cromosómico son fundamentales en el correcto estudio de las cromosomopatías y del cáncer. Las técnicas de HSF, con un número cada vez más creciente de sondas disponibles, se han convertido en una estrategia que se aplica en el momento actual de manera sistemática en el estudio de los enfermos con hemopatías malignas, siendo el complemento ideal de los clásicos estudios de citogenética convencional. Estos estudios son indispensables en el momento del diagnóstico, condicionan el pronóstico de las hemopatías y de algunos tumores sólidos y sirven en la monitorización de la enfermedad residual tras el tratamiento.

#### Utilidad de la citogenética en el estudio de las neoplasias hematológicas

Las leucemias agudas forman parte de un grupo heterogéneo de hemopatías malignas que requieren un tratamiento de acuerdo a su caracterización biológica. La mayoría de estas leucemias presentan alteraciones cromosómicas específicas, que están relacionadas con determinados subtipos morfológicos, inmunológicos y clínicos. Su identificación ha tenido gran repercusión sobre cualquier aspecto del manejo de estas enfermedades, ya sea desde el punto de vista diagnóstico, pronóstico o sobre el desarrollo de un plan terapéutico adaptado al riesgo de recidiva.

La aplicación de estudios Citogenéticos y de Biología Molecular ha facilitado un mejor y más profundo conocimiento de la patogenia de las leucemias. Las técnicas usadas varían según su poder de resolución; desde la citogenética convencional basada en el análisis de las bandas G de los cromosomas en metafase, que permite detectar anomalías numéricas y estructurales más o menos complejas, hasta el estudio molecular de los puntos de ruptura cromosómica que se han observado previamente en el cariotipo y que facilita la localización de reordenamientos genéticos implicados en la patogenia de la enfermedad.

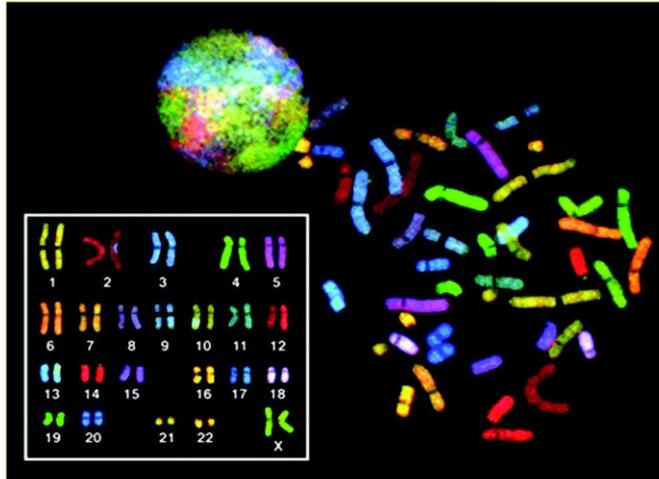
Sin embargo, la información sobre las alteraciones cromosómicas recurrentes que da la citogenética convencional es en algunos casos limitada, bien sea por dificultades de cultivo de las células leucémicas, por la escasez de mitosis analizables o por la poca definición de los cromosomas. Como se ha comentado anteriormente, en los últimos años estas dificultades se han solventado gracias al desarrollo de técnicas complementarias como la hibridación "in situ" fluorescente (HSF), que combina el cariotipo de rutina con la Biología Molecular.

#### 1. Citogenética de la leucemia mieloblástica aguda.

La leucemia mieloblástica aguda (LMA) es una enfermedad muy heterogénea que se clasifica de acuerdo con la morfología de los blastos y la presencia o ausencia de alteraciones citogenéticas específicas. Hoy día se acepta que casi todos los casos con LMA adquieren mutaciones genéticas. Sin embargo, una proporción significativa de pacientes tienen un cariotipo

aparentemente normal, y aún no se ha demostrado si realmente sucede así o si existen cambios crípticos que escapan a las técnicas citogenéticas convencionales de bandas.

Alrededor de un 70% de LMA de novo presentan anomalías cromosómicas clonales, relacionadas algunas de ellas con subtipos específicos de la clasificación FAB, que identifican entidades clínicas distintas dentro de una misma variedad morfológica (Tabla 4).



**Figura 4. SKY**

Tabla 4. Alteraciones cromosómicas recurrentes en los distintos tipos (clasificación FAB) de LMA.

FAB	Cariotipo	Genes implicados
M0	inv(3q26) t(3;3)	EVI1
M1	t(9;22)	BCR-ABL
M2	t(8;21)	AML1-ETO
M3	t(15;17)	PML-RARá
	t(11;17)	PLZF-RARá
M4	11q23	MLL
	inv(3q26)	EVI1
M4Eo	inv(16)/t(16;16)	CBFá-MYH11
M5	11q13	MLL
M7	t(1;22)	OTT-MAL

Para la LAM pueden establecerse grupos pronósticos en relación con los hallazgos citogenéticos. Determinan buen pronóstico las traslocaciones t(8;21), t(15;17) y la inv(16), mientras que los pacientes con +8, -7/7q- y cariotipos complejos tienen un pronóstico más adverso. Estos datos condicionan el tratamiento de los pacientes, especialmente en cuanto a la terapia de consolidación. Por esta razón, las técnicas citogenéticas han significado un gran avance en el entendimiento molecular de la patogenia de estas leucemias y han contribuido a su mejor clasificación.

## 2. Citogenética de los síndromes mielodisplásicos.

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) constituyen un grupo de enfermedades caracterizadas por citopenias periféricas y hematopoyesis ineficaz con tendencia a la transformación hacia leucemia mieloblástica aguda. Alrededor de un 50% de los pacientes con SMD presentan alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales, casi siempre con pérdida del material cromosómico, en forma de deleciones o monosomías. Algunas de las anomalías

recurrentes en el SMD son: -5/5q-, -7/7q-, +8, +21, 3q21 o 3q26, t(1;7), del(20q) y +1q. Muchas de ellas son inespecíficas y se pueden encontrar en otras neoplasias mieloides; sin embargo, aquellas típicas de la LMA de novo, raramente se observan en un SMD.

La información que ofrece un cariotipo en el estudio de los SMD, debe utilizarse para predecir su evolución, ya que la progresión de la enfermedad va unida a cambios cromosómicos adicionales a los del diagnóstico. En mujeres de mediana edad con anemia refractaria simple, la presencia de 5q- como anomalía cromosómica única, indica poca probabilidad de transformación leucémica. Por el contrario, los pacientes con dos o más alteraciones numéricas o estructurales (cariotipo complejo), tienen significativamente una supervivencia más corta.

### 3. Citogenética de la leucemia linfoblástica aguda.

El estudio cromosómico de las leucemias ofrece una gran ayuda en la clasificación y manejo de la leucemia linfoblástica aguda (LLA), ya que se trata de una entidad heterogénea con perfiles clínicos muy diferenciados. La genética junto con el inmunofenotipo y el estudio molecular, permite individualizar subtipos de LLA en niños y adultos de gran significado pronóstico que requieren opciones terapéuticas distintas.

Aproximadamente un 40-50% de los pacientes con LLA tienen alteraciones cromosómicas recurrentes visibles en el cariotipo y la mayoría guardan una gran correlación con el inmunofenotipo (Tabla 5).

Tabla 5. Alteraciones cromosómicas recurrentes en las LLA de origen B y T.

Cariotipo	Genes	Frecuencia(%)	
<b>Línea B</b>		<b>Niños/Adultos</b>	
Hiperdiploidía		25	4
t(12;21)	TEL-AML1	25	1-2
t(9;22)	BCR-ABL	3-5	20-30
t(4;11)	MLL-AF4	2-3	3-6
t(1;19)	E2A-PBX1	5-6	3
t(8;14)	MYC-IgH		
t(8;22)	MYC-Igè	2	4
t(2;8)	MYC-Igè		
<b>Línea T</b>			
t(1;14)	TAL1-TCRd		
t(8;14)	MYC-TCRa	3-4	1
t(11;14)	RBTN-TCRd		
t(1;7)	TAL-TCRb		
del(9p)			7

En la LAL el peor pronóstico está asociado con anomalías como la t(9;22) y los reordenamientos que afectan a la región 11q23. La mayor incidencia de cariotipos adversos en las LAL del adulto explicaría, en parte, su peor evolución respecto a las LAL infantiles. De igual modo la alta incidencia de t(4;11) en niños menores de un año explicaría su mal pronóstico cuando están afectados de la LAL. Las traslocaciones t(8;14), t(2;8) y t(8;22) asociadas al linfoma de Burkitt conllevan mal pronóstico si bien con las nuevas estrategias terapéuticas la supervivencia de estos enfermos ha mejorado considerablemente.

### 4. Citogenética de la leucemia mieloide crónica.

La leucemia mieloide crónica (LMC) fue la primera hemopatía maligna asociada a un reordenamiento cromosómico específico, la traslocación t(9;22)(q34;q11), que origina el cromosoma Filadelfia (Ph) y el gen quimérico BCR-ABL. Este gen está presente en el 95% de los casos de LMC y es, por tanto, fundamental en la patogenia de esta enfermedad.

Las técnicas citogenéticas convencionales y también la HISF y/o PCR, son imprescindibles para confirmar el diagnóstico de una LMC. Entre un 5-10% de los pacientes diagnosticados clínicamente y morfológicamente de LMC, son Ph negativos en el cariotipo pero el reordenamiento puede detectarse mediante técnicas moleculares. Sin embargo, aquellos casos que son también negativos con estos métodos, no deben considerarse como LMC, sino como procesos afines a SMD o bien a otros trastornos mieloproliferativos.

Un 10-20% de los casos de LMC Ph+ presentan al diagnóstico anomalías citogenéticas adicionales. Las más frecuentes incluyen una copia extra del cromosoma Ph, la trisomía 8 y la pérdida del cromosoma Y. Aunque estos cambios no parecen tener significado pronóstico y pueden ser transitorios, sin embargo describen cierta heterogeneidad genética de esta enfermedad. De igual modo, algunos pacientes presentan variantes de la traslocación t(9;22), que implican casi siempre a un tercer cromosoma.

La LMC es una enfermedad bifásica, se inicia con una fase crónica que suele durar 3 años y avoca invariablemente a una crisis blástica precedida a veces por un período de progresión o fase acelerada. La mayor ventaja de la citogenética en la LMC es la detección de la evolución del clon leucémico. La transformación a crisis blástica se acompaña en un 85% de los casos de cambios citogenéticos secundarios como son un segundo cromosoma Ph, un isocromosoma i(17q), y las trisomías 8 y 19.

Estudios recientes mediante HISF han sugerido que la pérdida de genes supresores tumorales localizados en regiones adyacentes a los lugares de ruptura cromosómica en la t(9;22), favorecerían la progresión de la enfermedad.

El resto de los síndromes mieloproliferativos (policitemia vera, trombocitemia esencial, mielofibrosis idiopática) presentan alteraciones cromosómicas en menor porcentaje que la LMC, pero en todos ellos la demostración de clonalidad ayuda a establecer su diagnóstico especialmente en los casos dudosos.

#### 5. Citogenética de los síndromes linfoproliferativos.

Durante muchos años, las alteraciones citogenéticas en los síndromes linfoproliferativos (SLP) han sido mucho menos conocidas que las de las leucemias agudas, síndromes mieloproliferativos y síndromes mielodisplásicos. Sin embargo, mediante el uso de mitógenos adecuados, el análisis sistemático de los ganglios linfáticos en los linfomas y los estudios de HISF han permitido conocer los cariotipos de los SLP.

Las alteraciones citogenéticas de los SLP B han sido estudiadas en profundidad, pero el cariotipo de los SLP T y de los de células NK ha sido analizado con menos detalle, en parte por la menor frecuencia de estos procesos. Una característica de los SLP B es que la mayoría de ellos presentan traslocaciones recurrentes, aunque no exclusivas (Tabla 6). Además de estas alteraciones primarias pueden tener anomalías secundarias, que pueden aparecer en cualquiera de ellos y que se consideran como una evolución clonal de la enfermedad. Las más frecuentes son las trisomías de los cromosomas 7 y 12, y la pérdida de un segmento de 6q o de 17p. Todas ellas suelen asociarse con mal pronóstico. El linfoma folicular, asociado con la t(14;18), presenta buen pronóstico. Por el contrario, el linfoma del manto, en el que aparece de manera recurrente la t(11;14), o la t(8;14), específica del linfoma de Burkitt, tienen peor pronóstico.

Tabla 6. Alteraciones características de los linfomas.

LNH	Citogenética	Genes
Inmunocitomat	(9;14)	PAX5/IgH
LEZM	del(7q)	?
L. MALT	t(11;18)	API2/MLT
L. Folicular	t(14;18)	IgH/BCL-2
L. Manto	t(11;14)	BCL-1/IgH
LCGD	3q27	BCL-6
LB	t(8;14)	c-MYC/IgH
L. Anaplásico	t(2;5)	ALK/NPM
LT	7p/7q/14q	TCR

**LNH:** linfoma no Hodgkin, **LEZM:** linfoma esplénico de la zona marginal, **LCGD:** linfoma difuso de células grandes, **LB:** linfoma de Burkitt, **LT:** linfoma de células T.

### 5.1. Leucemia linfoide crónica.

Hasta hace poco tiempo, el análisis citogenético no había sido considerado como una parte esencial en el estudio de las leucemias linfoides crónicas (LLC). El bajo índice mitótico de estas células leucémicas y la falta de especificidad de los cambios genéticos que presentaban, hacían difícil tanto la obtención de metafases como la interpretación del cariotipo. Sin embargo, el uso sistemático de la HISF mediante la combinación de varias sondas ha hecho posible la identificación de un mayor número de alteraciones clonales que contribuyen a una mejor clasificación.

La LLC se caracteriza por una proliferación monoclonal de linfocitos maduros B (95%), que aparece preferentemente en la edad adulta. La expresión clínica de esta leucemia es muy variable, desde formas indolentes de larga evolución a otras muy agresivas.

Un 50% de los pacientes con LLC, presentan alteraciones cromosómicas. La trisomía 12 es una de las anomalías citogenéticas más frecuentes y está asociada generalmente a morfología atípica, mayor masa leucocitaria, patrón medular difuso y progresión de la enfermedad. La trisomía 12 puede acompañarse de otras alteraciones adicionales que ensombrecen aún más el pronóstico de estos enfermos. La delección del cromosoma 13(q14) afecta al 60% de los pacientes, presentando generalmente un curso mucho más benigno, con morfología típica de LLC. Otra de las anomalías relacionadas con LLC y, descrita en un 10-20% de los enfermos, es la delección o traslocación a nivel del cromosoma 11(q22-23), de mayor incidencia en pacientes más jóvenes con grandes adenopatías y corta supervivencia. La pérdida de material en el cromosoma 14 [del(14q)] también identifica un subgrupo de pacientes con enfermedad más agresiva.

### 5.1.2. Mieloma múltiple.

El mieloma múltiple (MM) se caracteriza por presentar aneuploidías, así las trisomías más frecuentes corresponden a los cromosomas 1, 3, 5, 7, 9, 11, 15, y 19, mientras que las monosomías más recurrentes son las de los cromosomas 13, 14, 16 y 22. Dentro de las alteraciones estructurales son frecuentes las pérdidas de un fragmento del cromosoma 13q y las alteraciones a nivel de 1p. Además, se ha demostrado mediante HISF que los reordenamientos de la región 14q32, que contiene el gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGH), están presentes en aproximadamente el 50% de los enfermos con MM. Existen regiones cromosómicas recurrentes bien definidas que están involucradas en las traslocaciones de IGH, las tres más frecuentes son: BCL-1 en 11q13, FGFR3 en 4p16, y el gen C-MAF en 16q23. A nivel citogenético, el MM se comportaría como un linfoma no Hodgkin B (LNH-B), aunque IGH no tenga una región específica con la que trastocarse en este tipo de enfermedades.

Las alteraciones citogenéticas condicionan el pronóstico de los pacientes con MM. La pérdida de 13q, los cariotipos hipodiploides, la traslocación t(4;14) y la delección del gen P53 se

Revista

**bi**análisis

asocian con mal pronóstico. Por el contrario, los cariotipos normales, hiperdiploides, y los que presentan la  $t(11;14)(q13;q32)$  tienen mejor pronóstico.

Dra. Mariana Castellanos

Mariana@marthi.com

Doctoranda del Programa de doctorado: Biología y Clínica del Cáncer. Universidad de Salamanca. España.