

PROGRAMA EDUCACIONAL

Coordinadores: J. Román. Córdoba
J. Corral. Murcia

Introducción

J. ROMÁN Y J. CORRAL

XLVIII REUNIÓN NACIONAL AEHH
XXII CONGRESO NACIONAL SETH

El programa educacional de este año supone un cambio radical sobre las propuestas de otros años. Se trata de una apuesta osada y arriesgada. En lugar de realizar una puesta al día generalizada y dispersa de diferentes campos de la hematología, que en muchos casos se había convertido en mini-simposia generales, este año se opta por realizar un programa educacional monográfico, siguiendo modelos americanos. La finalidad de esta opción es conseguir una visión sencilla pero global de un aspecto concreto de interés para nuestra especialidad. El tema elegido para este año ha sido básicamente técnico: definir los fundamentos, las limitaciones y la aplicabilidad en hematología de las técnicas de genética, biología molecular, genómica, proteómica y transmisión de señales. Nuestra especialidad es sin duda una de las especialidades médicas en la que el laboratorio tiene mayor trascendencia. Además, es de las especialidades con mayor carga investigadora y en la que la iniciativa e inquietud por la investigación es más notoria. Estas dos características han hecho que la hematología no sea una especialidad estancada sino en constante evolución, que incorpora rápidamente a la práctica clínica los avances científicos y tecnológicos para un mejor diagnóstico, pronóstico e incluso terapéutico del paciente. Es sin duda una de las especialidades con mayor posibilidad de investigación multidisciplinar y translacional. El ejemplo claro de la interconexión entre hematología, investigación básica y desarrollo tecnológico es la citometría de flujo, desde los primeros estudios publicados en revistas especializadas, hasta su implantación en hospitales de carácter intermedio sólo han pasado unos pocos años, y ya todos los hematólogos y profesionales de su entorno conocen al menos básicamente los fundamentos de la misma.

El avance científico en el área de la genómica y proteómica es increíble y se sustenta en el exponencial desarrollo tecnológico. Se ha completado el estudio del genoma humano y ya se está terminando la caracterización de los polimorfismos responsables de la variabilidad genética. Se dispone de mapas proteicos extraordinariamente definidos, y se pretende completar en pocos años el proteoma humano. Hay un desarrollo de la bioinformática que permite el análisis de millones de datos simultáneos, y redes informáticas que permiten acceder y compartir cantidades de información desconocidas hasta la fecha. Sin duda todos estos avances tienen que ir integrándose en la

práctica diaria de la medicina en general y la hematología en particular, para su beneficio. Sin embargo, existe una importante deficiencia en la formación y conocimiento de estos relevantes temas, como ya ha puesto de manifiesto el Dr. Francis Collins, *Director of the National Human Genome Research Institute* y responsable junto a Craig Venter de la consecución del Proyecto del Genoma Humano: *"The explosion of information about the new genetics will create a huge problem in health education. Most physicians in practice have had not a single hour of education in genetics and are going to be severely challenged to pick up this new technology and run with it."*

El principal objetivo de este programa educacional es al menos conceder 8 h de formación en estos temas a los profesionales del campo de la hematología. Creemos que en el siglo XXI, en la era posgenómica, los especialistas en hematología deben estar familiarizados cuando menos con estos métodos, ya que son y serán herramientas cruciales en su trabajo. Este conocimiento también es imprescindible para poder entender la bibliografía de nuestra especialidad. Evaluando los trabajos publicados en el número de junio de 2006 de tres revistas de nuestra especialidad como son *Blood*, *Journal of Thrombosis and Haemostasis* y por supuesto, la revista de nuestra Sociedad: *Haematologica*, casi el 50 % de los trabajos emplean métodos genéticos o proteómicos y el 27 % usan modelos animales o celulares.

Los ponentes seleccionados son expertos en los temas que cada uno tratará, lo que en principio podría asustar en un programa educacional. Sin embargo, todos han hecho el esfuerzo de preparar unas presentaciones sencillas y didácticas en las que resumir la trascendencia de su tema con las aplicaciones que puede tener en hematología. Esperamos que su esfuerzo redunde en hacer que los miembros de nuestra Sociedad y los profesionales que acuden a este programa educacional consigan una visión global de herramientas moleculares que ya hoy son necesarias para el quehacer asistencial diario en muchos hospitales.

Cuando en 1953 James D. Watson y Francis Crick propusieron su modelo en doble hélice para la estructura del ADN en una pequeña carta al director en la revista *Nature*, nadie podría haber predicho el enorme impacto que este hallazgo tendría en el estudio de las enfermedades humanas. Para comenzar este programa educacional, el Dr. Fernández-Luna nos hará

un repaso histórico de los principales descubrimientos de la biología molecular y cómo los mismos han permitido un extraordinario avance en nuestra comprensión sobre los procesos biológicos normales y sobre los mecanismos moleculares básicos subyacentes en un importante número de enfermedades.

Desde el descubrimiento de la genética se han buscado genes y alteraciones en esos genes que pudieran estar asociados con enfermedades. Sin embargo, la localización e identificación de componentes genéticos implicados en patologías humanas o en fenotipos directa o indirectamente asociados a las mismas es un proceso complejo, especialmente para enfermedades complejas, y existen diferentes formas de abordarse. El Dr. Soria, es un experto genetista con un contrastado prestigio internacional que trabaja directamente en este campo. En su sesión el Dr. Soria nos hace un excelente resumen de los métodos, estrategias, diseños y herramientas tanto técnicas como informáticas y estadísticas que se emplean en la actualidad para identificar factores genéticos implicados en patologías humanas, con la perspectiva de su propia experiencia profesional y con una gran capacidad docente.

Los análisis citogenéticos y de FISH de las hemopatías malignas han mostrado un importante número de anomalías cromosómicas que han conducido al descubrimiento de genes con papeles clave en el proceso de leucemogénesis. Como nos expone el Dr. Solé en su ponencia, estas alteraciones se asocian con características clínicas específicas y son esenciales como marcadores diagnósticos y pronósticos que permiten al clínico seleccionar la mejor terapia.

La mayoría de enfermedades humanas, y la propia heterogeneidad genética de la especie humana, se deben a mutaciones puntuales, a cambios de un simple nucleótido. El Dr. Tizzano es un experto genetista que trabaja desde hace años en la identificación de alteraciones genéticas en patologías humanas. En su comunicación realiza un espléndido resumen de los tipos de mutaciones, sus implicaciones patológicas, así como de los métodos disponibles para su detección. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se ha convertido en uno de los más importantes instrumentos en el diagnóstico molecular gracias a su enorme sensibilidad y especificidad para la detección de secuencias específicas del ADN/ARN. La monitorización en "tiempo real" ha simplificado y acelerado los procedimientos de laboratorio de la PCR y ha incrementado la información obtenida de las muestras incluyendo la cuantificación de ácidos nucleicos en la práctica clínica de rutina. El Dr. Jiménez nos hablará sobre los usos de esta técnica especialmente en la toma de decisiones clínicas mediante la monitorización de la enfermedad mínima residual en hemopatías malignas.

El reciente desarrollo de la tecnología de *microarrays*, que permite el análisis simultáneo de los niveles de expresión de miles de genes, ha acelerado de forma significativa nuestros conocimientos sobre las bases moleculares de las leucemias. La Dra. Gutiérrez mostrará cómo esta metodología es capaz de reconocer nuevos subgrupos moleculares de leucemias y ha per-

mitido establecer mecanismos de sensibilidad y resistencia a la quimioterapia, generando nuevas herramientas pronósticas e identificando dianas moleculares para el tratamiento selectivo.

Con la caracterización del genoma humano se pensaba que tendríamos abiertas las puertas para la caracterización de todas las alteraciones moleculares asociadas con enfermedades. Sin duda es un avance significativo, pero incompleto. La genómica es sin duda una potencialidad, pero la molécula que realmente es responsable tanto del funcionamiento normal como patológico no es el gen, sino la proteína codificada por éste. En la era posgenómica el avance y desarrollo de la proteómica es absolutamente imprescindible para completar la caracterización completa de la base molecular de enfermedades. El Dr. Corrales es responsable del Servicio de Proteómica del CIMA de Navarra y nos muestra en su comunicación las enormes posibilidades, y también las dificultades y limitaciones actuales de la proteómica en biomedicina con ejemplos concretos de su propio grupo. En su presentación sin duda podremos conocer de forma sencilla y clara la metodología proteómica que se emplea en la actualidad.

El cáncer no sólo es una enfermedad genética, sino también, epigenética. La principal modificación epigenética es la metilación del ADN. Las células tumorales sufren un dramático cambio en los patrones de metilación de su ADN. Los promotores génicos se hipermetilan provocando el silencio en su expresión y esto se ve acompañado de una hipometilación genómica global. El Dr. Esteller mostrará cómo el perfil de metilación en las hemopatías malignas constituye una firma epigenética única para cada tipo de leucemia con importantes repercusiones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas.

Aunque las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores conducen a la transformación celular, muchos tumores no serían clínicamente relevantes si no fueran acompañados de una neoformación de vasos sanguíneos que sustenten su crecimiento. La Dra. López-Pedraza revisará los factores que contribuyen a la aparición de este fenotipo angiogénico y su posible empleo como diana molecular para el tratamiento de las neoplasias.

La mayoría de las técnicas que se están revisando en este programa educacional se emplean no sólo para identificar marcadores que puedan ser útiles en el diagnóstico, pronóstico o como veremos después en el tratamiento, sino también poder conocer más sobre la propia enfermedad hematológica. Sin embargo, para este último objetivo, son imprescindibles los modelos animales. El Dr. García de Frutos es un brillante científico español que ha generado diferentes modelos animales. En este programa educacional nos presenta de forma clara y concisa las posibilidades tecnológicas de manipulación genética en animales para poder estudiar enfermedades hematológicas en las dos áreas más relevantes: el cáncer hematológico y las enfermedades de la hemostasia

El Dr. Prosper nos mostrará cómo a pesar de los progresos realizados en la última década en el tratamien-

to de las hemopatías malignas, muchos pacientes presentan todavía un pronóstico desfavorable. Sin embargo, el conocimiento de la biología tumoral ha abierto la posibilidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas “inteligentes” que inhiben las principales vías moleculares de transformación celular y de esta forma eliminan células tumorales de una forma selectiva.

El programa educacional termina cerrando el círculo. La variabilidad interindividual al tratamiento también tiene su base molecular. La farmacogenética pretende identificar las variaciones genéticas asociadas con los requerimientos, eficacia y efectos secundarios adversos a tratamientos farmacológicos, y su fin es poder definir una terapia individualizada y eficaz. La Dra. González-Conejero lleva años trabajando en el campo

de la farmacogenética de tratamientos comunes como la terapia anticoagulante, antiplaquetaria y fibrinolítica. En este programa educacional resume de forma brillante las posibilidades y futuro de esta nueva disciplina y muestra ejemplos claros de la utilidad de la farmacogenética en patologías hematológicas y hemostáticas.

Como coordinadores del programa educacional, y tras revisar las ponencias, estamos seguros que tanto las presentaciones como las ponencias publicadas serán un éxito y primera herramienta para aquel que quiera introducirse sin traumas en la metodología molecular más avanzada que se aplica en nuestra especialidad.

PROF. J. ROMÁN (Córdoba) Y J. CORRAL (Murcia)
COORDINADOR DEL PROGRAMA EDUCACIONAL

Principios básicos de biología molecular: del almacenamiento de la información al desarrollo de la función

J.L. FERNÁNDEZ-LUNA

Jefe de la Unidad de Genética Molecular. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla.
Edificio Escuela Universitaria de Enfermería. Santander.

Revisión de los hechos históricos más destacables en biología molecular

En 1920, el premio Nobel H.J. Muller postulaba que el material genético, independientemente de su composición química, debía de tener tres propiedades fundamentales. Primero, tener capacidad de replicación. Segundo, codificar la información necesaria para producir los compuestos que determinan las características fenotípicas, y tercero, ser capaz de cambiar y de perpetuar esos cambios. Veinte años más tarde se demostró que el ADN estaba hecho de unidades individuales llamadas nucleótidos, que se formaban con una base nitrogenada (adenina –A–, guanina –G–, citosina –C– o timina –T–), un azúcar pentosa y ácido fosfórico. La naturaleza química del material genético intrigó a los científicos durante muchos años. Unos postulaban que los genes eran ADN y otros argumentaban que esa era una estructura demasiado simple para la función tan compleja que se asignaba a los genes. No fue hasta 1952 cuando se obtuvo una prueba definitiva por A. Hershey y M. Chase. Utilizaron un bacteriófago para demostrar que sólo el ADN de este virus era capaz de entrar en la bacteria y de producir nuevos virus, mientras que las proteínas formaban una estructura empaquetadora del ADN y eran eliminadas después de inyectar el ADN en las bacterias. Un año después, J. Watson y F. Crick descubrieron que el ADN consistía en dos largas cadenas de nucleótidos formando una doble hélice o espiral. Por ejemplo, el ADN del cromosoma 1 está constituido por una cadena de 263 millones de nucleótidos. El modelo de Watson y Crick predecía que cada cadena de ADN actuaba de molde para la producción de una nueva cadena, cuya secuencia de nucleótidos se determinaba por complementariedad de bases (A con T, y G con C). La clarificación de la función real de los genes se debió a las investigaciones con *Neurospora* de G. Beagle y E. Tatum, quienes recibirían el premio Nobel por este trabajo. Estos 2 investigadores desarrollaron un modelo que se conoce como la hipótesis “un gen-una enzima”, y es uno de los grandes conceptos unificadores en Biología, que se ha mantenido vigente durante muchos años.

En 1978, ya se había aprendido a determinar la secuencia de bases de un segmento de ADN. La secuencia de bases es la misma en todos los seres humanos

para el 99,9 % del ADN. Sin embargo, ocasionalmente se encontraban tramos cortos en los que la secuencia era distinta entre las personas. Los polimorfismos, como se llamaron a estas variaciones, podían ser de varios tipos. Ese mismo año, D. Botstein y R. Davis, formularon por primera vez la teoría de que había segmentos únicos de ADN esparcidos por todo el genoma que podían ser utilizados como marcadores para localizar genes. Este concepto de los polimorfismos se convirtió en la base para trazar el mapa del genoma humano.

Uno de los acontecimientos que revolucionó la biología molecular fue la invención de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) por K. Mullis en 1983 (recibió por ello el premio Nobel 10 años más tarde)¹. Esta metodología es capaz de amplificar un determinado fragmento de ADN millones de veces, lo que permite estudiar su secuencia con facilidad. Entre las múltiples aplicaciones de la PCR se encuentran el diagnóstico de enfermedades hereditarias, la detección de microorganismos patógenos o la identificación genética de muestras forenses.

A principios del siglo XVII, el astrónomo y físico italiano Galileo afirmaba en referencia al universo “La filosofía está escrita en ese gran libro, abierto a nuestros ojos. Pero el libro no puede ser entendido hasta que no se comprenda el lenguaje y se lean las letras en que se halla escrito. Lo está en el lenguaje de las matemáticas y sus letras son triángulos, círculos y otras figuras geométricas”. Cuatrocientos años después, el mismo razonamiento se ha aplicado al estudio del genoma humano. En un intento por descifrar la base genética de la vida, un grupo de científicos estadounidenses liderado por el premio Nobel J. Watson, inició en 1990 el Proyecto Genoma Humano, que pretendía determinar la secuencia completa del genoma (3.000 millones de bases) en un período de 15 años. Al poco tiempo, el proyecto adquirió una dimensión internacional sumándose otros países (Reino Unido, Francia, Canadá, Alemania y Japón) en apoyo de este monumental esfuerzo. En 2001, 4 años antes de lo previsto, debido fundamentalmente a los avances en las técnicas de secuenciación, se publicó el primer borrador de la secuencia del genoma^{2,3}. En abril de 2003, coincidiendo con el 50 aniversario del descubrimiento de la doble hélice, se presentó una nueva versión que incluía el 99 % de la secuencia del genoma que contiene los genes, con una fiabilidad del 99,99 %⁴. Los frag-

mentos que faltan por resolver, corresponden a regiones que no se pueden secuenciar con la tecnología actual. Del Proyecto Genoma Humano se han obtenido además otros datos de interés, como la existencia de unos 10 millones de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), de gran utilidad práctica en medicina, o la predicción de que el genoma contiene entre 20.000 y 25.000 genes, lejos de los 100.000 que se postulaban al inicio del proyecto. Además, en 1990 se conocían menos de 100 genes responsables de enfermedades, sin embargo durante el desarrollo del proyecto se han descubierto más de 1.400. Al anunciar estos resultados, el director del Proyecto Genoma Humano declaraba, “lo que hemos logrado no debe ser visto como un final sino como el punto de partida de una nueva era, la era de la genómica en medicina”.

variación genética sea considerada un SNP, ha de encontrarse al menos en el 1 % de la población. Las características más destacables de los SNP son:

1. Representan el 90 % de todas las variaciones genéticas.
2. Se encuentra un SNP cada 100-300 bases.
3. Dos de cada tres SNP son cambios de C por T.
4. Pueden darse tanto en regiones codificantes como no codificantes del genoma.
5. Son relativamente estables de generación en generación.

El médico inglés Sir William Osler escribió en 1892: “Si no fuera por la gran variabilidad entre individuos, la medicina sería una ciencia y no un arte”. Más de un siglo después, el análisis de SNP explica en buena medida esta variabilidad y proporciona la base para desarrollar tratamientos específicos para cada paciente. Muchos SNP no tienen efecto sobre las funciones celulares, pero otros predisponen a determinadas enfermedades o modifican la respuesta a agresiones ambientales, infecciones o fármacos (fig. 1). Esto hace que tengan gran valor tanto en investigación biomédica como en el desarrollo de productos farmacéuticos y métodos diagnósticos. Diversos grupos trabajan en la

Conceptos básicos de biología molecular necesarios en medicina

Polimorfismos de un nucleótido

Los SNP son variaciones en la secuencia de ADN que afectan a una sola base (A, T, G o C). Para que una

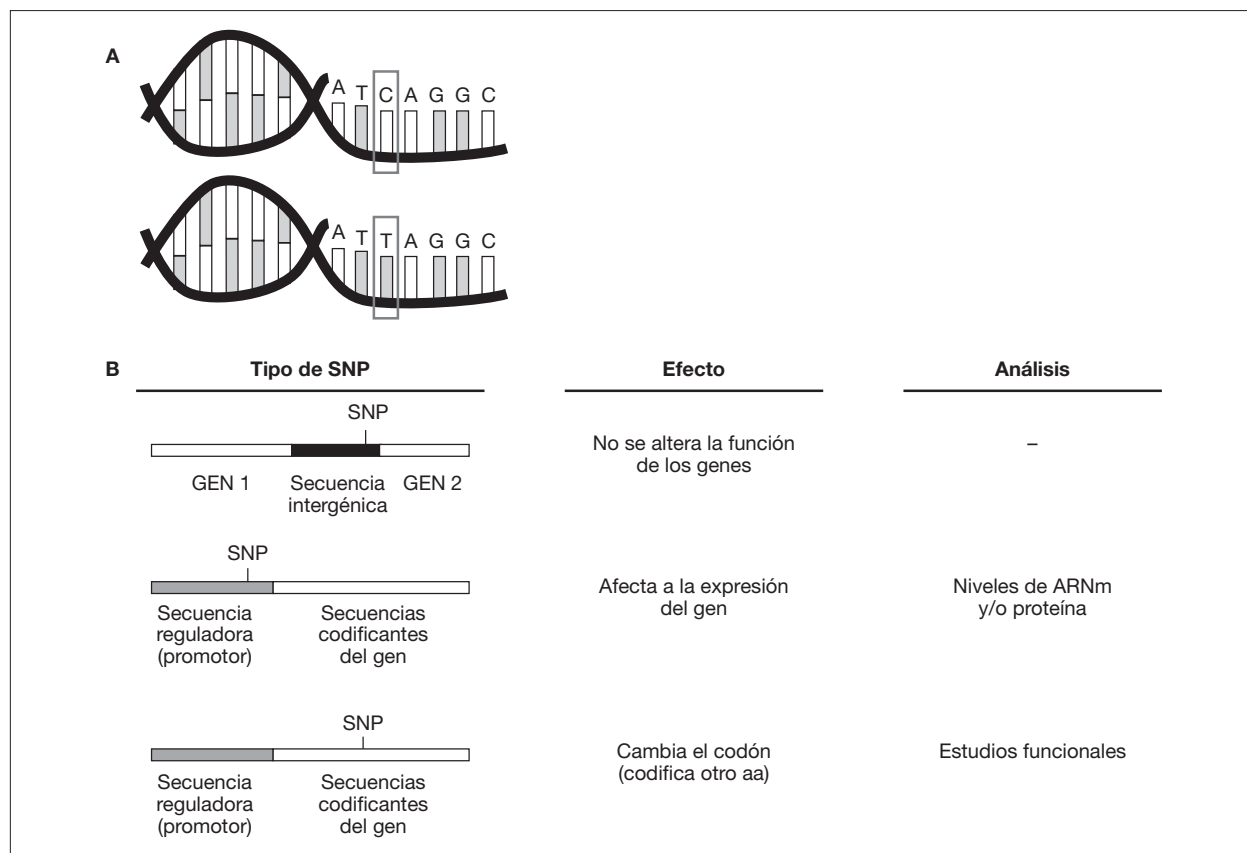


Figura 1. A) Los SNP son cambios de una sola base en el ADN. **B)** Esquema de los 3 tipos de SNP más representativos. En el primer caso el SNP se localiza en una región intragénica que no afecta a ninguno de los genes flanqueantes. En el segundo caso, el SNP cambia una base de la región promotora de un gen y altera su capacidad de transcripción, lo que resulta en mayores o menores concentraciones de ARNm y proteína. Finalmente, si el SNP se localiza en una región codificante, cambiará el codón. Este cambio puede dar lugar a un aminoácido que modifique la estructura de la proteína y altere su función.

creación de un mapa de SNP en el genoma humano (llamado mapa de haplotipos o HapMap), lo que puede ayudar en gran medida a identificar los múltiples genes asociados a enfermedades complejas como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiovasculares o la artritis reumatoide. Un haplotipo es un conjunto de SNP “vecinos” localizados en el mismo cromosoma y que son heredados en bloque, lo que permite identificar a uno de esos SNP (al que denominamos tag SNP) como representativo de un determinado haplotipo. De esta manera se reduce el número de SNP necesarios para examinar el genoma en busca de asociaciones con enfermedades o con susceptibilidad a factores ambientales o fármacos, de los 10 millones que existen a unos 500.000 tag SNP. Una vez identificado el haplotipo, se puede determinar qué SNP y qué gen están asociados a un determinado fenotipo.

Los SNP no causan enfermedades, pero pueden determinar la probabilidad de que alguien desarrolle una enfermedad. Uno de los genes asociados a la enfermedad de Alzheimer, la apolipoproteína E, es un buen ejemplo de ello⁵. Este gen tiene 2 SNP que dan lugar a tres posibles alelos (variantes de un gen): E2, E3 y E4. Cada alelo difiere en una sola base, y las proteínas resultantes difieren en un aminoácido, siendo este cambio suficiente para alterar la función de la proteína. Se ha demostrado que un individuo que hereda al menos un alelo E4 tendrá una mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad. Otro ejemplo lo encontramos en el gen que codifica el receptor P2X7. La activación de este receptor induce la apoptosis de linfocitos en pacientes con leucemia linfática crónica. Se ha descrito un SNP que produce una pérdida de función del receptor. La proteína modificada tiene un efecto antiapoptótico y conduce a un aumento del número de células B, pudiendo contribuir al desarrollo de la enfermedad⁶.

Los SNP también pueden condicionar la respuesta a los tratamientos. Este es el caso de los polimorfismos asociados al gen de la tiopurina S-metil-transferasa (TPMT) y su influencia en la respuesta a mercaptopurina y azatiopurina en pacientes que heredan los alelos no funcionales de la enzima⁷. Estos fármacos se utilizan como inmunosupresores y antitumorales, y en ausencia de TPMT se acumulan los nucleótidos de tioguanina en las células sanguíneas, lo que puede ocasionar una hematotoxicidad grave. Los pacientes portadores del polimorfismo inactivante de la enzima pueden ser tratados con éxito utilizando dosis menores de tiopurina.

Otro ejemplo de respuesta a fármacos es el del polimorfismo 677 C/T (en posición 677 puede haber una C o una T) encontrado en el gen que codifica la enzima metilén tetrahidrofolato reductasa (MTHFR). La tasa de respuesta a fluorouracilo en pacientes con cáncer colorrectal metastásico portadores del polimorfismo 677 TT (los dos alelos tienen una T en posición 677) es del 66 %, frente al 33 y 21 % en portadores de las variantes 677 CC y 677 CT, respectivamente⁸. Este análisis genético permite, por tanto, definir un grupo de pacientes con una menor respuesta a fluorouracilo

y podría ser utilizado para el diseño de tratamientos personalizados. En esta intersección de genómica y medicina se sitúa la farmacogenómica, cuyo objetivo es definir los determinantes genéticos de respuesta a los medicamentos.

Hoy día se utilizan diferentes técnicas para realizar análisis de un gran número de SNP. La espectrometría de masas, por ejemplo, tiene una capacidad de análisis de cientos de SNP en miles de muestras. Sin embargo, es más habitual, sobre todo en laboratorios asistenciales, el empleo de técnicas de PCR en tiempo real o de secuenciación, que analizan generalmente un solo SNP en múltiples muestras.

Expresión génica

Desde un punto de vista molecular, un gen es una secuencia específica de bases que sirve de molde para la síntesis de un ARN mensajero (ARNm). La secuencia de este ARNm es leída por una compleja maquinaria de “traducción” que asocia bloques de tres bases (codones) con aminoácidos mediante el denominado código genético (p. ej., GGA codifica una glicina, y GAC un ácido aspártico). La mayoría de los genes, en organismos superiores, están compuestos por un conjunto de regiones codificantes (exones) separadas por regiones no codificantes (intrones). Tras la síntesis de un ARNm, las secuencias que corresponden a intrones son eliminadas enzimáticamente y los exones se unen entre sí para formar un ARNm maduro y funcional. Este proceso, denominado “ARNm *splicing*” o procesamiento alternativo del ARNm, posibilita además el que un único gen sea capaz de generar diferentes proteínas, lo cual modifica la hipótesis “un gen-una enzima” de Tatum y Beagle y presenta un ingenioso mecanismo para producir muchas proteínas con pocos genes (fig. 2). Recordemos que las últimas estimaciones reducen a 23.000 el número de genes presentes en el genoma humano, pocos más que los de la planta *Arabidopsis thaliana* (20.000) o los del gusano *Caenorhabditis elegans* (19.099).

La actividad de cada célula se mantiene por la acción orquestada de miles de genes y sus productos (ARNm y proteínas). Sin embargo, los métodos tradicionales de biología molecular por lo general no tienen capacidad de analizar más de un gen a la vez, lo que dificulta los estudios funcionales y de interacción entre múltiples genes. En los últimos años, se ha desarrollado una nueva tecnología denominada biochip, genechip, chip de ADN o microarray de ADN, la cual permite analizar la expresión de todos los genes del genoma humano de forma simultánea. Un array es una disposición ordenada de muestras, en este caso fragmentos de ADN (sondas), colocadas sobre un soporte pequeño y rígido, generalmente un cristal del tamaño de un portaobjetos. Cada fragmento de ADN es complementario de un ARNm específico y proporciona un medio de identificar la expresión simultánea de miles de genes en células o tejidos. Los genechips están teniendo un gran impacto en farmacogenómica (correlación entre respuesta a fármacos y perfil genético del

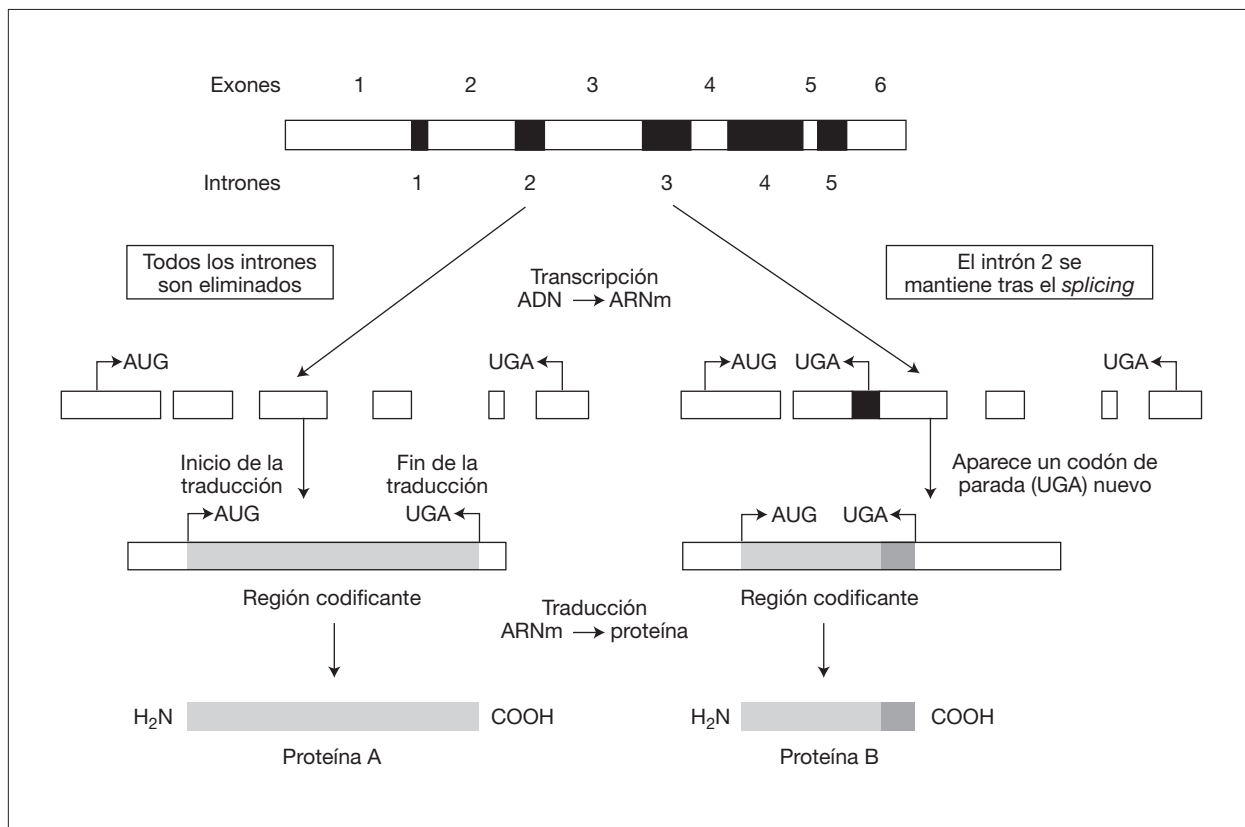


Figura 2. Ejemplo de la plasticidad del genoma humano. Se representa un gen con 6 exones y 5 intrones. Durante la transcripción se pueden dar 2 variantes de *splicing*: En una se eliminan todos los intrones y los 6 exones se unen entre sí. En la otra variante, el intrón 2 permanece y se genera un nuevo codón de terminación (UGA). Las 2 variantes codifican 2 proteínas de distinto tamaño, con la misma región NH₂ (amino) terminal pero con distinta región COOH (carboxilo) terminal. Estas 2 proteínas pueden tener incluso funciones antagónicas.

paciente), y en estudios toxicológicos (correlación entre la respuesta a productos tóxicos y los cambios en los niveles de expresión génica). A nivel todavía experimental, se están definiendo patrones de expresión génica asociados con enfermedades. En los últimos años se han analizado los perfiles de expresión de miles de muestras obtenidas de pacientes con distintas patologías, especialmente cáncer, y cientos de patrones de expresión génica o “firmas genéticas” se han asociado con la progresión de la enfermedad, el pronóstico y la respuesta al tratamiento. Uno de los primeros y más comentados trabajos fue el de un grupo del Instituto Holandés del Cáncer⁹, que publicó en 2002 un perfil de expresión de 70 genes en muestras de tejido tumoral que predecía la evolución de los pacientes con cáncer de mama. De esta manera, se definió un grupo de pacientes con “firma” genética de buen pronóstico (supervivencia a 10 años del 94,5 %) y otro con “firma” genética de mal pronóstico (supervivencia a 10 años del 50,6 %).

Entre otros muchos ejemplos, resumimos dos. El primero, describe diferentes patrones de expresión indicativos de diferentes estadios de desarrollo de los linfocitos T en la leucemia linfoblástica aguda de células T¹⁰. Estos patrones se asocian con rutas oncogénicas, e identifican la activación del oncogén *HOX11L2* como una nueva ruta de transformación tumoral de

las células T. Este hallazgo tiene relevancia clínica ya que *HOX11L2* confiere una peor respuesta al tratamiento en estos pacientes. Más recientemente, se ha descrito un grupo de pacientes con leucemia mieloide aguda que presenta un patrón de expresión génica asociado a una mala respuesta al tratamiento¹¹. Hay que tener en cuenta que la tecnología de los biochips requiere de un equipamiento caro y de un procesamiento bioinformático complejo. A esto se añade la dificultad de interpretar los datos de miles de genes en una misma muestra. Pese a ello, esta tecnología está sirviendo para definir grupos (varias decenas) de genes, asociados con alguna característica clínica. El análisis de un número reducido de genes permite el uso de plataformas más sencillas (p. ej., PCR en tiempo real) y al alcance de la mayoría de laboratorios asistenciales.

Conclusiones

El genoma humano es un código escrito con cuatro letras A, T, C y G que contiene toda la información necesaria para generar y mantener la vida de un organismo. Este código o libro genético tiene unos 25.000 párrafos (aproximadamente el 5 % de su contenido) de

especial relevancia (genes) porque son los encargados de generar todas las proteínas. Una vez descrita la secuencia del genoma humano, la investigación genómica incluye los siguientes objetivos:

1. Identificar los genes asociados con enfermedades comunes, como la diabetes o las enfermedades cardiovasculares.
2. Desarrollar nuevos métodos para la detección precoz de enfermedades.
3. Desarrollar nuevas tecnologías que permitan secuenciar el genoma de una persona en poco tiempo y con bajo coste.
4. Generalizar el acceso a la tecnología genómica para facilitar su incorporación a la clínica.

El objetivo final del Proyecto Genoma Humano es desarrollar nuevas estrategias para tratar, curar o prevenir las enfermedades. Sin embargo, el camino por recorrer desde la identificación de un gen hasta el desarrollo de un tratamiento efectivo es largo y lleno de dificultades. Mientras tanto, las compañías biotecnológicas están ya comercializando ensayos diagnósticos para detectar alteraciones en la expresión o en la secuencia de los genes en gente con sospecha de padecer alguna enfermedad o con riesgo de desarrollarla. En los próximos años veremos nuevas e interesantes aportaciones de la genómica a la biomedicina, pero tendremos que ir afianzando cada paso que damos y no dejarnos llevar por el entusiasmo de las expectativas generadas a raíz del descubrimiento de la secuencia completa del genoma humano; sin duda, uno de los logros más destacables de la historia de la ciencia.

Bibliografía

1. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985;230:1350-4.
2. Consortium IHGS. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.
3. Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, et al. The sequence of the human genome. *Science*. 2001;291:1304-51.
4. Consortium IHGS. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*. 2004;431:931-45.
5. Poirier J, Davignon J, Bouthillier D, Kogan S, Bertrand P, Gauthier S. Apolipoprotein E polymorphism and Alzheimer's disease. *Lancet*. 1993;342:697-9.
6. Wiley JS, Dao-Ung LP, Gu BJ, Sluyter R, Shemon AN, Li C, et al. A loss-of-function polymorphic mutation in the cytolytic P2X7 receptor gene and chronic lymphocytic leukaemia: a molecular study. *Lancet*. 2002;359:1114-9.
7. Evans WE, Hon YY, Bomgaars L, Coutre S, Holdsworth M, Janco R, et al. Preponderance of Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency and Heterozygosity Among Patients Intolerant to Mercaptopurine or Azathioprine. *J Clin Oncol*. 2001;19:2293-301.
8. Jakobsen A, Nielsen JN, Gyldenkerne N, Lindeberg J. Thymidylate synthase and methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism in normal tissue as predictors of fluorouracil sensitivity. *J Clin Oncol*. 2005;23:1365-9.
9. Van de Vijver MJ, He YD, Van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347:1999-2009.
10. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1:75-87.
11. Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, Erpelinck CA, Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani S, Boer JM, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1617-28.

Estrategias para identificar la base genética de enfermedades

J.M. SORIA

Unidad de Hemostasia y Trombosis. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

Introducción

La localización e identificación de componentes genéticos implicados en patologías humanas o en fenotipos directa o indirectamente asociados a las mismas es uno de los objetivos fundamentales de la genética y constituye una de las prioridades esenciales para el futuro inmediato del sector biomédico. Desde hace varias décadas hemos asistido por un lado al desarrollo teórico de múltiples estrategias estadísticas con esta finalidad, como el análisis de ligamiento y los estudios de asociación, y por otra parte a la mejora significativa de técnicas de laboratorio como las de secuenciación y genotipación, todos ellos avances que han supuesto progresos significativos en la búsqueda de genes responsables de enfermedades. De este modo, la deseable posibilidad de una medicina preventiva y personalizada basada en la genética podría ser una realidad al alcance de nuestra mano. El presente artículo pretende facilitar la comprensión de esta temática mediante una revisión de la complejidad del problema y de los pasos críticos necesarios para su correcta evaluación.

Identificación de factores genéticos implicados en patologías humanas

El estudio y la caracterización de las bases genéticas de las enfermedades hereditarias ha constituido el principal objetivo de la investigación en genética humana en los últimos 15 años¹. Durante estos años, los esfuerzos se han centrado en la identificación de los genes relacionados con las enfermedades de herencia mendeliana con más de 1.500 genes identificados (tabla 1: Web OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Man. database*).

Sin embargo, la inmensa mayoría de enfermedades comunes no siguen modelos de herencia monogénica mendeliana simple regulada por un gen único, sino que son el resultado de la interacción de múltiples genes entre sí y con factores ambientales². Son las enfermedades multifactoriales o complejas, como por ejemplo la cardiopatía isquémica, hipertensión, obesidad, alcoholismo, enfermedades mentales, diabetes, cáncer o la susceptibilidad a padecer procesos trom-

bóticos. Estas enfermedades afectan a un alto porcentaje del total de la población adulta.

En medicina es habitual entender la enfermedad como una variable discreta, dicotómica, con dos posibles estados: individuos sanos frente a individuos enfermos. Sin embargo la genética de enfermedades complejas permite interpretar la predisposición o susceptibilidad de cada individuo a padecer una enfermedad como una variable continua de riesgo. Esta variable es un fenotipo complejo, no observable ni mensurable directamente, pero deducible mediante modelos matemáticos³. El conjunto de genes responsables y todas sus interacciones determinan la susceptibilidad genética a la enfermedad para cada individuo⁴. Aquellos sujetos que sobrepasan un determinado umbral de este gradiente, manifiestan clínicamente la enfermedad. En otras palabras, lo que está regulado genéticamente no es la enfermedad en sí misma sino la mayor o menor predisposición a padecerla.

Es relevante comprender el salto en complejidad que significa pasar del estudio de las enfermedades mendelianas (monogénicas) al de las enfermedades comunes (complejas). Mientras los secretos de las primeras han podido ser desvelados a lo largo de las dos últimas décadas con un éxito remarcable, las segundas están ofreciendo una resistencia muy superior y constituyen el desafío central de la biomedicina para los próximos años.

Sin embargo, la consecución del Proyecto Genoma Humano⁵ abre nuevas perspectivas en el estudio de las enfermedades humanas⁶. Un primer resultado lo

Tabla 1. Recursos bioinformáticos disponibles en internet

Ensembl browser	http://www.ensembl.org
NCBI Entrez	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gquery/gquery.fcgi
UCSC browser	http://genome.ucsc.edu
OMIM	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM
ExpASY	http://us.expasy.org
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP
HapMap	http://www.hapmap.org/index.html.en
EMBOSS	http://emboss.sourceforge.net/what
mVISTA	http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml

constituye el conocimiento de la secuencia de nucleótidos de nuestro genoma. Pero no menos importante es el conocimiento de las variaciones que de esta secuencia presentan los diferentes individuos de la especie humana. Son estas diferencias las que definen nuestra identidad y, en último término, las responsables de que un individuo de la población tenga mayor o menor susceptibilidad a sufrir una determinada enfermedad⁷. El estudio y la caracterización de la variabilidad genética humana es, por tanto, el camino que nos ha de conducir al conocimiento más en profundidad de las bases genéticas de enfermedades comunes, y determinar su contribución a padecer estas enfermedades en múltiples ambientes⁸.

¿Qué hemos aprendido hasta la fecha? Que la inmensa mayoría de las patologías humanas tienen, al menos en parte, una base genética. En qué medida, sin embargo, es una cuestión variable. Es decir, la influencia de los genes es distinta según la enfermedad. La proporción de variabilidad de un rasgo o una enfermedad atribuible a componentes genéticos recibe el nombre de *heredabilidad* y es un concepto muy relevante en epidemiología genética, porque siendo relativamente fácil de calcular proporciona sentido científico a la búsqueda de genes.

Contrariamente a lo que ocurre en el caso de los rasgos mendelianos, cuya variación se explica por mutaciones en un solo gen, hay una inmensa cantidad de rasgos que están influenciados por *múltiples genes*. Esta diferencia es crítica. Por tanto, el valor de un fenotipo dependerá del contenido informativo en diversas zonas del genoma, cada una de ellas aportando una contribución (posiblemente pequeña) al resultado final. En el caso de las enfermedades complejas, cada uno de estos genes por sí solo puede no ser suficiente para desencadenar el problema, pero contribuye en cierto grado al incremento de riesgo. Por eso se les llama *genes de susceptibilidad*.

La enfermedad es, así, un *fenotipo complejo*: depende del estado de muchos otros fenotipos (que llamamos *fenotipos intermediarios*) y éstos, a su vez, pueden depender de la información residente en múltiples genes distintos, interaccionando entre ellos y con el ambiente^{9,10}. En la mayoría de procesos biológicos la actuación del conjunto de factores ambientales tiene un gran impacto. Además, su espectro y procedencia son ampliamente variables. Este panorama dibuja un escenario extraordinariamente complejo, donde la identificación de los factores genéticos supone una tarea difícil y complicada^{11,12}.

La importancia del diseño de los estudios

La búsqueda de factores genéticos que o bien determinan o bien alteran el riesgo de padecer una enfermedad es compleja, y puede abordarse de formas distintas (fig. 1). Esa diferencias pueden ser de matiz pero también pueden implicar aproximaciones conceptuales casi opuestas, con sus consecuencias correspondientes. Por ejemplo, y en primer lugar, el muestreo

puede realizarse escogiendo sujetos emparentados (familias) o sujetos no relacionados. Los marcadores genéticos utilizados pueden ser microsatélites (de alto poder informativo) o polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) (menos informativos, pero mucho más abundantes en el genoma). La estrategia estadística puede centrarse en el análisis de ligamiento o basarse en estudios de asociación. Finalmente, la aproximación metodológica puede incidir en una región concreta partiendo de un postulado apriorístico (selección de un gen candidato) o barrer todo el genoma dejando al margen cualquier preconcepción (análisis global del genoma). Por sí solas estas cuatro disyuntivas (familias o no, SNP o microsatélites, gen candidato o análisis global, ligamiento o asociación) dan lugar a una buena cantidad de combinaciones posibles¹³. La decisión adecuada para cada dicotomía depende del tipo de enfermedad que se analice, del tipo de estudio, de las innovaciones técnicas (que amplían posibilidades y abaratan costes a un ritmo muy intenso) y de los avances teóricos (que se producen también a gran velocidad). Toda esta problemática se enmarca dentro de lo que llamamos el *diseño del estudio*, que exige una cuidadosa atención y que tiene un impacto crítico en el resultado final¹⁴.

Pero en el corazón del proceso de búsqueda de factores genéticos se encuentra la estadística, porque en esencia la metodología consiste en comparar fenotipos con genotipos para detectar *correlaciones*.

El papel de la estadística: análisis de ligamiento y estudios de asociación

Hasta la fecha el esfuerzo por relacionar susceptibilidad a enfermedades comunes con factores genéticos ha contado esencialmente con dos técnicas estadísticas: el análisis de ligamiento y el estudio de asociación.

El *análisis de ligamiento* basa su estrategia en un fenómeno característico de la transmisión del material hereditario entre padres e hijos: la *recombinación genética*^{13,15}. Cada ser humano posee dos copias completas del genoma heredadas de cada uno de sus padres y por tanto con información diferente en cada una de ellas. En realidad no transmite ninguna de las dos copias entera, sino una recombinación de ambas. Esta recombinación se produce mediante la mezcla de segmentos de cada una de las copias. La mezcla es muy aleatoria, pero sabemos con certeza que se produce por bloques de gran tamaño (de millones de nucleótidos de longitud). Como consecuencia, si escogemos dos ubicaciones genómicas relativamente cercanas, lo más probable es que pertenezcan a un único bloque y, por tanto, viajarán habitualmente juntas (se dice por ello que están *ligadas*): contendrán o bien la información de una de las copias o bien la de la otra, pero no una combinación de las dos. El análisis de ligamiento aprovecha esta propiedad del mecanismo hereditario (la recombinación y el fenómeno de ligamiento) como estrategia para realizar inferencias^{13,15}.

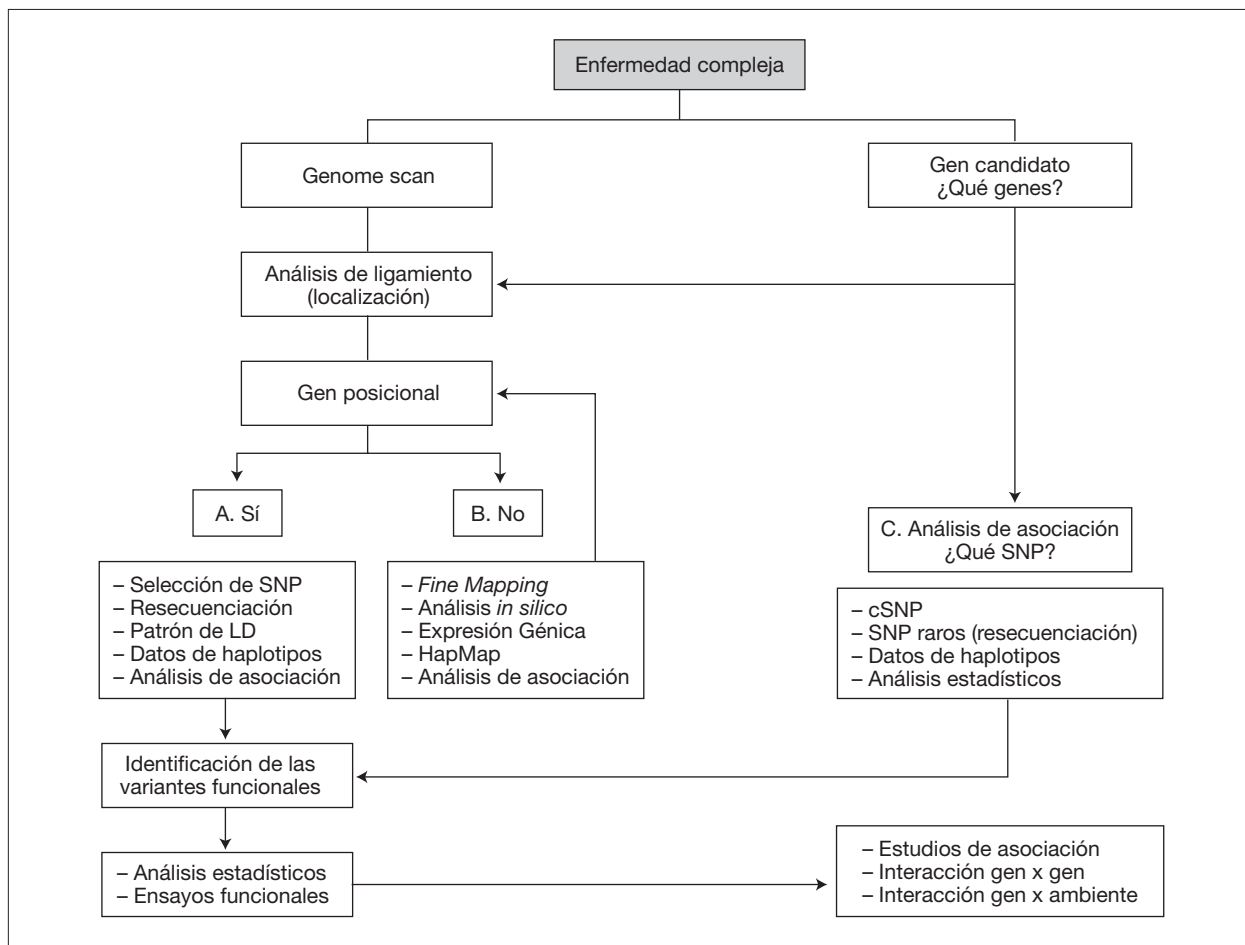


Figura 1. Esquema de los diseños, estrategias y metodología utilizados en el análisis genético de enfermedades complejas. Existen dos aproximaciones, Genome Scan y Gen Candidato, para llegar a la localización de un gen (apartados A y C del esquema). La situación más compleja es cuando no disponemos de gen candidato en la región cromosómica bajo estudio (apartado B del esquema). Los diferentes acercamientos al problema de identificar genes implicados en enfermedades complejas culminan con la identificación de las variantes funcionales de los genes bajo estudio.

La idea tras el análisis de ligamiento es comparar patrones de variación entre fenotipos y genotipos en un lugar concreto del genoma. El procedimiento habitual consiste en estudiar un conjunto de marcadores genéticos regularmente espaciados a lo largo de todo el genoma de modo que lo cubran por entero (análisis global del genoma)¹⁶. Cada uno de ellos representa una zona genómica contigua y señalizada. Cuando tenemos evidencia estadística para sospechar de una zona relacionada con la variación de un rasgo fenotípico continuo decimos que hemos encontrado un *loci* de rasgos cuantitativos (QTL). Un QTL es una región de tamaño indefinido que puede abarcar varios millones de nucleótidos. Aunque todavía impreciso, es una información muy valiosa porque supone un gran avance en el camino hacia la identificación de un gen y sus variantes alélicas¹⁷.

La otra técnica estadística, el *estudio de asociación*, es ampliamente utilizada en epidemiología clásica^{13,15}. El planteamiento consiste en comparar los valores de un determinado factor de riesgo entre dos grupos de sujetos, generalmente personas afectadas de un trastorno (casos) y personas sanas (controles). En epidemiología

genética el uso más extendido consiste en escoger marcadores tipo SNP (o variación de un nucleótido) y comparar sus frecuencias alélicas entre casos y controles. Si se observa una diferencia significativa entre los dos grupos puede inferirse una asociación entre la patología (o rasgo estudiado) y el marcador en cuestión. Hay dos grandes limitaciones que obligan a la prudencia siempre que se observa una asociación mediante este procedimiento^{18,19}. Por un lado existe el problema de la *estratificación* de las poblaciones: si los individuos escogidos en los grupos caso y control no pertenecen a una población homogénea, la diferencia de frecuencias alélicas obtenida puede deberse a una razón no relacionada en absoluto con el rasgo que estamos estudiando. Decimos entonces que estamos ante una asociación espúrea. Por otra parte, sucede que las variantes alélicas de los SNP no se encuentran repartidas de forma aleatoria o independiente entre la población. En lugar de esto, se observa un fenómeno muy importante de asociación entre SNP, de modo que el contenido de uno de ellos puede aportar información sobre el contenido de otro que se halle en sus proximidades. Este es el fruto de la historia genética de

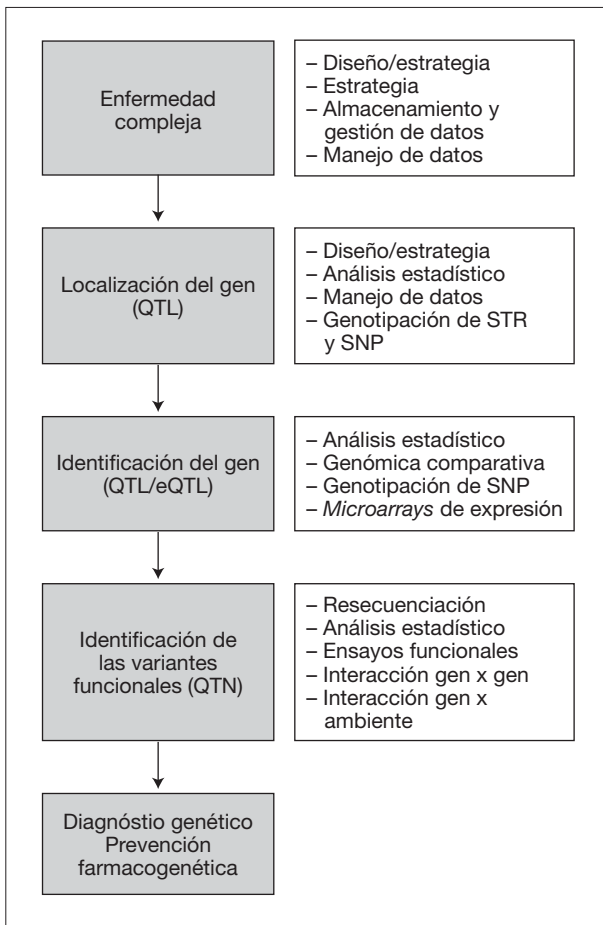


Figura 2. Diagrama con las diferentes etapas en la identificación de factores genéticos implicados en enfermedades complejas: del análisis genético de una enfermedad específica a la aplicación clínica de los resultados. A la derecha del diagrama se enumeran las diferentes estrategias y recursos para abordar cada una de las diferentes etapas descritas en el diagrama.

las poblaciones humanas: los cromosomas que observamos en la actualidad son mosaicos generados como resultado de procesos de recombinación meiótica a lo largo de las generaciones pasadas. Las variantes no se transmiten independientemente, sino en bloques. Esta asociación o relación observada entre diferentes SNP cercanos físicamente recibe el nombre de desequilibrio de ligamiento (*linkage disequilibrium* o LD).

Así pues, observar una asociación entre un rasgo fenotípico y un SNP puede deberse a tres causas distintas: que exista una asociación real entre ellos (es el resultado que perseguimos), que la asociación sea espúrea debido a un problema de estratificación poblacional (falso positivo), o que la verdadera asociación del rasgo no sea con el SNP analizado sino con otro que esté en LD con él.

A pesar de ello, una asociación exitosa puede ser de gran valor porque el LD no se extiende en general más allá de unas pocas decenas de kilobases. Es decir, aunque el SNP estudiado no sea el responsable real de la asociación, probablemente lo sea uno en las inmediaciones, a una distancia realmente pequeña a escala genómica. Esta resolución es muy superior a la que pro-

porciona el análisis de ligamiento, limitado como hemos visto a un tipo de localización que se mide por megabases (millones de nucleótidos).

Un análisis de ligamiento o un estudio de asociación proporcionan indicios de naturaleza estadística, y aunque la discusión respecto de los méritos relativos de ambos enfoques se ha planteado con frecuencia en términos de competición, la realidad es que estamos ante métodos muy complementarios^{18,20}. Los análisis de ligamiento son probablemente más eficientes para la localización inicial y sobre todo para descartar zonas con rigor (algo imposible con los estudios de asociación). Los estudios de asociación son útiles en el esfuerzo posterior de acotar las regiones con mayor precisión.

El papel de la bioinformática

A partir del diseño y la estrategia estadística adecuada (familias o no, SNP o microsatélites, gen candidato o análisis global, ligamiento o asociación) la búsqueda de variantes genéticas implicadas en enfermedades complejas se aborda por fases sucesivas de aproximación: desde la localización o acotación de la zona cromosómica, pasando por la identificación del gen o genes responsables, o la selección de genes candidatos, hasta la confirmación de funcionalidad de las variantes específicas (fig. 2). Todas estas tareas requieren de una combinación de recursos estadísticos, computacionales y de laboratorio, y cuyo éxito depende de multitud de factores.

Así, por ejemplo, imaginemos que un análisis de ligamiento ha conseguido acotar una región genómica que comprende unas 10 Mb (10 millones de bases nucleotídicas) donde, sospechamos, se halla una variante de nuestro interés. O, dependiendo del diseño y la estrategia estadística utilizada, tenemos un gen candidato donde identificar variantes alélicas implicadas en la variabilidad de un rasgo complejo o directamente en el riesgo a padecer una enfermedad. Sólo unos pocos años atrás nuestra investigación podía quedar en suspenso en estos puntos. Hoy en día, estas son algunas de las preguntas que podemos formular con cierta (creciente) esperanza de respuesta: ¿cuántos genes se encuentran en la zona?, ¿qué estructura tienen?, ¿de cuántos conocemos sus productos proteicos?, ¿cuáles son esos productos?, ¿qué dominios o familias proteicas comprenden?, ¿se ha encontrado alguna relación entre la patología y algún gen homólogo en alguna especie modelo como el ratón o la rata?, ¿cuántos están implicados en determinada ruta metabólica?, si ya tenemos gen candidato ¿cuántos SNP tiene y de cuántos tenemos información funcional?, ¿dónde se expresa este gen? Es aquí, en buscar la respuesta a estas preguntas, donde la ciencia computacional, y en concreto el ámbito bioinformático, están aportando soluciones novedosas e imaginativas.

La bioinformática desempeña un papel fundamental en la identificación de genes implicados en enfermedades complejas. En primer lugar, en relación a la in-

formación biológica, que aumenta a un ritmo exponencial, sin precedentes en la historia de la ciencia, de modo que las bases de datos actuales ya son de un tamaño formidable²¹. Las previsiones para el futuro inmediato son de un crecimiento sostenido. Almacenar, gestionar, hacer disponible, comprensible, comparable, etc., todo ese volumen de datos entraña una dificultad muy considerable. En definitiva, la bioinformática posibilita el intrincado conjunto de procesos destinados a transformar toda esa información en conocimiento²².

Un ejemplo relevante de estos esfuerzos es el llamado sistema de anotación distribuida (DAS, *distributed annotation system*: <http://biodas.org/>) diseñado específicamente con el ambicioso objetivo de que toda la información pueda encontrarse de forma centralizada en una sola ubicación en internet pero que al mismo tiempo provenga de múltiples orígenes (los centros productores especializados en cada tipo de información), sin restricciones. Estas herramientas presentan ya un alto nivel de sofisticación pero siguen avanzando a gran velocidad en su esfuerzo por facilitar la integración de contenidos y la disponibilidad de los mismos, permitiendo utilizar técnicas de *data mining* (minería de datos) con el objetivo de proponer genes candidatos en la búsqueda de factores genéticos implicados en enfermedades complejas^{23,24}. Esta estrategia es tanto más viable y efectiva cuanto mayor es la información disponible y, sobre todo, cuanto más sofisticada es la capacidad informática para relacionarla de forma eficiente. Gracias a la bioinformática este conocimiento, generado en centenares de centros por todo el mundo, está cada día más disponible para el investigador (tabla 1).

Modelos animales

Durante el proceso de identificación de factores genéticos, o al final de él, siempre nos quedará la caracterización de la funcionalidad de las variantes alélicas identificadas o, incluso más importante, la funcionalidad de las proteínas que codifican y su implicación en la enfermedad bajo estudio.

Es en este contexto donde la capacidad de generar cepas de animales manipuladas genéticamente ha tenido un enorme impacto en biomedicina⁸ y hoy día un número cada vez mayor de proyectos están utilizando esta estrategia experimental en el estudio de la patogenia de las enfermedades complejas²⁵.

Los modelos animales constituyen una interesante alternativa de estudio, ya que cepas de animales genéticamente manipulados, particularmente ratones transgénicos (que sobreexpresan) y *knock-out* (que no expresan) para un gen de interés han contribuido enormemente en la identificación, el análisis de la secuencia temporal y de la interrelación de los diferentes fenómenos patogénicos derivados de la función anormal de genes que llevan al desarrollo de un fenotipo equivalente a la enfermedad humana. El impacto de la utilización de estos modelos experimentales anima-

les se ha manifestado en el estudio de enfermedades multifactoriales con base genética compleja como aterosclerosis, cáncer, obesidad, diabetes mellitus, o hipertensión arterial, entre otras^{26,27}.

Discusión

Independientemente del gran número de dificultades que presenta el desciframiento de las bases genéticas de las enfermedades complejas, la determinación de causalidad entre variantes génicas y enfermedad es de enorme importancia debido fundamentalmente a su potencial aplicación clínica en la prevención, predicción y tratamiento de la mayoría de las enfermedades comunes²⁸. Sin embargo el mayor beneficio a corto plazo será, probablemente, un mejor entendimiento de la patogénesis de las enfermedades, lo cual puede conducir a nuevos y mejores tratamientos y al diseño más eficiente y personalizado de farmacoterapias.

Ya hemos explicado que a lo largo del siglo XX se consolidaron los conceptos de que la mayoría de las enfermedades, si no todas, tienen un componente genético considerable. Durante este mismo período el desarrollo de la farmacogenética y farmacogenómica ha puesto de manifiesto que la respuesta de los pacientes al tratamiento de las enfermedades esta igualmente influenciado por factores genéticos, ilustrando otro aspecto de la *individualidad* de los individuos.

Con estas premisas (predisposición y tratamiento dependen de la constitución genética) no cabe duda de que la identificación de los genes responsables de enfermedades y la caracterización funcional de las proteínas que codifican tienen un extraordinario impacto en medicina^{8,28}. Por un lado, conocer los genes responsables de la predisposición a enfermedades permite, mediante el desarrollo de herramientas diagnósticas, identificar los individuos susceptibles antes de que se manifiesten los síntomas de la enfermedad, facilitando la aplicación de terapias preventivas. Por otro lado, la identificación del gen responsable de una enfermedad y la caracterización posterior de la función de la proteína que codifica permite establecer las bases moleculares de la patología, algo que suele ser desconocido para la mayoría de las enfermedades. El conocimiento de los procesos fisiológicos alterados que conducen al desarrollo de una determinada patología es a menudo imprescindible para la identificación de dianas susceptibles de intervención terapéutica y para el desarrollo de terapias que eliminen la patología o alivien sus síntomas.

El desarrollo de la Genómica, la Proteómica y la Bioinformática, de la mano del Proyecto Genoma Humano, como aproximaciones experimentales que contemplan el análisis del conjunto de los genes o de las proteínas, son buenos ejemplos de esta nueva aproximación global en el estudio de la Biomedicina. Sin embargo, aunque conocemos los genes responsables de muchas enfermedades, para un número importante ignoramos su función y los procesos fisiológicos que se ven alterados en su ausencia y este conoci-

miento es necesario para poder desarrollar tratamientos eficaces. Este es el auténtico reto del conjunto de las áreas de conocimiento que conforman la investigación biomédica actual.

Bibliografía

1. Risch NJ. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature*. 2000;405:847-56.
2. Hedrick PW. Quantitative traits and evolution. En: Hedrick PW, editor. *Genetics of populations*. 2nd ed. Sudbury: Jones and Bartlett Publishers; 2000. p. 445-500.
3. Duggirala R, Williams JT, Williams-Blangero S, Blangero J. A variance component approach to dichotomous trait linkage analysis using a threshold model. *Genet Epidemiol*. 1997;14:987-92.
4. Guttmacher AE, Collins FS. Genomic medicine-a primer. *N Engl J Med*. 2002;347:1512-20.
5. Human genome projects: work in progress. *Nature*. 2000;405:981.
6. Peltonen L, McKusick VA. Genomics and medicine. Dissecting human disease in the postgenomic era. *Science*. 2001;291:1224-9.
7. Zwick ME, Cutler DJ, Chakravarti A. Patterns of genetic variation in Mendelian and Complex traits. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2000;1:387-407.
8. Collins FS, Green ED, Guttmacher AE, Guyer MS. US National Human Genome Research Institute. A vision for the future of genomics research. *Nature*. 2003;422:835-47.
9. Cooper DN. Gene-environment interactions and the etiology of common complex disease. *Ann Intern Med*. 2003;139:437-40.
10. Kelada SN, Eaton DL, Wang SS, Rothman NR, Khoury MJ. The role of genetic polymorphisms in environmental health. *Environ Health Perspect*. 2003;111:1055-64.
11. Guo SW, Lange K. Genetic mapping of complex traits: promises, problems, and prospects. *Theor Popul Biol*. 2000;57:1-11.
12. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234:177-86.
13. Vink JM, Boomsma DL. Gene finding strategies. *Biol Psychol*. 2002;61:53-71.
14. Terwilliger JD, Goring HH. Gene mapping in the 20th and 21st centuries: statistical methods, data analysis, and experimental design. *Hum Biol*. 2000;72:63-132.
15. Risch N, Merikangas K. The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*. 1996;273:1516-7.
16. Blangero J. Localization and identification of human quantitative trait loci: king harvest has surely come. *Curr Opin Genet Dev*. 2004;14:233-40.
17. Soria JM, Fontcuberta J. New approaches and future prospects for evaluating genetic risk of thrombosis. *Haematologica*. 2005;90:1212-22.
18. Almasy L, MacCluer JW. Association studies of vascular phenotypes: how and why? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1055-7.
19. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A. Association studies of genetic polymorphisms and complex disease. *Lancet*. 2000;355:308-11.
20. Soria JM, Almasy L, Souto JC, Bacq D, Buil A, Faure A, et al. A quantitative trait locus in human factor XII gene jointly influence plasma factor XII levels and susceptibility to thrombotic disease. *Am J Hum Genet*. 2002;70:567-74.
21. Roos DS. Computational biology. Bioinformatics-trying to swim in a sea of data. *Science*. 2001;291:1260-1.
22. Buckingham S. Bioinformatics: data's future shock. *Nature*. 2004;428:774-7.
23. Debes JD, Urrutia R. Bioinformatics tools to understand human diseases. *Surgery*. 2004;135:579-85.
24. Frishman D, Kaps A, Mewes HW. Online genomics facilities in the new millennium. *Pharmacogenomics*. 2002;3:265-71.
25. Spradling A, Ganetsky B, Hieter P, Johnston M, Olson M, Orr-Weaver T, et al. New roles for model genetic organisms in understanding and treating human disease: report from the 2006 genetics society of america meeting. *Genetics*. 2006;172:2025-32.
26. Smith J. Quantitative trait locus mapping for atherosclerosis susceptibility. *Curr Opin Lipidol*. 2003;14:499-504.
27. Byrne FR, Viney JL. Mouse models of inflammatory bowel disease. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2006;9:207-17.
28. Holzman NA, Marteau TM. Will genetics revolutionize Medicine. *N Engl J Med*. 2000;343:141-4.

Utilidad práctica de la citogenética hematológica: presente y futuro

F. SOLÉ

Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular. Servicio de Patología. Hospital del Mar. Barcelona.

Utilidad de la citogenética en el estudio de las neoplasias hematológicas

En los últimos 30 años los análisis citogenéticos han ido adquiriendo mayor importancia en el estudio de las neoplasias, y sobre todo en el más concreto de las hemopatías malignas. Los avances registrados en este campo, entre los que destacan la calidad de las bandas cromosómicas, han permitido identificar subgrupos clínicos asociados a cambios cromosómicos específicos. Actualmente, cuando se quiere realizar el diagnóstico de una sospecha de neoplasia hematológica se debe coordinar la realización del estudio citológico, inmunológico y el citogenético. Se tiene que destacar que la interpretación de los resultados citogenéticos se deberá realizar teniendo en cuenta tanto la historia clínica del paciente, como los hallazgos de laboratorio. Por ello, es necesario una estrecha colaboración entre los citogenetistas y los hematólogos, colaboración que permitirá interpretar el significado y el valor del cambio cromosómico hallado en un paciente determinado. Hoy en día, el diagnóstico de una neoplasia hematológica, se debe realizar integrando la información que nos da la historia clínica con la citología, inmunología y la citogenética (diagnóstico integrado).

Es asimismo importante tener en cuenta el tipo de material que debe utilizarse para la realización de un estudio citogenético, que necesariamente corresponderá a las células implicadas en la enfermedad. Así, en el caso de las leucemias agudas, la valoración se debe realizar en la médula ósea, aunque exista infiltración en sangre periférica, ya que por motivos desconocidos el rendimiento en este tejido es más bajo. En los linfomas, hay que analizar los ganglios linfáticos o los tejidos también implicados; en la leucemia linfática crónica B (LLC-B) y en otras enfermedades, puede efectuarse en sangre periférica al hallarse en ella una gran proporción de células leucémicas. No obstante, en general, y a pesar de la invasión periférica, tanto para los síndromes mieloproliferativos crónicos como para síndromes mielodisplásicos y leucemias agudas se requiere el estudio de médula ósea para obtener la debida información citogenética. En aquellos casos en que debe descartarse que la alteración cromosómica hallada en médula ósea es constitucional, se requerirá asimismo un estudio de sangre periférica estimulada con fitohemaglutinina o de otro tejido no hematológico.

Por lo demás, los resultados citogenéticos además de ser importantes para la precisa caracterización de las neoplasias hematológicas, también aportan información de valor pronóstico. Así, por ejemplo, existen alteraciones que implican un pronóstico favorable, tales como la $t(8;21)(q22;q22)$ en la leucemia aguda no linfoblástica (LANL) M2 o la $inv(16)(p13q22)$ en la LANL M4 con eosinofilia medular (M4Eo), mientras que la monosomía del cromosoma 7 (-7) o la detección de cariotipos complejos (cariotipo con más de tres alteraciones cromosómicas) se relacionan con un pronóstico desfavorable. En éstos y en otros casos concretos, son los cambios cromosómicos los que por sí solos tienen valor pronóstico.

Los recientes avances en el campo de la genética molecular constituyen un complemento importante para los citogenetistas, ya que enriquecen la información que aporta el estudio citogenético. Por otro lado, la caracterización y el mapado de los genes localizados en los puntos de rotura implicados en alteraciones cromosómicas, está permitiendo conocer el mecanismo por el cual se origina una neoplasia, y diseñar terapias más específicas en función del cambio genético.

Valor pronóstico de los hallazgos citogenéticos

Seguidamente se detallan los cambios cromosómicos que tienen un valor pronóstico, por orden de importancia:

Cambio cromosómico primario. Se acepta que es el que está relacionado con el proceso de transformación maligna y está estrechamente asociado a mecanismos moleculares, los cuales serían los responsables de la neoplasia. Este cambio es detectable por citogenética convencional, y también por hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cambio cromosómico secundario. Cuando ocurren cambios cromosómicos secundarios, la enfermedad sigue un curso más agresivo, haciéndose más resistente a la terapia y siendo más difícil obtener una remisión completa o de larga duración. Estos cambios cromosómicos sólo son detectables por citogenética convencional ya que es la técnica que permite analizar todos los cromosomas; por ello siempre es recomendable en

Tabla 1. Ventajas y limitaciones de la técnica de citogenética convencional y de hibridación *in situ*

Técnica	Ventajas	Limitaciones
Citogenética convencional	Aporta información de todos los cromosomas Bajo coste económico (5 euros)	Requiere células en división del clon neoplásico Interpretación dificultosa en caso de obtener cromosomas de mala calidad Permite el análisis de pocas células Baja sensibilidad
Hibridación <i>in situ</i>	Aplicable tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase Permite el análisis de un mayor número de células Mayor sensibilidad	Aporta información concreta dependiendo del tipo de sonda utilizada Alto coste económico (30-50 euros)

el momento del diagnóstico aplicar la citogenética convencional.

Cuando existen alteraciones secundarias el valor pronóstico parece estar relacionado con el número de anomalías. Por ello, la presencia de muchos cambios cromosómicos (MAKA, *major karyotypic abnormalities*) conlleva peor pronóstico que la presencia de pocos cambios (MIKA, *minor karyotypic abnormalities*).

Presencia o ausencia de células citogenéticamente normales en médula ósea. Generalmente, los pacientes que sólo presentan células con un cariotipo anormal (AA) tienen un peor pronóstico que los que tienen células normales (AN o NN).

Presencia de dobles diminutos (DMS, double minutes) o de regiones de tinción uniforme (HSR, homogeneously staining regions). La presencia en las células neoplásicas con DMS o HSR se asocia a un mal pronóstico. Los DMS y las HSR están relacionados con una amplificación génica, y ésta confiere una mayor resistencia a la terapia.

Cambios cromosómicos numéricos (sin anomalías estructurales). Algunas leucemias (particularmente la leucemia linfoblástica aguda) están relacionadas con una alteración cromosómica numérica. Cuando estas anomalías representan el único cambio cromosómico, probablemente tienen el mismo valor pronóstico que los cambios primarios, tales como translocaciones, deleciones, inserciones o inversiones.

Técnicas de estudio de los cambios genéticos

Citogenética convencional

La citogenética convencional se basa en la visualización de los cromosomas (fase de metafase) para la obtención de un cariotipo (ordenación de los cromosomas). Para su realización es necesario un cultivo celular y obtener células en división. La principal limitación en citogenética hematológica es obtener metafases de las células neoplásicas y otra limitación es que alteraciones genéticas más pequeñas de 10 Mb no se pueden detectar. Por otro lado, su principal ventaja es que permite estudiar todos los cromosomas con un único experimento (tabla 1).

Hibridación *in situ* (CISH, FISH)

La técnica de hibridación *in situ* (HIS) permite detectar y localizar secuencias específicas de ácidos nucleicos (ADN o ARN) sobre preparaciones cromosómicas, extensiones celulares, cortes de tejido y cortes ultrafinos utilizados para el estudio al microscopio electrónico. La utilización de las técnicas de HIS ha aumentado en los últimos años como complemento de las técnicas de citogenética convencional. La ventaja de la citogenética convencional radica en la visualización de todos los cromosomas, pero presenta varias limitaciones: es necesario que existan células en división y en ocasiones se pueden valorar pocas metafases (< 20). Por otra parte, los cromosomas pueden presentar unas bandas cromosómicas poco definidas siendo imposible determinar el cariotipo. En este caso, no será factible la detección de alteraciones cromosómicas que afecten a regiones genéticas muy pequeñas. Para complementar las técnicas citogenéticas convencionales, actualmente disponemos de las técnicas de HIS (tablas 1-4).

Hibridación *in situ* (HIS) "convencional"

La HIS "convencional" de aplicación más generalizada en el estudio de las neoplasias hematológicas, se basa en la utilización de tres tipos principales de sondas: sondas centroméricas, sondas de pintado cromosómico y sondas de secuencia única o también llamadas de *locus* específico. La HIS con el uso de fluorocromos se denomina FISH, mientras que si el marcaje es cromogénico se denomina CISH.

Las sondas *centroméricas* están formadas por una secuencia repetitiva de ADN que hibrida con el ADN de la región centromérica del cromosoma. Éstas permiten detectar alteraciones cromosómicas numéricas tanto sobre metafases como sobre núcleos en interfase (citogenética interfásica). Mediante esta técnica se puede valorar la presencia o ausencia de alteraciones numéricas (monosomías o trisomías) sin la necesidad de tener células en división.

Las *sondas de pintado cromosómico* están formadas por una batería de sondas que en su conjunto hibridan con todo el cromosoma. Dichas sondas permiten vi-

Tabla 2. Sondas de HIS “convencional” utilizadas en el estudio de neoplasias hematológicas

Tipo de patología		Sondas centroméricas	Sondas de secuencia única
LANL	M1		t(9;22) BCR/ABL
	M2		t(8;21) AML/ETO
	M3		t(15;17) PML/RARA
	M4eo		16p13/inv(16) CBPB/MYH11
	M4/M5		11q23 MLL
SMD		- 5, - 7, + 8	5q31
SMPC	LMC		t(9;22) BCR/ABL
LLA	L1,L2	Hiperdiploidías	t(9;22) BCR/ABL 11q23 MLL t(12;21) TEL/AML MYC/IgH
	L3		
SLPC	LLC	+ 12	11q23 ATM
			13q14 D13S319, D13S25
			17p13 p53
	LM		t(11;14) IgH/BCL-1
	LF		t(14;18) IgH/BCL-2
	LB		t(8;14) IgH/c-MYC
	LEZM	+ 3	7q32; BCL6
LMN y LMALT	+ 3		
LACG		ALK (2p23)	
MM	+ 6, + 9, -13, + 17	14q32, 11q, 13q, 1q	

HIS: hibridación in situ; LANL: leucemia aguda no linfoblástica; SMD: síndrome mielodisplásico; SMPC: síndrome mieloproliferativo crónico; LMC: leucemia mieloide crónica; LLA: leucemia linfoblástica aguda; SLPC: síndrome linfoproliferativo crónico.

sualizar alteraciones citogenéticas numéricas y estructurales sobre metafases y confirmar de forma inequívoca cariotipos con translocaciones complejas o con cromosomas marcadores. El pintado cromosómico es de gran utilidad cuando los cromosomas son de mala calidad y la citogenética convencional, por sí sola, no puede resolver el cariotipo.

Las sondas de secuencia única o locus específico hibridan con el ADN de una región genómica concreta, correspondiente a un gen o a una banda cromosómica. Con ellas es posible detectar alteraciones numéricas y estructurales tanto en metafases como en núcleos interfásicos. Estas sondas son de gran utilidad para descartar alteraciones cromosómicas difíciles de identificar con las técnicas de bandeado convencionales. La principal ventaja de estas sondas es que pueden aportar información de células fijadas, por ejemplo, tejido parafinado.

Nuevas técnicas de FISH

Las técnicas de FISH multicolor-FISH (M-FISH), *spectral karyotyping* (SKY), *multibanding*-FISH (Rx-FISH) e hibridación genómica comparada (HGC) han surgido con la intención de resolver las carencias de la HIS “convencional” y aportar una mayor información en el conocimiento del cariotipo.

Las técnicas M-FISH o SKY se basan en la cohibridación de 24 sondas de pintado cromosómico marcadas con fluorescencia sobre metafases. El resultado de la hibridación permite visualizar simultáneamente cada par cromosómico de un color diferente. Estas técnicas

Tabla 3. Ventajas e inconvenientes de las técnicas de hibridación *in situ* “convencionales” y de las nuevas técnicas de hibridación *in situ*

	Ventajas	Inconvenientes
HIS centromérica	No requiere células en división	Sólo informa de alteraciones numéricas
HIS de locus específico	No requiere células en división	Sólo informa del locus que se estudia
HIS de pintado cromosómico	Muy útil para descifrar cariotipos complejos	Requiere células en división Sólo informa del cromosoma concreto que se analiza
Hibridación genómica comparada	Requiere una pequeña cantidad de ADN No requiere células en división Permite estudiar material archivado (congelado, en parafina) Permite detectar ganancias y pérdidas de ADN en todo el genoma	Sólo se detectan alteraciones citogenéticas que impliquen ganancias y pérdidas de ADN Requiere una infiltración tumoral mínima del 50 % No permite cuantificación de las ganancias o pérdidas No detecta ganancias de ADN menores de 4-5 Mb ni pérdidas de 10-20 Mb
Multicolor-FISH-SKY	Permite obtener información de todos los cromosomas Muy útil para descifrar cariotipos complejos	Requiere células en división No detecta alteraciones estructurales dentro de un mismo par cromosómico No detecta alteraciones estructurales de ADN menores de 10 Mb
Multibanding-FISH	Permite obtener información de todos los cromosomas Muy útil para descifrar cariotipos complejos Detecta alteraciones estructurales dentro de un mismo par cromosómico	Requiere células en división No detecta alteraciones estructurales de ADN menores de 10 Mb

HIS: hibridación in situ; FISH-SKY: hibridación in situ de fluorescencia-spectral karyotyping.

Tabla 4. Técnicas de FISH

Técnica	Resolución	Comentario
FISH <i>locus</i>		Sólo aporta información de la región de estudio
FISH centrómero		Sólo aporta información de la sonda que se utiliza
FISH pintado	10 Mb	Sólo aporta información de la sonda que se utiliza
SKY	10 Mb	Permite estudiar todos los cromosomas. Útil para detectar translocaciones entre cromosomas no homólogos. Requiere metafases
M-FISH	10 Mb	Permite estudiar todos los cromosomas. Útil para detectar translocaciones entre cromosomas no homólogos. Requiere metafases
Rx-FISH	10 Mb	Permite estudiar todos los cromosomas. Útil para detectar translocaciones entre cromosomas no homólogos, deleciones e inversiones. Requiere metafases
HGC	10 Mb	Permite estudiar todos los cromosomas. No detecta translocaciones o cambios equilibrados
Array-HGC	0,5-1 Mb	Permite estudiar todos los cromosomas. No detecta translocaciones o cambios equilibrados

FISH: hibridación in situ de fluorescencia; SKY: spectral karyotyping; M-FISH: multicolor-FISH; Rx-FISH: multibanding-FISH; HGC: hibridación genómica comparada.

son muy útiles para determinar de forma inequívoca cariotipos complejos y cromosomas no identificables con las técnicas de bandeado (cromosomas marcadores). Esta técnica presenta una limitación en aquellas patologías con un índice proliferativo bajo debido a la necesidad de obtener células en división. Así mismo, estas tecnologías no permiten el reconocimiento de algunos puntos de rotura como aquellos asociados con deleciones, inserciones, adiciones y translocaciones de pequeño tamaño (< 10 Mb), para los cuales es necesario utilizar sondas de *locus* específico.

En los últimos años se ha descrito la técnica de *multibanding-FISH* o *cross species color banding (Rx-FISH)*, técnica similar a las de M-FISH o SKY, que permite la generación de un patrón de bandas de distintos colores para cada cromosoma. Su principal ventaja es que permite detectar inversiones y translocaciones entre cromosomas homólogos, sin embargo, su principal limitación es que un mismo color puede estar en regiones de distintos cromosomas y esto dificulta poder conocer la región cromosómica que está implicada.

La HGC, también llamada CGH (del inglés, *comparative genomic hybridization*), es una técnica citogenética-molecular que permite detectar cambios numéricos de secuencias de ADN (pérdidas, deleciones, ganancias y amplificaciones) en un tejido tumoral. Dicha técnica se basa en la hibridación del ADN tumoral y de un ADN control marcados con fluorocromos de distinto color sobre metafases normales. La HGC tiene particular interés en el análisis de cambios numéricos de secuencias de ADN en tumores sólidos y en neoplasias hematológicas de índice proliferativo bajo ya que para la realización de la técnica no es necesaria la obtención de metafases. Así mismo, es de gran utilidad en aquellos casos que presentan cariotipos

complejos con numerosos cromosomas marcadores, dobles diminutos (DM) y regiones de tinción homogénea (HSR). Esta técnica únicamente detecta cambios presentes en una proporción elevada de células tumorales (50 %) y tiene una resolución de 10 Mb. Por otra parte, no permite detectar translocaciones, inversiones y otras alteraciones de tipo equilibrado que no comportan ganancias o pérdidas de material genético. Con el mismo fundamento que la HGC, recientemente ha surgido la técnica denominada array-CGH o matrix CGH, que en lugar de hibridar sobre portaobjetos con metafases, hibrida sobre matrices con BAC u oligos que pueden cubrir todo el genoma, permitiendo detectar cambios genéticos de 0,5 a 1 Mb.

Reacción en cadena de la polimerasa

La técnica de la PCR permite amplificar material genético a partir de una pequeña porción de tejido. Ésta representa su principal ventaja y a la vez representa su principal inconveniente, al poder dar una elevada frecuencia de falsos positivos.

Su principales ventajas son las de requerir poco tejido de estudio y de ser una técnica de fácil aplicación e interpretación. Entre las principales limitaciones está que sólo aporta información del reordenamiento que se quiere estudiar y que puede dar falsos positivos y falsos negativos.

Arrays de expresión

Recientemente, el desarrollo tecnológico junto con la mejora de las herramientas informáticas han permitido la creación de plataformas que realizan el análisis simultáneo de hasta 40.000 genes de una misma muestra. Esta tecnología recibe el nombre de microarrays, biochips o matrices. Se puede aplicar al estudio de los niveles de expresión de genes, analizando el ARN mensajero de la muestra.

Los microarrays se están aplicando a la práctica totalidad de las neoplasias hematológicas. Los resultados obtenidos hasta el momento han permitido establecer patrones de expresión génica relacionados con alteraciones moleculares y con el curso clínico. Se ha podido diferenciar patologías en función del patrón de expresión génico, así como establecer subgrupos dentro de una misma patología.

La información que están aportando los estudios con arrays de expresión probablemente permitirán mejorar el conocimiento de los mecanismos genéticos implicados en el desarrollo de muchas patologías hematológicas.

Conclusión

Los resultados citogenéticos son importantes porque no sólo son indispensables para el diagnóstico de una enfermedad neoplásica hematológica, sino también

Tabla 5. Recomendaciones metodológicas al diagnóstico

Enfermedad	Alteración	Técnica recomendada
LMC	t(9;22)(q34;q11)	Citogenética + FISH
SMPC		Citogenética
SMD	5q- -7/7q- + 8	Citogenética Citogenética Citogenética
LANL		
M2	t(8;21)(q22;q22)	Citogenética
M3	t(15;17)(q22;q21)	Citogenética/FISH/PCR
M4/M5	t(11q23)	Citogenética/FISH
M4	Inv(16)(p13q22)	Citogenética/FISH
LLA	t(9;22)(q34.1;q11.2) t(12;21)(p13;q11) MLL	Citogenética FISH FISH
	t(8;14)(q24;q32) Hiperdiploidía	Citogenética/FISH Citogenética/FISH
Mieloma	t(11;14)(q13;q32) t(14;16)(q32;q22) t(4;14)(p15;q32)	Citogenética + FISH FISH FISH
MGUS		No procede
Linfomas		
Folicular	t(14;18)(q32;q21)	Citogenética, FISH, PCR
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	Citogenética, FISH, PCR
Manto	t(11;14)(q13;q32)	Citogenética, FISH, PCR
LDCG	t(3;V)(q27;?)	Citogenética, FISH
LZME	del(7q) + 3q	Citogenética, FISH Citogenética, FISH
MALT	t(11;18)(q21;q21) t(14;18)(q32;q21)-Igh/MLT t(3;14)(p14;q32)-Igh/FOXP1	Citogenética, FISH, PCR Citogenética, FISH, PCR Citogenética, FISH, PCR

LMC: leucemia mieloide crónica; FISH: hibridación in situ de fluorescencia;
SMPC: síndrome mieloproliferativo crónico; SMD: síndrome mielodisplásico;
LANL: leucemia aguda no linfoblástica; PCR: reacción en cadena de la polimerasa;
LLA: leucemia linfoblástica aguda; MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance.

por su información de cara al valor pronóstico (tablas 5-7).

Aún existen muchas alteraciones cromosómicas que no se correlacionan con unas características clínicas determinadas. Por ello, se debe aplicar el estudio citogenético en todos los pacientes con sospecha de neoplasia hematológica y además es indispensable una completa historia clínica con el fin de determinar la correlación entre el cambio cromosómico y el curso de la enfermedad.

En los últimos años, la introducción de las técnicas de HIS, ha representado un complemento importante para las técnicas citogenéticas convencionales. En aquellos casos en los que el índice mitótico de la células leucémicas es bajo (p. ej., en la LLC-B), y se quiere descartar una alteración numérica (p. ej., la trisomía 12), mediante una sonda centromérica del cromosoma que se quiere estudiar, se puede determinar, sin tener que realizar un cultivo celular y sin la necesidad de tener células en metafase, las copias que existen de un determinado cromosomas mediante el recuento de las señales de hibridación en los núcleos. En otros casos, si la calidad de los cromosomas y de las bandas

Tabla 6. Recomendaciones metodológicas al seguimiento

Enfermedad	Alteración	Técnica
LMC	t(9;22)	PCR
SMD	5q- -7/7q- + 8	FISH FISH FISH
LANL		PCR
M2	t(8;21)(q22;q22)	PCR
M3	t(15;17)(q22;q21)	PCR
M4/M5	t(11q23)	FISH
M4	Inv(16)(p13q22)	PCR
LLA	t(9;22)(q34;q11) t(12;21)(p13;q11) MLL	PCR PCR FISH
	t(8;14)(q24;q32) Hiperdiploidía	FISH FISH
Mieloma	t(11;14)(q13;q32) t(14;16)(q32;q22) t(4;14)(p15;q32)	FISH FISH FISH
MGUS		Nada
Linfomas		
Folicular	t(14;18)(q32;q21)	PCR
Burkitt	t(8;14)(q24;q32)	PCR
Manto	t(11;14)(q13;q32)	PCR
LDCG	t(3;V)(q27;?)	FISH
LZME	del(7q)/+ 3q	FISH
MALT	t(11;18)(q21;q21) t(14;18)(q32;q21)-Igh/MLT	PCR PCR

*Se aplicará PCR siempre y cuando en el momento del diagnóstico la alteración citogenética se haya detectado por PCR. En el caso que la alteración no se haya detectado por PCR, se aplicará FISH o en caso de no existir sonda, se aplicará la citogenética convencional. En los linfomas se podrá realizar el seguimiento con el estudio de clonalidad (Igh o TCR).

LMC: leucemia mieloide crónica; PCR: reacción en cadena de la polimerasa;
SMD: síndrome mielodisplásico; FISH: hibridación in situ de fluorescencia;
LANL: leucemia aguda no linfoblástica; LLA: leucemia linfoblástica aguda;
MGUS: monoclonal gammopathy of undetermined significance.

Tabla 7. Técnica de estudio de los cambios genéticos en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas

Técnica	Sensibilidad	Comentarios	Utilidad
Citogenética	5-10 %	Permite estudiar todos los cromosomas	Diagnóstico
FISH	1 %	Aporta información de la región de estudio*	Diagnóstico
PCR	1,10 ⁶	Aporta información de la región de estudio	Seguimiento

*SKY, M-FISH y Rx-FISH aportan información de todos los cromosomas, pero requieren células en división (metafasas).
FISH: hibridación in situ de fluorescencia; PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

no es satisfactoria, se pueden aplicar sondas de secuencia única o un conjunto de sondas para el "pintado" de un cromosoma en concreto, y determinar la existencia de una alteración cromosómica que mediante la citogenética convencional no se puede asegurar.

Por otro lado, el desarrollo de técnicas moleculares ha introducido una nueva dimensión en el estudio y comprensión del papel de los cambios cromosómicos en la génesis del tumor, por lo que en un futuro próximo, los citogenetistas y los genetistas moleculares deberán trabajar coordinados para aportar una mayor información sobre el origen y desarrollo del cáncer. El conocimiento de las alteraciones genéticas está siendo de utilidad clínica para diseñar tratamientos dirigidos a compensar el cambio genético, por lo que en un presente o futuro inmediato se tendrán terapias específicas, más efectivas, y sin tantos efectos secundarios. Sin embargo, hoy en día a pesar de existir técnicas muy novedosas para la caracterización genética de las células tumorales, se debe seguir realizando la citogenética convencional porque permite conocer todos los cromosomas implicados en un solo experimento. A su vez, aún quedan muchas patologías por caracterizar y en las cuales la citogenética seguirá siendo clave para definir nuevos marcadores.

Bibliografía recomendada

- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-11.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Döhner K, Bentz M, Lichter P. Chromosome aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia: reassessment based on molecular cytogenetic analysis. *J Mol Med*. 1999;77:226-81.
- Ebert BL, Golub TR. Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood*. 2004;104:923-32.
- Ferrando AA, Thomas Look A. Gene expression profiling: will it complement or replace immunophenotyping? *Best Pract Res Clin Haematol*. 2003;16:645-52.
- Gabert J, Beillard E, Van der Velden VH, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of "real-time" quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. 2003;17:2318-57.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-7.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:1937-47.
- Sandberg AA. Chromosomes in human cancer and leukemia. Second and revised edition. North Holland, Elsevier, New York; 1990.
- Second MIC Cooperative Study Group. Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 1988;30:1-15.
- Shipp MA, Ross KN, Tamayo P, et al. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nature Medicine*. 2002;8:68-74.
- Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, Brendel C, Leo R, Daxberger H, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation (BSCT) using multiplex amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia*. 2001;15:293-302.

DetECCIÓN DE MUTACIONES IMPLICADAS EN PATOLOGÍAS HEMATOLÓGICAS

E. TIZZANO FERRARI

Servicio de Genética. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Introducción

El contexto de la mutación

El ADN está presente en el núcleo de todas las células. De esta forma, podemos determinar si un gen está o no mutado no ya en los tejidos donde cumple su función, sino en tejidos o células más accesibles como el ADN de leucocitos de sangre periférica. Durante muchos años se pensó que para que un gen no funcionara tendría que estar obligatoriamente mutado en su secuencia nucleotídica. Sin embargo, con las nuevas metodologías se ha constatado que la función de un gen depende de muchos factores y que la indemnidad de su secuencia no siempre va asociada con una función normal. Por el contrario, hay cambios o variantes en la secuencia que no están asociadas a patologías. Para la patología molecular, lo más importante no es la secuencia del gen en sí, sino el efecto que produce el alelo mutante. En general se piensa que las mutaciones se asocian a pérdida de función. Sin embargo, una proporción de mutaciones en determinados genes (sobre todo en cáncer) pueden ocasionar ganancia de función que resulta perjudicial. Se debe entonces jerarquizar la información clínica de cada paciente y establecer que cada mutación tiene un contexto específico para manifestarse en el paciente que dependerá de muchos factores ya sea determinantes (la naturaleza de la propia mutación) y modificadores del fenotipo (la influencia de otros genes)¹. En este capítulo se resumen los tipos y características de las mutaciones más comunes en la patología humana y las metodologías para detectarlas.

Mutaciones y polimorfismos: definición y nomenclatura

Las mutaciones o lesiones moleculares se definen como cualquier cambio permanente de la secuencia de ADN. Las mutaciones pueden ocurrir en cualquier célula ya sea de línea germinal (gaméticas) o somática, aunque sólo las que ocurren en la línea germinal se pueden transmitir de generación en generación. Un individuo en el que uno de los gametos que lo formaron llevara una determinada mutación, tendrá dicha

mutación en todas sus células (somáticas y germinales), podrá expresar el fenotipo y transmitirá la enfermedad a sucesivas generaciones. Las mutaciones conocidas pueden dividirse en, al menos, tres categorías: las grandes anomalías estructurales (deleciones, inserciones o reordenamientos), las anomalías sutiles en regiones críticas del gen (mutación de un solo nucleótido, deleción o inserción de algunos de ellos) y las mutaciones dinámicas, o inestabilidad de una determinada secuencia repetida de ADN (tabla 1). Estas últimas se conocen también como enfermedad de los tripletes dado que existen variaciones en el número de dichas secuencias (CAG, CGG, CTG, GAA, CCG) que se modifican al paso de sucesivas generaciones. Hasta la fecha este tipo de mutaciones se ha descrito únicamente en patologías neurológicas.

Las grandes anomalías estructurales de un gen son, técnicamente, sencillas de detectar mediante análisis molecular dado que se trata de identificar fragmentos anómalos o ausentes y también es relativamente fácil el interpretar su repercusión en la expresión patogénica: un gen no funciona porque no existe (deleción total) en el genoma, porque está parcialmente delecionado, porque está reordenado o porque un fragmento de ADN se ha insertado en una región codificante del mismo.

Las mutaciones que implican uno o muy pocos nucleótidos son una de las causas más comunes de alteraciones de la expresión génica y pueden afectar la

Tabla 1. Tipos de mutaciones

Grandes anomalías estructurales

Deleciones
Inversiones
Duplicaciones

Alteraciones puntuales

Deleciones o inserciones pequeñas (una o pocas bases)
Cambio de bases que afectan codones
– Sustitución de un aminoácido por otro
– Sustitución de un aminoácido por un codón stop
Cambio de bases en sitios donantes (GT) o aceptores (AG) o sitios críticos del intrón
– Proceso de formación ARN (*splicing*)

Dinámicas

Expansión de tripletes (CAGn, CTGn, CGGn, GAA_n, CCGn)

Tabla 2. Polimorfismos de ADN más comúnmente usados en el estudio del genoma humano

Tipo de polimorfismo	Característica	Informatividad	Frecuencia
RFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)	Variante de una base que afecta un sitio de restricción	Dos o tres alelos que se identifican al tratar con una enzima de restricción	Variable
VNTR (secuencia repetida en tándem un número variable de veces)	Secuencia repetida en tándem en un lugar del genoma	Multialélicos	Variable
Microsatélites o STR (<i>simple tandem repeat</i>)	Secuencia de di-tri o tetranucleótidos repetida en tándem en un lugar del genoma	Multialélicos	1 de cada 40.000 pares de bases
SNP (polimorfismos de un solo nucleótido)	Cuando en un sitio del genoma hay más de un nucleótido como variante	Generalmente dos alternativas	1 de cada 1.000 pares de bases (2/3 son transiciones C → T)

transcripción del gen a ARN, la maduración del mismo o la traducción del ARN mensajero (ARNm) a proteína. Existen mutaciones que cambian el sentido (un aminoácido por otro o *missense*) o sin sentido (un aminoácido por un codón de parada o *stop, nonsense*). Con respecto a la nomenclatura de las mutaciones, se pueden denominar de acuerdo al cambio en el ADN o en la proteína. En general se empieza con una letra, que corresponde al aminoácido en la posición establecida. Los 20 aminoácidos tienen una letra específica para diferenciarlos. La mutación C282Y en el gen *HFE* (*hemocromatosis*) representa un cambio de una guanina por una adenina (G > A) en la posición 846 de la secuencia nucleotídica del gen. El codón TGC (cisteína) cambia entonces a TAC (tirosina). Así, C282Y indica que la mutación puntual en el ADN ha cambiado el codón 282 que en esa posición codificaba para cisteína (C) siendo reemplazado por tirosina (Y). En las inserciones o deleciones de una o pocas bases, se altera el molde de lectura y aparecen codones *stop* y la mayoría de las veces no llega a producirse la proteína. En estas mutaciones, la nomenclatura empieza generalmente por un número, que indicará la posición del nucleótido (s) insertado o delecionado. Así, 3637delA se refiere a la deleción de una adenina en el nucleótido 3637 del gen del factor VIII. La modificación del molde de lectura hace predecir en la proteína que a partir del codón donde apareció la mutación (en este caso I1194) haya un codón *stop* (se representa con la letra X) 4 codones más allá. Las modificaciones actuales en estas nomenclaturas colocan una p minúscula cuando la mutación describe la proteína, una c cuando describe los nucleótidos codificantes (p. ej., c.3637delA o p.I1194fsX4) y una g cuando se refiere a nucleótidos que están en el intrón².

En el ADN humano, uno de cada pocos cientos de nucleótidos varía de un individuo a otro, sin que exista una expresión fenotípica de esta variación que se denomina polimorfismo. La variante debe estar presente en al menos una mínima parte de la población general. Un marcador genético será aquel polimorfismo que permita distinguir los diferentes alelos que ocupan un determinado *locus* en el genoma humano. Puesto que dichos polimorfismos son muy abundantes, cuando un gen responsable de una enfermedad se identifica y se caracteriza, se dispone de un buen

número de polimorfismos situados en el interior o en zonas adyacentes a dicho gen. A pesar de que las consecuencias moleculares del polimorfismo no parecen producir el mismo efecto que las mutaciones, una variante polimórfica en determinado gen puede asociarse con un determinado fenotipo o a una susceptibilidad aumentada con respecto a los que no lo tienen. Existen varias clases de polimorfismos como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), la secuencia repetida en tándem un número variable de veces (VNTR), microsatélites (repeticiones de 2, 3 o 4 nucleótidos en tándem) y los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). Las características principales de cada uno de ellos se indican en la tabla 2.

El hecho de caracterizar la mutación en un gen causante de alguna enfermedad puede aplicarse al paciente o a su familia para confirmar o descartar el diagnóstico y para identificar los portadores de la enfermedad a riesgo de transmitirla a su descendencia (diagnóstico genotípico). En otros casos, el descubrir ciertas mutaciones o polimorfismos en un gen o grupo de genes pueden indicar una susceptibilidad aumentada a padecer algún trastorno específico o al contrario, un factor de protección. Mas allá del diagnóstico genotípico, la caracterización del gen lleva a una ampliación del conocimiento fisiopatológico de la enfermedad y de las posibilidades terapéuticas.

Métodos utilizados para detectar mutaciones

Grandes rearrreglos o deleciones

La mayoría de estas alteraciones pueden ser detectadas mediante la técnica de Southern (transferir la electroforesis del ADN a un soporte sólido) o más recientemente con la amplificación selectiva de grandes fragmentos de ADN (*long range* PCR). Así, la inversión del intrón 22, que es la mutación mayoritaria en la hemofilia A puede ser identificada según el tamaño y el patrón de bandas que se observan por el método de Southern (14, 17,5 y 20 kb) o de *long range* PCR (10 y 12 kb)³.

Mutaciones puntuales

Búsqueda de una mutación conocida

La secuenciación del fragmento de ADN donde se encuentra situada la mutación es en la actualidad el método más utilizado, dado que la mayoría de los laboratorios de diagnóstico disponen de secuenciadores automáticos que reducen considerablemente el tiempo de trabajo. Inclusive la nueva metodología de microarrays (donde en una muestra de ADN puede obtenerse información de muchos genes en un solo experimento) incorpora la detección de mutaciones conocidas o la secuenciación de muchos fragmentos de ADN. Existen otros dos métodos en los que no es necesario disponer de una tecnología avanzada para la identificación de una mutación conocida:

Mediante alteración de un sitio de restricción. Si la mutación crea o destruye un sitio de restricción, puede ser detectada sometiendo el fragmento amplificado a la digestión de la enzima en cuestión. Una electroforesis sencilla en agarosa seguida de una coloración con bromuro de etidio, permite visualizar directamente la presencia (más de una banda) o ausencia de digestión (banda única).

Mediante hibridación específica (ASO/DOT-BLOT). Se utiliza una oligonucleótido de una veintena de nucleótidos, interna a la región comprendida entre los dos cebadores de amplificación, y cuya secuencia es específica del alelo buscado (ASO, *allele specific oligoprobe*). La hibridación se realiza después de inmovilización del ADN a estudiar sobre el filtro (método del *dot-blot*). El principal problema de este método es el de la especificidad: es necesario que las condiciones experimentales sean tales que tan sólo un despareamiento (o *mismatch*) sea suficiente para desestabilizar el híbrido, permitiendo la discriminación entre híbrido perfecto (señal positiva) e híbrido imperfecto (señal negativa).

En los últimos años, han hecho su expansión los aparatos que realizan la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real con fluorocromos que aumentan la señal y se pueden utilizar tanto para la detección de mutaciones conocidas como para la determinación de dosis génica (ver apartado).

Búsqueda de una mutación puntual desconocida

El problema en este caso consiste en buscar sistemáticamente una anomalía de secuencia en un segmento de ADN previamente amplificado por PCR. El análisis de la secuencia de ADN es evidentemente uno de los métodos más seguros, ya que, en principio, detectaría cualquier alteración en la secuencia. A pesar del tiempo que lleva y su coste, tiende a desarrollarse cada vez más conforme progresa su automatización y el descenso de su coste. Además de la secuenciación, se puede recurrir a otros métodos capaces de localizar el fragmento de ADN de un gen que contiene la mutación como la cromatografía líquida de alta resolución (DHPLC); electroforesis en gel con gradiente

de desnaturizante (DGGE); corte químico por apareamiento incorrecto (CCM), análisis de heterodúplex y el polimorfismo de conformación con cadena sencilla (SSCP)⁴. A pesar del análisis sistemático por secuenciación completa de los genes, en algunos se ha visto que no siempre aparece una mutación detectable. En estos casos es importante estudiar el ARNm (para detectar alteraciones en su tamaño y o cantidad) y la dosificación génica (duplicación de todo o una parte del gen).

Estudios de ARN

La extracción de ARN se hace generalmente también de los glóbulos blancos de sangre periférica. Un concepto importante es que el disponer de una muestra de ADN de un paciente no permite analizar su ARN. Debe hacerse una nueva extracción y procesar la muestra de manera diferente. También la conservación del ARN debe ser más cuidadosa puesto que se degrada muy fácilmente. Esto hace que el análisis del ARN no se realice de forma rutinaria. La primera alternativa a la secuenciación de todo el gen por el ADN es la secuenciación del ADNc, es decir del transcrito ARN tras una retrotranscripción a ADN gracias a la transcriptasa reversa. En este caso solamente estaremos analizando las regiones exónicas. Podremos determinar si un exón(es) está ausente o si hay secuencias distintas a las esperadas que sean de una zona intrónica. La medida del fragmento analizado también puede ser útil dado que una duplicación dará como resultado un aumento de tamaño. Finalmente la cuantificación del ARN o la determinación de su ausencia, pueden indicar una disminución o abolición de la función del gen. La ausencia de ARNm detectado en algunos genes cuya secuencia era normal⁵, ha dado lugar al concepto de genes no funcionantes ya sea por mutaciones en los promotores, por otros factores epigenéticos (metilación) o por causas todavía no bien establecidas.

Dosificación génica y PCR a tiempo real

Los sistemas de PCR convencional son categóricos a la hora de determinar la presencia de un alelo (cualitativo) pero mucho menos fiables para determinar las copias de ese alelo (cuantitativo). Los aparatos de PCR a tiempo real permiten determinar la cantidad de moléculas amplificadas en cada ciclo y no sólo al final de toda la reacción. De esta manera es posible distinguir el número de copias del ADN inicial y compararlo con una curva patrón u otros genes de la misma muestra. Entre los aparatos más conocidos de este tipo está el termociclador ultrarrápido LightCycler (Roche®)⁶ y la metodología Taqman (en aparatos ABI PRISM Applied Biosystems®)⁷. Existe un método reciente descrito en el año 2002 y patentado por MRC-Holland denominado MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) que permite la búsqueda de deleciones y duplicaciones así como la cuantificación de ADN, en

genes muy grandes⁸. Este método permite detectar los cambios del número de copias de secuencias de más de 45 nucleótidos en una sola reacción. Puede utilizarse tanto en ADN genómico como ARNm, y es capaz de analizar múltiples exones de un gen o exones de varios genes.

Conclusiones

Los genes responsables de una importante proporción de enfermedades hematológicas o involucrados en las mismas han sido clonados y caracterizados desde el punto de vista de su patología molecular. Las metodologías para la detección de mutaciones en ellos se van implementando cada vez más y secuenciar un gen o determinar su dosificación forma parte de la rutina de una gran parte de los laboratorios de diagnóstico. Desde la biología molecular clásica de un gen-un experimento hasta la nueva tendencia de analizar en un experimento miles de genes por microarrays, no se debe olvidar el contexto de la mutación dentro de la clínica del paciente. Un gen mutado produce una proteína anómala o ausente en las células donde su función es importante pero que a su vez es un contexto muy complejo que depende de una serie de factores extra e intracelulares que pueden modificar el efecto de dicha proteína y en consecuencia el desarrollo del fenotipo. Asimismo, la integridad estructural de un gen, no garantiza su función que puede verse afectada por factores epigenéticos muchas veces desconocidos.

Agradecimientos

Fundació Catalana d'Hemofilia.

Bibliografía

1. Tizzano EF, Cornet M, Doménech M, Baiget M. Modifier genes and haemophilia: their expansion in the human genome. *Haemophilia*. 2002;8:250-4.
2. Den Dunnen, Antonarakis S. Nomenclature for the description of sequence variations. *Hum Genet*. 2001;109:121-4.
3. Bagnall RD, Giannelli F, Green PM. Int22h-related inversions causing hemophilia A: a novel insight into their origin and a new more discriminant PCR test for their detection. *J Thromb Haemost*. 2006;4:591-8.
4. Grompe M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. *Nat Genetics*. 1993;5:111-6.
5. El-Maarri O, Singer H, Klein C, Watzka M, Herbiniaux U, Brackmann HH, et al. Lack of F8 mRNA: a novel mechanism leading to hemophilia A. *Blood*. 2006;107:2759-65.
6. Tizzano EF, Barceló MJ, Baena M, Cornet M, Venceslá A, Mateo J, et al. Rapid identification of female haemophilia A carriers with deletions in the F8 gene by quantitative Real-Time PCR analysis. *Thromb Haemost*. 2005;94:661-4.
7. Perea G, Lasa A, Aventin A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia*. 2006;20:87-94.
8. Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*. 2002;30:e57.

PCR en tiempo real, una nueva herramienta para la toma de decisiones clínicas

A. JIMÉNEZ VELASCO¹, J. ROMÁN GÓMEZ², X. AGIRRE³, M. BARRIOS¹, G. NAVARRO¹, E. SAN JOSÉ ENÉRIZ³, L. CORDEU³, L. GÁRATE³, J.A. CASTILLEJO², F. PROSPER³, A. TORRES² Y A.I. HEINIGER¹

¹Servicio de Hematología. Hospital Universitario Carlos Haya. Málaga. ²Servicio de Hematología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ³Servicio de Hematología. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona.

Introducción

Desde el descubrimiento por Mullis et al¹ de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en 1983 hasta nuestros días, probablemente ninguna técnica de laboratorio haya evolucionado tanto en tan poco tiempo, ni haya aportado tanta información al conocimiento científico. Sus aplicaciones han ido desde la secuenciación del genoma, la identificación de nuevos genes y polimorfismos, hasta el análisis cuantitativo de expresión y el conocimiento de anomalías cromosómicas estructurales y epigenéticas²⁻⁴.

Su aplicación en hematología ha estado principalmente centrada en el estudio de translocaciones o reordenamientos cromosómicos y en el análisis de mutaciones. En sus inicios el estudio de un gen de fusión mediante PCR era meramente cualitativo, tan sólo podíamos hablar de la presencia o ausencia del mismo. A finales de 1980 y principios de 1990 surgen las primeras tentativas para cuantificar la expresión o cantidad de ARN-ADN presente en una muestra mediante los estudios de PCR competitiva⁵⁻⁷. Pero es realmente con el desarrollo de la técnica de PCR en tiempo real (PCRtr) a finales de 1990 y principios del nuevo siglo, cuando la cuantificación de la expresión alcanza su verdadera importancia en la práctica clínica, intentando establecer nuevos factores que influyan en la génesis y pronóstico de la patología hematológica y principalmente en el seguimiento mediante los estudios de enfermedad mínima residual (EMR)^{8,9}. Sin embargo, las aplicaciones de la PCRtr no se limitan sólo a la cuantificación de la expresión de genes, también es posible el estudio de mutaciones o polimorfismos de un solo nucleótido mediante el análisis de temperaturas de fusión, el estudio de deleciones o pérdidas de heterociguidad, el estudio del estado de metilación de los genes, etc.¹⁰⁻¹².

Aspectos técnicos de la PCRtr: plataformas, química y métodos de cuantificación

El fundamento de la PCR convencional y de la PCRtr es idéntico, la amplificación de un material genético (ADN o ARN) que se encuentra en poca cantidad mediante un termociclador y ciclos consecutivos de des-

naturalización del ADN, hibridación de cebadores con el gen diana y la extensión de la nueva molécula creada. La diferencia principal radica en que mientras en la PCR convencional el producto genético amplificado se observaba o analiza al final de la reacción, en la PCRtr es posible ver la dinámica de las curvas de amplificación gracias a la presencia de fluorocromos unidos a sondas de hibridación que son detectados y analizados mediante un programa informático¹³. De esta forma podemos establecer con gran exactitud el ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia de una determinada muestra sobrepasa el umbral mínimo o basal, este ciclo es denominado punto de cruce de la curva (Cp) (*crossing point* o *threshold cycle*). Este principio establece la base de la cuantificación mediante PCRtr, es decir, el ciclo en el que se empieza a detectar fluorescencia para un determinado gen es proporcional a la cantidad de dicho gen o reordenamiento en la muestra de ADN o ARN, a mayor cantidad de gen diana más precoz será el ciclo en el que la fluorescencia es detectada (fig. 1).

Los métodos más utilizados son tres y varían dependiendo del tipo de sondas empleadas en la PCR. El primer método emplea un fluorocromo inespecífico (*sybr green*) capaz de unirse a cualquier molécula de ADN. Un segundo método usa las sondas de hidrólisis "Taq-Man" (ABI Prism[®]) para la detección del producto amplificado, es el método más extendido, y el empleado en la estandarización realizada en el programa Europeo BIOMED. El tercero utiliza sondas de hibridación "FRET" (LightCycler, Roche[®]), si bien está algo menos extendido su uso, cuando han sido comparadas ambas metodologías los resultados obtenidos son equiparables¹⁴⁻¹⁶ (fig. 2).

Como comentamos al principio, una de las principales aportaciones de la PCRtr respecto a la PCR convencional ha sido la posibilidad de poder cuantificar la expresión de genes concretos o genes de fusión fruto de translocaciones cromosómicas. Cualquier método de cuantificación que empleemos parte de un valor clave, el ciclo de PCR en el cual la fluorescencia emitida por el producto amplificado del gen en estudio sobrepasa el umbral de detección o punto de cruce (Cp o CT).

Existen dos métodos fundamentales de cuantificación: hablamos de *cuantificación absoluta* cuando empleamos curvas estándar o patrón, son realizadas normalmente con plásmidos a distintas concentraciones y sobre éstas llevamos el valor del Cp del gen en estu-

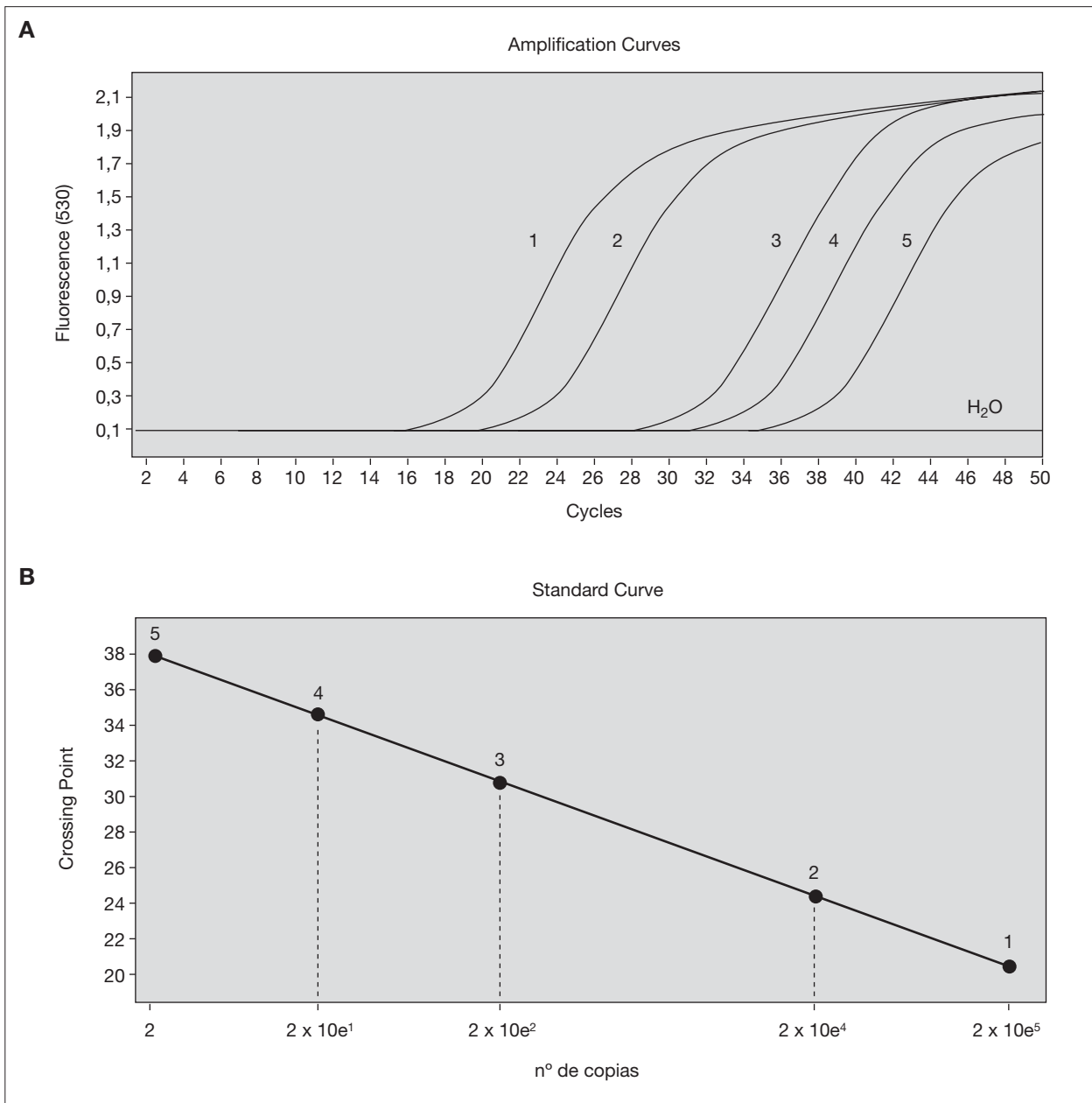


Figura 1. A) El ciclo de PCR (Cp) (eje de abscisas) en el que se empieza a detectar la fluorescencia del gen a estudiar depende de su cantidad en la muestra (ARN o ADN). **B)** El valor del Cp llevado a la curva patrón o estándar nos indicará el número de copias de la muestra en estudio: En la 1 la cantidad de copias del gen es de 200.000, en la muestra 2 de 20.000, en la 3 de 200, en la 4 de 20 y en la 5 de 2 copias.

dio. Hablamos de *cuantificación relativa* cuando empleamos una muestra calibrador a la que damos el valor 100 %, normalmente una línea celular o bien la muestra del paciente al diagnóstico, y sobre este 100 % cuantificamos de forma relativa la muestra en estudio¹⁷. Pero independientemente de la forma que utilicemos para cuantificar, los resultados obtenidos siempre van a ser relativizados a la expresión obtenida en el estudio simultáneo de un gen de referencia o control, el cual se debe expresar de manera constante en células sanas o leucémicas, por lo que los resultados deberán ser expresados como una razón o *ratio* entre el gen diana a analizar y el gen control^{18,19}.

Leucemia mieloide crónica

Desde la PCR convencional hasta la PCRtr, el reordenamiento *BCR-ABL* ha sido siempre uno de los puntos de partida en los que desarrollar y estandarizar las nuevas técnicas moleculares. La PCR cualitativa nos enseñó que los pacientes que conseguían negativizar con el tratamiento (normalmente después de un trasplante alogénico) el reordenamiento *BCR-ABL* mantenían la enfermedad controlada y en remisión, sin embargo el comportamiento de aquellos que permanecían positivos era variable²⁰. Lógicamente sabía-

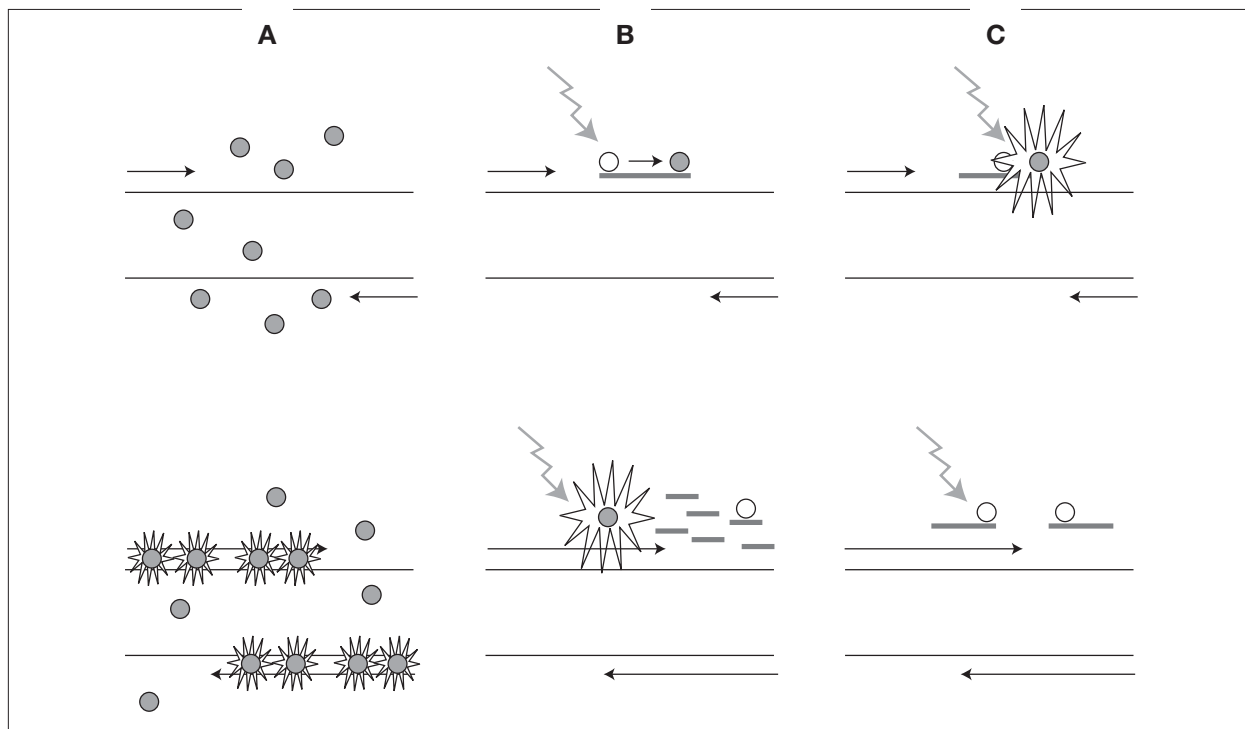


Figura 2. Los métodos más empleados en la PCR en tiempo real: **A)** Detección de fluorescencia mediante un agente inespecífico de unión a las moléculas de ADN (*Sybr Green*). **B)** Detección de fluorescencia mediante sondas de hidrólisis "TaqMan" (*ABI Prism®*) complementarias a la secuencia diana. **C)** Sondas de fluorescencia "FRET" (*LightCycler®*) también complementarias al gen en estudio.

mos que dentro de los positivos el nivel de transcrito *BCR-ABL* era distinto pero no podíamos cuantificarlo. Dos hechos simultáneos han determinado en los últimos años un gran avance tanto en el desarrollo de la PCR cuantitativa en tiempo real (PCRqtr) como en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica (LMC). El uso de imatinib como fármaco de primera línea en la LMC ha permitido que se avance rápidamente en el conocimiento y estandarización de la PCRqtr y al mismo tiempo la PCRqtr ha permitido optimizar y racionalizar el tratamiento con imatinib.

¿Qué datos ha aportado la PCRqtr en el seguimiento de los pacientes con LMC y tratados con imatinib?

Mientras los estudios de citogenética convencional eran la base del seguimiento del tratamiento con interferón, la PCRqtr del reordenamiento *BCR-ABL* constituye actualmente el método más utilizado para la monitorización de la respuesta a imatinib^{21,22}.

Los niveles de *BCR-ABL* van a ir paralelos a la respuesta citogenética, así una reducción de más de 2 logaritmos (log) (1 %) se correlaciona con la remisión citogenética completa (RCyC). Dentro de los pacientes tratados con imatinib es posible separar dos grupos en función del nivel de *BCR-ABL* en el momento que alcanzan la RCyC, aquellos que consiguen más de 2 log de reducción presentan una mayor supervivencia libre de progresión que los que no lo consiguen, igualmente los que consiguen más de 3 log de reducción (respuesta molecular mayor) durante el transcurso del tratamiento presentarán mayor supervivencia libre de progresión que los que presentan niveles superiores de *BCR-ABL*²³.

Durante el seguimiento molecular, en aquellos pacientes en los que se detecta un aumento superior a dos veces sobre el valor anterior de *BCR-ABL* según el grupo de Adelaida, o bien un ascenso de 1 log o dos ascensos consecutivos según otros grupos (pérdida de respuesta molecular) serían candidatos al estudio de mutaciones del gen *ABL* y al empleo de tratamientos alternativos^{24,25}.

Leucemia mieloblástica aguda (LMA) con t(8;21)(q22;q22) (*AML1-ETO*) o con inv(16)(p13q22) (*CBFB-MYH11*)

Dentro de las alteraciones cromosómicas más frecuentemente encontradas en la LMA están la t(8;21) y la inversión pericéntrica del cromosoma 16. En la t(8;21) se fusionan el gen *AML1* (*RUNX1* o *CBFA*) localizado en el cromosoma 21 al gen *ETO* (*MTG8* o *CBF2T1*) localizado en el cromosoma 8 resultando el gen quimérico o de fusión *AML1-ETO*. En la inversión del cromosoma 16, se crea un ARN mensajero (ARNm) quimérico entre los genes *CBFB-MYH11*. Alguna de estas dos translocaciones es detectada en aproximadamente entre el 15-20 % de las LMA del adulto, y si bien son consideradas de buen pronóstico, hasta un 30 % de pacientes portadores recaen²⁶.

Como en otros reordenamientos estudiados mediante PCRqtr la negatividad tras el tratamiento está asociada con una menor probabilidad de recaída, sin embargo su positividad no establece bien el riesgo de la misma²⁷⁻²⁹.

Los estudios realizados mediante PCRqtr han podido establecer el riesgo de recaída en función de los niveles de expresión del transcrito *AML1-ETO* o *CBFB-MYH11* y el momento de su detección. El riesgo de recaída es superior en los pacientes con mayores niveles de transcrito al diagnóstico de la enfermedad, lo cual permitiría estratificarlos al inicio del tratamiento³⁰. Una reducción de transcrito tras la inducción de más de 3 log (0,1 %) sobre los niveles al diagnóstico, establece un bajo riesgo de recaída sobre los que no lo consiguen. Tras la quimioterapia de consolidación un nivel inferior a 10^{-4} - 10^{-5} (< 0,01-0,001 %) se asocia a muy baja probabilidad de recaída frente a los que presentan niveles superiores a 10^{-4} o un ascenso progresivo³¹⁻³⁴.

Leucemia promielocítica aguda (LPA)

Aproximadamente el 95 % de los pacientes con LPA presentan la t(15;17) en el momento del diagnóstico, consecuencia de la misma se crea el gen de fusión *PML-RAR α* el cual constituye una diana molecular para la monitorización mediante PCRqtr^{35,36}.

En la última década gracias al tratamiento con el ácido transretinoico el pronóstico de los pacientes con LPA ha mejorado notablemente, si bien todavía un número reducido de ellos recaen. En un estudio realizado sobre un total de 99 pacientes uniformemente tratados, el nivel de transcritos *PML-RAR α* detectados al diagnóstico estableció dos grupos de pacientes con distinta supervivencia global y libre de enfermedad en el análisis multivariante, siendo ésta más baja para aquéllos con un nivel de *PML-RAR α* superior al percentil 75³⁷. También se ha demostrado que aquellos enfermos con positividad para *PML-RAR α* tras completar la quimioterapia de consolidación o tras trasplante autólogo presentan un alto riesgo de recaída, mientras que este es mínimo cuando *PML-RAR α* es persistentemente negativo durante el seguimiento, de forma que los protocolos terapéuticos se están adaptando según haya o no remisión molecular de la enfermedad³⁸⁻⁴¹.

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) con t(12;21)(p13;q22) (*TEL-AML1*)

El reordenamiento *TEL-AML1* es detectado en aproximadamente el 25 % de los pacientes en edad pediátrica con LLA de fenotipo B, está asociado a la presencia del antígeno CD10 y suelen responder bien al tratamiento quimioterápico. La búsqueda de esta translocación se debe realizar mediante PCR o hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) ya que a nivel de citogenética convencional no es posible demostrarla al tratarse de una translocación de pequeño tamaño o translocación oculta^{42,43}. Los pocos estudios realizados mediante la monitorización por PCRqtr durante el tratamiento, establecen que aquellos con una reducción rápida en el nivel de transcritos *TEL-AML1* tras la inducción

(niveles < 10^{-3} - 10^{-4}) presentan significativamente menor índice de recaídas que los que presentan niveles superiores a 10^{-3} ^{44,45}.

Estudio en leucemias agudas de la expresión del gen del tumor de Wilms (*WT1*)

El gen *WT1* está localizado en el cromosoma 11p13 y codifica un factor de transcripción implicado en la regulación del procesamiento del ARNm, en el control de la proliferación, diferenciación, apoptosis y ciclo celular⁴⁶. La expresión de *WT1* a nivel de ARNm detectada mediante PCRqtr es muy baja o ausente en células hematopoyéticas de sujetos sanos, pero cuando esta es estudiada en células leucémicas, es posible encontrar una sobreexpresión en aproximadamente el 80-90 % de las LMA y el 70-90 % del las LLA. Esto hace que en aquellos pacientes en los que no encontremos un marcador molecular para el seguimiento de la enfermedad mínima residual, la monitorización del nivel de expresión de *WT1* mediante PCRqtr se convierta en una alternativa para valorar la respuesta al tratamiento y la posibilidad de recaída^{47,48}. En los estudios realizados, los pacientes con buena respuesta al tratamiento permanecieron con niveles bajos de *WT1*, mientras que en los que recayeron, un ascenso en la expresión de *WT1* precedió en 3-4 meses la recaída morfológica⁴⁸⁻⁵⁰.

Estudio del reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (*Ig*) y del receptor de células T (*RCT*)

Mediante estudios de PCR del gen de las *Ig* o del *RCT* es posible detectar clonalidad en las neoplasias linfoides de origen B o T, respectivamente, esto es debido a que cada célula precursora linfoide va a presentar un reordenamiento propio en estos genes. Los productos monoclonales obtenidos al diagnóstico tras una primera PCR utilizando cebadores "universales", pueden ser secuenciados y posteriormente diseñaríamos cebadoras y sondas específicas para el seguimiento de cada paciente^{51,52}. Sin embargo, esta aproximación metodológica es más compleja y laboriosa que la utilizada con los genes de fusión para el seguimiento de la EMR y siempre se debe tener presente la posibilidad de resultados falsos negativos durante el seguimiento, debidos principalmente a los posibles "cambios de clonalidad" durante la evolución de la leucemia⁵³⁻⁵⁵.

Quimerismo y trasplante alogénico

El seguimiento del quimerismo mediante PCR en el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos está basado en la detección de polimorfismos genéticos que diferencien donante y receptor. Así, en el período postrasplante intentaremos detectar las se-

cuencias propias del receptor para poder detectar la posibilidad de recaída. El empleo de la PCRqtr en el estudio del quimerismo ha sido más tardía y se tiene mucha menos experiencia que en el resto de estudios antes descritos, esto es debido a que los clásicos polimorfismos utilizados en la PCR convencional (repeticiones en tándem de nucleótidos, secuencia repetida en tándem un número variable de veces [VNTR] o *simple tandem repeat* [STR]) no eran buenas dianas para ser amplificadas mediante PCRqtr. Actualmente existen dos tipos de polimorfismos usados para el seguimiento del quimerismo mediante PCRqtr, los de un solo nucleótido (SNP) y los de inserción/delección (indel). El estudio mediante SNP fue desarrollado por Alizadeh et al⁵⁶, pero su empleo clínico debe ser validado en series amplias de pacientes⁵⁷. Nuestro grupo ha trabajado en los últimos 4 años en los polimorfismos indel como forma de seguimiento del quimerismo mediante PCRqtr y hemos desarrollado un método que permite detectar células residuales del receptor con mucha mayor sensibilidad que los métodos convencionales de PCR de regiones VNTR-STR (0,01 % frente al 3 %). En un estudio retrospectivo pudimos comprobar cómo de un total de 17 recaídas analizadas por ambos métodos, el quimerismo estudiado por PCRqtr detectó un incremento del quimerismo mixto en 15 de ellos (88 %) frente a un 44 % de la PCR-VNTR. La mediana de tiempo entre la detección del incremento de quimerismo mixto y la recaída fue de 58 días^{58,59}. Son necesarios estudios prospectivos empleando estos nuevos métodos de monitorización del quimerismo con PCRqtr mucho más sensibles que los actuales de PCR convencional VNTR-STR

y aplicar medidas terapéuticas precoces que eviten la recaída y determinar el impacto que puedan tener en mejorar la supervivencia postrasplante.

Estudio de mutaciones mediante PCRtr y análisis de temperaturas de fusión

El estudio de mutaciones es realizado clásicamente por secuenciación directa del fragmento de ADN donde se localiza la mutación, o bien mediante amplificación por PCR de la zona de interés y posterior digestión con enzimas específicas que proporcionan fragmentos de restricción diferentes, dependiendo si está presente o no la mutación o si se encuentra en hetero u homocigosis. Estos métodos proporcionan una gran especificidad en el estudio de mutaciones, pero son laboriosos en su ejecución. Mediante PCRtr utilizando sondas de hibridación específica (FRET) que sean complementarias a la zona donde se encuentra una mutación, es posible su detección analizando las temperaturas de fusión⁶⁰. Cuando la mutación está presente y la sonda de hibridación es complementaria a la secuencia no mutada, la temperatura de fusión o separación será menor que cuando la mutación no esté presente. También es posible determinar si hay heterozigocidad u homozigocidad ya que veremos una sola curva en los homozigotos y dos curvas de fusión en los heterozigotos⁶¹. Este método permite el estudio de mutaciones puntuales de una forma más rápida y menos laboriosa que con los métodos convencionales (fig. 3).

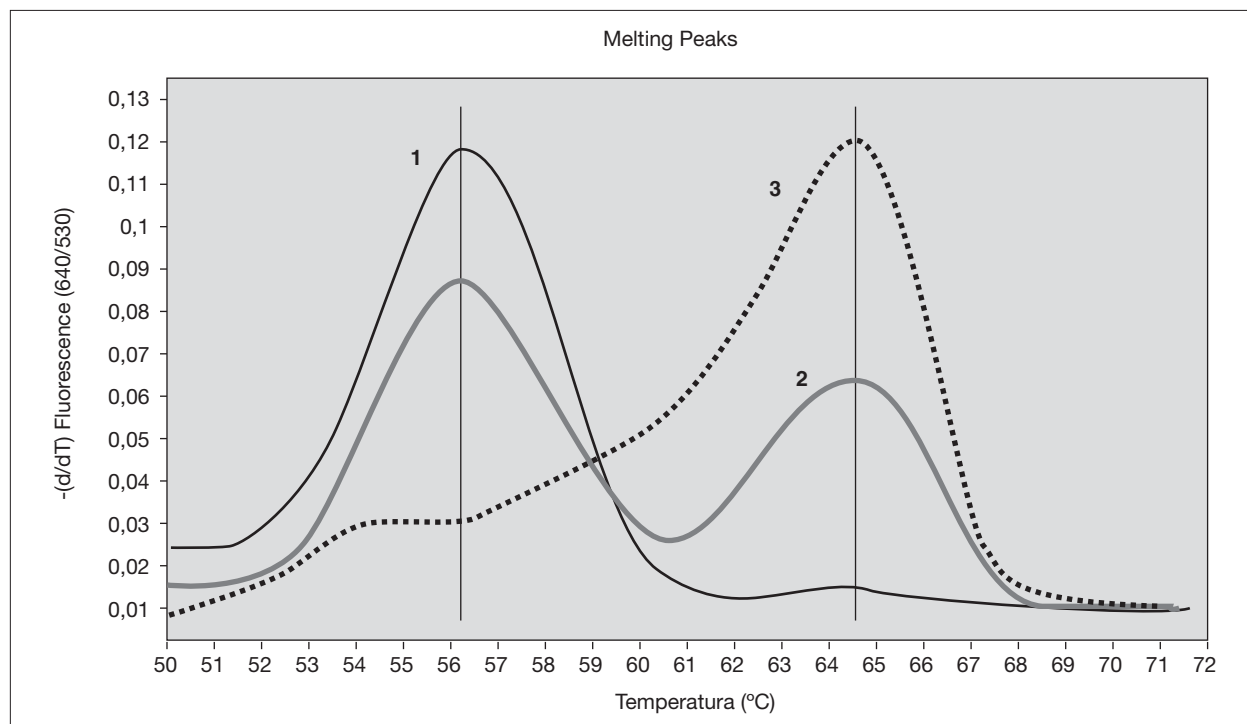


Figura 3. Estudio de mutaciones mediante PCR en tiempo real y análisis de temperaturas de fusión o “melting”: curva 1: paciente homocigoto, curva 2: paciente heterocigoto y curva 3: paciente negativo para la mutación.

Las aplicaciones clínicas más conocidas del estudio de mutaciones mediante PCRtr y análisis de temperaturas de fusión se realiza en los estudios de enfermedad tromboembólica (mutación 20210 del gen de la protrombina, factor V Leiden, mutaciones del gen *MTHFR*, etc.), talasemias, hemocromatosis hereditaria, etc.⁶²⁻⁶⁴. También es posible mediante el empleo de fluorocromos con distintas longitudes de onda analizar en una misma reacción de PCRtr varias mutaciones a la vez. Recientemente esta metodología ha sido aplicada al estudio de la mutación V617F del gen *JAK2* mostrando una total concordancia con los resultados obtenidos mediante PCR seguida de digestión enzimática, PCR alelo específica e incluso logrando más sensibilidad en su detección que la secuenciación directa del gen^{65,66}.

Conclusiones y futuro

Probablemente nos encontramos en el momento adecuado para que las técnicas de PCRtr se integren cada vez más en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes. El esfuerzo realizado por el programa "Europa Contra el Cáncer" para la estandarización de los métodos de PCRqtr en el seguimiento de la EMR debería ser aprovechado por todos los grupos que trabajen en este campo. Aunque las evidencias científicas establecen que la cuantificación de la EMR mediante PCRqtr es capaz de estratificar a los pacientes según el riesgo de recaída y supervivencia global, son necesarios más estudios prospectivos con métodos estandarizados de seguimiento que indiquen claramente cuando se debe cambiar de actitud terapéutica y el beneficio real que dichas medidas aportarían.

Las nuevas plataformas de PCRtr van dirigidas al desarrollo de los llamados "arrays de PCR en tiempo real" donde partiendo de una muestra diagnóstica es posible estudiar el perfil de expresión no sólo de los clásicos transcritos de fusión, sino de otros múltiples genes implicados en los procesos claves de la diferenciación, proliferación y muerte celular⁶⁷. Gracias a estos nuevos instrumentos de PCR seremos capaces de establecer nuevos perfiles pronósticos, conocer cada vez más sobre la biología molecular de la patología hematológica y probablemente en un futuro no muy lejano sentar las bases de nuevas terapias dirigidas contra dianas moleculares específicas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado en parte por las siguientes becas y Fundaciones: Fondos de Investigación Sanitaria 01/0013-01, 01/F018, 02/1299, 03/0141; Junta de Andalucía 03/143, 03/144; Fundación IMABIS; RETIC C03/10, y Fundación de Investigación Médica de la Mutua Madrileña Automovilística.

Bibliografía

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1986;51:263-73.
- Kaltenboeck B, Wang C. Advances in real-time PCR: application to clinical laboratory diagnostics. *Adv Clin Chem.* 2005;40:219-59.
- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Cervantes F, Sánchez J, Garate L, et al. Promoter hypomethylation of the LINE-1 retrotransposable elements activates sense/antisense transcription and marks the progression of chronic myeloid leukemia. *Oncogene.* 2005;24:7213-23.
- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Castillejo JA, Agirre X, Barrios M, Navarro G, et al. Promoter hypermethylation of cancer-related genes: a strong independent prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2004;104:2492-8.
- Becker-Andre M, Hahlbrock K. Absolute mRNA quantification using the polymerase chain reaction (PCR). A novel approach by a PCR aided transcript titration assay (PATTY). *Nucleic Acids Res.* 1989;17:9437-46.
- Becker-Andre M. Absolute levels of mRNA by polymerase chain reaction-aided transcript titration assay. *Methods Enzymol.* 1993;218:420-45.
- Cross NC, Feng L, Chase A, Bungey J, Hughes TP, Goldman JM. Competitive polymerase chain reaction to estimate the number of BCR-ABL transcripts in chronic myeloid leukemia patients after bone marrow transplantation. *Blood.* 1993;82:1929-36.
- Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem.* 2000;285:194-204.
- Schmittgen TD. Real-time quantitative PCR. *Methods.* 2001;25:383-5.
- Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem.* 2003;4:1120-8.
- Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Agirre X, Barrios M, Navarro G, Vázquez I, et al. Downregulation of the large tumor suppressor 2 (LATS2/KPM) gene is associated with poor prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 2005;19:2347-50.
- Román-Gómez J, Jiménez-Velasco A, Agirre X, Prosper F, Heiniger A, Torres A. Lack of CpG island methylator phenotype defines a clinical subtype of T-cell acute lymphoblastic leukemia associated with good prognosis. *J Clin Oncol.* 2005;23:7043-9.
- Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005;39:75-85.
- Bolufer P, Colomer D, Gómez MT, Martínez J, González SM, González M, et al. Quantitative assessment of PML-RARa and BCR-ABL by two real-time PCR instruments: multiinstitutional laboratory trial. *Clin Chem.* 2004;50:1088-92.
- Exner MM, Lewinski MA. Sensitivity of multiplex real-time PCR reactions, using the LightCycler and the ABI PRISM 7700 Sequence Detection System, is dependent on the concentration of the DNA polymerase. *Mol Cell Probes.* 2002;16:351-7.
- Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003;3:18.
- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med.* 2002;8:257-60.
- Arocho C, Chen B, Ladanyi M, Pan Q. Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol.* 2006;15:56-61.
- Hughes TP, Deininger MW, Hochhaus A, Branford S, Radich JP, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to tre-

- atment with tyrosine kinase inhibitors – Review and recommendations for “harmonizing” current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006.
20. Serrano J, Román J, Sánchez J, Jiménez A, Castillejo JA, Herrera C, et al. Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood*. 2000;95:2659-65.
 21. Bacarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia. Recommendations from an expert panel on behalf of the European Leukemianet. *Blood*. 2006.
 22. Ross DM, Branford S, Moore S, Hughes TP. Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. *Leukemia*. 2006;20:664-70.
 23. Press RD, Love Z, Tronnes AA, Yang R, Tran T, Mongouet-Tchokote S, et al. BCR-ABL mRNA levels at and after the time of a complete cytogenetic response (CCR) predict the duration of CCR in imatinib mesylate-treated patients with CML. *Blood*. 2006;107:4250-6.
 24. Hughes T, Branford S. Molecular monitoring of BCR-ABL as a guide to clinical management in chronic myeloid leukaemia. *Blood Rev*. 2006;20:29-41.
 25. Wang L, Knight K, Lucas C, Clark RE. The role of serial BCR-ABL transcript monitoring in predicting the emergence of BCR-ABL kinase mutations in imatinib-treated patients with chronic myeloid leukemia. *Haematologica*. 2006;91:235-9.
 26. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999;341:1051-62.
 27. Saunders MJ, Tobal K, Yin JA. Detection of t(8;21) by reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients in remission of acute myeloid leukaemia type M2 after chemotherapy or bone marrow transplantation. *Leuk Res*. 1994;18:891-5.
 28. Marucci G, Caligiuri MA, Bloomfield CD. Core binding factor (CBF) acute myeloid leukemia: is molecular monitoring by RT-PCR useful clinically? *Eur J Haematol*. 2003;71:143-54.
 29. Tobal K, Liu Yin JA. Diagnosis and monitoring of AML1-MTG8 (ETO)-positive acute myeloid leukemia by qualitative and real-time quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med*. 2006;125:149-61.
 30. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*. 2003;102:2746-55.
 31. Barragan E, Bolufer P, Moreno I, Martín G, Nomdedeu J, Brunet S, et al. Quantitative detection of AML1-ETO rearrangement by real-time RT-PCR using fluorescently labeled probes. *Leuk Lymphoma*. 2001;42:747-56.
 32. Krauter J, Gorlich K, Ottmann O, Lubbert M, Dohner H, Heit W, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in patients with core binding factor leukemias. *J Clin Oncol*. 2003;21:4413-22.
 33. Krauter J, Hoellge W, Wattjes MP, Nagel S, Heidenreich O, Bunjes D, et al. Detection and quantification of CBF/MBYH11 fusion transcripts in patients with inv(16)-positive acute myeloblastic leukemia by real-time RT-PCR. *Genes Chromosomes Cancer*. 2001;30:342-8.
 34. Perea G, Lasa A, Aventin A, Domingo A, Villamor N, Queipo de Llano MP, et al. Prognostic value of minimal residual disease (MRD) in acute myeloid leukemia (AML) with favorable cytogenetics [t(8;21) and inv(16)]. *Leukemia*. 2006;20:87-94.
 35. Grimwade D, Lo CF. Acute promyelocytic leukemia: a model for the role of molecular diagnosis and residual disease monitoring in directing treatment approach in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2002;16:1959-73.
 36. Mokany E, Todd AV, Fuery CJ, Applegate TL. Diagnosis and monitoring of PML-RARalpha-positive acute promyelocytic leukemia by quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med*. 2006;125:127-47.
 37. Schnittger S, Weisser M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*. 2003;102:2746-55.
 38. Sanz MA, Martín G, González M, León A, Rayon C, Rivas C, et al. Risk-adapted treatment of acute promyelocytic leukemia with all-trans-retinoic acid and anthracycline monotherapy: a multicenter study by the PETHEMA group. *Blood*. 2004;103:1237-43.
 39. Román J, Martín C, Torres A, Jiménez MA, Andrés P, Flores R, et al. Absence of detectable PML-RAR alpha fusion transcripts in long-term remission patients after BMT for acute promyelocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 1997;19:679-83.
 40. Lo CF, Diverio D, Avvisati G, Petti MC, Meloni G, Pogliani EM, et al. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1999;94:2225-9.
 41. Lo-Coco F, Romano A, Mengarelli A, Diverio D, Iori AP, Moleti ML, et al. Allogeneic stem cell transplantation for advanced acute promyelocytic leukemia: results in patients treated in second molecular remission or with molecularly persistent disease. *Leukemia*. 2003;17:1930-3.
 42. Romana SP, Mauchauffe M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, et al. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood*. 1995;85:3662-70.
 43. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, et al. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1996;88:302-8.
 44. Madzo J, Zuna J, Muzikova K, Kalinova M, Krejci O, Hrusak O, et al. Slower molecular response to treatment predicts poor outcome in patients with TEL/AML1 positive acute lymphoblastic leukemia: prospective real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction study. *Cancer*. 2003;97:105-13.
 45. Seeger K, Kreuzer KA, Lass U, Taube T, Buchwald D, Eckert C, et al. Molecular quantification of response to therapy and remission status in TEL-AML1-positive childhood ALL by real-time reverse transcription polymerase chain reaction. *Cancer Res*. 2001;61:2517-22.
 46. Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1: its oncogenic function and clinical application. *Int J Hematol*. 2001;73:177-87.
 47. Cilloni D, Saglio G. WT1 as a universal marker for minimal residual disease detection and quantification in myeloid leukemias and in myelodysplastic syndrome. *Acta Haematol*. 2004;112:79-84.
 48. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. 2002;16:2115-21.
 49. Boublikova L, Kalinova M, Ryan J, Quinn F, O'Marcaigh A, Smith O, et al. Wilms' tumor gene 1 (WT1) expression in childhood acute lymphoblastic leukemia: a wide range of WT1 expression levels, its impact on prognosis and minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. 2006;20:254-63.
 50. Ostergaard M, Olesen LH, Hasle H, Kjeldsen E, Hokland P. WT1 gene expression: an excellent tool for monitoring minimal residual disease in 70 % of acute myeloid leukaemia patients – results from a single-centre study. *Br J Haematol*. 2004;125:590-600.
 51. Lassmann S, Gerlach UV, Technau-Ihling K, Werner M, Fisch P. Application of BIOMED-2 primers in fixed and decalcified bone marrow biopsies: analysis of immunoglobulin H receptor rearrangements in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Mol Diagn*. 2005;7:582-91.
 52. Van Dongen JJ, Langerak AW, Bruggemann M, Evans PA, Hummel M, Lavender FL, et al. Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect

- lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia*. 2003;17:2257-317.
53. Szczepanski T, Willemse MJ, Brinkhof B, Van Wering ER, Van der BM, Van Dongen JJ. Comparative analysis of Ig and TCR gene rearrangements at diagnosis and at relapse of childhood precursor-B-ALL provides improved strategies for selection of stable PCR targets for monitoring of minimal residual disease. *Blood*. 2002;99:2315-23.
 54. Szczepanski T, Van dV V, Raff T, Jacobs DC, Van Wering ER, Bruggemann M, et al. Comparative analysis of T-cell receptor gene rearrangements at diagnosis and relapse of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) shows high stability of clonal markers for monitoring of minimal residual disease and reveals the occurrence of second T-ALL. *Leukemia*. 2003;17:2149-56.
 55. Steward CG, Goulden NJ, Katz F, Baines D, Martín PG, Langlands K, et al. A polymerase chain reaction study of the stability of Ig heavy-chain and T-cell receptor delta gene rearrangements between presentation and relapse of childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1994;83:1355-62.
 56. Alizadeh M, Bernard M, Danic B, Dauriac C, Birebent B, Lapart C, et al. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*. 2002;99:4618-25.
 57. Maas F, Schaap N, Kolen S, Zoetbrood A, Buno I, Dolstra H, et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia*. 2003;17:621-9.
 58. Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, Navarro G, Buno I, Castillejo JA, et al. Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia*. 2005;19:336-43.
 59. Barrios M, Jiménez-Velasco A, Román-Gómez J, Madrigal ME, Castillejo JA, Torres A, et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica*. 2003;88:801-10.
 60. Lyon E. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Rev Mol Diagn*. 2001;1:92-101.
 61. Schroell-Metzger B, Dicato M, Bosseler M, Berchem G. Comparison of standard PCR and the LightCycler technique to determine the thrombophilic mutations: an efficiency and cost study. *Clin Chem Lab Med*. 2003;41:482-5.
 62. Cooper PC, Cooper SM, Smith JM, Kitchen S, Makris M. Evaluation of the Roche LightCycler: a simple and rapid method for direct detection of factor V Leiden and prothrombin G20210A genotypes from blood samples without the need for DNA extraction. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2003;14:499-503.
 63. Nakamura S, Aoshima T, Ikeda M, Sekido Y, Shimokata K, Niwa T. Simultaneous detection of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms, C677T and A1298C, by melting curve analysis with LightCycler. *Anal Biochem*. 2002;306:340-3.
 64. Von Ahnen N, Oellerich M, Schutz E. A method for homogeneous color-compensated genotyping of factor V (G1691A) and methylenetetrahydrofolate reductase (C677T) mutations using real-time multiplex fluorescence PCR. *Clin Biochem*. 2000;33:535-9.
 65. Murugesan G, Aboudola S, Szpurka H, Verbic MA, Maciejewski JP, Tubbs RR, et al. Identification of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders using FRET probes and melting curve analysis. *Am J Clin Pathol*. 2006;125:625-33.
 66. McClure R, Mai M, Lasho T. Validation of two clinically useful assays for evaluation of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006;20:168-71.
 67. Steinbach D, Schramm A, Eggert A, Onda M, Dawczynski K, Rump A, et al. Identification of a set of seven genes for the monitoring of minimal residual disease in pediatric acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2434-41.

Diagnóstico de las hemopatías malignas mediante el perfil de expresión génica

N.C. GUTIÉRREZ, J.M. HERNÁNDEZ, M. DELGADO, I. ISIDRO, B. GONZÁLEZ, E. FERMIÑÁN, J.L. GARCÍA Y J.F. SAN MIGUEL

Servicio de Hematología. Hospital Universitario de Salamanca. Centro de Investigación del Cáncer (CIC). Universidad de Salamanca-CSIC.

Introducción

La cuantificación de la expresión génica viene siendo una práctica habitual en la investigación de los procesos tumorales. Tradicionalmente, estos estudios estaban restringidos al examen de un número muy limitado de genes, hasta que el desarrollo de la tecnología de microarrays ha hecho posible monitorizar simultáneamente la expresión de todos los genes que integran el genoma. Aunque existen otras técnicas para evaluar la expresión de un gran número de genes a la vez, los microarrays se han convertido en el método comúnmente más utilizado para el análisis de la expresión génica, tanto por su rapidez como por su relativa facilidad de ejecución. Las dos plataformas que imperan en la actualidad son los microarrays de oligonucleótidos y los de ADNc. En los microarrays de ADNc las sondas aplicadas en el soporte, mediante robots que dispensan cantidades mínimas de volumen, son clones de ADNc amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)¹. Los microarrays de oligonucleótidos pueden fabricarse con la misma metodología que los anteriores, es decir depositando los "oligos" en el soporte. Sin embargo, la tecnología basada en la síntesis *in situ* de los "oligos" mediante fotolitografía (manufacturados por Affymetrix) es en estos momentos la más difundida². El resultado final de un análisis de expresión génica mediante microarrays es una cantidad ingente de datos que hacen compleja su interpretación. De hecho, el análisis de las matrices de datos generadas en los estudios de microarrays constituye uno de los mayores desafíos, debido al enorme número de variables (genes) que se exploran para un número no muy elevado de casos, situación inversa a la de la mayoría de los estudios clínicos. Aunque los algoritmos y programas diseñados para analizar los perfiles de expresión génica son numerosos, la mayoría se pueden encuadrar en uno de los siguientes abordajes: análisis no supervisado y análisis supervisado. El análisis no supervisado o de "clustering" intenta agrupar las muestras en función de las similitudes en su perfil de expresión génica, sin asumir *a priori* ninguna característica conocida de las muestras, lo cual permite descubrir nuevas clases de tumo-

res. Por el contrario, el análisis supervisado o discriminante parte de categorías bien definidas y tiene el objetivo de identificar genes capaces de distinguirlas, así como de predecir la pertenencia de muestras sin clasificar a dichas clases.

Respecto a las muestras que se van a analizar mediante microarrays de expresión es importante destacar que se deben procesar inmediatamente a su recogida y almacenar a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para evitar la degradación del ARN. También conviene tener en cuenta que la población tumoral que se pretende analizar debe estar representada de manera mayoritaria ($> 80\%$) en la muestra, puesto que en caso contrario es obligatorio realizar una selección celular para evitar una interpretación errónea de los patrones de expresión, debido a la contaminación por otros elementos celulares no pertenecientes al clon tumoral.

El diagnóstico de las hemopatías malignas se basa normalmente en la evaluación morfológica de la muestra complementada con el análisis de un número limitado de marcadores moleculares. Sin embargo, en algunas de las categorías diagnósticas definidas de esta manera la respuesta de los pacientes al tratamiento es marcadamente heterogénea, lo cual apunta a que puede haber enfermedades molecularmente diferentes dentro de una misma categoría morfológica. En el ámbito de las hemopatías malignas, el análisis de la expresión génica puede ayudar a perfeccionar su taxonomía, a predecir la respuesta al tratamiento, así como a identificar rutas críticas en los mecanismos patogénicos, que sentarían las bases para futuras intervenciones terapéuticas.

El estudio de los perfiles de expresión génica en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia, marcó el inicio de la aplicación de los microarrays al análisis del transcriptoma de las neoplasias hematológicas³. Este trabajo demostró que el perfil de expresión génica determinado mediante microarrays de oligonucleótidos era capaz de distinguir las leucemias mieloblásticas agudas (LMA) de las linfoblásticas (LLA), sin otro tipo de información sobre las muestras. Aunque lógicamente la diferenciación entre LMA y LLA no ofrece ninguna dificultad con las técnicas inmunofenotípicas disponibles en la actualidad, la importancia de este trabajo estriba en poner de manifiesto la factibilidad de clasificar el cáncer mediante los patrones de expresión génica sin la necesidad de conocimientos biológicos previos, lo que puede ser

Este trabajo ha sido financiado en parte por el Fondo de Investigación Sanitaria PI051801.

Tabla 1. Genes desregulados específicamente en los tres subtipos de LMA asociados con pronóstico favorable

Gen (símbolo)	Descripción	Expresión*	Localización
t(15;17)			
<i>HGF</i>	"Hepatocyte growth factor"	A	7q21
<i>FGF13</i>	"Fibroblast growth factor 13"	A	Xq26
<i>FGFR1</i>	"Fibroblast growth factor receptor 1"	A	8p11
<i>MEG3</i>	"Maternally expressed gene 3"	A	14q32
<i>ANX8</i>	"Annexin A8"	A	10q11
<i>ARHGAP4</i>	"Rho-GTPase-activating protein 4"	D	Xq28
<i>NRIP1</i>	"Nuclear receptor-interacting protein 1"	D	21q11
t(8;21)			
<i>ETO</i>	"Core-binding factor, alpha subunit 2"	A	8q22
<i>IL5RA</i>	"Interleukin 5 receptor, alpha"	A	3p26
<i>TRH</i>	"Thyrotropin-releasing hormone"	A	3q13
<i>CAV1</i>	"Caveolin 1"	A	7q31
inv(16)			
<i>MYH11</i>	"Myosin, heavy polypeptide 11, smooth muscle"	A	16p13
<i>CLIPR-59</i>	"CLIP-170-related protein"	A	19q13
<i>DHRS3</i>	"Short-chain dehydrogenase/reductase 1"	A	1p36
<i>SPARC</i>	"Secreted protein, acidic, cysteine-rich"	A	5q31
<i>RUNX3</i>	"Runt-related transcription factor 3"	D	1p36
<i>CYLN2</i>	"Cytoplasmic linker 2"	D	7q11

*A: expresión aumentada; D: expresión disminuida.
LMA: leucemia mieloblástica aguda.

crucial para tipificar entidades en las que aún no se han identificado categorías biológicas. Además, fue el detonante de numerosas publicaciones posteriores destinadas a identificar las firmas genéticas de las diferentes neoplasias hematológicas.

A continuación se revisarán las aportaciones de los estudios de expresión génica al diagnóstico y conocimiento de la patogenia de las hemopatías malignas, centrándonos únicamente en las entidades sobre las que se ha generado más información. Por este motivo no se han incluido los síndromes mieloproliferativos ni los mielodisplásicos.

Leucemia mieloblástica aguda

Hasta ahora se han estudiado más de 2.000 muestras de LMA, si bien la mayoría de los trabajos comprenden un número escaso de pacientes con características biológicas y genéticas muy dispares entre los distintos estudios. Probablemente, la conclusión más destacable es el elevado grado de concordancia entre ellos, sobre todo si se tiene en cuenta que se han utilizado plataformas de microarrays diferentes. Esto demuestra la solidez de los análisis de microarrays y los consolida como una metodología fiable y reproducible. Se ha conseguido identificar firmas de expresión génica asociadas tanto a anomalías cariotípicas, como al estado mutacional de algunos genes y también a subtipos morfológicos. Todos los estudios coinciden en que las LMA con t(15;17), t(8;21) o inv(16), alteracio-

nes que conllevan un pronóstico favorable, presentan un patrón de expresión inconfundible que permite distinguirlas entre sí y del resto de las LMA, utilizando un número reducido de genes y con una precisión absoluta (tabla 1)⁴⁻⁶. Otras alteraciones citogenéticas presentes de manera recurrente en las LMA, como las translocaciones de 11q23, deleciones de 7q y 5q, o las trisomías del cromosoma 8 no muestran un perfil de expresión génica específico hasta el punto de permitir distinguirlas con total certeza del resto de las LMA^{6,7}. Esto indica que estos grupos citogenéticos engloban LMA biológicamente más heterogéneas. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en aproximadamente la mitad de las LMA no se detectan alteraciones citogenéticas, y por tanto, este grupo de pacientes es el más atractivo para intentar descubrir mediante microarrays nuevas categorías con comportamientos biológicos diferentes, que permitan una estratificación pronóstica adecuada. En este sentido, hay estudios en los que las muestras con cariotipo normal tienden a mostrar un patrón de expresión característico, pero en ningún caso tan consistente como el presentado por las alteraciones citogenéticas de buen pronóstico^{7,8}.

Los estudios moleculares de la LMA han detectado numerosas mutaciones genéticas, generalmente distribuidas a lo largo de todo el espectro morfológico y citogenético, que están ayudando a afinar la estratificación pronóstica de las LMA. La mutación más frecuente es la que afecta al gen *NPM*, nucleofosmina, ($\approx 40\%$), que está presente fundamentalmente en las LMA con cariotipo normal. El perfil de expresión de las LMA con mutaciones del gen *NPM* se caracteriza por la activación de varios genes supuestamente implicados en mantener el fenotipo de la célula *stem* (genes de las familias *HOX* y *TAL1*), aunque la expresión de CD34 está reprimida⁹. Otras mutaciones como las que afectan a *FLT3*, *CEBP α* , o las duplicaciones en tándem parciales de *MLL* aparentemente no presentan una firma genética específica⁶.

En cuanto a los subtipos morfológicos, algunos de ellos se asocian exclusivamente con una alteración citogenética y por tanto los perfiles de expresión son coincidentes. No obstante, hay que destacar que las LMA con diferenciación monocítica muestran una firma genética común en la mayoría de los estudios, independientemente de las alteraciones citogenéticas⁴. Además, la expresión de sólo 2 genes implicados en la maduración monocítica (*HLX1* y *PPP1R14B*) permiten diferenciar el subtipo M5a del M5b¹⁰. También es interesante el hecho de que las leucemias promielocíticas agudas (LPA) exhiben un patrón de expresión diferente en función de si la morfología es variante o no¹¹. La posibilidad que ofrecen los microarrays de expresión de tener una visión global del estatus transcripcional de la célula les convierte en una herramienta de primer orden en la disección de vías críticas en la génesis y desarrollo tumoral, así como en la exploración de nuevas modalidades de intervención terapéutica. En las LMA se han descubierto cambios significativos de expresión en genes con funciones biológicas relevantes que hasta ahora no se habían relacionado con la patogenia de las LMA. Así por ejemplo, en las

LPA el gen *HGF*, que es un potente factor angiogénico, muestran niveles de expresión muy elevados, lo cual junto con los niveles altos de *VEGF* presentes en este subtipo de leucemias pone de manifiesto una actividad angiogénica incrementada en las LPA⁴. Otro dos genes significativamente aumentados en las LPA son el *FGF13* y su posible receptor tirosincinasa *FGFR1*⁴. Estos hallazgos pueden ser el punto de partida de futuras investigaciones sobre el papel de agentes antian-giogénicos, y de inhibidores del receptor tirosincinasa *FGFR1* en el tratamiento de la LPA.

Leucemia linfoblástica aguda

Los análisis mediante microarrays de expresión de las LLA pediátricas han identificado 6 subgrupos que se asocian con una precisión casi del 100 % con 6 subtipos citogenéticos y morfológicos bien definidos: LLA-T, t(1;19)/*E2A-PBX1*, t(9;22)/*BCR-ABL*, t(12;21)/*TEL-AML1*, reordenamientos del gen *MLL* y cariotipos hiperdiploides (> 50 cromosomas) (tabla 2)¹². Se identificó un séptimo grupo que contenía casos con cariotipo normal, pseudodiploide e hiperdiploide, y que carecía de anomalías citogenéticas recurrentes. Estos resultados se han visto reproducidos en los análisis llevados a cabo en pacientes adultos. Las LLA con translocaciones que implican al gen *MLL* muestran un patrón de expresión génica significativamente diferente a otras LLA y LMA: activación de genes propios de progenitores hematopoyéticos precoces, algunos de ellos marcadores multilínea, de varios genes de la familia *HOX* y del gen *FLT3*¹³.

A diferencia de las LLA-B, sólo el 30 % de las LLA-T tienen translocaciones cromosómicas. Sin embargo, los perfiles de expresión génica han puesto de manifiesto que los oncogenes *HOX11*, *TAL1*, *LYL1*, *LMO1*, *LMO2* y *MLL-ENL* están activados en una proporción de casos mucho mayor de la que se podría justificar por las translocaciones de dichos oncogenes. Además, la desregulación de cada uno de estos oncogenes define diferentes patrones de expresión que se corresponden con los estadios de diferenciación normales del timocito¹⁴.

Linfoma de células B

Los 3 tipos de linfomas no hodgkinianos B que están siendo estudiados con más detalle mediante microarrays de expresión son el linfoma de células B grandes difuso (LCBGD), el linfoma de células del manto (LCM) y el linfoma folicular (LF).

Linfoma de células B grandes difuso. Es la categoría de linfomas que se ha analizado más pormenorizadamente mediante microarrays de expresión, con la intención de entender su heterogeneidad clínica, que ni la morfología, ni la inmunohistoquímica, ni las más modernas técnicas de genética molecular han sido capaces de explicar. Los perfiles de expresión génica han revelado que más del 80 % de los LCBGD pueden ser

Tabla 2. Selección de los 5 genes (todos ellos con expresión aumentada) más altamente correlacionados con los 5 subtipos de LLA-B reconocidos mediante análisis de expresión génica

Gen (símbolo)	Descripción
E2A-PBX1	
<i>ADPRT</i>	"ADP-ribosyltransferase NAD polyADP-ribose polymerase"
<i>PBX1</i>	"Pre-B-cell leukemia transcription factor 1"
<i>NP</i>	"Nucleoside phosphorylase"
<i>FAT</i>	"FAT tumor suppressor Drosophila homolog"
<i>NID2</i>	"Nidogen 2"
BCR-ABL	
<i>MAPKAPK3</i>	"Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3"
<i>CCND2</i>	"Cyclin D2"
<i>HYA22</i>	"HYA22 protein"
<i>ABL</i>	"Proto-oncogene tyrosine-protein kinase ABL gene"
<i>CASP8</i>	"Caspase 8 apoptosis-related cysteine protease"
TEL-AML1	
<i>POU2AF1</i>	"POU domain class 2 associating factor 1"
<i>CBFA2T3</i>	"Core-binding factor runt domain alpha subunit 2 translocated to, 3"
<i>PCLO</i>	"Piccolo presynaptic cytomatrix protein"
<i>IDI1</i>	"Isopentenyl-diphosphate delta isomerase"
<i>TNFRSF7</i>	"Tumor necrosis factor receptor superfamily member 7"
MLL	
<i>MBNL</i>	"Muscleblind Drosophila like"
<i>ADAM10</i>	"A disintegrin and metalloproteinase domain 10"
<i>LGALS1</i>	"LGALS1 Lectin, galactoside-binding, soluble, 1"
<i>S100A10</i>	"S100 calcium-binding protein A10"
<i>IGFBP7</i>	"Insulin-like growth factor binding protein 7"
Hiperdiploide > 50	
<i>SOD1</i>	"Superoxide dismutase 1 soluble amyotrophic lateral sclerosis 1 adult"
<i>VBP1</i>	"Von Hippel-Lindau binding protein 1"
<i>PGK1</i>	"Phosphoglycerate kinase 1"
<i>DXS1357E</i>	"Accessory proteins BAP31/BAP29"
<i>MPP1</i>	"Membrane protein palmitoylated 1"

LLA: leucemia linfoblástica aguda B.

incluidos en unas de estas tres entidades: los LCBGD semejantes a las células B del centro germinal (GCB), que expresan genes propios de dichas células, como *BCL6*, *CD10*, *A-myb*, *JNK3* y *LMO2*; los LCBGD semejantes a las células B activadas (ABC), que expresan genes que se sobreexpresan durante la activación mitogénica de las células B, como *BCL2*, *IRF4* y *CCND2*, y que no expresan *BCL6*; y el linfoma de células B mediastínico primario (LBMP)^{15,16}. Estas tres categorías moleculares de LCBGD surgen de estadios diferentes de la diferenciación linfocítica B normal, utilizan distintos mecanismos oncogénicos y difieren en su respuesta a la quimioterapia (fig. 1). A diferencia de los LCBGD GCB, el origen de los LCBGD ABC es menos claro, aunque se cree que puede estar en una rara subpoblación de plasmablastos presentes en el centro germinal, que posteriormente migraría a la médula ósea donde se diferenciaría a células plasmáticas (CP). Los LCBGD ABC expresan niveles altos de genes propios de las CP, como *XBP1*, si bien no expresan una variedad de genes que caracterizan a las CP normales y al mieloma, lo que apunta a que derivan de células

	LCBGD GCB ¹	LCBGD ABC ²	LBPM ³
Origen celular	Células B del centro germinal	Células B posteriores al centro germinal	Células B tímicas posteriores al centro germinal (?)
Mutaciones somáticas "ongoing"	Sí	No	No
Mecanismos oncogénicos	Traslocación de <i>BCL2</i> Amplificación del gen <i>REL</i>	Activación constitutiva de NF-κB	Activación constitutiva de NF-κB Ganancias en 9p
Perfil de expresión génica	<i>BCL6, CD10, JNK3, LMO2</i>	<i>BCL6, IFR4, CCND2, XBP1, CD44</i>	<i>CD30, IL13RA1, TARC, JAK2, PDL2</i>
Pronóstico	Favorable	Desfavorable	Favorable
Frecuencia	40%	34%	8%

Figura 1. Resumen de las características moleculares, patogénicas y clínicas de los 3 subgrupos de linfomas de células B grandes difuso (LCBGD) identificados mediante análisis de los perfiles de expresión génica. LCBGD GCB: LCBGD semejantes a las células B del centro germinal; LCBGD ABC: LCBGD semejantes a las células B activadas; LBPM: linfoma de células B mediastínico primario.

en un estadio intermedio entre las células B del CG y las CP¹⁷. El LBPM presenta una firma de expresión génica que se distingue claramente de la de los LCBGD GCB y de la de los LCBGD ABC. Un hallazgo inesperado ha sido que el perfil de expresión del LBPM está estrechamente relacionado con el del linfoma de Hodgkin, aunque no es idéntico^{16,18}. Una explicación para estas similitudes podría ser que ambos tipos de linfomas se originen en la escasa población de células B que hay en el timo. No obstante, a pesar de este paralelismo entre las dos entidades existen importantes diferencias, como es la expresión de algunos genes propios de células B maduras en el LBPM que no se detecta en el linfoma de Hodgkin.

Uno de los argumentos más sólidos que apoya esta clasificación molecular de los LCBGD según su firma genética es que los tres subtipos de LCBGD utilizan distintos mecanismos oncogénicos. Se ha demostrado que la t(14;18) y la amplificación del oncogén *REL* observadas en los LCBGD GCB no aparecen nunca en los LCBGD ABC. Esto no debe confundirse con la sobreexpresión de *BCL2* que se observa en el grupo de los LCBGD ABC y que hay que atribuirle a un aumento en la transcripción de este gen y no a la t(14;18)¹⁹. Tanto los LCBGD ABC como los LBPM tienen una activación constitutiva de la ruta antiapoptótica NF-κB, hallazgo también demostrado en los estudios de expresión, que no se ha encontrado en los LCBGD GCB¹⁶. Esto ha llevado a ensayar moléculas inhibitoras de la cinasa IκB y se ha visto que resultaban tóxicas para las líneas celulares derivadas de los LCBGD ABC y de los LBPM, pero no tenían efecto sobre las líneas generadas a partir de de LCBGD GCB. Por tanto, la ruta de NF-κB es una diana terapéutica potencial para los LCBGD ABC y los LBPM²⁰.

Esta subdivisión del LCBGD en tres subgrupos explica buena parte de la variación en la supervivencia de

los pacientes con LCBGD. No obstante, si bien la mayoría de los pacientes con LCBGD GCB tienen un pronóstico favorable, y de los que presentan un LCBGD ABC tienen un pronóstico adverso, hay casos que no se ajustan a esta estratificación. Por este motivo se re-analizó la serie de enfermos con métodos estadísticos adaptados al análisis de supervivencia, lo cual permitió agrupar los genes predictores de supervivencia en cuatro firmas de expresión^{19,21}:

1. Firma de las células B del centro germinal: es la que se asocia de manera más fuerte con pronóstico favorable.
2. Firma del nódulo linfático: incluye una variedad de genes que al parecer reflejan la respuesta dentro del nódulo linfático de las células no tumorales a las células linfomatosas. Se asocia también con un pronóstico favorable que podría explicarse bien por el desarrollo de una respuesta inmunitaria que favorezca la respuesta a la quimioterapia, o por una posible dependencia de las células malignas de las señales del microambiente del nódulo linfático que impide su diseminación a otros territorios anatómicos.
3. Firma del complejo mayor de histocompatibilidad clase II: predice una supervivencia más prolongada. Se especula con la posibilidad de que la ausencia de expresión de estos genes contribuya a que las células tumorales consigan evadirse del sistema inmunitario.
4. Firma de proliferación: la expresión de estos genes se asocia a un pronóstico adverso.

Conviene reseñar que la capacidad de estos cuatro conjuntos de genes para predecir la supervivencia sólo ha sido reproducida en parte, en cohortes de pacientes diferentes, y por tanto es conveniente ampliar considerablemente la casuística para determinar su verdadera influencia. En este sentido, un trabajo posterior

ha reducido el número de genes con un posible impacto en la supervivencia a un grupo de 6 genes: *LMO2*, *BCL6* (pertenecientes a la firma del centro germinal) y *FN1* (perteneciente a la firma del nódulo linfático), cuya expresión se asocia con supervivencia más prolongada; y *BCL2*, *CCND2* y *SCYA3* (expresados en las células B activadas), cuya expresión se correlaciona con corta supervivencia²².

Linfoma de células del manto. Los LCM, definidos a nivel molecular por la t(11;14) que da lugar a un aumento de la proteína ciclina D1, poseen una firma genética específica que permite distinguirlos con precisión de otros subtipos de linfomas. También se ha observado que un grupo de LCM que no expresaban ciclina D1 compartía el mismo perfil de expresión génica que los LCM con expresión de ciclina D1. Algunos de estos LCM expresaban ciclina D2 o ciclina D3 lo que insinúa que estas ciclinas podrían sustituir funcionalmente a la ciclina D1. Los LCM que no expresaban ciclina D1 no diferían en la supervivencia de los que sí la expresaban²³.

La supervivencia de los LCM está íntimamente ligada al nivel de expresión de los genes relacionados con la proliferación celular, es decir aquellos que tienen una expresión más elevada en las células en división que en las quiescentes, de manera que un aumento en la expresión de estos genes se asocia a menor supervivencia. Además la estimación de la supervivencia mediante estos genes es mucho más exacta que la calculada a partir de la proporción de células positivas para Ki-67. Y lo que es más importante, esta predicción de la supervivencia se mantiene evaluando únicamente la expresión de 4 de los genes pertenecientes a la signatura de proliferación (*CDC2*, *ASPM*, tubulin α y *CENP-F*), lo que facilita su análisis mediante RCR en tiempo real²³. Los mecanismos moleculares, hasta ahora descritos, que justifican un aumento en la proliferación de los LCM afectan a la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Los estudios de microarrays también han intentado dar una explicación a la capacidad proliferativa tan variable de los LCM. Parece ser que el aumento en la expresión de los genes de proliferación y por tanto la menor supervivencia se correlaciona con una expresión de ciclina D1 más elevada, a expensas de isoformas de ARN mensajero (ARNm) más cortas, que son más estables debido a que han perdido secuencias que desestabilizan el ARN. Por tanto, la concentración intracelular de *CCND1* a través de su acción sobre diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular podría determinar la capacidad proliferativa de los LCM. Otro mecanismo molecular asociado al aumento en la expresión de los genes de proliferación y que también conlleva la progresión en el ciclo celular es la delección del *locus* *INK4a/ARF* (9p21), que codifica los genes supresores *P16* y *P14*²³.

Lógicamente, se trata de los primeros resultados sobre la expresión génica de los LCM obtenidos mediante microarrays y la aplicación clínica de la firma de proliferación tiene que ser validada en ensayos clínicos que incorporen la cuantificación de estos genes.

Linfoma folicular. El LF mantiene el programa de expresión génica propio del estado de diferenciación de las células B en el centro germinal, con la diferencia de

la elevada expresión de *BCL2* como resultado de la t(14;18). Los perfiles de expresión génica han revelado que las características moleculares de las células inmunes no tumorales que acompañan a los linfocitos B neoplásicos pueden ser determinantes a la hora de entender la evolución clínica tan heterogénea de este subtipo de linfomas. Las últimas investigaciones indican que en el LF se puede identificar dos firmas genéticas que comprenden genes expresados en células encargadas de la respuesta inmunitaria: la firma de respuesta inmunitaria 1, que está integrada fundamentalmente por genes que codifican proteínas restringidas a las células T (*CD7*, *CD8*, *LEF1*) y que se asocia con una supervivencia prolongada, y la firma de respuesta inmunitaria 2, que incluye genes expresados por macrófagos y células dendríticas (*CD64*, *TLR5*, *SEPT10*, *LGMN*) y que se asocia con una supervivencia corta²⁴.

Leucemia linfática crónica

Los primeros estudios con microarrays de expresión realizados en LLC identificaron una firma genética común a todas las LLC que la diferenciaba del resto de los síndromes linfoproliferativos B, y que era independiente del estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgV_H)^{25,26}. Sin embargo, cuando se realizó un análisis supervisado de las LLC, restringido únicamente a investigar las diferencias entre las LLC mutadas y las no mutadas, se descubrió un grupo reducido de genes que discriminaba correctamente los dos grupos. Uno de estos genes es *ZAP70* que codifica una proteína tirosinasa normalmente expresada en las células T, y cuyo aumento de expresión predice el estado no mutado de las LLC en el 93 % de los pacientes^{25,26}.

Las técnicas de hibridación *in situ* fluorescente han puesto de manifiesto que el 80 % de las LLC presentan alteraciones cromosómicas. Las más frecuentes son las que suponen pérdida de material genómico en 13q14, 11q22-23, 17p13 y 6q21, y ganancias del cromosoma 12. Mediante microarrays de expresión se han identificado los genes desregulados para cada una de estas alteraciones citogenéticas, y se ha observado una correlación entre la localización cromosómica de los genes anormalmente expresados y las alteraciones cromosómicas respectivas, especialmente en el caso de las delecciones de 17p13, donde más de la mitad de los genes infraexpresados se localizan en esta banda cromosómica. Este hallazgo indica que el "efecto dosis génica" puede ejercer un papel en la patogénesis de la LLC²⁷.

Recientemente, el análisis de los perfiles de expresión de los microARN ha detectado un grupo de miARN localizados en 13q14 que está infraexpresado en más de la mitad de las LLC, hallazgo que coincide con la incidencia de delecciones en dicha banda cromosómica²⁸. Por otro lado, se ha observado que los bajos niveles de estos miARN inducen una activación de *BCL2* que puede ser clave en la patogénesis de la LLC²⁹.

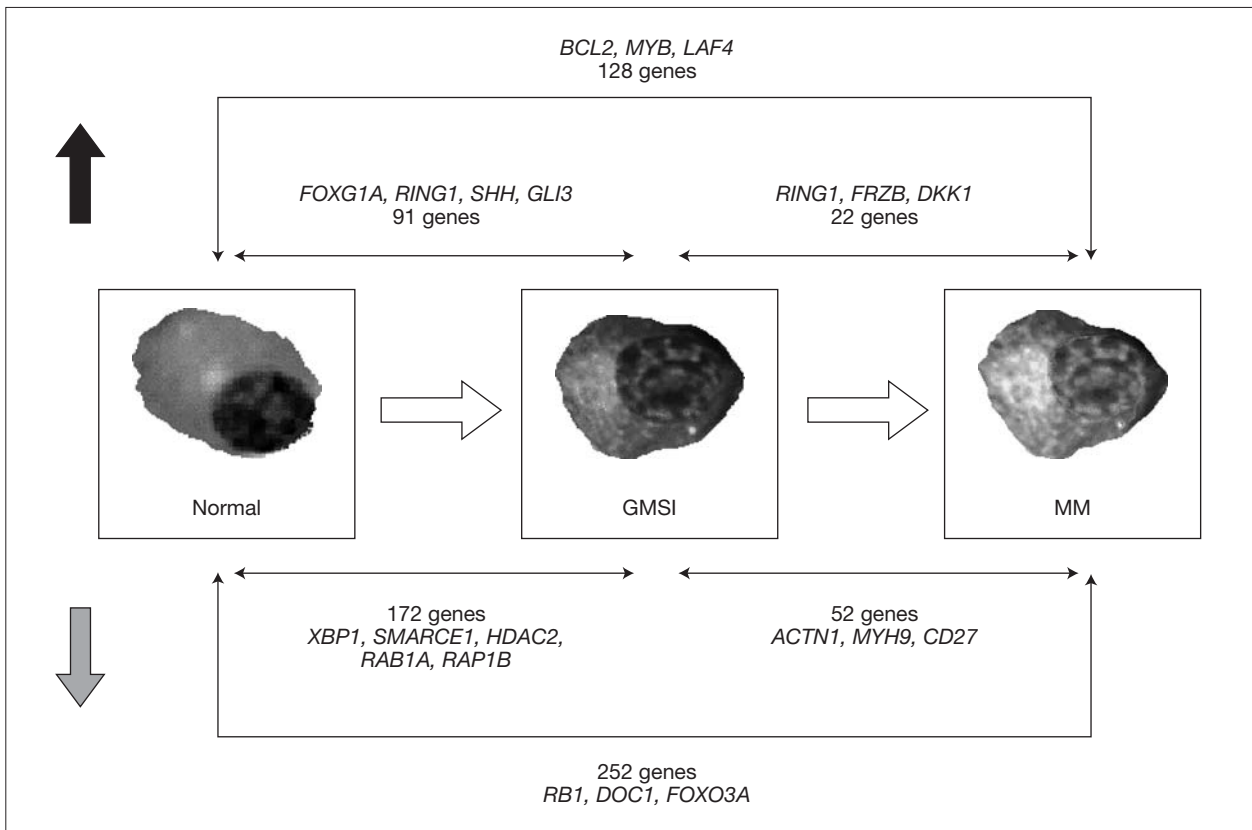


Figura 2. Esquema de los genes desregulados en la transición de la célula plasmática (CP) normal a la CP de la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI), y de ésta a la CP del mieloma múltiple (MM). La flecha negra indica aumento de expresión y la gris disminución. Modificada de Davies et al³¹.

Mieloma múltiple

Las dificultades técnicas que entraña obtener una población pura de CP no han impedido que se haya analizado un número extenso de pacientes con mieloma múltiple y con gammapatías monoclonales de significado incierto (GMSI)³⁰. Uno de los objetivos principales ha sido explorar los genes desregulados en las CP del mieloma múltiple y de las GMSI en relación a las CP normales. Se ha observado que la mayor parte de los cambios de expresión se producen entre las CP normales y las de las GMSI, y sólo un reducido número de genes muestra diferente expresión cuando se comparan los mielomas múltiples y las GMSI (fig. 2)³¹. Recientemente mediante microarrays se ha demostrado que la expresión de las ciclinas D (D1, D2 y D3) está aumentada en la práctica totalidad de los mielomas múltiples, lo que ha llevado a plantear la hipótesis de que la desregulación de estas ciclinas sea el fenómeno oncogénico que vertebraba la patogenia del mieloma múltiple. Utilizando esta hipótesis como punto de partida se ha propuesto una clasificación del mieloma múltiple que se basa en la expresión de las ciclinas D y en las translocaciones de *IGH*³². Otra importante aportación del análisis de los perfiles de expresión de las células mielomatosas ha sido revelar la existencia de marcadores genéticos predictores de la enfermedad ósea. El más importante de ellos,

DKK1 (inhibidor de la diferenciación osteoblástica) está sobreexpresado en los mielomas múltiples con lesiones óseas³³.

Conclusiones

Los análisis de la expresión génica mediante microarrays constituyen una herramienta útil y reproducible, cuya aplicación en el campo de las neoplasias hematológicas ha servido para definir mejor algunos diagnósticos y para profundizar en el conocimiento de su patogenia, tal y como se ha expuesto en esta revisión. No obstante, el entusiasmo despertado en los primeros momentos de su desarrollo se ha visto ensombrecido por la no siempre adecuada interpretación de los resultados, como consecuencia de la dificultad que entraña el análisis estadístico, y por su difícil implantación en la rutina clínica. En estos momentos se podría decir que los estudios de expresión mediante microarrays han generado más preguntas que respuestas a la hora de explicar los mecanismos biológicos del cáncer. Si bien, este hecho habría que interpretarlo más como un reflejo de la complejidad y variabilidad de las células neoplásicas, que como una limitación de esta tecnología. Es probable que con el paso del tiempo muchos de los descubrimientos im-

portantes en la patogenia del cáncer asienten en las cuestiones surgidas de los experimentos actuales. Por otro lado, hay que hacer hincapié en que la metodología de los microarrays constituye un avance tecnológico trascendental en la investigación biomédica, promovido a su vez por el gran desarrollo de la bioinformática, y que ha conducido a la expansión de una nueva forma de abordar los sistemas biológicos, la llamada biología *in silico*. De hecho se puede decir que la tecnología de microarrays representa la estrategia metodológica que más ha transformado la biología molecular en los últimos años. Su versatilidad ha permitido que en la actualidad se puedan escudriñar mediante esta técnica casi todos los elementos biológicos de la célula, desde el ADN hasta el ARN y las proteínas³⁴. Y lo que es más importante, se están desarrollando plataformas de microarrays para poder estudiar las interacciones entre todas estas moléculas, lo que permitirá un conocimiento de la regulación de los procesos biológicos al más alto nivel.

Bibliografía

- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-70.
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996;14:1675-80.
- Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286:531-7.
- Gutiérrez NC, López-Pérez R, Hernández JM, et al. Gene expression profile reveals deregulation of genes with relevant functions in the different subclasses of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19:402-9.
- Schoch C, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Acute myeloid leukemias with reciprocal rearrangements can be distinguished by specific gene expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:10008-13.
- Valk PJ, Verhaak RG, Beijnen MA, et al. Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1617-28.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2004;350:1605-16.
- Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, et al. Global approach to the diagnosis of leukemia using gene expression profiling. *Blood*. 2005;106:1189-98.
- Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc + AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*. 2005;106:899-902.
- Haferlach T, Schoch C, Schnittger S, et al. Distinct genetic patterns can be identified in acute monoblastic and acute monocytic leukaemia (FAB AML M5a and M5b): a study of 124 patients. *Br J Haematol*. 2002;118:426-31.
- Haferlach T, Kohlmann A, Schnittger S, et al. AML M3 and AML M3 variant each have a distinct gene expression signature but also share patterns different from other genetically defined AML subtypes. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;43:113-27.
- Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. 2002;1:133-43.
- Armstrong SA, Staunton JE, Silverman LB, et al. MLL translocations specify a distinct gene expression profile that distinguishes a unique leukemia. *Nat Genet*. 2002;30:41-7.
- Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 2002;1:75-87.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403:503-11.
- Rosenwald A, Wright G, Leroy K, et al. Molecular diagnosis of primary mediastinal B cell lymphoma identifies a clinically favorable subgroup of diffuse large B cell lymphoma related to Hodgkin lymphoma. *J Exp Med*. 2003;198:851-62.
- Wright G, Tan B, Rosenwald A, et al. A gene expression-based method to diagnose clinically distinct subgroups of diffuse large B cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003.
- Savage KJ, Monti S, Kutok JL, et al. The molecular signature of mediastinal large B-cell lymphoma differs from that of other diffuse large B-cell lymphomas and shares features with classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2003;102:3871-9.
- Rosenwald A, Wright G, Chan WC, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med*. 2002;346:1937-47.
- Lam LT, Davis RE, Pierce J, et al. Small molecule inhibitors of I κ B kinase are selectively toxic for subgroups of diffuse large B-cell lymphoma defined by gene expression profiling. *Clin Cancer Res*. 2005;11:28-40.
- Staudt LM, Dave S. The biology of human lymphoid malignancies revealed by gene expression profiling. *Adv Immunol*. 2005;87:163-208.
- Lossos IS, Czerwinski DK, Alizadeh AA, et al. Prediction of survival in diffuse large-B-cell lymphoma based on the expression of six genes. *N Engl J Med*. 2004;350:1828-37.
- Rosenwald A, Wright G, Wiestner A, et al. The proliferation gene expression signature is a quantitative integrator of oncogenic events that predicts survival in mantle cell lymphoma. *Cancer Cell*. 2003;3:185-97.
- Dave SS, Wright G, Tan B, et al. Prediction of survival in follicular lymphoma based on molecular features of tumor-infiltrating immune cells. *N Engl J Med*. 2004;351:2159-69.
- Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med*. 2001;194:1625-38.
- Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med*. 2001;194:1639-47.
- Haslinger C, Schweifer N, Stilgenbauer S, et al. Microarray gene expression profiling of B-cell chronic lymphocytic leukemia subgroups defined by genomic aberrations and VH mutation status. *J Clin Oncol*. 2004;22:3937-49.
- Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:15524-9.
- Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:13944-9.
- Zhan F, Hardin J, Kordsmeier B, et al. Global gene expression profiling of multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and normal bone marrow plasma cells. *Blood*. 2002;99:1745-57.
- Davies FE, Dring AM, Li C, et al. Insights into the multistep transformation of MGUS to myeloma using microarray expression analysis. *Blood*. 2003;102:4504-11.
- Bergsagel PL, Kuehl WM, Zhan F, et al. Cyclin D dysregulation: an early and unifying pathogenic event in multiple myeloma. *Blood*. 2005;106:296-303.
- Tian E, Zhan F, Walker R, et al. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med*. 2003;349:2483-94.
- Hoheisel JD. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*. 2006;7:200-10.

Proteómica y aplicaciones en biomedicina

E.J. CORRALES, E. SANTAMARÍA Y J. FERNÁNDEZ-IRIGOYEN

Laboratorio de Proteómica. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra. Pamplona.

Generalidades

La historia natural de una enfermedad implica una progresión desde etapas tempranas en las que se produce una leve perturbación reversible de la homeostasis celular, hacia estadios avanzados que se caracterizan por un incremento progresivo en la dimensión e impacto de la alteración patológica, hasta que ésta se hace irreversible. La proteómica es una disciplina que ha despertado enormes expectativas en la investigación biomédica por su potencial en la identificación de biomarcadores específicos que permitan diagnosticar, clasificar, pronosticar y predecir enfermedades, así como en la definición de nuevas dianas terapéuticas. Es indudable que la secuenciación de los genomas de diferentes organismos, incluido el humano, junto con el desarrollo de técnicas que permiten estudiar la expresión de todos los genes de un organismo en un único experimento marca un punto de inflexión en la forma de estudiar nuestra propia biología. Sin embargo, el genoma es estático y por ello, sería simplista in-

tentar explicar las alteraciones funcionales que condicionan las respuestas adaptativas o están asociadas a la progresión de enfermedades a nivel transcripcional únicamente, sin tener en cuenta la secuencia de procesos que se producen desde la transcripción de un gen hasta que su producto funcional es activo (fig. 1). El término proteómica fue introducido por vez primera en 1995, aunque el concepto apareció en la biología moderna unos años antes cuando Anderson y Anderson propusieron la creación de un atlas molecular de las proteínas humanas¹. La proteómica se define como el estudio del proteoma, término análogo a genoma, que se refiere al conjunto de proteínas de un órgano, una célula, un tejido o un organismo completo. El proteoma es tremendamente dinámico, no es posible hablar de un proteoma único a menos que la definición inicial se complemente con parámetros tanto genéticos como ambientales que condicionan en gran medida el repertorio de especies proteicas que lo constituyen. Esta plasticidad del proteoma es esencial para regular con precisión las funciones celulares mediante mecanismos de control complementarios a los

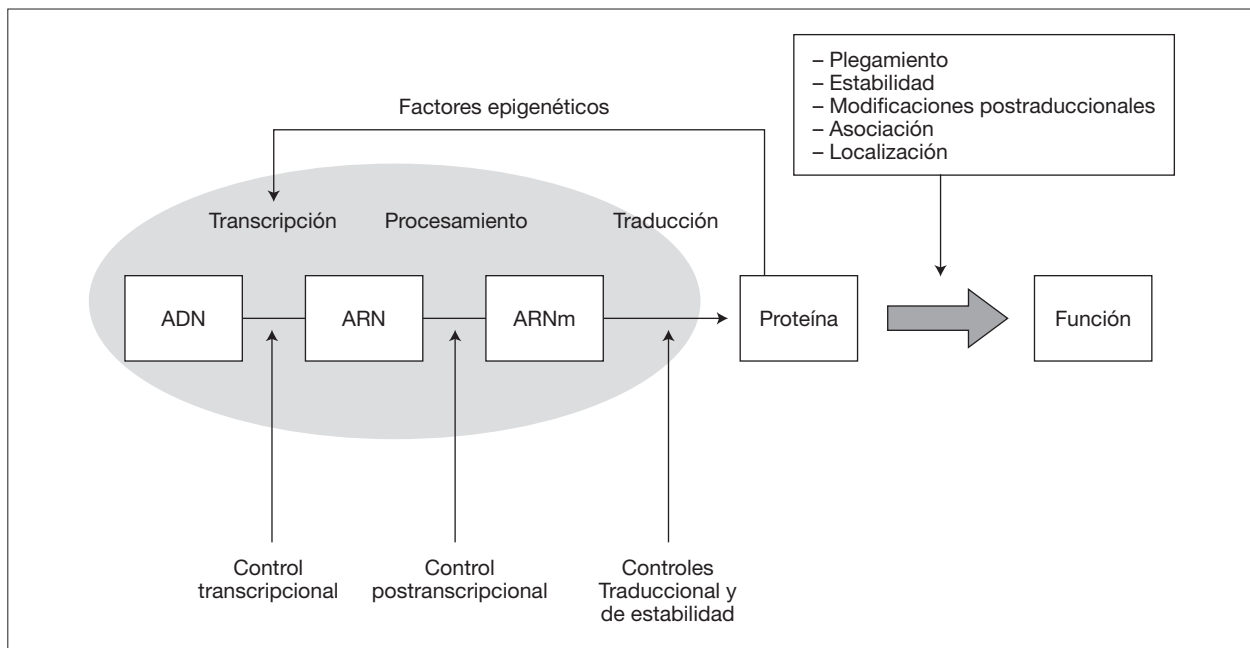


Figura 1. Esquema representativo de la relación entre genoma, transcriptoma, proteoma y funciones celulares.

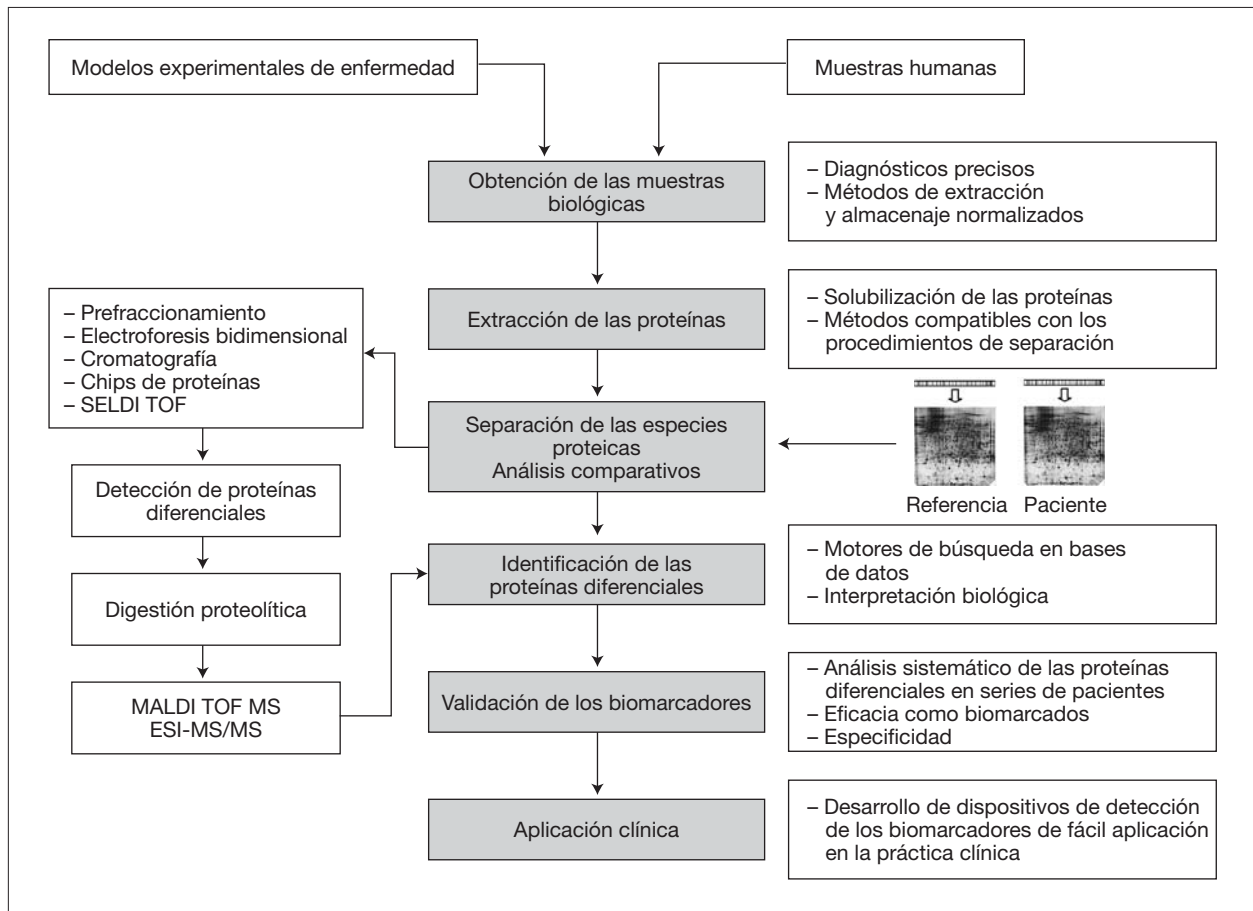


Figura 2. Esquema representativo de las diferentes etapas en un experimento de proteómica diferencial.

meramente transcripcionales que permitan reacciones rápidas y eficaces a estímulos externos y, así, asegurar respuestas que garanticen la supervivencia. La función de una proteína está condicionada por su localización subcelular, las interacciones con otras proteínas y por mecanismos de regulación postranscripcional que hacen necesario revisar, o al menos matizar, el axioma un gen, una proteína. El estudio de todos estos factores es imprescindible para profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de enfermedades, pero supone un reto de una complejidad sin precedentes. Los experimentos de proteómica diferencial², cuyo objetivo es el descubrimiento de especies proteicas alteradas en una patología, especialmente en biofluidos, son quizá los más relevantes en biomedicina dado que los resultados que de ellos se derivan (no los experimentos de proteómica en sí) pueden tener una aplicación clínica inmediata. En un experimento de proteómica diferencial podemos distinguir diferentes fases o procedimientos que es necesario normalizar y estandarizar para asegurar la reproducibilidad del ensayo ya que de ello depende en gran medida el éxito del análisis (fig. 2).

– *Recogida y almacenamiento de muestras.* Uno de los factores clave en un experimento de proteómica es el diseño de estrategias para la recolección y almace-

namiento de las muestras biológicas que aseguren la integridad del proteoma y la reproducibilidad de los análisis. Además, es esencial disponer diagnósticos precisos que permitan establecer correlaciones claras entre los parámetros clínicos, histológicos y moleculares.

– *Extracción y solubilización de las proteínas.* Es necesario extraer y solubilizar las proteínas con la menor contaminación posible de otros biomateriales (lípidos, ácidos nucleicos, etc.). En general, los medios de extracción y solubilización contienen detergentes (detergentes no iónicos como el CHAPS) que contribuyen a la solubilización de proteínas de membrana y a su separación de componentes lipídicos, agentes reductores (DTT o tributilfosfina) que reducen los puentes disulfuro y previenen la oxidación de proteínas y agentes caotrópicos (urea, tiourea) que eliminan las interacciones entre proteínas e inducen su desnaturalización.

– *Separación y detección de las proteínas diferenciales.* El objetivo es resolver las complejas mezclas de proteínas de las muestras biológicas combinando diversos procedimientos cromatográficos y electroforéticos. El método de referencia es la electroforesis bidimensional que permite la separación de las especies peptídicas de acuerdo a su punto isoeléctrico y a su peso molecular. Se obtienen así patrones con

unas 3.000 especies proteicas que se pueden comparar utilizando programas informáticos específicos para detectar las alteraciones asociadas a la patología en estudio. Está claro, sin embargo, que la complejidad del proteoma requiere métodos de prefraccionamiento habitualmente basados en técnicas cromatográficas, que permitan el estudio de un mayor número de especies proteicas y, sobre todo, analizar componentes minoritarios, especialmente en fluidos biológicos.

- **Identificación de las proteínas de interés.** La identificación de las proteínas requiere su digestión con proteasas específicas (la tripsina es la enzima de referencia) y el análisis de los péptidos generados mediante dos tipos de espectrómetros de masas. En primer lugar el hidrolizado tróptico se analiza en instrumentos MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*) que permiten medir las masas moleculares de los fragmentos peptídicos generados (huella peptídica). Este método presenta dos ventajas: su relativamente fácil manejo y la elevada capacidad de análisis que facilita el abordaje de proyectos de alto rendimiento. Alternativamente, los instrumentos ESI-MS/MS (*electrospray ionization tandem mass spectrometry*), generalmente conectados a nano-cromatógrafos capilares, permiten la secuenciación y una caracterización más detallada de los péptidos, pero requieren una elevada especialización y ofrecen una menor capacidad de análisis. La información obtenida en los espectrómetros de masas se procesa con la ayuda de programas informáticos especializados que proporcionan la identidad de la proteína en base a la huella peptídica o secuencia obtenida y la información disponible en las bases de datos de proteínas (SwissProt, TrEMBL, Ensembl, NCBI, etc.).

A pesar de que los recientes avances han aumentado enormemente el grado de eficacia de los análisis tanto de separación como de espectrometría de masas, la proteómica es un área emergente que integra múltiples tecnologías en continua evolución^{3,4}. Es necesario desarrollar nuevas técnicas que nos permitan explorar con mayor precisión el proteoma en todo su rango dinámico, algo especialmente importante en el estudio de biofluidos, así como herramientas bioinformáticas que permitan analizar, integrar, interpretar e intercambiar los datos generados. Es evidente que el estudio del proteoma humano requiere de un esfuerzo pluridisciplinar que integre los trabajos de expertos en el área de la biología, de la informática, de la física y de la medicina y, así, generar nuevos conceptos en biología, identificar nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas o determinar el mecanismo de acción de fármacos.

Identificación de proteínas asociadas a la progresión de enfermedades hepáticas mediante proteómica diferencial

La aplicación de técnicas analíticas que permiten resolver mezclas complejas de proteínas como la elec-

troforesis bidimensional en asociación con diversos métodos de espectrometría de masas que facilitan la identificación y caracterización de las proteínas, ha permitido definir perfiles proteómicos específicos de algunos tipos de enfermedades. Sin embargo, no es fácil deducir conclusiones prácticas de los datos disponibles en la literatura especializada. En el caso particular del hepatocarcinoma (HCC), se han realizado varios estudios en los que, mediante la utilización de proteómica diferencial, se consigue un panel de proteínas específicamente alteradas que se proponen como marcadores y, en algún caso, se les asigna un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, los repertorios de proteínas derivados de los diferentes análisis tienen poco en común por lo que su valor como marcadores de HCC es relativo. Las discrepancias entre los trabajos realizados en los distintos laboratorios podrían tener su origen en diferencias en la metodología empleada así como en la naturaleza o tipo de muestra analizada. Cada muestra representaría un punto concreto de una secuencia en progresión que se caracterizará por acumular una serie de alteraciones específicas, que, a su vez, vendrán condicionadas por el sustrato genético de cada individuo⁵. Esta observación pone de manifiesto la necesidad de establecer unas normas internacionales de estandarización, tanto a nivel metodológico, como a nivel diagnóstico, para poder obtener resultados comparables. Además, la utilización de modelos experimentales en los que el sustrato genético o las condiciones medioambientales no suponen una fuente de heterogeneidad y permiten realizar estudios longitudinales desde estadios preneoplásicos, pueden potenciar de manera decisiva la identificación de proteínas asociadas al proceso de hepatocarcinogénesis.

La S-adenosilmetionina (AdoMet) es una molécula esencial en el mantenimiento de la homeostasis hepática. La AdoMet participa en casi tantas reacciones como el ATP: participa en la síntesis de homocisteína, poliaminas y es el principal donante de grupos metilo de la célula, pero además, en los hepatocitos, regula funciones celulares esenciales como la proliferación, diferenciación y muerte celular. De acuerdo con estas observaciones, diversos estudios sugieren que el descenso en los niveles de AdoMet es uno de los factores que participan en la patogénesis de enfermedades hepáticas⁶. Para investigar los mecanismos por los cuales tienen lugar esas funciones no tradicionales del AdoMet hemos caracterizado las alteraciones en el proteoma hepático y sérico de un ratón *knock-out* para el gen *MAT1A* (gen que codifica para la enzima responsable de la síntesis de AdoMet en hígado adulto) que desarrolla progresivamente esteatohepatitis no alcohólica (EHNA) y HCC^{7,8}. La combinación de la información obtenida con el análisis de muestras humanas nos ha permitido identificar proteínas y, por tanto alteraciones funcionales, asociadas al desarrollo de estas patologías así como identificar potenciales biomarcadores.

El análisis de los perfiles diferenciales de expresión observados entre ratones WT y *MAT1A*^{-/-} de hasta 8 meses, momento en que se desarrolla la EHNA, indican

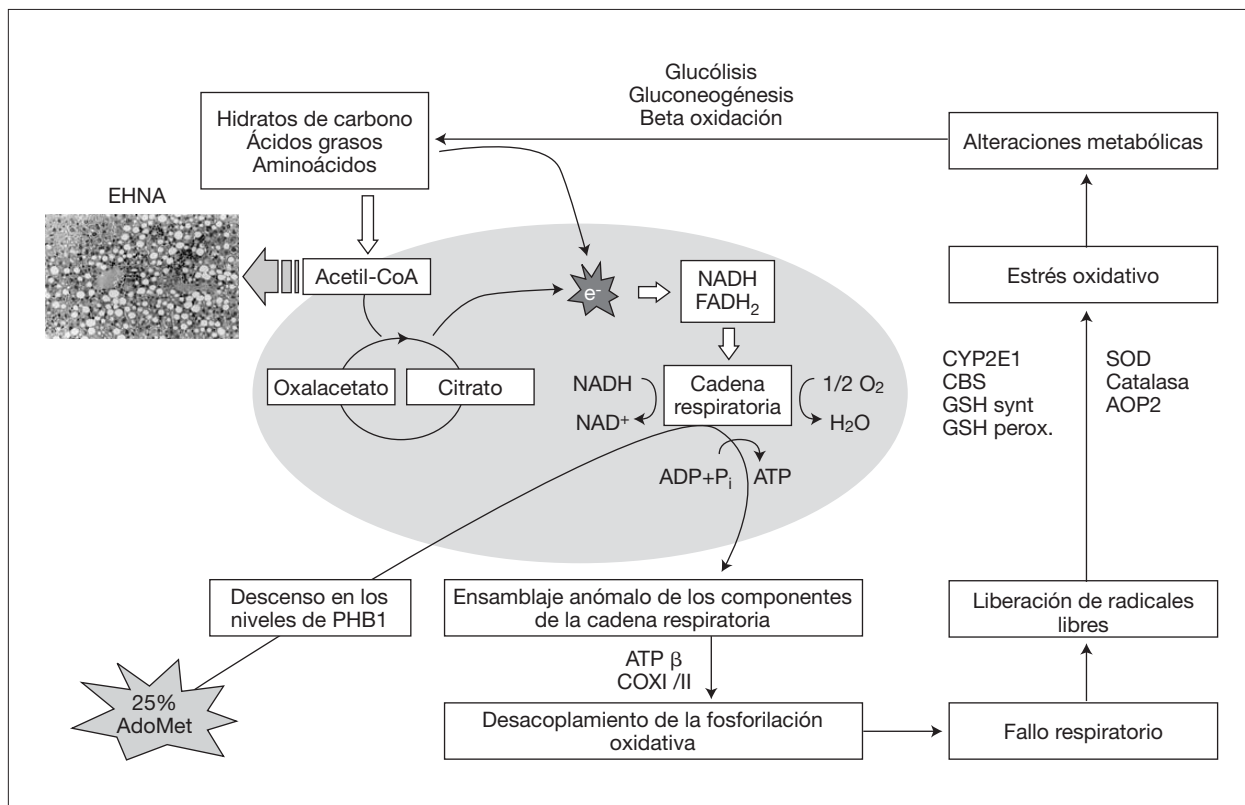


Figura 3. Esquema de la patogénesis de EHNA en un modelo de deficiencia crónica de AdoMet. La disminución de los niveles hepáticos de AdoMet induce la reducción de los niveles de PHB y condiciona una deficiente actividad respiratoria mitocondrial, generando estrés oxidativo que, junto con las alteraciones en el metabolismo de glúcidos, lípidos y aminoácidos, participan en el desarrollo de EHNA.

que una deficiencia en AdoMet tiene un efecto pleiotrópico en el hígado, alterando funciones hepáticas esenciales⁶. Inicialmente identificamos 117 proteínas diferenciales en el hígado del ratón *MAT1A*^{-/-} que indicaban una importante respuesta al estrés oxidativo, alteraciones en el metabolismo de azúcares, lípidos y aminoácidos, así como una disminución de la respiración mitocondrial, condicionada por la reducción en los niveles de prohibitina (PHB)⁹. Experimentos realizados en cultivos primarios de hepatocitos demuestran que esta proteína es una diana directa de AdoMet. PHB es necesaria para el correcto plegamiento y ensamblaje de los complejos respiratorios y su deficiencia, se asocia con una carencia estructural de las proteínas integrantes que son degradadas por las proteasas mitocondriales. De acuerdo con estos datos, identificamos una disminución de las subunidades I y II de la citocromo C oxidasa en el hígado KO⁹. El hecho de que la reducción de estas tres proteínas se produzca meses antes de que las lesiones histológicas sean detectables en los ratones *MAT1A*^{-/-} junto con los resultados que indican que estas deficiencias también se producen en el hígado de ratones obesos (*ob/ob*) y humanos obesos, situaciones propensas al desarrollo de EHNA, sugiere que estas proteínas podrían ser consideradas como marcadores precoces de esta enfermedad⁹ (fig. 3).

La hepatocarcinogénesis es un proceso lento y multifactorial que implica la acumulación progresiva de

cambios a nivel genómico y proteómico que alteran el fenotipo de los hepatocitos induciendo la aparición de intermediarios celulares que evolucionan a HCC. De acuerdo a estas observaciones, nuestros resultados indican una elevada heterogeneidad en los perfiles proteómicos de los nódulos tumorales de ratones *MAT1A*^{-/-}, en comparación a la observada en el hígado WT o en otras patologías como EHNA. La acumulación estocástica de errores en la programación celular durante el desarrollo de los tumores, podría explicar el incremento de tres veces en la variabilidad observada al comparar nódulos procedentes del mismo hígado. Sin embargo, el hecho de que la variabilidad proteómica aumente hasta 10 veces al comparar nódulos procedentes de diferentes ratones¹⁰, sugiere que factores específicos de cada individuo ejercen una presión selectiva sobre las lesiones preneoplásicas estableciendo un sistema de selección darwiniano⁵ que condiciona la evolución en cada caso. La comparación de los proteomas de hígado WT y nódulos tumorales del ratón *MAT1A*^{-/-} nos ha permitido identificar 154 proteínas diferenciales¹⁰, que proporcionan una huella proteómica de HCC y establecer una base molecular para algunas de las alteraciones que caracterizan la biología del tumor. El análisis funcional de estas alteraciones indica que en los hepatocitos transformados se produce una disminución de la actividad metabólica así como un incremento en proteínas asociadas a respuestas a estrés. Estas proteínas se localizan

Tabla 1. Potenciales marcadores de HCC. Se incluyendo aquellas proteínas diferenciales identificadas en al menos el 50 % de los tumores de ratones MAT1A-/- analizados

Proteína	N.º de acceso	Función	Casos
Metionina adenosiltransferasa*	Q91X83	Síntesis de Adomet	6/6
Carbónico anhidrasa III*	P16015	Hidratación reversible del dióxido de carbono	6/6
Proteína Rik 1300018L09	Q9DBB8	Catabolismo de los hidrocarburos policíclicos	5/6
Glutamina sintetasa	P15105	Homeostasis del nitrógeno	5/6
Proteína de unión a selenio 2*	Q63835	Unión de selenio y acetomifeno	5/6
Adenosilhomocisteinasa	P50247	Regula los niveles de S-adenosilhomocisteína	5/6
Proteína antioxidante 2*	O08709	Implicada en la regulación redox de la célula	5/6
Regucalcina	Q64374	Homeostasis del calcio	5/6
Apolipoproteína A1*	Q00623	Transporte reverso de colesterol al hígado	4/6
Apolipoproteína E	P08226	Unión e internalización de lipoproteínas	4/6
Albumina**	P07724	Regula la presión osmótica de la sangre	4/6
Sorbitol deshidrogenasa*	Q64442	Implicada en la vía de los polioles	3/6
Fenilalanina 4 hidroxilasa	P16331	Catabolismo de la fenilalanina	3/6
Malato deshidrogenasa*	P14152	Implicada en el ciclo de Krebs	3/6
Arginasa 1*	Q61176	Degradación de la arginina (ciclo de la urea)	3/6
Fosfoglucomutasa	Q9D0F9	Degradación/síntesis de glucosa	3/6
Ornitina aminotransferasa*	P29758	Controla los niveles de L-ornitina en los tejidos	3/6
Ornitina carbamoiltransferasa	P00481	Participa en la biosíntesis de arginina	3/6
Proteína transportadora de esterol 2	P32020	Transporta grupos acil-CoA	3/6
Glicina N-metiltransferasa*	Q91WN7	Metilación de la glicina	3/6
Alcohol deshidrogenasa*	Q9JII6	Metabolismo de etanol	3/6
Proteína Rik 2810435D12	Q9CYW4	Actividad hidrolasa	3/6
Aldehído deshidrogenasa mit.**	P47738	Implicada en la utilización del etanol	3/6
Transferasa de glutatión Mu1**	P10649	Detoxificación de electrófilos hidrofóbicos	3/6
Transferasa de glutatión P2	P46425	Detoxificación de electrófilos hidrofóbicos	3/6
Proteína de choque térmico de 71 kDa*	P63017	Proteína de estrés	3/6
Proteína disulfuro isomerasa**	P09103	Chaperonina, isomerasa con actividad redox	3/6

*Alteraciones que se detectaron meses antes de que se manifestase la ninguna enfermedad de acuerdo a parámetros histológicos.

**Modificaciones postraduccionales o procesamientos anómalos. Se destacan en *negrita* las alteraciones que han sido identificadas en muestras humanas.

zan preferentemente en la mitocondria, citoplasma, retículo endoplásmico y citoesqueleto. La respuesta a estrés se puede considerar una adaptación a la presión impuesta por el déficit de AdoMet^{7,8}. De las 154 proteínas alteradas, únicamente 27 fueron detectadas como diferencias en al menos el 50 % de los tumores analizados y, por ello fueron consideradas potenciales marcadores de HCC¹⁰ (tabla 1). Es interesante resaltar que este grupo de alteraciones seleccionadas por su alta incidencia reproducen el fenotipo funcional de los tumores descrito anteriormente: enzimas metabólicas cuya alteración supone un deficiente metabolismo de hidratos de carbono (fosfoglucomutasa), aminoácidos (arginasa 1, ornitina carbamoiltransferasa), metabolismo de grupos metilo (MAT, SAH hidrolasa, GNMT), metabolismo y transporte de lípidos (NSLTP, Apo A-I, ApoE) e incremento en proteínas implicadas en detoxificación y respuesta a estrés (proteína de estrés 71, proteína disulfuro isomerasa, isoformas de la glutatión-S-transferasa). Además, la proteína de unión a selenio se ha relacionado con fibrosis y con envejecimiento, por lo que su disminución podría favorecer el desarrollo del tumor. La alteración de la actividad sorbitol deshidrogenasa (SDH) ha sido utilizada como parámetro indicativo de daño hepático. El descenso en SDH puede estar relacionado con la pérdida de capacidad de metabolizar sorbitol en las células transformadas. La SMP30 o regucalcina es una proteína de

unión a calcio que desempeña un papel decisivo en el mantenimiento de la homeostasis y función celular en el hígado. Finalmente, glutamina sintasa (GS) y ornitina aminotransferasa (OAT) son enzimas implicadas en el metabolismo de la glutamina cuya sobreexpresión, en parte a través de la ruta Wnt/ β -catenina, está asociada con la carcinogénesis hepática. En roedores, se ha demostrado que un fenotipo GS positivo favorece el crecimiento tumoral, aunque no todas las lesiones presentan esta alteración. La disminución de los niveles de GS en los tumores del ratón MAT1A-/- podría ser un rasgo característico de este modelo experimental de deficiencia de AdoMet en hígado. Sin embargo, nuestros resultados no permiten descartar posibles modificaciones postraduccionales que den lugar a una nueva especie no detectable en las condiciones de análisis utilizadas.

La utilización del ratón MAT1A-/- como sistema de filtrado previo al análisis de muestras humanas, ha demostrado ser eficaz en la identificación de marcadores de HCC. La complejidad proteómica se ve reducida a 27 potenciales marcadores deducidos de los análisis con el ratón MAT1A-/-, de los que 15 han sido validados en HCC humano mediante estudios de PCR cuantitativa¹⁰. La disminución de OCT, OAT, AldDH, CAIII, Apo A-I y P4H únicamente se observó en tumores y, por ello podrían considerarse marcadores de transformación neoplásica. Sin embargo, las alteracio-

nes en ADH, AOP2, SMP30, NSLTP, SDH, SAP y PGM, así como en MAT1A y GNMT¹¹ fueron detectadas en hígado cirrótico, independientemente de que el tejido analizado estuviera asociado o no a un tumor. La cirrosis se considera una situación de alto riesgo para el desarrollo de HCC y, por ello, estas alteraciones, que permanecen en el tumor, podrían representar marcadores precoces que permiten la definición de un estadio preneoplásico. El análisis de estos marcadores en muestras de tejido sano o infectado por virus C o B procedentes de hígados con HCC resultó negativo con la única excepción de la ADH, que previamente se ha asociado a procesos de lesión hepática de muy diversa etiología. Finalmente, a pesar de no haber alcanzado significación estadística, HSC71 y SBP, estaban alteradas en el 40 % de los casos analizados, porcentajes similares a los descritos en otros estudios. Además, los resultados obtenidos en el caso de la GS son compatibles con los datos previamente publicados que indican que, sólo un subgrupo de HCC humanos son positivos para GS, a pesar de que la glutamina es esencial para el crecimiento de células en proliferación. Meses antes de que ninguna lesión neoplásica fuera detectable, hemos detectado el incremento en el suero de una isoforma de Apo A-I altamente oxidada, tanto en el modelo de hepatocarcinogénesis *MAT1A*-/- como en pacientes con HBV y HCC¹². En resumen, en nuestro estudio se describe un repertorio de marcadores de HCC, algunos tempranos y otros específicos de tumor, que podría resultar de gran utilidad en el seguimiento de la población de riesgo y en la detección precoz de esta enfermedad.

Consideraciones finales

La posibilidad de explorar el proteoma de los sistemas biológicos en base a tecnologías cada vez más potentes abre unas expectativas sin precedentes en el estudio de la patogénesis molecular de enfermedades así como en la identificación de paneles de biomarcadores específicos que permitan diagnosticar, clasificar, pronosticar y predecir enfermedades, definir nuevas dianas terapéuticas o predecir el comportamiento a fármacos. Indudablemente se trata de un área emergente cuyo desarrollo requiere la contribución de especialistas en diversas áreas, clínica, bioquímica, informática, física, etc., para asegurar la disponibilidad de muestras clasificadas sistemáticamente y compatibles con los procedimientos analíticos posteriores, el desarrollo de nuevas tecnologías más eficaces así como de métodos de trabajo estandarizados que per-

mitan la obtención de resultados reproducibles en formatos accesibles e intercambiables.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por: el acuerdo entre FIMA y el "UTE proyecto CIMA"; Plan Nacional I+D+I 2004-03538 y 2004-01855 from Ministerio de Educación y Ciencia; grant ROI AA-12677 from the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism; grant R01 AT1576 from the National Center for Complementary and Alternative Medicine; grant RO1 AA013847 from the National Center for Complementary and Alternative Medicine; C03/02 y G03/015 del Instituto de Salud Carlos III; FIS PI040819 y CP04/00123 del Ministerio de Sanidad y Consumo. Ortiz de Landazuri del Gobierno de Navarra; STREP FP6-2004-LIFESCIHEALTH-5 018649 del 6th framework program of the UE; PROFIT FIT-340000-2005-353 del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. Este laboratorio es miembro del Instituto Nacional de Unidades de Proteómica, ProteoRed.

Bibliografía

1. Anderson NG, Anderson L. The Human Protein Index. *Clin Chem.* 1982;28:739-48.
2. Monteoliva L, Albar JP. Differential proteomics: an overview of gel and non-gel based approaches. *Brief Funct Genomic Proteomic.* 2004;3:220-39.
3. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* 2003;422:198-207.
4. De Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2004;5:267-93.
5. Thorgeirsson SS, Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. *Nat Genet.* 2002;31:339-46.
6. Mato JM, et al. S-Adenosylmethionine: a control switch that regulates liver function. *Faseb J.* 2002;16:15-26.
7. Lu SC, et al. Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:5560-5.
8. Martínez-Chantar ML, et al. Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *Faseb J.* 2002;16:1292-4.
9. Santamaria E, et al. Functional proteomics of nonalcoholic steatohepatitis: mitochondrial proteins as targets of S-adenosylmethionine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:3065-70.
10. Santamaria E, et al. Molecular profiling of hepatocellular carcinoma in mice with a chronic deficiency of hepatic s-adenosylmethionine: relevance in human liver diseases. *J Proteome Res.* 2006;5:944-53.
11. Avila MA, et al. Reduced mRNA abundance of the main enzymes involved in methionine metabolism in human liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2000;33:907-14.
12. Fernández-Irigoyen J, et al. Oxidation of specific methionine and tryptophan residues of apolipoprotein A-I in hepatocarcinogenesis. *Proteomics.* 2005;5:4964-72.

Cancer Epigenetics: Breaking the DNA Methylation and Histone Codes

DR. MANEL ESTELLER

Spanish National Cancer Centre (CNIO). Madrid. Spain.

The disruption of the genomic DNA methylation patterns was the first epigenetic abnormality described in human cancer. This imbalance consists in the promoter CpG island hypermethylation of tumor suppressor genes leading to transcriptional repression and global genomic hypomethylation leading to chromosomal instability and reactivation of endoparasitic sequences. The relationship between DNA methylation and histone modifications was initially described for the inactivation of the X chromosome in females and for the demonstration of strong interactions between the DNA methylation machinery and the chromatin modifiers. It was also shown that the repression of tumor suppressor genes by promoter hypermethylation is associated with a specific histone modification index. In this jigsaw it was missing a global view of how the histone modification landscape was distorted in the cancer cells. We have recently provided this piece of the puzzle demonstrating that the association between

DNA methylation and histone modification aberrations in cancer also occurs at global level. In human and mouse tumors, histone H4 undergoes a loss of monoacetylated and trimethylated lysines 16 and 20, respectively. Most important, these alterations occur within the context of the repetitive DNA sequences that also becomes hypomethylated in transformed cells. The global alterations of histone acetylation status suggest novel pathways through which histone acetyltransferases (HATs), histone methyltransferases (HMTs) and histone deacetylases (HDACs) and may play roles as tumor suppressor genes or oncogenes. In this regard, we have shown how in leukemias the generation of particular fusion proteins involving HATs is associated with an erasure of the monoacetylated lysine 16-H4 mark and other authors have postulated how the loss of trimethylation at lysine 20-H4 might disrupt of heterochromatic domains and reduce the response to DNA damage of cancer cells.

Señalización intracelular de los procesos angiogénicos en oncohematología

C. LÓPEZ-PEDRERA¹, N. BARBARROJA², L. ARÍSTIDES TORRES SÁNCHEZ², P. BUENDÍA² Y F. VELASCO²

¹Investigador Contratado del Ministerio de Educación y Ciencia. Programa Ramón y Cajal. ²Unidad de Investigación. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción

La angiogénesis es un proceso fundamental en el desarrollo tumoral y la metástasis en tumores sólidos. Se trata asimismo de un proceso clave en la patogénesis de las hemopatías malignas. Datos recientes han mostrado que la angiogénesis constituye un mecanismo con valor pronóstico y terapéutico en diversas patologías del sistema hematopoyético, tales como las leucemias agudas y crónicas, los síndromes mielodisplásicos, el mieloma múltiple, los linfomas no hodgkinianos y los linfomas de Hodgkin. Entre los factores proangiogénicos, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es un factor clave, regulador de múltiples funciones en células endoteliales y neoplásicas, tales como la mitogénesis, la permeabilidad vascular, el crecimiento, la supervivencia y la migración celular. Los niveles celulares y circulantes de VEGF se encuentran significativamente incrementados en neoplasias hematológicas y están asociados de manera adversa con el pronóstico de las mismas. La angiogénesis es un proceso múltiple y muy complejo, regulado de forma muy específica. En concreto, la desregulación de la expresión de VEGF, sus receptores específicos y la señalización intracelular asociada, es de gran relevancia en la patogénesis de las neoplasias hematológicas. En la actualidad se está iniciando el uso de terapias antiangiogénicas como complemento a la terapia convencional. Dichas terapias antiangiogénicas se hallan dirigidas a inhibir diversos elementos celulares y moleculares de la cascada angiogénica. Aunque se trata de estudios aún en fases iniciales, abren la posibilidad de usar una combinación de agentes con actividad citotóxica y efectos antiangiogénicos como terapia antineoplásica efectiva.

Angiogénesis tumoral

Las células tumorales necesitan oxígeno y nutrientes para crecer, proliferar y sobrevivir. La sangre, rica en estos elementos, llega a través de los vasos sanguíneos

a todo el tumor y a los tejidos circundantes. A medida que las células tumorales proliferan, la masa tumoral aumenta hasta alcanzar un tamaño crítico. El crecimiento del tumor es limitado, debido al aporte insuficiente de factores de crecimiento y oxígeno, y a la incapacidad de eliminar los subproductos tóxicos del metabolismo. La inducción de angiogénesis salva este obstáculo y permite que el tumor no sólo aumente de tamaño sino también que metastatice a otros lugares del organismo.

Para inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, las células tumorales secretan factores de crecimiento: factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y VEGF principalmente. Estos factores de crecimiento atraen a las células endoteliales de los capilares cercanos hacia el tumor y estimulan su proliferación y organización en nuevos capilares. Los vasos neoformados, presentes en gran densidad dentro y alrededor de la masa tumoral, son muy permeables, por lo que constituyen una vía accesible para la diseminación de células tumorales por todo el organismo. Así pues, la angiogénesis es un proceso fundamental en el desarrollo tumoral y la metástasis en los tumores sólidos.

Angiogénesis en neoplasias hematológicas

Estudios recientes indican que la angiogénesis también es crítica en la patogénesis de numerosas hemopatías malignas, tales como la leucemia aguda y crónica, los linfomas Hodgkin y no hodgkinianos, el síndrome mielodisplásico y el mieloma múltiple¹⁻⁶. En dichas hemopatías se ha demostrado un incremento sustancial en la neoformación de vasos sanguíneos en la médula ósea, así como aumentos significativos en los niveles de diversos factores angiogénicos, tales como el VEGF, el bFGF, el PDGF, el factor de crecimiento epidérmico, la angiogenina, la angiopoyetina-1, etc. De hecho, la expresión de diversos marcadores de angiogénesis (p. ej., VEGF o bFGF) correlaciona con características clínicas adversas de la hemopatía, sirviendo como predictores de un pronóstico adverso. Entre los factores antiangiogénicos endógenos, expresados de forma variable en las distintas neoplasias hematológicas, se encuentran la trombospondina-1, la angiostatina, la

Trabajo subvencionado por: Fondo de Investigación Sanitaria (FIS PI041291 y PI05/0910) y Junta de Andalucía (exp. 0024/2005 y 0060/2005).

endostatina, el factor plaquetario 4, los inhibidores tisulares de las metaloproteasas, el interferón alfa y el receptor soluble del bFGF.

Así pues, la angiogénesis se encuentra finamente regulada por moléculas proangiogénicas y antiangiogénicas. Dichas moléculas son producidas por células neoplásicas, células estromales, células endoteliales, la matriz extracelular y la sangre. La contribución relativa de estas moléculas depende del tipo tumoral y el lugar de generación, y su expresión cambia con la progresión tumoral, la regresión y el relapso. La alteración en la expresión de reguladores angiogénicos (p. ej., el VEGF o la angiopoyetina) es responsable de la formación de vasos sanguíneos alrededor del tumor, de pared más delgada y con una estructura caótica, lo que origina un flujo sanguíneo variable y reduce la llegada y distribución homogénea de drogas antitumorales, contribuyendo así a la malignidad de la neoplasia⁷.

A nivel molecular los factores de crecimiento de tipo angiogénico, como el VEGF, el bFGF y el factor de transformación tipo alfa (TGF- α) actúan como ligandos de sus receptores específicos, lo que da lugar a la fosforilación de los residuos intracitoplásmicos de tirosincinasas (actividad catalítica), iniciándose así el proceso de señalización intracelular. Los receptores deben dimerizarse para su activación, y un hecho importante es que en las neoplasias hematológicas existe sobreexpresión y transactivación de los mismos⁸. Finalmente, la angiogénesis requiere la rotura de la matriz extracelular (colagenasas, fibronectina, laminina y glucoproteínas de la membrana principalmente). La participación en dicho proceso de las metaloproteasas (familia de enzimas cinc-calcio dependientes capaces de degradar la matriz extracelular y liberar y/o activar factores de crecimiento proangiogénicos) es esencial y en su producción colaboran estrechamente las células tumorales, estromales y endoteliales⁹.

Papel del VEGF en la patogénesis de las neoplasias hematológicas

De entre los citados factores, el VEGF es el principal factor proangiogénico, regulador de múltiples funciones tanto en las células endoteliales como en las células neoplásicas. De hecho, estudios recientes de inactivación génica han demostrado que el VEGF es esencial para la respuesta angiogénica celular. La actividad del VEGF está mediada por sus tres principales receptores (Flt-1, KDR/Flk-1 y Flt-4), pertenecientes a la clase V de la familia de receptores de tirosincinasas (RTK)⁸. El receptor Flt-1 se expresa en células endoteliales y monocitos y media la motilidad celular. Las actividades proliferativa y mitogénica del VEGF, así como la permeabilidad vascular, están mediadas principalmente por el receptor KDR/Flk1. Por su parte, el Flt-4, homólogo del receptor 1 de la neurofilina, media la linfangiogénesis.

El VEGF en el microambiente tumoral

El microambiente de la médula ósea está constituido por una población heterogénea de células: las células madre hematopoyéticas, células endoteliales, células del estroma (fibroblastos, macrófagos, linfocitos T, etc.) y células implicadas en la homeostasis ósea, tales como los condroclastos, los osteoclastos y los osteoblastos. La diferenciación, el mantenimiento y la expansión de las células tumorales, por ejemplo, de mieloma múltiple, en el microambiente medular, es un proceso altamente coordinado que implica a:

1. Numerosos factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas secretadas por las células tumorales.
2. Células estromales.
3. Órganos no hematopoyéticos (p. ej., riñón e hígado).
4. Interacciones célula tumoral-célula estromal⁷.

La función del VEGF y sus receptores forma parte de los procesos reguladores que contribuyen a la patogénesis de estas neoplasias hematológicas. El VEGF se encuentra presente en el microambiente medular de los pacientes con mieloma múltiple y también asociado con los procesos de neovascularización en las zonas de infiltración de las células de mieloma múltiple¹⁰. Numerosas interacciones autocrinas y paracrinas mediadas por VEGF y sus receptores promueven la proliferación de las células neoplásicas y también de las células endoteliales. Las proteínas de la matriz extracelular (laminina, colágeno microfibrilar tipo VI y fibronectina) ejercen una importante actividad proadherente sobre las células tumorales, actividad mediada por integrinas celulares (p. ej., integrina β -1 [CD29])¹¹. Las integrinas β 1 expresadas en las células de mieloma múltiple median la adhesión de las células tumorales a células endoteliales y células estromales de la médula ósea, confirmando así protección contra la apoptosis inducida por las drogas quimioterapéuticas, a través de dos mecanismos principales: el contacto célula-célula y la inducción de la transcripción y secreción de interleucina-6 (IL-6), un factor de gran relevancia en el crecimiento, supervivencia y resistencia a fármacos en el mieloma múltiple¹².

Asimismo, en las leucemias agudas se ha demostrado que el VEGF se halla implicado en complejas interacciones moleculares autocrinas y paracrinas en el entorno de la médula ósea. A través de diversas interacciones paracrinas, el VEGF producido por las células leucémicas promueve la proliferación y migración de células endoteliales, las cuales a su vez producen diversas proteínas promotoras del crecimiento tumoral. De hecho, el VEGF puede estimular la producción de factores estimuladores de colonias granulocito-macrofágicas (GM-CSF) e IL-6 en células endoteliales. Esta interacción paracrina origina a su vez un círculo vicioso que potencia la angiogénesis y la proliferación de las células neoplásicas. Alternativamente, es posible que el VEGF pueda actuar de forma autocrina sobre las propias células leucémicas productoras de esta citocina. La coexpresión demostrada de VEGF y sus

receptores en leucemia, linfoma y mieloma múltiple, junto a sus efectos sobre la supervivencia celular, la migración y la proliferación, confirma el papel de los efectos autocrinos del VEGF en la patogénesis de estas hemopatías malignas^{13,14}.

El rango de dianas celulares del VEGF dentro del compartimiento de la médula ósea puede ser incluso más amplio, puesto que el VEGF afecta de forma dramática la diferenciación de numerosas células hematopoyéticas *in vivo* e incrementa la producción de células B, así como la generación de células mieloides, regula la supervivencia de las células madre hematopoyéticas, inhibe la maduración de células dendríticas e incrementa la quimiotaxis y la capacidad de reabsorción ósea de los osteoclastos⁷.

Mecanismos intracelulares reguladores de la expresión de VEGF en hemopatías malignas

Como hemos comentado anteriormente, el inicio de la angiogénesis tumoral deriva de la concatenación de diversos procesos, entre los que cabe destacar la expresión mediada por oncogenes tumorales de proteínas angiogénicas (VEGF, bFGF, angiopoyetina, etc.) y la activación de diversas rutas intracelulares. Los mecanismos celulares y moleculares que regulan la secreción de VEGF se han analizado en detalle en el mieloma múltiple, la leucemia mieloide crónica (LMC) y la leucemia mieloide aguda (LMA).

Entre los factores que modulan la secreción de VEGF en el mieloma múltiple se encuentran: *a)* la secreción de IL-6 por las células estromales de médula ósea (BMSC del inglés *bone marrow stromal cells*), potenciadora de la producción y secreción de VEGF por las células de mieloma múltiple, promoviendo así el crecimiento tumoral y la supervivencia. A su vez, la unión de las células de mieloma múltiple a las BMSC induce la secreción por éstas de IL-6, factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1 (IGF-1) y VEGF¹⁵. *b)* La hipoxia y la activación de oncogenes mutantes (p. ej., el oncogén *Ras* mutante o el *Bcl-1/b*), los cuales incrementan la producción de VEGF en un mecanismo mediado por la proteína HIF-1 α . *c)* Secreción de IGF-1, activador de la expresión y secreción de VEGF en células tumorales. Asimismo, la expresión de Flt-1 en estas células está regulada por IGF-1, vía HIF-1 α . *d)* La expresión de la integrina tumoral β 7 promueve la expresión de la integrina tumoral β 7 promovida por c-maf. *e)* Expresión celular tumoral de ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular de clase 1) y factor de activación linfocitario tipo 1 (LFA-1), moduladores de la adhesión de las células tumorales a las BMSC y las células de la matriz extracelular, induciendo igualmente el aumento en la secreción de VEGF. *f)* Activación de CD40, promotor de la expresión de VEGF mediada por p53⁷.

En la LMC, el VEGF se encuentra expresado a muy altos niveles en médula ósea y en sangre periférica; es más, el oncogén asociado a la LMC, el *Bcl-1/b* induce

la expresión génica de VEGF y HIF- α a través de la ruta PI3K-mTOR.

Finalmente, en LMA se ha demostrado recientemente que la expresión aberrante del receptor procoagulante factor tisular también contribuye de manera significativa al desarrollo del fenotipo angiogénico, en parte mediante la inducción de la expresión de VEGF y la inhibición de la expresión de la proteína antianangiogénica trombospondina 1 (TSP-1) en procesos mediados por MEK/ERK y NF κ B¹⁶.

Rutas intracelulares activadas por VEGF

En el mieloma múltiple el crecimiento celular tumoral, la supervivencia y la migración son necesarias para la invasión de la médula ósea, su expansión dentro del microambiente medular y su paso a la circulación periférica. La unión de VEGF a las células de mieloma múltiple promueve la fosforilación de su receptor Flt-1. Como consecuencia de dicha fosforilación varias rutas intracelulares son activadas: *a)* una cascada PI3K dependiente de PKC α , que media la migración de células de mieloma múltiple sobre fibronectina; *b)* la ruta MEK/ERK que media la proliferación de células de mieloma múltiple, y *c)* una ruta que media la supervivencia de las células de mieloma múltiple mediante la inducción del incremento de Mcl-1 y supervivencia de modo dosis-dependiente (fig. 1).

En células leucémicas, la estimulación autocrina de KDR por VEGF, activa su proliferación y migración, promoviendo el desarrollo de un fenotipo tumoral más invasivo. Es más, el VEGF induce la expresión de la proteína Hsp90 y su unión a Bcl-2 y Apaf-1, incrementando de este modo la resistencia de las células leucémicas a la apoptosis inducida por privación de suero¹⁷.

Factores angiogénicos independientes del VEGF

Otros factores angiogénicos independientes del VEGF también desempeñan un papel relevante en la fisiopatología de las neoplasias hematológicas. Los niveles de bFGF y/o HGF se hallan significativamente incrementados en pacientes con LMA, síndrome mielodisplásico (SMD), LMC, leucemia mielomonocítica crónica (LMC), LLC y mieloma múltiple. Entre las hemopatías malignas, los más altos niveles de bFGF se han detectado en pacientes con LLC mientras que los mayores niveles de HGF se hallan presentes en pacientes con LMC. Curiosamente, en pacientes con LLA, mientras los niveles de bFGF y HGF se encuentran significativamente incrementados, no ocurre así con los valores plasmáticos de VEGF. Las implicaciones terapéuticas de esta observación aún no se han analizado.

Por otra parte, es de particular importancia destacar que aunque se ha documentado la presencia de elevados niveles de VEGF y bFGF en pacientes con LLC,

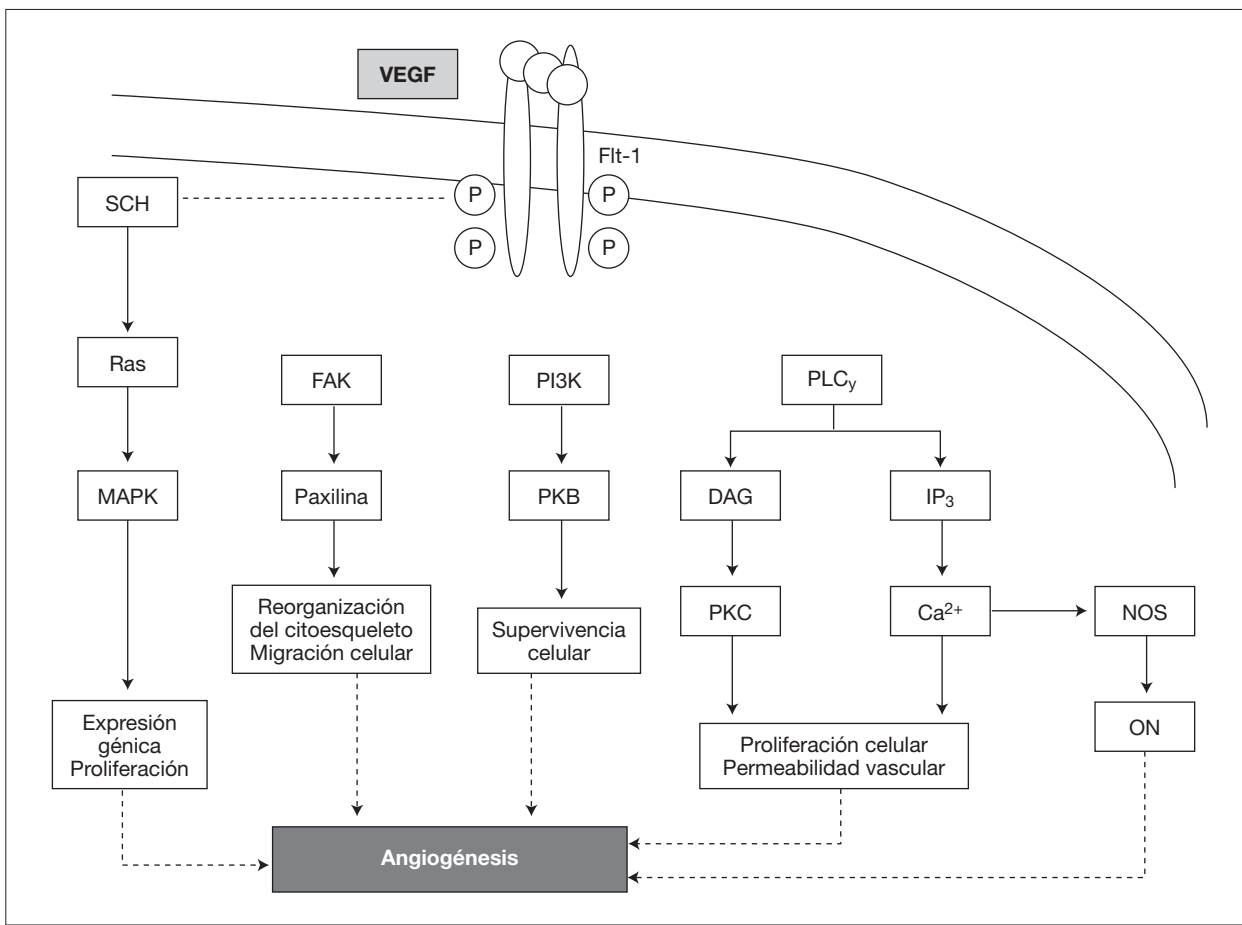


Figura 1. Rutas intracelulares activadas por VEGF en células de mieloma múltiple.

la densidad microvascular de la médula ósea no se halla significativamente incrementada en la mayoría de estos pacientes. Finalmente, en pacientes con mieloma múltiple, el HGF está sobreexpresado y las células de mieloma múltiple poseen el receptor de HGF, c-Met. Esto sugiere que podría existir una interacción autocrina que contribuye a la progresión tumoral¹⁸. En su conjunto, estos datos indican que aparte de la estimulación de la neoformación de vasos sanguíneos, algunos factores implicados en la modulación de la angiogénesis muestran otras propiedades en la patogénesis de estas hemopatías. Sin embargo, la relación entre ellos es compleja y aún no se conoce en detalle.

Nuevas terapias antiangiogénicas

El análisis del proceso angiogénico demuestra la existencia de diversas etapas que podrían ser dianas útiles para la intervención antiangiogénica. Dichas etapas incluyen la inhibición de factores de crecimiento angiogénicos (VEGF, bFGF, etc.) o sus receptores, inhibición de MMP, bloqueo de la activación endotelial e inhibición de la vasculatura tumoral. Por su parte, la inhibición de la señalización intracelular inducida por

factores de crecimiento podría llevarse a cabo mediante la reducción en la producción de VEGF, bloqueo de la unión de VEGF a sus receptores (anticuerpos monoclonales), y bloqueo de señales intracelulares. La angiogénesis también podría ser inhibida mediante tratamiento con inhibidores de proliferación celular endotelial, bloqueo de integrinas o de señalización intracelular responsable de la supervivencia, y la inhibición de la actividad de las MMP¹⁹. Adicionalmente, las múltiples rutas intracelulares activadas por el VEGF (p. ej., MAPK, FAK, PI3k/Akt, PLC) están siendo analizadas como posibles dianas terapéuticas; los estudios llevados a cabo hasta el momento indican que numerosos compuestos que regulan estas rutas intracelulares necesitan ser analizados, bien como aproximaciones no citotóxicas, bien como tratamientos combinados con la terapia citotóxica convencional. Esta posibilidad está basada en la asunción de que estas combinaciones pueden afectar a distintas dianas celulares, los patrones de resistencia no deben solaparse, los efectos deben ser aditivos, y la ausencia de mielosupresión podría facilitar la administración conjunta de algunos agentes citotóxicos²⁰. En la tabla 1 se muestran diversos compuestos farmacológicos actualmente en fase de ensayo clínico en diversas hemopatías malignas (<http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angiortable>).

Tabla 1. Principales terapias antiangiogénicas aplicadas en pacientes con hemopatías malignas

Compuesto	Actividad	Hemopatía	Estatus en ensayos clínicos
Bevacizumab	Anticuerpo monoclonal anti-VEGF. Previene la proliferación endotelial	MM, LMC, LNH	Fase II
VEGF-trap	Inhibidor del receptor Flt-1 de VEGF. Supresor de angiogénesis	LNH	Fase I
PTK787/ZK222584	Inhibidor de tirosincinasas. Inhibe el crecimiento y la migración de células neoplásicas	MM, LMA, LMC, SMD	Fases I/II
Talidomida	Inhibe la producción de VEGF. Previene la proliferación y la capilarogénesis y potencia la inmunidad antitumoral por estimulación de células T	Linfomas B, LLC, MM	Fases II/III
CC-5013 (análogo de la talidomida)		Linfomas, SMD, MM	Fases I/II
2-ME (2-metoxiestradiol)	Metabolito natural del estradiol. Inhibe el crecimiento tumoral, reduce la angiogénesis y prolonga la supervivencia	MM	Fase I
LY317615	Inhibidor de PKC. Reduce los niveles plasmáticos de VEGF	Linfoma refractario	Fase II
EMD121974	Inhibidor de integrinas $\alpha v \beta 3$ y $\alpha v \beta 5$	Linfomas, LMA	Fases I/II
SU6668	Inhibidor de tirosincinasas. Supresor de angiogénesis tumoral y proliferación celular	LMA	Fase II
SU11248	Inhibidor de tirosincinasas tipo fms (Fit3), VEGF y PDGF. Supresor de angiogénesis	LMA	Fase III

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial; MM: mieloma múltiple; LMC: leucemia mieloide crónica; LNH: linfoma no Hodgkiniano; LMA: leucemia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplásico; LLC: leucemia linfocítica crónica; PKC: proteincinasa C; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Conclusiones y perspectivas terapéuticas

La complejidad de efectos y actividades del VEGF está determinada por la multiplicidad de células diana. Además de su papel esencial como regulador de la angiogénesis fisiológica y patológica, el VEGF promueve el crecimiento, la supervivencia y la migración de células leucémicas y de mieloma múltiple (a través de interacciones autocrinas y paracrinas), inhibe la maduración de células dendríticas e incrementa la capacidad de resorción ósea de los osteoclastos. Es más, el VEGF también se encuentra asociado a la diferenciación de las células madre y a la recuperación hematopoyética en adultos. Niveles incrementados de VEGF y una alta neovascularización poseen un valor pronóstico adverso en diversas hemopatías malignas, tales como las leucemias, los linfomas y el mieloma múltiple. Además, los efectos del VEGF sobre células diana distintas de las células endoteliales también pueden contribuir a las manifestaciones clínicas de dichas hemopatías. Así pues, tanto el VEGF como sus receptores específicos, constituyen dianas específicas para el desarrollo de nuevas terapias antiangiogénicas. Cuando las células tumorales se multiplican, se produce un amplio número de moléculas proangiogénicas. Ésta puede ser, al menos en parte, la razón por la que la monoterapia con agentes inhibidores del VEGF es sólo parcialmente efectiva, siendo necesario un cóctel de terapias antiangiogénicas para prevenir de modo eficiente la angiogénesis. La potenciación de la terapia antitumoral también puede alcanzarse a través de la combinación de drogas que bloquean la señalización intracelular inducida por el VEGF con quimioterapia o irradiación, “normalizando” de este modo la vasculatura tumoral y mejorando la oxigena-

ción y el acceso de drogas a las células tumorales y endoteliales adyacentes. Además, las acciones del VEGF y sus células diana pueden variar, dependiendo del estadio y el tipo de tumor. Actualmente se hallan en marcha diversos estudios que analizan estas interacciones dinámicas con el fin de traducirlas en una intervención terapéutica efectiva. Es más, puesto que el VEGF tiene un papel esencial en la diferenciación de células madre, su efecto, junto al de su receptor VEGFR-1 sobre el desarrollo clonal leucemogénico ya se halla en fase de estudio. Será necesaria una colaboración estrecha entre investigadores básicos y clínicos para potenciar nuestro conocimiento acerca del papel fisiopatológico del VEGF en hemopatías malignas y dirigir así nuevos ensayos clínicos que permitan el desarrollo de tratamientos más específicos y menos tóxicos para los pacientes neoplásicos.

Bibliografía

1. Pérez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E, Folkman J. Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.* 1997;150:815-21.
2. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2000;95:309-13.
3. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, Gidel G, Estey E, Thomas D, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2000;96:2240-5.
4. Vacca A, Ribatti D, Roncali L, Dammacco F. Angiogenesis in B cell lymphoproliferative diseases: biological and clinical studies. *Leuk Lymphoma.* 1995;20:27-38.
5. Pruneri G, Bertolini F, Soligo D, Carboni N, Cortezzi A, Ferrucci PF, et al. Angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Br J Cancer.* 1999;81:1398-401.

6. Vacca A, Ribatti D, Presta M, Minischetti M, Iurlaro M, Ria R, et al. Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*. 1999;93:3064-73.
7. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood*. 2005;105:1383-95.
8. Bellamy WT. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in multiple myeloma and other hematopoietic malignancies. *Semin Oncol*. 2001;28:551-9.
9. Klein G, Vellenga E, Fraaije MW, Kamps WA, De Bont ESJM. The possible role of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in cancer, e.g. acute leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;50:87-100.
10. Yaccoby S, Barlogie B, Epstein J. Primary myeloma cells growing in SCID-hu mice: a model for studying the biology and treatment of myeloma and its manifestations. *Blood*. 1998;92:2908-13.
11. Podar K, Tai YT, Liu BK, et al. Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J Biol Chem*. 2002;277:7875-81.
12. Uchiyama H, Barut BA, Mohrbacher AF, Chauhan D, Anderson KC. Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood*. 1993;82:3712-20.
13. Podar K, Tai YT, Davies FE, Lentzsch S, Sattler M, Hideshima T, et al. Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration. *Blood*. 2001;98:428-35.
14. Kini AR, Peterson LC, Tallman MS, Lingen MW. Angiogenesis in acute Promyelocytic leukemia: induction by VEGF and inhibition by all-trans retinoic acid. *Blood*. 2001;97:3919-24.
15. Gupta D, Treon SP, Shima Y, et al. Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*. 2001;15:1950-61.
16. Barbarroja N, López-Pedraza C, Buendía P, Siendones E, Capote M, Montiel-Duarte C, et al. Coordinated dysregulation of cellular receptors, proangiogenic factors and intracellular pathways in acute leukemia. En: Stegnar M, Bozic M, Kozak M, Peternel P, editors. *Medimond International*. 2004. p. 101-6.
17. Dias S, Shmelkov SV, Lam G, Rafii S. VEGF(165) promotes survival of leukemic cells by Hsp90-mediated induction of Bcl-2 expression and apoptosis inhibition. *Blood*. 2002;99:2532-40.
18. Giles FJ. The vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway: a therapeutic target in patients with hematologic malignancies. *Oncologist*. 2001;6 Suppl 5:32-9.
19. Moehler TM, Neben K, Ho AD, Goldschmidt H. Angiogenesis in hematologic malignancies. *Ann Hematol*. 2001;80:695-705.
20. Hagedorn M, Bikfalvi A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from Basic research to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000;34:89-110.

Modelos animales de enfermedades hematológicas

S. PÉREZ-PUJOL Y P. GARCÍA DE FRUTOS

Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona. IIBB-CSIC-IDIBAPS. Barcelona.

El uso de modelos animales en el estudio de las enfermedades hematológicas ha supuesto una herramienta esencial para descifrar mecanismos patológicos a nivel molecular. Para las enfermedades de la sangre, en las que el componente genético es muy importante, la manipulación de los genomas de ratón para crear modelos animales ha sido especialmente fructífera. El ratón, que siempre ha sido un animal idóneo para crear modelos de patología humana, ha pasado a ser la especie estrella gracias a la generación de animales que presentan modificaciones específicas en sus genes. El uso de modelos de ratón transgénico, donde introducir mutaciones específicas de una manera regulada, espacial y temporalmente ha supuesto un salto cualitativo en la utilidad de los mismos. En la presente revisión haremos un repaso de las principales técnicas empleadas en la generación de estos modelos, así como una descripción resumida de los modelos más relevantes en dos áreas: el cáncer hematológico y las enfermedades de la hemostasia.

Modelos murinos de cáncer hematopoyético. Herramientas genéticas para crear modelos de leucemias y linfomas en los ratones

Los modelos más interesantes para el estudio de enfermedades hematológicas han sido desarrollados creando mutaciones de líneas troncales embrionarias de ratón (células ES), que tienen capacidad de incorporarse a la línea germinal. La posibilidad de introducir mutaciones somáticas, añadida a la posibilidad de reconstituir el sistema hematopoyético en ratones irradiados mediante células sanguíneas de ratones modificados, provee una importante estrategia alternativa para generar modelos murinos de cáncer hematopoyético.

Transducción retroviral en células primarias de la médula ósea

La esencia de estos protocolos es la manipulación de las células de la médula ósea murinas, o subpoblacio-

nes de estas células, para su reimplantación en ratones receptores. Los vectores retrovirales defectivos en replicación que se usan en la transformación de estas células incluyen LTR (*long terminal repeats*), señales de empaquetamiento, el gen de interés introducido (el transgén), y generalmente un marcador de selección. Estos vectores retrovirales se transfectan en líneas celulares empaquetadoras que, al proveer de las proteínas retrovirales gag, pol y env, permiten al ARN retroviral producir partículas retrovirales y ser liberado. Para infectar células hematopoyéticas primarias, se recolectan células de la médula ósea de ratones donantes tratados con 5-fluorouracilo. Este tratamiento mata muchas de las células maduras, produciendo una proliferación de las células de la médula ósea y es importante en el protocolo porque la progresión en el ciclo celular es necesaria para la integración del transgén y la expresión de los vectores retrovirales más comunes. La médula ósea recogida de los huesos largos se cultiva *in vitro* con citocinas hematopoyéticas, que estimulan más aún la proliferación celular. Las células de la médula ósea *in vitro* se exponen a sobrenadantes retrovirales y las células se reintroducen en ratones irradiados de manera letal. Estos ratones regeneran el sistema hematopoyético a partir de la médula ósea donante. La relación entre células transducidas y no transducidas, incluyendo las células hematopoyéticas troncales, puede tener un impacto significativo en la latencia y la penetrancia de la enfermedad. Por esta razón, se ha utilizado tanto la selección previa o posterior a la transducción para aumentar la relación de células genéticamente modificadas a células normales. Una de estas técnicas consiste en escoger aquellas células hematopoyéticas inmaduras que carezcan de marcadores específicos de linaje. Otro método es enriquecer las células transducidas usando un marcador fluorescente coexpresado con el transgén o bien aplicando un antibiótico de selección previamente a la inyección de estas células en los receptores.

Nuevos desarrollos continúan aumentando la aplicación de la transducción retroviral para la generación de ratones con el sistema hematopoyético modificado. Existen vectores que permiten inducir la activación de los genes de interés. Estos vectores permiten la expresión regulada por doxiciclina o la regulación de la actividad proteica por hormonas como el tamoxifeno. La creación de vectores que permitan la expresión de ARN inhibidores permitirá la inhibición espe-

Esta revisión ha sido parcialmente financiada por el proyecto SAF2004-07539, del Ministerio de Educación y Ciencia.

cífica de genes en las células hematopoyéticas. El uso de vectores lentivirales, que a diferencia de los retrovirus clásicos pueden inducir la expresión en células que no están en división, sin duda aumentará la aplicación de las tecnologías de transgénesis retroviral¹.

Modelos transgénicos

Desde un punto de vista histórico, la primera manipulación con éxito de la línea germinal del ratón se consiguió inyectando el pronúcleo de un embrión en estadio unicelular con ADN inmediatamente después de la fertilización. Una vez introducido en el pronúcleo, el ADN extraño puede introducirse de manera aleatoria en el genoma. Esta estrategia es aún la más directa para detectar la capacidad oncogénica de determinados genes o productos génicos aberrantes *in vivo*. Dado que las alteraciones génicas asociadas con la leucemia o el linfoma son frecuentemente lesiones somáticas adquiridas en determinados tipos celulares, es esencial limitar la expresión del gen aberrante a los compartimentos celulares donde puede ejercer su efecto. Esta especificidad puede conseguirse construyendo vectores de expresión con aquellos elementos reguladores que dirijan la expresión del transgén de manera específica a tejido/célula o a determinada fase de la diferenciación hematopoyética. Aunque se han acumulado experiencias en los últimos 10 años que han enfatizado la importancia de la especificidad de tejido para modelar leucemias y linfomas en el ratón, el primer experimento con éxito usó un promotor ubicuo para probar el potencial del gen de fusión *BCR-ABL*. Ratones transgénicos para el promotor de metalotioneína 1 con esta construcción MT-*BCR-ABL*p190, morían de leucemia mieloide crónica (LMC) o linfoma agudo (LLA) entre 10 días y 2 meses tras el nacimiento. De esta manera, establecieron la primera evidencia de una relación causal entre el cromosoma Filadelfia y la leucemia humana. El promotor MT dirige un nivel de expresión baja y ubicua, pero dependiente de Zn. En cambio, los intentos iniciales de generar modelos transgénicos de LMC o LLA inducidos por *BCR-ABL*p210 bajo el control de el promotor de *BCR*, fallaron por los efectos deletéreos del transgén en la embriogénesis. El promotor MT permitió a los investigadores evitar ese problema. Los transgénicos de MT-*BCR-ABL*p210 son viables y desarrollan de manera reproducible leucemia B linfoblástica después de tratarlos con Zn, por lo que son un modelo interesante para estudios preclínicos. Sin embargo, ninguna de estas líneas transgénicas desarrolla LMC. Hasta la fecha, el único modelo de enfermedad mieloproliferativa asociada con *BCR-ABL*p210 se ha obtenido en ratones donde la expresión del transgén es dirigida por el promotor *tec*, que se expresa de manera preferente en la línea hematopoyética².

Otro tipo de leucemia que ha sido estudiado de manera exhaustiva en ratones es la leucemia promielocítica aguda (LPA), un subtipo diferente de leucemia mieloide aguda caracterizada por un bloqueo de la diferenciación mieloide en el estadio promielocítico.

En LPA, como consecuencia de la translocación recíproca y equilibrada de translocaciones cromosómicas, el gen del receptor del ácido retinoico (*RARα*) se fusiona con una variedad de parejas (genes X), que conduce a la generación de proteínas X-*RARα* + *RARα*-X fusionadas. En la mayoría de los casos, el gen *RARα* se une al gen de la leucemia promielocítica (PML) que se encuentra en la banda 15q22. Los esfuerzos iniciales para crear un modelo de LPA en el ratón, fallaron porque la expresión fuerte y sin limitaciones de PML-*RARα* producía letalidad embrionaria. Como en el caso de *BCR-ABL*, se desarrolló una línea inducible de ratones transgénicos en la que la expresión de PML-*RARα* se regulaba por el promotor de gen de la metalotioneína. Sorprendentemente, estos ratones no desarrollaban leucemia sino patologías hepáticas, incluyendo el desarrollo de carcinomas hepatocelulares, después de 5 días de estimulación con Zn. En conjunto estos estudios iniciales con promotores ubicuos apoyaban la hipótesis de un papel oncogénico para PML-*RARα*, pero también indicaban la necesidad esencial de usar promotores específicos de tejido para evitar la letalidad embrionaria y conseguir un modelo de LPA en el ratón. Primero, se emplearon los elementos reguladores de CD11b y *Fes*, un gen específico de las células CD34+, pero estos producían una expresión muy temprana o tardía del transgén PML-*RARα* y por ello no derivaban en leucemias. En cambio, el promotor humano de la catepsina G (hCG), que se activa en la transición entre mieloblastos y mielocitos, demostró ser la mejor elección para restringir la expresión al estadio promielocítico. La expresión de PML-*RARα* dirigida por este promotor, produce un síndrome mieloproliferativo caracterizado por el bloqueo de la diferenciación mieloide en el estadio promielocítico en todos los ratones transgénicos. Entre un 15 % y un tercio de estos ratones desarrollan LPA murina letal después de 6 a 14 meses de latencia. Estas leucemias tienen los rasgos de la enfermedad humana, incluso en su respuesta al tratamiento por transretinoico (AtRA). Otro modelo murino similar a la enfermedad humana usa el promotor de la proteína relacionada con el factor humano de migración número 8 (hMRP8) para dirigir la expresión de PML-*RARα*. El promotor de hMRP8 se activa en el estadio mieloblástico de la diferenciación mieloide. Los animales transgénicos hMRP8-PML-*RARα* también desarrollan una LPA, que después de una larga latencia desarrolla la enfermedad de forma sensible al AtRA. Modelos adicionales de LPA han sido generados usando la zona reguladora de hCG para dirigir la expresión del gen de fusión PLZF-*RARα*. Estos animales transgénicos también desarrollan leucemias mieloides tras una larga latencia. Curiosamente, los ratones transgénicos para hCG-PLZF-*RARα* desarrollan leucemias resistentes a AtRA, igual que en el caso de la enfermedad humana. Sin embargo, carecen del bloqueo característico a nivel promielocítico y tienen más características similares a la LMC que a la LPA, lo que sugiere que PLZF-*RARα* no es suficiente para producir un fenotipo LPA completo y puede necesitar la cooperación de otros sucesos genéticos en este proceso³.

Como se comentaba anteriormente, en las leucemias humanas, reordenaciones cromosómicas frecuentemente generan genes de fusión, lo que a su vez reduce la dosis de los alelos parentales a hemizigosidad. Esto es relevante cuando estos genes son factores de crecimiento o supresores tumorales. Por el contrario, muchos de los transgénicos retienen dos alelos normales de los genes que están involucrados en la translocación asociada a la leucemia. Además, dado que la translocación en los LPA y en otras enfermedades hematopoyéticas son recíprocas y equilibradas, no se producen únicamente genes de tipo X-RAR α , sino también los RAR α -X recíprocos. La importancia de estos procesos ha sido también objeto de estudio en diferentes modelos en ratón. La reducción de la dosis de PML conseguida al cruzar transgénicos PML-RAR α con *knock-outs* para PML (PML-RAR α /PML^{-/-}), demostró un aumento marcado de la frecuencia de leucemias y un inicio temprano de la enfermedad, en comparación a los transgénicos. En los transgénicos de PLZF-RAR α /PLZF^{+/-} se produjo una transformación del fenotipo crónico a leucemias de tipo LPA. Por otra parte, el análisis de los transgénicos de RAR α -X y sus cruces con mutantes X-RAR α demostró la importancia de los dos productos recíprocos en el desarrollo de la enfermedad. Los dobles transgénicos hCG-PML-RAR α /RAR α -PML tenían una mayor incidencia de leucemias que los controles PML-RAR α . Sin embargo, la latencia de la leucemia era la misma en ambos casos. Sorprendentemente, RAR α -PLZF también transforma el fenotipo crónico observado en las leucemias de los ratones PLZF-RAR α en ratones típicamente LPA. Ello indicaría que RAR α -PLZF puede actuar como un alelo dominante negativo sobre PLZF⁴.

El tipo clásico de transgénico ha sido también un modelo muy poderoso para desarrollar modelos de los cánceres de linajes de células B, donde las translocaciones cromosómicas son también un mecanismo común de generación de protooncogenes. En más de cuatro quintos de las neoplasias de origen en células B, un protooncogén celular se fusiona con la cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14 o con alguna región de las cadenas ligeras en los cromosomas 2 o 22. Como resultado los poderosos *enhancer* de los promotores de estos genes funcionan sobre los protooncogenes produciendo niveles elevados de transcripción. El primer ejemplo de este tipo de translocaciones se encontró en los linfomas de Burkitt, donde el gen *MYC* se yuxtapone a secuencias de las inmunoglobulinas, lo que lleva a la activación constitutiva del gen *MYC*. Ratones transgénicos con el oncogén *Myc* asociado a *enhancers* como el E μ de la cadena pesada, fueron el primer intento de modelar los linfomas *in vivo*. Los transgénicos entre E μ -*Myc* desarrollan linfomas fatales de tipo pre-B o B, pero no de tipo Burkitt. La lista de protooncogenes clonados en los puntos de rotura de las translocaciones de las células B de los linfomas incluye otros genes clave en tumorigénesis humana, como BCL2 y la ciclina D1. Casi todos los linfomas de células B con histología folicular están asociadas con translocaciones involucrando BCL2 y el *locus* IDH. Una vez más, ratones transgénicos

que expresan BCL2 bajo el control del *enhancer* E μ desarrollan linfomas de la línea germinal B. Cruzando animales transgénicos para Bcl2 y Myc se encontró una prueba de esta hipótesis ya que estos ratones tenían una generación de linfomas acelerada en comparación a los transgénicos E μ -*Myc*, lo que probablemente es debido a la supresión de la apoptosis asociada con la expresión de c-*Myc*. El gen de la ciclina D1 se ha clonado en el punto de rotura t(11;14), lo que también hacía desarrollar linfomas. En conjunto, estos experimentos sostenían la idea de que el linfoma de células B es un proceso con varios estadios donde la falta de regulación de *MYC* tiene un efecto crucial⁵. La realización de estos modelos en ratón ha sido facilitada por la existencia de varios promotores que dirigen la expresión de transgenes específicamente en el linaje T. El *locus* de la región de control de CD2 y los promotores distales y proximales de *Lck*, son ejemplos de elementos reguladores suficientemente específicos de las células T para ser utilizados en la regulación de transgenes. Por el contrario, la expresión mediada por Cd2 del factor de transcripción *Tal1*, que está involucrada en la translocación más común en T-LLA asociada con la niñez, no producía linfomas ni leucemias en animales transgénicos, sugiriendo que quizá se estaba expresando en el momento incorrecto del desarrollo de células T. De hecho, cuando se expresaba *Tal1* en los progenitores de células T en el timo, usando el promotor proximal de *Lck*, los mutantes sí desarrollaban leucemia linfoblástica de células T. Una vez que el potencial oncogénico de una proteína se ha podido determinar en ratones transgénicos, el sistema constituye una herramienta poderosa para determinar los requerimientos estructurales para la transformación *in vivo*. Creando animales transgénicos que expresan un mutante del gen *Tal1* que carece del lugar de unión al ADN, fue posible demostrar que la unión al ADN no es necesaria para esa transformación. Por tanto, una estrategia transgénica convencional en el ratón es todavía una herramienta muy poderosa para estudiar leucemias y linfomas *in vivo*. Esta metodología, aunque directa, tiene bastantes limitaciones, siendo algunas de ellas características de los aspectos técnicos del proceso, como la expresión del transgén, que es muy dependiente del número de copias que se integren y del lugar de integración en el genoma. Además, la expresión no restringida o en fases no requeridas frecuentemente deriva en fenotipos letales de manera embrionaria que pueden constituir un impedimento mayor para el estudio del potencial oncogénico del transgén. Estos impedimentos son los que hacen interesante los protocolos más complicados, que se describen a continuación⁶.

Ratones “knock-out y “knock-in”

La generación de ratones modificados por recombinación homóloga del ADN ha sido utilizada recientemente por un número de investigadores para evitar algunas de las desventajas encontradas en el uso de ratones transgénicos. Esta estrategia utiliza la técnica

de recombinación homóloga en células embrionarias troncales (ES) para introducir nueva información genética en un *locus* determinado del genoma. En muchos casos, la estrategia ha sido usada para reemplazar un gen con un producto de fusión específico (*knock-in*), lo que a su vez es colocado bajo el control de un promotor endógeno, imitando de cerca lo que ocurre a nivel somático en las células cancerosas. Esta sustitución reduce el alelo normal del gen si es autosómico a hemizigosis, como en el caso de la mayoría de translocaciones que se dan en los linfomas y leucemias. Así, el problema de la dosis relativa del alelo normal y el aberrante está compensado en estos modelos. Alternativamente, un protooncogén normal puede ser introducido en otro *locus* específico para mimetizar las consecuencias de una translocación normal. Otra ventaja de esta estrategia es la eliminación del efecto de variedad de cepas debido a la inserción aleatoria del gen aberrante en diferentes lugares del genoma en distintos ratones transgénicos.

La estrategia de *knock-in* ha sido utilizada de manera exitosa para introducir el gen de fusión BCR-ABLp190 en el *locus* de BCR para generar ratones que desarrollan LLA en las células B, reproduciendo de manera exacta el fenotipo que se ha observado en pacientes. De manera análoga, el gen de fusión *MLL-AF9* ha sido introducido para producir un modelo de leucemia mieloide aguda (LMA)⁷. Existen evidencias de que la adquisición de nuevas propiedades por la combinación de *MLL* con las parejas de fusión, que más que la pérdida del *MLL* silvestre, lleva a la generación de un oncogén en el compartimento mieloide, a pesar de la actividad del promotor en otros tejidos. La generación de modelos *knock-in* tiene una limitación esencial: mientras que en las reordenaciones asociadas a las leucemias ocurren a nivel somático y probablemente en los progenitores hematopoyéticos, en el animal el gen mutante se introduce como una característica heredable en las células germinales. Muchos de estos genes involucrados en las translocaciones asociadas al cáncer desempeñan un papel importante no únicamente en la hematopoyesis, sino también en el desarrollo. Además, las proteínas de fusión identificadas en las leucemias humanas son frecuentemente dominantes negativos de los alelos normales. Por tanto, una de las mayores desventajas de la estrategia *knock-in* es la falta de especificidad de tejido, lo que puede producir letalidad embrionaria. En resumen, debido a las limitaciones mencionadas, esta estrategia complementaría, pero no reemplazaría a la estrategia transgénica. Sin embargo, recientemente se ha observado que el uso de estrategias *knock-in* combinadas con las secuencias loxP permite la regulación temporal o espacial de la mutación (ver más adelante).

Las deleciones cromosómicas recurrentes encontradas en cánceres hematopoyéticos sugieren que, al igual que para muchos tumores sólidos, la inactivación de genes que actúan como supresores tumorales contribuye a la patogénesis. Por ejemplo, deleciones en cáncer mieloide incluyen la del(5q), del(7q), del(9q), del(11q), del(12p), del(13q) y del(20q) lo que sugiere que estos segmentos cromosómicos contienen pro-

blemente supresores tumorales no caracterizados. Sin embargo, los transgenes involucrados en el desarrollo de la leucemia y el linfoma son en su mayoría desconocidos. Existen estrategias sofisticadas para inactivar los supresores tumorales en la línea germinal del ratón. Éstas necesitan fabricar vectores diana que eliminen los genes diana por recombinación homóloga. Dado que ese proceso es poco eficiente, un marcador selectivo que confiere resistencia a un antibiótico se incorpora dentro de la zona que se reemplaza en el transgén. Algunos vectores permiten la escisión de este marcador mediante secuencias loxP. El gen de la neurofibromatosis 1 (NF1) y su homólogo murino son supresores tumorales en la formación de leucemias mieloides⁸. Mutaciones de NF1 causan la neurofibromatosis de tipo 1, una enfermedad dominante con una incidencia de 1 cada 3.500. NF1 codifica para la neurofibromina, una proteína grande que regula la señalización a través de p21ras actuando como una proteína activadora de GTPasas. Ratones deficientes en NF1 mueren en el desarrollo embrionario debido a un desarrollo anormal del sistema cardiopulmonar. Sin embargo, la hematopoyesis está bien establecida en el hígado fetal en este momento, y el crecimiento de células KO para NF1 ha sido investigado *in vitro* tras la incorporación a animales irradiados. Células de hígado fetal NF1-/- muestran una hipersensibilidad selectiva a CFU-GM en respuesta a GM-CSF, similar a lo que se encuentra en las células de la enfermedad humana. Además, la transferencia de células KO fetales produce una sobreproliferación de precursores inmaduros y células mieloides indiferenciadas que infiltran de manera extensiva el hígado y el bazo. Un mutante condicional de NF1 se ha generado con la tecnología Cre-LoxP.

Sistemas inducibles por tetraciclina

Como se ha discutido anteriormente, la letalidad embrionaria en transgénicos o animales mutados es una limitación importante para el análisis *in vivo* de los productos oncogénicos. Una complicación adicional en la interpretación de estos resultados puede ser causada por la respuesta sistémica de los animales a los cambios genéticos durante el desarrollo. Una estrategia ideal *in vivo* sería el control de la expresión inducible de un gen de interés en una forma específica de tejido. Los primeros intentos usaron promotores que podían ser inducidos por metales pesados, empleados en la regulación de los transgenes de BCR-ABL y PML-RAR α . Sin embargo, este sistema tiene dos limitaciones importantes: los promotores producen una expresión ubicua del transgén y, a pesar de su inducibilidad, tienen una actividad basal apreciable. Para eliminar estas limitaciones se han utilizado sistemas combinados donde el transgén está bajo la dirección de dos componentes, un efector y una diana. En el sistema más clásico, la proteína efectora transactiva la transcripción del transgén diana. El método más usado de estos es el sistema regulador dependiente de tetraciclina. En estos sistemas, el efector o activa-

dor de tetraciclina (tTA), es una proteína de fusión donde el dominio de transactivación se fusiona con el represor de tetraciclina de *Escherichia coli*. tTA se une de manera específica tanto a la tetraciclina y al operador (tetO) del operón tet, clonado a 5' del transgén que se pretende activar. En la versión más utilizada del sistema, el tTA no puede unir el ADN cuando el inductor (tetraciclina) está presente (*tet-off*), mientras que en una versión modificada, el tTA reverso se une únicamente al ADN en presencia de tetraciclina (*tet-on*). El sistema *tet-off* se ha probado para evitar la letalidad embrionaria de AML1-ETO y así investigar su papel en las leucemias^{9,10}. Para ello se cruzaron animales que tienen la proteína de fusión dirigida por el promotor de tetraciclina con animales transgénicos en el que la expresión de tTA estaba controlada por el promotor del virus del tumor mamario murino. Cuando se eliminaba la tetraciclina del agua de bebida de los animales, se expresaba la proteína de fusión a niveles elevados en la médula ósea y en los macrófagos peritoneales, y esto se acompañaba a un bloqueo parcial de la diferenciación mielóide. Sorprendentemente, sin embargo, estos animales no desarrollaban leucemias, lo que indicaría que esta proteína de fusión no era suficiente para causar leucemia. Alternativamente, es posible que no exista expresión del transgén de manera específica en el compartimento hematopoyético del que derivan las células leucémicas.

Recientemente el sistema regulador de la tetraciclina se ha perfeccionado más para conferir una especificidad de tejido⁹. Esta estrategia ha sido empleada recientemente para expresar de manera condicional MYC en células hematopoyéticas. Para conseguir especificidad de tejido se expresa el controlador del operador de tetraciclina bajo control del *enhancer* de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y del promotor de S α (E μ tA). Los transgénicos desarrollan linfomas malignos de tipo T y leucemias mieloides agudas cuando se elimina la tetraciclina del sistema. La inactivación del transgén al añadirse tetraciclina previene el desarrollo de más tumores y produce la regresión de los ya establecidos. El patrón diferente del fenotipo leucémico observado en estos ratones comparado con los transgénicos E μ -MYC que desarrollan leucemias de células B, puede atribuirse a la diferencia entre cepas usadas en estas investigaciones. En cualquier caso, se ha podido demostrar que es necesaria la expresión continuada de MYC para inducir y mantener los tumores¹¹. Esta reversibilidad de la tumorigénesis, incluso en estadios avanzados de la leucemia, se demostró también en transgénicos de BCR-ABL. Conjuntamente, estos importantes resultados prueban que a pesar de la naturaleza en varios estadios del cáncer, el rescate de una única lesión genética puede revertir la tumorigenicidad y ser de gran importancia terapéutica.

El sistema Cre-loxP

El uso de recombinasas específicas de secuencia ha expandido las posibilidades de producir manipulaciones genéticas para estudiar la patogénesis de las enfer-

medades hematopoyéticas. Aunque varias recombinasas específicas de secuencia, como la derivada de levadura Flp/frt son cada vez más usadas, el sistema Cre-loxP es el más usado en la actualidad para manipular el genoma del ratón. Cre es una recombinasa específica del bacteriófago P1 que reconoce 34 bp de los llamados lugares loxP. Cre cataliza la delección de un segmento de ADN si está flanqueado por lugares loxP colocados en orientación opuesta. El sistema representa un instrumento ideal para manipular *in vivo* la organización génica. De hecho, los lugares loxP pueden ser introducidos por recombinación homóloga en cualquier lugar del genoma de ratón. De manera paralela, han sido generados mutantes que expresan la recombinasa Cre en cualquier tejido o tipo celular. Bases de datos creadas a partir de transgénicos que expresan Cre, permiten que puedan usarse virtualmente para cualquier tipo de aplicación. El sistema se desarrolló inicialmente para la generación de *knock-outs* condicionales que eliminan el gen de interés en determinados tejidos o tipos celulares. En este sistema, los lugares loxP se localizan en regiones intrónicas flanqueando la región codificante del gen a inactivar. El ratón *knock-out* se genera al cruzar estos mutantes con transgénicos que expresan un transgén de Cre en determinados tejidos. Más recientemente, este sistema también se ha usado para producir pequeñas alteraciones en genes o secuencias reguladoras para modular la activación del transgén de manera específica, así como para producir grandes delecciones o translocaciones génicas. De esta forma, se puede emplear el sistema Cre-loxP para copiar mutaciones encontradas en cánceres humanos, produciendo translocaciones y eliminando determinados supresores tumorales de manera condicional. En la primera estrategia se coloca un transgén bajo el control de un represor separado por una secuencia aislante flanqueada por secuencias loxP. Cuando se expresa Cre, esto induce la recombinación que pone el transgén bajo la influencia del promotor fuerte, induciendo su expresión. Alternativamente, el transgén puede introducirse en un intrón del gen parental precedido por un lugar loxP, mientras que el segundo se coloca justo antes de la primera metionina. Bajo la acción de Cre, la recombinación pondrá el transgén bajo el control del promotor natural.

Colocando lugares loxP en cromosomas diferentes, mediante dos tandas de recombinación homóloga y al poner estas células en contacto con la recombinasa Cre de manera recíproca, se producirá una lesión génica similar a la observada en las células cancerosas. Experimentos exitosos con esta estrategia se han hecho recombinando los lugares de rotura de Mll y Af9 y Aml1 y Eto. En ambos casos, el lugar involucrado fue translocado de manera exitosa, no únicamente *ex vivo* sino también *in vivo*, demostrando la factibilidad de esta estrategia. Translocaciones entre Mll y Enl o Af9 causan neoplasias mieloides, iniciando en progenitores multipotentes troncales o mieloides. Sin embargo, mientras Mll-Enl pueden producir leucemias a partir de progenitores de células T, no se producen tumores a partir de las translocaciones entre Mll-Af9 en células T¹².

En resumen, el desarrollo reciente de técnicas genéticas sofisticadas basadas en manipular el genoma del ratón ha permitido avances extraordinarios en la generación de modelos de enfermedades humanas hematopoyéticas, lo que ha avanzado nuestro entendimiento de los mecanismos de estas patologías. Aunque en muchos casos, los intentos iniciales de reproducir no fueron exitosos, estos estudios añadieron nuevos componentes para poder entender su patogenia molecular. Únicamente la integración de esta información a través de metodologías *in vivo* específicas, permitirán obtener un conocimiento más completo de estos procesos.

Enfermedades de la hemostasia

En la actualidad, prácticamente todos los genes de la hemostasia han sido mutados en células embrionarias de ratón. Los resultados que se han obtenido de estos estudios han cambiado profundamente la manera de entender la hemostasia que tenemos. Los estudios en animales han permitido demostrar que muchas de las mutaciones son incompatibles con la vida, pero no siempre debido a problemas en la hemostasia. Por otra parte, genes centrales en la cascada de la coagulación pueden perderse y generar ratones adultos, indicando que los procesos de hemostasia tienen varios niveles de redundancia funcional que permiten prescindir de algunas ramas del sistema si se mantienen otras.

Modelos de hemofilia

El factor IX circulante se inactiva mediante el factor tisular/factor VIIa y se une al factor VIII circulante para formar el complejo de proteasas factor IXa/FVIII que activa el factor X (complejo tenasa). Como en los humanos, los genes de los factores VIII y IX están localizados en el cromosoma X del ratón. Los ratones *knock-out* para factor IX tienen hinchazón hemorrágica en los pies debido a sangrados espontáneos. Mordeduras entre compañeros de jaula lleva normalmente a hemorragias que causan la muerte del animal. Si la herida no se cauteriza, la amputación parcial de la cola produce hemorragias mortales. Los animales presentan esplenomegalia, un signo de anemia. En contraste, los animales deficientes en factor VIII tienen un fenotipo algo más suave. Estos animales no tienen hemorragias espontáneas; únicamente se observan tras la amputación parcial de la cola, que es fatal en dos tercios de los animales examinados. En humanos, la deficiencia en factor VIII y en factor IX tiene una clínica prácticamente idéntica. Los síntomas varían entre personas, pero la presencia de hemorragias graves y sangrados en las articulaciones son comunes. Es posible que el fenotipo relativamente más suave en los ratones deficientes en factor VIII refleje una diferencia específica de la proteína murina. Sin embargo, estos modelos murinos son inútiles para explorar la posibi-

lidad de terapia génica en humanos, ya que hay estudios exitosos con ambos modelos murinos de hemofilia. Los papeles no esenciales de los factores VIII y IX en humanos y en el desarrollo murino se correlacionan con la observación de que hay poca o ninguna expresión de estos genes durante el desarrollo embrionario temprano, mientras que otros factores que generan trombina se expresan de manera apreciable. Además, el patrón de expresión de estos factores en desarrollo embrionario humano sugiere que ambos tienen un papel menos importante en el embrión que en los adultos. Como estos factores amplifican la trombina cuando se necesitan grandes cantidades de la proteasa, no están involucrados probablemente en la vía directa usada para generar trombina durante la embriogénesis para los procesos de vasculogénesis. Los factores VIII, IX y XI de la coagulación no son esenciales para generar la pequeña cantidad de trombina que presuntamente se necesita, sino que parecen necesarios para aumentar la concentración de trombina posteriormente en la formación del coágulo^{13,14}. Una de las mayores contribuciones de esos modelos es la posibilidad de probar estrategias de terapia génica en animales deficientes en uno de los dos factores. Las hemofilias A y B son enfermedades candidatas excelentes para la aplicación de terapia génica en células somáticas. Una de las mayores ventajas en el desarrollo de estrategias preclínicas de terapia génica es la disponibilidad de varios modelos animales para ambos tipos de deficiencias. Estos modelos contienen la mayoría de los aspectos fenotípicos de la enfermedad humana, y han probado ser muy informativos para explorar la eficacia y seguridad de la terapia génica. Progresos considerables se han realizado en el diseño de estos protocolos, y durante los últimos 5 años se ha demostrado la posibilidad de producir una corrección de la expresión de larga duración que son valores terapéuticos en plasma de ambos factores. Estos modelos animales también han elucidado potenciales complicaciones de la terapia génica, incluyendo la toxicidad aguda derivada del vector con inducción de anticuerpos neutralizantes a los productos del transgén. Sin embargo, aunque el paradigma de modelo preclínico del ratón hemofílico seguido de estudios en perros hemofílicos ha probado ser muy valioso para evaluar seguridad y eficacia de estos protocolos, persisten varias limitaciones. Por ejemplo, el tiempo en que los valores de factores de coagulación se mantienen de manera sostenible parece depender del fondo genético exacto en que se hagan los experimentos en ratón. Además, no se dispone de un modelo en que se incluyan las infecciones virales que son frecuentes en los pacientes humanos y que pueden comprometer el éxito de una estrategia de terapia génica¹⁵.

Modelos de trombofilia

La asociación de mutaciones genéticas con la trombosis venosa se conoce desde los años 1980, con la determinación de la causa de trombosis en familias que presentaban deficiencias específicas en factores anti-

coagulantes naturales, fundamentalmente de anti-trombina, proteína C y proteína S. Las mutaciones que causaban esas deficiencias eran en general mutaciones de pérdida de función, en las que diferentes cambios producen una proteína o bien no expresada o que se expresa con una eficacia muy baja. En general, las deficiencias asociadas con trombosis venosa se encuentran en heterocigosis, aunque se han descrito casos de homocigotos en los que se da una enfermedad mucho más grave, en la que se presenta coagulación intravascular diseminada en el momento del nacimiento que puede ser mortal si no se trata con concentrados de la proteína deficitaria. Por ello, los modelos en ratón que mejor describen la patología son ratones *knock-out* o *knock-in* en los que se ha sustituido el gen por secuencias no funcionales o por secuencias con mutaciones específicas.

Los ratones deficientes en proteína C (PC^{-/-}) se desarrollan con normalidad hasta el nacimiento, sin embargo mueren de manera perinatal. En estos ratones no puede detectarse fibrinógeno en el plasma, lo que es indicativo de una coagulopatía de consunción grave que es la causa de la muerte. Síntomas de trombosis, incluyendo deposición de fibrina en el cerebro y necrosis en focos hepáticos son visibles a partir del día E12.5. Este fenotipo es similar al observado en ratones deficientes en trombomodulina rescatados con células tetraploides, lo que puede ser indicativo de que TM y proteína C tienen papeles similares durante la embriogénesis^{16,17}. La formación de trombos es más severa a partir del día E17.5, cuando el 22 % de los ratones son *knock-outs*, mientras que en el nacimiento sólo un 8 % de los cruces entre heterocigotos son *knock-outs*. Dado que el nacimiento a través de cesáreas no aumenta la supervivencia de los *knock-outs*, es poco probable que sea el trauma asociado con el nacimiento el que cause la mortalidad. Los ratones heterocigotos para proteína C no desarrollan trombosis pero mantienen niveles de fibrinógeno en plasma significativamente reducidos, lo que es coincidente con la existencia de una coagulopatía en estos animales. Al cruzar los animales deficientes en proteína C con animales KO para el factor VII se observó de manera sorprendente que en estos animales aumenta la patología trombótica. Esto implica que la generación descontrolada de trombina que se espera con la falta de APC no se compensa por la falta de factor VII. En cambio, la coagulopatía de los PC^{-/-} se compensa con la falta de factor XI, ya que los dobles *knock-outs* sobreviven a la letalidad neonatal, llegando a varias semanas de edad. El crecimiento de estos animales es retardado y presentan hemorragias y deposiciones de fibrina y fibrosis. Así, estos animales tienen un fenotipo protrombótico más tardío en su desarrollo. Por tanto, la limitación de la generación de trombina a través de la inactivación del gen del factor XI no es suficiente para compensar totalmente la falta de control por APC en la generación de trombina. Sería interesante saber si la falta de cualquiera de los dos sustratos de proteína C puede compensar la falta de APC en estos ratones.

La mutación de cambio de sentido R506Q en el factor V conocida como factor V Leiden, es el factor ge-

nético asociado a trombosis más frecuente en humanos. La creación de un *knock-in* que introduce la mutación R504Q en ratones produce animales que son resistentes a APC. La fracción de resistencia a APC en plasma de estos ratones disminuye de 2 a 1,5 en heterocigotos y a 1,3 en homocigotos¹⁸. Los ratones homocigotos para la mutación aparecen sanos, llegan a adulto y se reproducen de manera normal. Ni la biosíntesis ni el procesamiento del factor V está afectada por la presencia de esta mutación. Sin embargo, se observa deposición de fibrina en varios órganos, indicando que existe una producción de trombina de baja intensidad pero constante en estos animales. A pesar de este estado pretrombótico, la única presencia patológica remarcable es la de algunos focos fibróticos en el hígado de estos animales. El fondo genético tiene un efecto remarcable en la expresión del fenotipo de estos animales. Mientras en el fondo genético C57BL/6J los animales se desarrollan de manera normal y sin problemas, en el fondo mixto 129Sv-C57BL/6J aproximadamente el 50 % de los ratones mutantes sufren de coagulación intravascular diseminada en el período perinatal. Los modificantes genéticos que funcionan en este período no han sido descritos hasta el momento.

En modelos de inducción de trombosis se ha podido observar que los ratones mutantes en el factor V Leiden tienen aumentada la formación de trombosis arterial y aterosclerosis en cruces con ratones *knock out* para ApoE^{-/-}.

El gen de la antitrombina (AT) fue eliminado mediante una deleción que eliminaba el exón II. Los ratones heterocigotos tienen una disminución del 50 % en el antígeno plasmático y en su funcionalidad. Sin embargo, estos animales se mantienen sanos si no existen estímulos protrombóticos. La deleción homocigota produce mortalidad intrauterina en todos los mutantes a partir del día E14.5. A partir de entonces, los ratones mueren de hemorragias graves en el cerebro en un 70 % de los embriones ATIII^{-/-} en el día E15.5 y en todos ellos en el día E16.5. En los análisis patológicos se observa necrosis en el miocardio e hígado, además de depósitos de fibrina en los sinusoides hepáticos pero no en otros órganos¹⁹.

El papel de proteína Z en la hemostasia permanece oscuro. Los ratones deficientes en proteína Z son fenotípicamente normales, y no presentan evidencias de trombosis vascular o deposición de fibrina hepática. Sin embargo, cuando se cruzan estos ratones con ratones homocigotos para el factor V Leiden se produce una disminución en la supervivencia de estos ratones debida a la coagulopatía consuntiva en estos ratones. Estos estudios demuestran la naturaleza multigénica de la trombofilia y predicen que la deficiencia de proteína Z en humanos puede estar asociada con trombosis²⁰.

Conclusión

Aunque los mecanismos precisos de la patología humana en las enfermedades hematológicas son com-

plejos, la acumulación de datos de modelos animales hace que nuestra visión de la patología pueda hacerse desde condiciones experimentales reguladas. Además, los modelos animales permiten una resolución molecular de la patología en el contexto del animal vivo. En el futuro, la existencia de mutaciones dirigidas que puedan permitir introducir nuevas características a los genes involucrados en las enfermedades hematológicas, de una manera controlada en el tiempo y el espacio mediante técnicas de recombinación y expresión reguladas, permitirán alcanzar un nuevo y más detallado nivel de comprensión en sistemas tan complejos como los descritos.

Bibliografía

1. Montini E, Cesana D, Schmidt M, et al. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat Biotechnol.* 2006;24:687-96.
2. Pekarsky Y, Calin GA, Aqeilan R. Chronic lymphocytic leukemia: molecular genetics and animal models. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;294:51-70.
3. Lallemand Y, Nicola MA, Ramos C, et al. Analysis of *Msx1*; *Msx2* double mutants reveals multiple roles for *Msx* genes in limb development. *Development.* 2005;132:3003-14.
4. Insinga A, Pelicci PG, Inucci S. Leukemia-associated fusion proteins. Multiple mechanisms of action to drive cell transformation. *Cell Cycle.* 2005;4:67-9.
5. Purity M, Blanck JK, Schreiber-Agus N. Lessons learned from *Myc/Max/Mad* knockout mice. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;302:205-34.
6. Bernardi R, Grisendi S, Pandolfi PP. Modelling haematopoietic malignancies in the mouse and therapeutical implications. *Oncogene.* 2002;21:3445-58.
7. Corral J, Lavenir I, Impey H, et al. An *Mll-AF9* fusion gene made by homologous recombination causes acute leukemia in chimeric mice: a method to create fusion oncogenes. *Cell.* 1996;85:853-61.
8. Donarum EA, Halperin RF, Stephan DA, et al. Cognitive dysfunction in *NF1* knock-out mice may result from altered vesicular trafficking of *APP/DRD3* complex. *BMC Neurosci.* 2006;7:22.
9. Maddison K, Clarke AR. New approaches for modelling cancer mechanisms in the mouse. *J Pathol.* 2005;205:181-93.
10. Lewandoski M. Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat Rev Genet.* 2001;2:743-55.
11. Arvanitis C, Felsher DW. Conditionally *MYC*: insights from novel transgenic models. *Cancer Lett.* 2005;226:95-9.
12. Drynan LF, Pannell R, Forster A, et al. *Mll* fusions generated by *Cre-loxP*-mediated de novo translocations can induce lineage reassignment in tumorigenesis. *EMBO J.* 2005;24:3136-46.
13. Rawle FE, Lillicrap D. Preclinical animal models for hemophilia gene therapy: predictive value and limitations. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:205-13.
14. Gailani D. Gene targeting in hemostasis. factor XI. *Front Biosci.* 2001;6:D201-7.
15. Rawle FE, Lillicrap D. Preclinical animal models for hemophilia gene therapy: predictive value and limitations. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30:205-13.
16. Jalbert LR, Rosen ED, Moons L, et al. Inactivation of the gene for anticoagulant protein C causes lethal perinatal consumptive coagulopathy in mice. *J Clin Invest.* 1998;102:1481-8.
17. Weiler-Guettler H, Christie PD, Beeler DL, et al. A targeted point mutation in thrombomodulin generates viable mice with a prethrombotic state. *J Clin Invest.* 1998;101:1983-91.
18. Eitzman DT, Westrick RJ, Shen Y, et al. Homozygosity for factor V Leiden leads to enhanced thrombosis and atherosclerosis in mice. *Circulation.* 2005;111:1822-5.
19. Yanada M, Kojima T, Ishiguro K, et al. Impact of antithrombin deficiency in thrombogenesis: lipopolysaccharide and stress-induced thrombus formation in heterozygous antithrombin-deficient mice. *Blood.* 2002;99:2455-8.
20. Yin ZF, Huang ZF, Cui J, et al. Prothrombotic phenotype of protein Z deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:6734-8.

Dianas moleculares para el tratamiento en hematología

F. PRÓSPER

Servicio de Hematología y Área de Terapia Celular. Pamplona.

Resumen

El desarrollo de moléculas como el imatinib, y la demostración de su capacidad de producir una elevada tasa de respuestas en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), sugiere que el tratamiento basado en las dianas moleculares en neoplasias hematológicas es posible. Por otra parte durante la última década el conocimiento de algunos de los mecanismos moleculares que favorecen los procesos de tumorigénesis, y una mejor clasificación de los subtipos de enfermedades basada en las características moleculares, han llevado a una mejor caracterización de algunas de estas posibles dianas terapéuticas, llevando al desarrollo de numerosos compuestos dirigidos contra dichas dianas moleculares. La existencia de anticuerpos monoclonales como el rituximab, inhibidores de mecanismos de transducción de señal como el imatinib o modificadores biológicos como el ácido transretinoico (ATRA) son algunos de los ejemplos más paradigmáticos de este tipo de tratamiento. Por limitaciones obvias de espacio, a lo largo de las siguientes páginas no pretendo revisar exhaustivamente los distintos tratamientos basados en las dianas moleculares, sino tratar de dar una visión global basándome de forma más específica en el desarrollo de la que ha podido ser el ejemplo más significativo de estos nuevos tratamientos, el desarrollo del inhibidor específico de BCR-ABL imatinib.

¿Qué es la terapia dirigida contra dianas moleculares?

Aunque intuitivamente todos sabemos que quiere decir “dianas moleculares” merece la pena hacer algún comentario en relación con su definición que nos ayude a poner en perspectiva de lo que hablamos y que nos ayude a contestar algunas preguntas: ¿qué queremos decir cuando hablamos de terapias dirigidas contra dianas moleculares? Funcionalmente, ¿cómo

podemos asegurar que este tipo de tratamiento es exitoso en la clínica?

De una manera simplista, para que exista este tipo de tratamiento debe existir una diana molecular. Sin embargo, esta sería una definición demasiado amplia, de hecho para que cualquier tipo de tratamiento funcione, debe existir una diana molecular. En algunos casos conocemos la diana antes de desarrollar el tratamiento –como el caso de imatinib– en otros utilizamos el fármaco y sólo posteriormente profundizamos en la diana terapéutica –Aspirina®–. También es posible que un tratamiento no tenga una única diana, como nuevamente ocurre con el imatinib, capaz de actuar sobre distintas dianas (c-ABL, PDGFR o c-Kit).

La LMC nos permite una mejor definición funcional de lo que es una terapia dirigida. Además de la existencia de la diana (el gen *BCR-ABL*), una diana molecular debería estar implicada en procesos biológicos relevantes, preferiblemente fundamentales en el desarrollo del tumor. Nuevamente este sería el caso del imatinib y la LMC, donde se afectan procesos relacionados con el ciclo celular y la apoptosis entre otros. La diana debería ser medible clínicamente (la existencia del oncogén *BCR-ABL*) y debería estar relacionado con el resultado del tratamiento una vez es administrado (la inhibición de la actividad cinasa y la desaparición del gen están directamente relacionados con la respuesta de la enfermedad).

Siguiendo esta definición, es obvio que el imatinib cumple los requisitos para ser considerado una terapia dirigida contra la diana molecular, mientras que otros tratamientos como los antiangiogénicos dirigidos contra el factor VEGF no cumplen, hoy por hoy todos estos criterios (desconocemos con precisión la diana ni las células que son atacadas y tampoco podemos establecer la relación entre tratamiento y respuesta de la enfermedad). Esto no quiere decir que no puedan llegar a cumplir estos criterios en el futuro.

Dianas terapéuticas basadas en mecanismos de transducción de señales

Algunas de las dianas terapéuticas más atractivas en los procesos tumorales derivan de las alteraciones que presentan las células neoplásicas a nivel de las distintas vías de señalización intracelular. Sin embargo, an-

Trabajo financiado en parte por ayudas del Gobierno de Navarra GN 31/2002, Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS 01/0013-02, RETIC C03/10, Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña Automovilista y la Fundación para la Investigación Médica Aplicada.

tes de entrar en algunos ejemplos es importante hacer alguna consideración general. Las células neoplásicas presentan una desproporcionada actividad de algunas vías de señalización, lo cual hace que la inhibición parcial de dichas vías pueda producir un efecto selectivo sobre las células neoplásicas sin producir efectos adversos significativos. Sin embargo, estas mismas vías son esenciales también para las células normales, por lo que un exceso de inhibición puede llevar a desarrollar importantes toxicidades¹.

Otro aspecto importante a la hora de diseñar inhibidores, es el grado de especificidad y selectividad de dichos compuestos. Habitualmente es complejo obtener inhibidores totalmente específicos ya que en la mayoría de las ocasiones, son capaces de inhibir distintas moléculas o receptores lo cual condiciona que además de los efectos sobre las células tumorales, puedan tener efectos sobre otros tejidos. Además es importante considerar que muchas de las vías de transducción de señal sobre las que actúan forman parte de complejos circuitos lo que conlleva una alta redundancia y por tanto en ocasiones una disminución de la eficacia terapéutica.

Inhibición de la actividad cinasa asociada a proteínas de fusión: papel del imatinib

Enfermedades caracterizadas por la aparición de determinados oncogenes que inducen la activación constitutiva de determinadas vías de señalización intracelular favorecen el desarrollo de dianas específicas y selectivas. Un ejemplo son las translocaciones específicas que inducen la formación de genes de fusión con un aumento de la actividad cinasa como son *BCR-ABL*, *TEL-PDGFRβ* o *NPM-ALK*.

La LMC se caracteriza por la presencia de una translocación cromosómica t(9;22)(q34;q11) específica y recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 lo que genera un cromosoma anormal que se conoce como cromosoma Filadelfia². La consecuencia molecular de dicha translocación es la fusión entre el oncogén *c-abl* presente en el cromosoma 9 y secuencias del cromosoma 22 conocidas como *bcr* lo que genera un gen de fusión *bcr-abl*³. Este gen codifica una proteína de fusión cuyo tamaño puede variar según los puntos de rotura en la región Bcr. Las 2 proteínas más frecuentemente detectadas son p210 y p185. La proteína p210 se detecta en el 95 % de las LMC y en el 20 % de los pacientes diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda (LLA), mientras que p185 se detecta en los pacientes con LLA con cromosoma Filadelfia, aunque también un porcentaje de pacientes con LMC expresan p185⁴. Ambas proteínas se caracterizan por tener una hiperactividad tirosincinasa responsable de la activación de numerosas rutas de transducción de señal y que es esencial para la capacidad de transformación maligna^{5,6}. Diversos estudios han demostrado que la presencia del oncogén *Bcr-Abl* y la expresión de la proteína quimérica p210 es el agente causal de la LMC^{7,8}. Sin embargo, aunque la expresión de *Bcr-Abl*

es la causa desencadenante de la enfermedad, otras alteraciones citogenéticas son responsables de la progresión de la enfermedad.

El aumento de la actividad tirosincinasa de ABL es responsable de la activación de rutas de señalización que conducen a alteraciones en los mecanismos de regulación del ciclo celular, apoptosis, migración y adhesión celular de las células leucémicas^{6,9}. El imatinib es capaz de unirse específicamente a la región de unión del ATP del dominio cinasa de ABL y de esta forma inhibirlo. La naturaleza de esta inhibición ha sido caracterizada estructuralmente demostrándose que para que el imatinib se una a ABL es necesario que el dominio cinasa se encuentre en la conformación inactiva lo cual confiere especificidad a esta unión¹⁰.

Los resultados de los ensayos clínicos realizados con imatinib en fase crónica de la enfermedad han demostrado que más del 95 % de los pacientes obtienen una respuesta compuesta hematológica y más de un 50 % experimentan una respuesta citogenética¹¹. Estas respuestas suelen ser mantenidas y sólo en un pequeño porcentaje de pacientes se produce una progresión de la enfermedad debido al desarrollo de resistencia al imatinib por parte de las células leucémicas^{12,13}. Por el contrario en fases avanzadas de la enfermedad, a pesar de que un número importante de pacientes presentan una respuesta hematológica y también citogenética, el desarrollo de resistencias es la norma con la consiguiente progresión de la enfermedad^{11,14-16}. Estudios tanto *in vitro* como *in vivo* han aportado nueva información relacionada con los potenciales mecanismos de resistencia al imatinib¹⁷.

Un número importante de pacientes diagnosticados de LMC, presentan la translocación t(5;12)(q33;p13) que genera la proteína de fusión TEL-PDGFR¹⁸. Como consecuencia de dicha translocación se produce un aumento constitutivo de la actividad cinasa de *PDGFRβ* lo que estimula el crecimiento de los progenitores hematopoyéticos primitivos y condiciona la aparición de la enfermedad. La capacidad del imatinib de inhibir específicamente la actividad cinasa de *PDGFRβ* ha demostrado su potencial en el tratamiento de pacientes con esta alteración¹⁹, siendo un nuevo ejemplo de una diana terapéutica dirigida contra una diana molecular.

Inhibición de otras moléculas con actividad tirosincinasa

Existen múltiples vías de señalización dependientes de la actividad tirosincinasa. La vía de Jak-stat está implicada en la señalización de numerosos factores de crecimiento y citocinas pudiendo ser inhibida a distintos niveles. Debido a que muchos de estos factores de crecimiento participan en procesos de proliferación o resistencia a la apoptosis, la inhibición de la actividad dependiente de Jak-stat se presenta como una diana particularmente atractiva (interleucina-6 [IL-6] en mieloma; IL-2 en algunos linfomas T; IL-1, IL-3 o factor estimulante de colonias granulocítico-macrofágicas [GM-CSF] en leucemia mieloblástica aguda [LMA])^{1,20}.

Recientemente se ha descrito el papel de las mutaciones de FLT-3R en la patogenia de la LMA. Hasta el 30 % de los pacientes con LMA presentan bien una duplicación en tándem o una mutación en el dominio TK que produce la activación constitutiva del receptor, susceptible de ser inhibida mediante la utilización de inhibidores específicos²¹⁻²³.

Por último no podemos olvidarnos del papel de las terapias dirigidas en la leucemia promielocítica aguda (APL) donde la contribución de grupos españoles ha sido particularmente significativa^{24,25}. La translocación más frecuente en la LPA, t(15;17)(q22;q11.2) induce la fusión entre los genes *RARα* y *PML* con la generación de una proteína de fusión que presenta los dominios funcionales de ambas proteínas^{26,27}. La proteína de fusión recluta correpresores nucleares (SMRT) y N-CoR que junto con las desacetilasas de histonas (HDAC) mantienen la cromatina en la conformación cerrada e impiden el efecto del receptor de los retinoides sobre genes que participan en el desarrollo de las células mieloides²⁸. En pacientes que expresan la proteína de fusión PML-RARα, el tratamiento con ATRA transforma la actividad dominante negativa de la proteína de fusión en un activador con lo que se induce la diferenciación de las células leucémicas, habiendo sido el primer ejemplo de terapia diferenciadora.

Conclusiones

Estos son algunos de los ejemplos más significativos en el campo de las nuevas dianas terapéuticas en hematología pero sin duda no son los únicos. No hemos querido entrar en el campo de los anticuerpos monoclonales como rituximab, campath o mylotarg. Aunque conocemos las células diana de dichos anticuerpos no se conoce el mecanismo exacto por el cual ejercen su acción terapéutica. Existen asimismo numerosos fármacos en desarrollo en el campo de otras neoplasias hematológicas y oncológicas en fase de experimentación algunos de los cuales sin duda llegarán a la práctica clínica en el futuro próximo. Sin embargo, a pesar de las enormes expectativas que despiertan estos nuevos tratamientos no podemos ignorar el hecho de que incluso en casos como el del imatinib, donde el éxito terapéutico ha sido indudable, el desarrollo de mecanismos de resistencia por parte de las células leucémicas o el hecho de que el fármaco no tiene la misma eficacia sobre la célula origen de la enfermedad –célula madre del cáncer– nos lleva a un optimismo moderado, lejos de establecer estos fármacos como la panacea en el tratamiento de las neoplasias hematológicas.

Bibliografía

- Frank DA. Stat signaling in cancer: insights into pathogenesis and treatment strategies. *Cancer Treat Res*. 2003;115:267-91.
- Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 1973;243:290-3.
- Shtivelman E, Lifshitz B, Gale RP, Canaani E. Fused transcript of *abl* and *bcr* genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature*. 1985;315:550-4.
- Serrano J, Román J, Sánchez J, et al. Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood*. 2000;95:2659-65.
- Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of *bcr-abl* oncogene products. *Science*. 1990;247:1079-82.
- Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2000;96:3343-56.
- Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science*. 1990;247:824-30.
- Li S, Ilaria RL Jr, Million RP, Daley GQ, Van Etten RA. The P190, P210, and P230 forms of the *BCR/ABL* oncogene induce a similar chronic myeloid leukemia-like syndrome in mice but have different lymphoid leukemogenic activity. *JEM*. 1999;189:1399-412.
- Horita M, Andreu EJ, Benito A, et al. Blockade of the Bcr-Abl kinase activity induces apoptosis of chronic myelogenous leukemia cells by suppressing signal transducer and activator of transcription 5-dependent expression of Bcl-xL. *JEM*. 2000;191:977-84.
- Schindler T, Bornmann W, Pellicena P, Miller WT, Clarkson B, Kuriyan J. Structural mechanism for STI-571 inhibition of abelson tyrosine kinase. *Science*. 2000;289:1938-42.
- Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med*. 2001;344:1038-42.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2001;344:1031-7.
- Kantarjian H, Sawyers C, Hochhaus A, et al. Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med*. 2002;346:645-52.
- Talpaz M, Silver RT, Druker BJ, et al. Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood*. 2002;99:1928-37.
- Kantarjian HM, Cortes J, O'Brien S, et al. Imatinib mesylate (STI571) therapy for Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia in blast phase. *Blood*. 2002;99:3547-53.
- Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood*. 2002;99:3530-9.
- Agirre X, Fontalba A, Andreu EJ, et al. Lack of Bcr-Abl point mutations in chronic myeloid leukemia patients in chronic phase before imatinib treatment is not predictive of response. *Haematologica*. 2003;88:1425-6.
- Golub TR, Barker GF, Lovett M, Gilliland DG. Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*. 1994;77:307-16.
- Apperley JF, Gardembas M, Melo JV, et al. Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med*. 2002;347:481-7.
- Savino R, Ciapponi L, Lahm A, et al. Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6. *Embo J*. 1994;13:5863-70.
- Tse KF, Allebach J, Levis M, Smith BD, Bohmer FD, Small D. Inhibition of the transforming activity of FLT3 internal tandem duplication mutants from AML patients by a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*. 2002;16:2027-36.

22. Tse KF, Novelli E, Civin CI, Bohmer FD, Small D. Inhibition of FLT3-mediated transformation by use of a tyrosine kinase inhibitor. *Leukemia*. 2001;15:1001-10.
23. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001;98:1752-9.
24. Sanz MA, Tallman MS, Lo-Coco F. Practice points, consensus, and controversial issues in the management of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia. *Oncologist*. 2005;10:806-14.
25. Sanz MA, Vellenga E, Rayon C, et al. All-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy for the treatment of elderly patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2004;104:3490-3.
26. Dyck JA, Maul GG, Miller WH Jr, Chen JD, Kakizuka A, Evans RM. A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein. *Cell*. 1994;76:333-43.
27. Weis K, Rambaud S, Lavau C, et al. Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RAR alpha in acute promyelocytic leukemia cells. *Cell*. 1994;76:345-56.
28. Miller WH Jr, Waxman S. Differentiation induction as a treatment for hematologic malignancies. *Oncogene*. 2002;21:3496-506.

Farmacogenética en Hematología

R. GONZÁLEZ-CONEJERO¹, J. CORRAL¹, V. ROLDÁN² Y V. VICENTE²

¹Ramón y Cajal de la Universidad de Murcia. ²Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia.

“Si no fuera por la gran variabilidad entre individuos la medicina sería una ciencia y no un arte”

Sir WILLIAM OSLER, 1892

En la década de 1950, la observación clínica de que pacientes con un mismo tratamiento tuvieran distintas concentraciones del fármaco en plasma u orina, llevó a Vogel a acuñar el término farmacogenética. Nace de este modo esta ciencia, cuyo objetivo es identificar las bases genéticas de las diferencias interindividuales en la eficacia o reacciones adversas de un tratamiento farmacológico¹. De forma paralela surge la farmacogenómica, o el estudio de las bases genético-moleculares de las enfermedades con el fin de diseñar nuevas dianas terapéuticas. Se trata de una disciplina nueva pero crucial con dos repercusiones: médica (definir el tratamiento más adecuado para cada paciente o la denominada medicina a la carta), y económica, ya que el empleo incorrecto de un tratamiento (por ineficaz o por la morbilidad y mortalidad asociadas a reacciones adversas) supone un importante coste. Un estudio en Reino Unido sugiere que 1/15 ingresos en hospitales se debe a reacciones adversas a fármacos, mientras que en Estados Unidos unos 2,2 millones de norteamericanos hospitalizados cada año tienen reacciones adversas a los fármacos, aun cuando éstos han sido prescritos y administrados adecuadamente. Entre los objetivos de la farmacogenética se encuentran disminuir estas reacciones adversas, reducir el número de fármacos para tratar a un paciente, la reaprobación de fármacos retirados para poblaciones más específicas, o establecer la necesidad de diagnóstico genético antes de una prescripción.

Aunque la farmacogenética tiene el potencial de identificar el fármaco correcto en dosis óptima para cada paciente, nunca va a explicar todas las diferencias en la respuesta a ese fármaco. Otros factores no genéticos como edad, sexo, estadio de la enfermedad, función orgánica y factores ambientales, también van a influenciar esa respuesta. Sin embargo, los factores genéticos adquieren un peso específico ya que son los únicos que permanezcan estables a lo largo de la vida del individuo. La reciente publicación de la secuencia completa del genoma humano ha permitido que en los últimos 5 años, la farmacogenética haya experimentado un significativo avance. Las variaciones de secuencias génicas más comúnmente heredadas son

los polimorfismos. Hoy sabemos que unos 10 millones de polimorfismos son los responsables de la diversidad en nuestra especie y en parte, van a ser determinantes de la eficacia y/o efectos adversos de un tratamiento. Cuando un fármaco se administra, se absorbe y distribuye hasta su sitio de acción donde interactúa con su sustrato (receptores y enzimas), se metaboliza y luego se excreta. En cada uno de estos pasos podría existir variaciones genéticas (principalmente polimorfismos) que condicionasen un resultado clínico distinto ante un mismo tratamiento. Es importante destacar que una respuesta atípica a un fármaco raramente va a ser condicionada por sólo un gen. Por ejemplo, es sabido que los afroamericanos responden mejor a los diuréticos que los caucásicos, debido a una mayor retención de sales y menor activación del sistema angiotensina renal, y que esta susceptibilidad no se explica por un solo gen. De este modo, el conocimiento de las bases genéticas de cualquier enfermedad está ayudando no sólo a la mejora del manejo clínico de los pacientes, sino también al conocimiento del desarrollo de la propia enfermedad. En el campo de la hematología ya se conocen variaciones genéticas claramente asociadas con la efectividad o toxicidad de un tratamiento. A pesar de la enorme amplitud de patologías en nuestra área, las enfermedades en las que claramente se ha establecido la importancia de la farmacogenética son las que veremos a continuación.

Farmacogenética en patología hematológica

Leucemia linfoblástica aguda (LLA) en niños

La incidencia de cáncer en niños entre 0-14 años es de 1/7.000, frecuencia homogénea en la mayoría de los países del mundo. El más frecuente de ellos es la LLA, que supone un 25 % del total. Hace 4 décadas, esta enfermedad era prácticamente mortal, siendo hoy la tasa de curación del 80 %. Esta mejora se puede atribuir en gran medida al mejor conocimiento de los valores pronósticos, los tratamientos de intensificación y combinación con quimioterapias, mejoras en el tratamiento neurológico y terapia de soporte. Sin embargo, en los últimos 20 años estos factores se han barajado empíricamente, diseñando estrategias de tra-

Tabla 1. Variaciones genéticas y eficacia de tratamiento en patologías hematológicas

Patología	Gen	Polimorfismo	Tratamiento	Relación eficacia	Toxicidad	Referencia
LLA	TPMT	TMPT*2 TMPT*3A TMPT*3C	Mercaptopurina	Sí	Sí	2, 4
LMC	DKFZP434C131	rs2290573	Imatinib	Sí		5
LNH	FcγRIIIa	Val158Phe	Rituximab Rituximab + CHOP	Sí Sí		6 7

LLA: leucemia linfoblástica aguda; LMC: leucemia mieloide crónica; LNH: linfoma no hodgkiniano.

tamiento que mejoraran la tasa de curación de los pacientes. En 1980 se identificó un polimorfismo funcional en la tiopurina-S-metil transferasa (TPMT) en voluntarios sanos y en la actualidad constituye uno de los mejores ejemplos desarrollados de farmacogenética clínica². La TPMT es una enzima citosólica que cataliza la metilación de los compuestos sulfidrílicos heterocíclicos y aromáticos de los agentes tiopurínicos azatioprina, mercaptopurina y tioguanina, propiciando así su metabolización. Estos fármacos se usan como antineoplásicos e inmunosupresores en el tratamiento no sólo de LLA, también en enfermedades reumáticas y en el trasplante de órganos sólidos (ciclosporina). El principal mecanismo de citotoxicidad de estos fármacos es la incorporación de nucleótidos tioguaninas en el ADN. La actividad de la TPMT es altamente variable (90-0,3 %), y viene determinada por distintos haplotipos. Las bases moleculares de la actividad polimórfica de la TPMT han sido bien definidas y aunque se han identificado 20 alelos, tres de ellos (TPMT*2, TPMT*3A y TPMT*3C) explican el 95 % de la variabilidad de la actividad enzimática, de manera que los sujetos homocigotos son deficientes de tal actividad (tabla 1). Estudios recientes han establecido que el mecanismo que ocasiona una menor actividad catalítica de los alelos TPMT*2, TPMT*3A y TPMT*3C consiste en una mayor tasa de degradación proteolítica³. En pacientes con variantes no funcionales de TPMT que son tratados con fármacos tiopurínicos parece claramente establecida una toxicidad hematológica grave (incluso muerte)⁴. Sin embargo, entre sujetos normales homocigotos y heterocigotos las diferencias en la toxicidad del tratamiento no son tan claras. Por otra parte, el genotipo TPMT parece tener un impacto sustancial en la enfermedad mínima residual tras la administración de mercaptopurina durante el tratamiento de consolidación. Según el estudio de Stanulla et al⁴, los pacientes heterocigotos tendrían casi tres veces menos riesgo de sufrir enfermedad mínima residual tras el tratamiento de consolidación (OR: 2,9; IC 95 %: 0,13-0,86; p = 0,02).

Algunos centros americanos como la Clínica Mayo y el St. Jude's Children's Hospital, ya realizan pruebas de diagnóstico molecular de la enzima TPMT como una práctica corriente, lo que les permite individualizar el tratamiento de los fármacos.

Leucemia mieloide crónica (LMC)

La LMC es un síndrome mieloproliferativo clonal cuya característica citogenética más habitual (90 % de los casos) es la translocación recíproca de los cromosomas 9 y 22, resultando la proteína de fusión Bcr-Abl. Aunque el único tratamiento curativo para la LMC es el trasplante de médula, en los últimos años ha surgido una alternativa farmacológica: el imatinib, un inhibidor selectivo de la actividad tirosinasa de Bcr-Abl. El estudio internacional multicéntrico IRIS, en el que participaron hematólogos españoles, intentó identificar marcadores genéticos en pacientes con LMC que se asociaran a una mejor respuesta citogenética (RC) como variable independiente, en respuesta al tratamiento con imatinib⁵. Tras analizar 26 genes candidatos, este estudio encontró una asociación significativa entre la mejor RC y el polimorfismo rs2290573 (en 15q22.23). En los pacientes con genotipo CC la tasa de RC fue del 52 %, frente al 89 % en los portadores del polimorfismo (OR: 6,72; IC 95 %: 1,51-29,91). El análisis de progresión de la enfermedad en pacientes tratados con imatinib también estuvo relacionado con el genotipo; los pacientes con genotipo CC no sólo presentaron mayor tasa de progresión (21 % frente a 6 %) sino que además estuvieron menor tiempo en la fase de estabilización⁵ (tabla 1). Hasta la fecha no se conoce con exactitud la funcionalidad de DKFZP434C131, el gen donde se ha localizado el polimorfismo rs2290573, y no hay evidencia de que esta variable genética afecte su expresión. Dado que rs2290573 está en una zona intrónica, es más probable que represente un marcador de alguna variación genética cercana que sea la realmente responsable de los diferentes niveles de expresión observados en sujetos con genotipo CC. Aunque queda mucho por hacer en este campo, ya se prevé la importancia de la farmacogenética en el manejo clínico de la LMC.

Linfomas no hodgkinianos (LNH)

El rituximab es un anticuerpo monoclonal antiinmunoglobulina G1 (anti-CD20) que, en los últimos años, ha modificado considerablemente la estrategia terapéutica de los síndromes mieloproliferativos B, particularmente de los LNH. Sin embargo, entre el

30-50 % de los pacientes con LNH de bajo grado, no experimentan respuesta clínica al rituximab. Estudios *in vitro* sugieren que el rituximab induce lisis de células tumorales por citotoxicidad dependiente de anticuerpos mediada por células. Este proceso requiere receptores de leucocitos para la porción Fc de las IgG (FcγR): los antígenos IgG se unirían a los FcγR de células citotóxicas disparando así los mecanismos de activación celular. Una de las tres clases de FcγR que se expresan en humanos, el FcγRIIIa que se expresa en células NK y macrófagos, presenta un dimorfismo en la posición 158. Se ha demostrado claramente que la IgG se une más fuertemente a las células NK con FcγRIIIa Val158 que a las FcγRIIIa Phe158. En un estudio reciente, Cartron et al⁶ demuestran una relación directa entre el genotipo FcγRIIIa y la respuesta a rituximab en pacientes con LNH folicular. La tasa de respuesta objetiva a los 12 meses fue del 90 % para los pacientes FcγRIIIa Val158 y del 51 % para los FcγRIIIa Phe158 (p = 0,03). Además, los autores encontraron una remisión molecular a los 12 meses en el 83,3 % de los pacientes del primer grupo, frente al 29,4 % del segundo grupo (p = 0,03)⁶. Muy recientemente, un estudio de Kim DH et al⁷, ha ampliado estos resultados a pacientes con linfoma difuso de células grandes (LDCG) que son tratados con rituximab y quimioterapia (CHOP). Aunque el genotipo FcγRIIIa no se correlacionó con la supervivencia de estos pacientes, sí fue predictivo de la respuesta a rituximab + CHOP. De nuevo, los pacientes FcγRIIIa Val158 homocigotos tuvieron una tasa de respuesta al tratamiento del 88 % frente a 50 % en pacientes FcγRIIIa Phe158 homocigotos⁷. Estos hallazgos, que apuntan a diferencias claras en respuesta al rituximab en pacientes con LNH, permitirá el desarrollo de aproximaciones farmacogenéticas en el tratamiento de estos pacientes que conseguirán mayores tasas de remisión (tabla 1).

Farmacogenética en terapia antitrombótica

La trombosis es el mecanismo subyacente más importante en enfermedad coronaria, infarto embólico y la trombosis venosa. En su conjunto, la enfermedad tromboembólica es la principal causa de morbimortalidad del mundo. Por ello, la terapia antitrombótica es utilizada de forma generalizada en nuestra sociedad, tanto de forma profiláctica como terapéutica. Sin embargo, dado que el riesgo trombótico es una situación compleja, en la que intervienen gran cantidad de factores, una importante proporción de pacientes sufren nuevos episodios trombóticos a pesar del tratamiento.

Terapia antiplaquetaria

Resumiremos brevemente la posible farmacogenética asociada con el tratamiento antiplaquetario. Una más amplia revisión del mismo realizada por nuestro grupo se ha publicado recientemente⁸ (tabla 2).

Aspirina

Es el fármaco antitrombótico más empleado y el estándar en la práctica clínica. La aspirina acetila de forma irreversible el centro activo de la enzima Cox-1, lo que impide la formación de tromboxano A₂ (un potente agonista plaquetario) y metabolitos relacionados. Sin embargo, un alto porcentaje de pacientes con aterosclerosis sufren un nuevo episodio trombótico a pesar del tratamiento con aspirina, lo que ha originado el concepto de resistencia a aspirina. La definición de este concepto sigue siendo aún hoy controvertida⁹. Aunque algunos de los polimorfismos de genes candidatos que podrían estar relacionados con la eficacia de la aspirina ya han sido estudiados, la heterogeneidad de los diseños de los estudios no ha permitido obtener datos concluyentes. Probablemente, el polimorfismo más estudiado en este campo sea el P1^A, responsable del cambio Pro33Leu en la glucoproteína plaquetaria GPIIIa. En la bibliografía encontramos datos que apoyan que los pacientes portadores del alelo Leu33 necesitarían mayor dosis de aspirina para alcanzar el mismo grado de antiagregación que los pacientes Pro33. El genotipo Leu33 también se ha relacionado con una peor evolución en cuanto al número de eventos adversos¹⁰. Sin embargo, los resultados son controvertidos, y ponen en duda la validez de su extrapolación a todas las situaciones patológicas. Menos estudiados han sido los polimorfismos de Cox-1 y Cox-2, ambas dianas terapéuticas de la aspirina⁹. Se ha sugerido que el cambio C50T de Cox-1 se relacione con la dosis que asegura la antiagregación. En sujetos sanos este dimorfismo parece ser predictor de los niveles de TXB₂, un marcador del riesgo trombótico en sujetos tratados con aspirina. También se ha señalado el cambio C893T del receptor de ADP P2Y_{II} como candidato para explicar diferencias en el tratamiento con aspirina, aunque los resultados son preliminares y no está claro el mecanismo involucrado¹¹.

Clopidogrel

Es un derivado de tienopiridinas que antagoniza el receptor de ADP de la superficie plaquetaria de forma

Tabla 2. Variaciones genéticas y eficacia del tratamiento anticoagulante y fibrinólisis

	Gen	Polimorfismo	Efecto	Referencia
Aspirina	<i>GPIIIa</i>	PIA	Controvertido	10
	<i>Cox-1, Cox-2</i>	C50T, G-765C	Inconcluyente	9
	<i>ADP P2Y_{II}</i>	A1622G	Inconcluyente	11
Clopidogrel	<i>GPIIIa</i>	PIA	Controvertido	12
	<i>GPIa</i>	C807T	Inconcluyente	12
	<i>ADP P2Y_{II}</i>	C893T	Inconcluyente	13
Inhibidores GP IIb/IIIa	<i>GPIIIa</i>	PIA	Especulativo	14
Cumarínicos	<i>CYP 450</i>	CYP2C*9	Condiciona dosis	16
	<i>VKORC-1</i>	1173 C/T	Condiciona dosis	17
	<i>CALU</i>	Arg4Gln	Preliminar	18
r-tPA	<i>FXIII</i>	Val134Leu	Condiciona eficacia	19, 20

irreversible. Su eficacia, seguridad y el amplio rango de implicaciones clínicas que cubre, lo han convertido en el máximo tratamiento antiagregante adyuvante. Los estudios que analizan el potencial de polimorfismos en la eficacia de este fármaco, como en el caso de la aspirina, no resultan concluyentes. Se ha relacionado el polimorfismo PI^A con resultados similares al caso de la aspirina; en el caso del cambio C807T de la GPIa, el alelo T parece modular la agregación plaquetaria inducida por ADP y el efecto del clopidogrel¹². Más interés ha despertado un polimorfismo descrito en el receptor de ADP $P2Y_{12}$, aunque su relación con la farmacogenética del clopidogrel es aún incierta¹³ (tabla 2).

Inhibidores de la GPIIb/IIIa

Los inhibidores orales de la GPIIb/IIIa no han demostrado ningún efecto beneficioso en los síndromes coronarios agudos. Se ha sugerido que la eficacia de la interacción con su diana sea dependiente del genotipo PI^A . Ligeras diferencias en la estructura del receptor provocadas por el cambio Pro33Leu podrían no sólo atenuar el efecto beneficioso sino también, aumentar los efectos deletéreos del fármaco¹⁴ (tabla 2).

Terapia anticoagulante oral

Los derivados cumarínicos son el tratamiento de elección en todo el mundo para la prevención de sucesos tromboembólicos. En 2003, sólo en EE.UU., se prescribió warfarina en un total de 21,2 millones de pacientes. Estos tratamientos se administran de forma empírica a pesar de que su efecto, en la práctica clínica, se traduce en una gran variabilidad interindividual en los requerimientos de la dosis adecuada. Los cumarínicos actúan como antagonistas de la vitamina K (VK), la cual funciona como coenzima en la γ -carboxilación de los residuos glutamato de la proteínas dependientes de VK (FII, FVII, FIX, FX, proteínas C, S y Z; osteocalcina y Gas-6). La modificación de estas proteínas es catalizada por un complejo multienzimático de la membrana del retículo endoplásmico, integrado por la γ -glutamyl-carboxilasa, VK epóxido reductasa-1 (VKORC-1) y calumenina (CALU)¹⁵. La función última de esta maquinaria enzimática consiste en asegurar el ciclo redox de la VK. Entre las variaciones genéticas candidatas a influir en la eficacia de este tratamiento, la mejor estudiada es la que afecta al citocromo P450 CYP2C9, una enzima hepática requerida para el metabolismo de muchos fármacos, y actualmente uno de los mejores ejemplos de la farmacogenética¹⁶. Dos variantes alélicas reducen su actividad, y por tanto, ralentizan el metabolismo de cumarínicos: 2C9*2 (Arg144Cys) y 2C9*3 (Ile359Leu). CYP2C3* se asocia con menores requerimientos de acenocumarol, una mayor frecuencia de sobredosis al inicio de la terapia, una respuesta anticoagulante más inestable y mayores complicaciones hemorrágicas¹⁶. En los últimos 2 años se han descrito los genes de dos componentes del complejo multienzimático: VKORC-1 (cuyo centro catalítico es la diana de los cumarínicos)

y CALU (chaperón del retículo endoplásmico, parece modular la funcionalidad de VKORC-1). Recientes estudios han caracterizado los haplotipos de VKORC-1 y puesto de manifiesto la relación directa que hay entre el genotipo y la dosis de anticoagulante necesaria para alcanzar un INR adecuado¹⁷. Por su parte, la relación entre el genotipo de CALU y el tratamiento anticoagulante oral sólo se ha descrito en un trabajo de este mismo año¹⁸. Dada la importancia de esta proteína en la regulación del sistema enzimático de la γ -carboxilación, estos datos resultan prometedores (tabla 2).

Fibrinólisis

La terapia fibrinolítica es utilizada para restaurar el flujo coronario tras una oclusión arterial y se emplea tanto en enfermedad cardiovascular como cerebrovascular. Sin embargo, hasta en el 40 % de los pacientes es ineficaz o incluso deletérea. Los factores responsables de esta heterogeneidad son la edad, el retraso entre los síntomas y la asistencia médica, tabaquismo y localización del infarto, entre otros. La búsqueda de variaciones genéticas relacionadas con la eficacia de esta terapia, ha conducido al análisis de metaloproteinasas y la GPIIIa, sin que los resultados hayan sido concluyentes. Nosotros evaluamos el papel del cambio Val34Leu del FXIII, fundamental en la estructura y estabilidad del coágulo de fibrina¹⁹. La variante Leu34 produce una mayor tasa de activación del FXIII por trombina y ofrece mayor resistencia de la malla de fibrina a la fibrinólisis. En un grupo de supervivientes de infarto agudo de dos diferentes poblaciones europeas incluidos prospectivamente, observamos que los portadores del alelo Leu34 eran peores respondedores a la terapia fibrinolítica. En otro estudio, nuestro grupo ha determinado la eficacia de la terapia fibrinolítica en pacientes con infarto isquémico cerebral tratados con r-tPA²⁰. Nuestros datos indican que los portadores del genotipo Val34Val y bajos niveles de fibrinógeno en la admisión, presentaban mejor respuesta clínica y mayor tasa de supervivencia. Estos datos son un nuevo ejemplo de cómo la combinación de factores genéticos y ambientales pueden explicar la amplia heterogeneidad de la eficacia una terapia.

Conclusiones

La farmacogenética es un nuevo campo de la medicina que emerge como disciplina relevante y cuya finalidad es ayudar a encontrar el tratamiento más adecuado para cada paciente, aumentando así la eficacia y reduciendo los efectos adversos. En esta revisión hemos seleccionado algunos de los ejemplos mejor establecidos en el extenso campo de la hematología. Hemos querido enfatizar la importancia de identificar individuos en quienes el beneficio clínico potencial pueda estar limitado, como resultado de un tratamiento inadecuado de acuerdo con su perfil genético.

Todos los pacientes son diferentes, y con la ayuda de las nuevas tecnologías de biología molecular, la identificación de las bases genéticas de esta heterogeneidad nos ayudará a desplazar los protocolos generales a cambio de tratamientos individuales.

Bibliografía

- Roses AD. Pharmacogenetics and future drug development and delivery. *Lancet*. 2000;355:1358.
- Cheok MH, Lugthart S, Evans WE. Pharmacogenomics of acute leukemia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:317.
- Tai HL, Krynetski EY, Schuetz EG, et al. Enhanced proteolysis of thiopurine S-methyltransferase (TPMT) encoded by mutant alleles in humans (TPMT*3A, TPMT*2): mechanisms for the genetic polymorphism of TPMT activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:6444.
- Stanulla M, Schaeffeler E, Flohr T, et al. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype and early treatment response to mercaptopurine in childhood acute lymphoblastic leukemia. *JAMA*. 2005;293:1485.
- Dressman MA, Malinowski R, McLean LA, et al. International Randomized Study of Interferon-alpha versus ST1571 Study Group. Correlation of major cytogenetic response with a pharmacogenetic marker in chronic myeloid leukemia patients treated with imatinib (ST1571). *Clin Cancer Res*. 2004;10:2265.
- Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood*. 2002;99:754.
- Kim DH, Jung HD, Kim JG, et al. FcγRIIIa gene polymorphisms may correlate with response to frontline R-CHOP therapy for diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2006 Apr 11; [Epub ahead of print].
- Marín F, Roldán V, González-Conejero R, et al. Pharmacogenetics in cardiovascular antithrombotic therapy. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 2005;3:357.
- González-Conejero R, Rivera J, Corral J, et al. Biological assessment of aspirin efficacy on healthy individuals: heterogeneous response or aspirin failure? *Stroke*. 2005;36:276.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006;367:606.
- Jefferson BK, Foster JH, McCarthy JJ, et al. Aspirin resistance and a single gene. *Am J Cardiol*. 2005;95:805.
- Angiolillo DJ, Fernández-Ortiz A, Bernardo E, et al. 807 C/T Polymorphism of the glycoprotein Ia gene and pharmacogenetic modulation of platelet response to dual antiplatelet treatment. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2004;15:427.
- Von Beckerath N, Von Beckerath O, Koch W, et al. P2Y12 gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2005;16:199.
- Steinhubl SR, Moliterno DJ. The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2005;5:399.
- Wallin R, Hutson SM. Warfarin and the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system. *Trends Mol Med*. 2004;10:299.
- Sanderson S, Emery J, Higgins J. CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGenet systematic review and meta-analysis. *Genet Med*. 2005;7:97.
- Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, et al. Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose. *N Engl J Med*. 2005;352:2285.
- Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin. *Thromb Haemost*. 2006;95:205.
- Marín F, González-Conejero R, Lee KW, et al. A pharmacogenetic effect of factor XIII valine 34 leucine polymorphism on fibrinolytic therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:25.
- González-Conejero R, Fernández-Cadenas I, Iniesta JA, et al. Gene-environment interactions in thrombolytic therapy in stroke patients: Role of fibrinogen levels and factor XIII V34L polymorphism. *Stroke* 2006. (En prensa.)

Formación médica continuada en hematología y hemoterapia

RAMÓN SALINAS ARGENTÉ Y COMISIÓN DE FORMACIÓN CONTINUADA

Althaia, Xarxa Assistencial de Manresa. Barcelona.

Introducción

Se puede definir la Educación Médica como el proceso de formación recorrido en y para el ejercicio de la medicina, considerada ésta en sentido amplio, por un profesional de la misma. Este proceso, en términos administrativos y prácticos, se ha dividido en tres fases. La primera es la licenciatura o formación de pregrado, en la que se adquieren los conocimientos, habilidades y actitudes que permiten la práctica de la medicina. En la segunda fase, la formación de posgrado, se pretende la especialización de los contenidos en un área concreta del ejercicio médico. La tercera fase es la formación médica continuada, objeto del presente documento.

La separación en las fases citadas no debe hacer olvidar que el proceso de formación del médico es continuo y que los diversos períodos se relacionan e influyen mutuamente. Por tanto, la planificación del proceso idealmente debería tener carácter unitario y perseguir objetivos comunes. Ello no es así en la práctica, pues son muy diversos los estamentos que imparten la enseñanza de cada fase y también las personas que la reciben. En el caso concreto de la formación médica continuada, sus peculiaridades, su carácter continuo y la necesidad de que se desarrolle y extienda cada vez más y mejor hacen deseable una profundización en su organización. Tal es la pretensión de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) al crear la Comisión de Formación Continuada.

Formación médica continuada

Concepto y alcance

La formación médica continuada es el período de aprendizaje que todo médico debe seguir a lo largo de su vida profesional en relación con los diversos campos de conocimiento relacionados con la práctica médica. El fundamento de la formación continuada,

como es bien conocido, lo da el hecho de que los conocimientos básicos, los procedimientos terapéuticos y diagnósticos y los protocolos de tratamiento de todas las enfermedades humanas cambian y progresan, renacen y desaparecen, de forma vertiginosa. Por tanto, el mantenimiento de los conocimientos y habilidades necesarios para el desempeño correcto de la profesión médica exige que aquellos sean actualizados de forma permanente y es un componente fundamental del desarrollo profesional.

Dicha actualización continua debe comprender los aspectos básicos de la medicina en su conjunto, pero sobre todo debe centrarse en el contenido específico de la especialidad correspondiente. De ahí que, aunque las directrices generales sean comunes, cada especialidad deba desarrollar sus propios contenidos, como más adelante se verá.

Objetivos

El objetivo fundamental de la formación médica continuada es el mantenimiento de la competencia clínica, es decir, de la calidad del ejercicio médico, que supuestamente se adquirió en las primeras 2 fases de pregrado y posgrado y, si es posible, el perfeccionamiento continuo de la misma. En la tabla 1 se resumen algunos de los componentes de la competencia clínica que la formación continuada pretende mantener e incrementar.

Procedimientos

Hay dos procedimientos básicos para lograr el objetivo citado de la formación médica continuada. El primero y más importante es el autoaprendizaje, es decir, la formación adquirida de forma individual y personal por el médico mediante el estudio, el contacto personal o las visitas a otros centros. El segundo procedimiento es la formación médica estructurada, compuesta por una gran variedad de actividades organizadas por diversas entidades profesionales (Asociaciones Científicas, Facultades de Medicina, Organizaciones Profesionales, Hospitales, etc.) que los médicos utilizan para adquirir la formación que precisan.

Basado en el documento para la Formación Médica Continuada de la Sociedad Española de Cardiología.

Comisión de Formación Continuada

Fundamento

La creciente conciencia de que es preciso impulsar la formación continuada y la reciente legislación aprobada (LOPS; Estatuto Marco), han hecho que se estén implantando en nuestro país diversos procedimientos para ponerla en práctica. En el caso de la especialidad de Hematología y Hemoterapia, parece claro que la AEHH debe asumir como parte esencial de su actividad la formación continuada de sus socios, en primer lugar y de todos los profesionales médicos y de otras especialidades sanitarias en segundo.

Organización general

El órgano encargado de la promoción –en sentido amplio– de actividades educativas en la AEHH es su Comisión de Formación Continuada. Las directrices para su funcionamiento quedan recogidas en el presente documento. La Comisión de Formación Continuada será presidida por un miembro de la AEHH designado por la junta directiva y la compondrá un número variable de miembros elegidos por el Ejecutivo a propuesta de aquél. A pesar de tratarse de un cargo no electo, el presidente de la Comisión acudirá a todas las reuniones de la junta directiva de la AEHH y de la Fundación Española de Hematología y Hemoterapia (FEHH), con voz y sin voto, debiendo informar puntualmente de todas las actividades, proyectos, etc., que acometa la Comisión de Formación Continuada.

Objetivos

El objetivo primordial de la Comisión de Formación Continuada es garantizar que se oferten y aprovechen actividades de Formación Continuada en Hematología y Hemoterapia de suficientes categoría y alcance como para asegurar la calidad de la misma.

Los objetivos concretos de este programa, en el marco citado, serían:

1. Avalar la calidad de las actividades de formación continuada, respaldando la adecuación y metodología de sus objetivos docentes.
2. Orientar al hematólogo, o a los profesionales sanitarios a quienes vayan dirigidas, sobre las actividades más adecuadas para mantener la formación continuada en su campo.
3. Promover el desarrollo de actividades que cubran de forma equilibrada todo el campo de formación continuada deseable para la Hematología y Hemoterapia en general y sus Áreas de Capacitación Específica en particular.

Funciones

Sin pretensión de exhaustividad, la Comisión de Formación Continuada de la AEHH puede desarrollar tres grandes grupos de funciones:

Tabla 1. Componentes del concepto de competencia clínica

1. Corrección técnica:
 - Conocimientos científicos sólidos
 - Dominio de habilidades manuales
 - Reconocimiento de problemas
 - Empleo juicioso de las técnicas diagnósticas
 - Formulación científica de los juicios
 - Prescripción racional de las terapéuticas
2. Consideración de los aspectos psicológicos y sociales
3. Respeto de los principios éticos
4. Capacidad de autoaprendizaje

Adaptada de Rozman C. Med Clin 1997;108:582-6.

Diseño de un currículum básico en Hematología y Hemoterapia

Esta función hace referencia al diseño de los contenidos mínimos de formación continuada de los diversos profesionales relacionados con la hematología y hemoterapia (hematólogos, otros médicos, diplomados en enfermería, biólogos). Posteriormente, debería velar porque estos profesionales dispusieran de material educativo de calidad y fácilmente accesible.

Gestión de actividades de formación continuada

Se incluirían en este apartado diversos contenidos: el registro de actividades; la organización del calendario de las diferentes actividades utilizables; la consultoría de toda sugerencia de actividad formativa que llegue a la AEHH; la elaboración y mantenimiento del catálogo de materiales educativos permanentes y el control de su disponibilidad para sus socios y otros profesionales; y la concesión de un posible marchamo a las actividades que lo merecieran del tipo de “Reconocido de utilidad formativa por la Comisión de Formación Continuada de la AEHH”.

Promoción de actividades de Formación Continuada

En el término promoción caben las actividades de formación organizadas por los diversos componentes de la AEHH:

- La propia Comisión de Formación Continuada (Cursos de Formación Continuada de la FEHH, posibles Cursos de Formación Continuada en el Congreso Nacional de la AEHH, por ejemplo, y otras actividades).
- Otros organismos de la AEHH (p. ej., si existieran la Comisión de Internet y, eventualmente, la propia Revista Española de Hematología y Hemoterapia).
- La promoción de actividades dirigidas al gran público, tal como indican los estatutos de la FEHH (aunque, propiamente, las actividades dirigidas al público no entran en el concepto de Formación Continuada).
- Las Sociedades Científicas y Grupos de Trabajo.
- Las Sociedades Autonómicas.

- Cualesquiera socios a título individual o colectivo.
- Las entidades cooperadoras.

También incluye el término promoción la posibilidad de sugerir temas, profesorado, etc., a cualesquiera otras entidades promotoras de actividades de formación en cualquier campo que la Comisión estime poco representado en las actividades organizadas por entidades externas a la propia AEHH.

Acreditación de actividades de formación continuada

Introducción

La formación médica continuada es el período de aprendizaje permanente que todo médico debe seguir a lo largo de su vida profesional, con la finalidad de mantener los conocimientos y habilidades necesarias para el desempeño correcto de su profesión. La necesidad de la formación continuada surge, de forma primordial, del propio anhelo del profesional de estar a la altura de las expectativas de los pacientes que demandan su asistencia. Esta individualidad, no obstante, es compatible con la conveniencia de controlar el proceso formativo y sus logros por parte de una entidad científica independiente.

De ahí la necesidad de la acreditación. Se entiende como tal el proceso mediante el cual una entidad científica o gubernamental garantiza la calidad de las actividades de formación que se imparten. El equivalente en el ámbito personal es la recertificación, o sea, la demostración periódica de la competencia del médico ante una instancia reconocida oficialmente.

Una de las premisas básicas de la acreditación es la separación entre las entidades que imparten las actividades de formación y las entidades que las acreditan. De ahí que la AEHH, en su empeño por velar por la calidad de la formación ofrecida a sus socios y otros

profesionales sanitarios y público en general, haya fomentado la creación de una entidad acreditadora independiente. Dicha entidad se denomina Comité de Acreditación (CdA) y funcionará de acuerdo con las normas expresadas en este documento.

Objetivos

El objetivo fundamental del CdA es crear un marco que permita la certificación periódica de los profesionales que trabajan en el ámbito de la Hematología y Hemoterapia o campos afines. Para ello, sus objetivos específicos son:

1. Diseñar los requisitos de calidad, de acuerdo con otras entidades públicas y privadas similares, que deben cumplir las actividades de formación continuada.
2. Crear un sistema de acreditación de actividades de formación continuada riguroso, accesible y versátil, con el fin de aprovechar las actividades de formación disponibles que reúnan los requisitos de calidad y, a la vez, velar porque dicha calidad sea evaluada y objetivada.
3. Organizar un sistema de control de calidad de las actividades de formación continuada acreditadas.
4. Emitir los certificados acreditativos correspondientes.
5. Llevar una base de datos donde se recojan los créditos obtenidos por cada individuo en actividades acreditadas.
6. Emitir documentos oficiales de recertificación individual, en su caso.

Organización general

El órgano técnico acreditador independiente al que hacen referencia estas normas, designado con el nombre de Comité de Acreditación (CdA), tiene a su cargo el trabajo cotidiano de la acreditación de actividades y de profesionales. Este órgano técnico dispondrá del personal adecuado, de acuerdo con la carga de trabajo que se origine, y de la infraestructura administrativa e informática necesaria para mantener los registros, tanto de las actividades acreditadas como la base de datos de los participantes en dichas actividades.

Actividades objeto de acreditación

Son muy diversas las actividades docentes cuyo contenido educativo puede ser susceptible de acreditación. En la tabla 2 se presentan algunas posibilidades en una lista no exhaustiva.

Dichas actividades se dividen en dos grandes grupos: a) formación externa o presencial, que incluye todas las actividades en las que la formación se imparte di-

Tabla 2. Tipos de actividades que pueden acreditarse

Tipo	Modalidades
1. Formación externa	Congresos Reuniones Programas <i>master</i> Seminarios Cursos <i>Symposia</i> Talleres de trabajo
2. Formación autoadministrada	Estancias en otros centros "Reciclaje" Programas de ordenador Formato audiovisual Cursos vía "Internet"

rectamente a los discentes estando éstos presentes y b) formación autoadministrada o no presencial, que los discentes pueden recibir en cualquier momento y lugar y por cualquier procedimiento reconocido.

Clasificación de las actividades

Además de la clasificación en tipo 1 (presenciales) y tipo 2 (autoadministradas), las actividades de formación continuada acreditadas se subdividen en las siguientes categorías:

- Ciencias básicas y aspectos generales.
- Clínica y métodos diagnósticos.
- Procedimientos terapéuticos.
- Actividades educativas para público no sanitario (acreditación de actividades y de personas, aunque *sensu stricto* no puedan incluirse en el concepto de Formación Continuada).
- Enfermería.

La unidad de valoración de todas las actividades será la hora-crédito, que corresponde a una hora de actividad formativa, sea teórica, práctica o de cualquier otra modalidad.

Solicitud de acreditación

Cualquier actividad que pretenda ser acreditada debe solicitar con antelación su inclusión en el programa. En ningún caso se acreditarán actividades ya realizadas. El mecanismo de solicitud y aprobación se detallará más adelante.

En el caso de otras actividades organizadas por entidades de solvencia que ya dispongan de un sistema de acreditación y recertificación oficial, se diseñará un procedimiento especial para homologar las certificaciones obtenidas de forma individual.

La solicitud de acreditación de las actividades de formación continuada debe hacerse, con una antelación de al menos 3 meses antes de la realización de las mismas, en el formulario de solicitud oficial, que se encuentra en la dirección electrónica <http://www.aehh.org>.

La solicitud se enviará, debidamente cumplimentada en todos sus apartados, a la dirección electrónica: aehh@aejh.org. Deben adjuntarse el programa de la actividad y la hoja de evaluación de los asistentes.

Evaluación

Una vez recibida la solicitud, el CdA le asignará un número de registro, emitirá un acuse de recibo y procederá a comprobar que cumple todos los requisitos exigidos, incluyendo la cuota de tramitación (de la cual se enviará la factura correspondiente). Las solici-

tudes incompletas se devolverán con especificación de los puntos a aclarar.

Si la solicitud cumple los aspectos formales, será evaluada por tres de los miembros del CdA. Las personas que evalúen cada actividad no serán conocidas por el solicitante de la misma y entre ellas no podrán figurar ni el director científico ni ninguno de los docentes de aquélla.

Los evaluadores dispondrán de un plazo de 10 días para contestar en sentido afirmativo o negativo. Se entenderá que la actividad queda acreditada cuando exista unanimidad favorable; si existe unanimidad desfavorable, la actividad será rechazada; en el caso de que exista disparidad de opinión, deberá debatirse en la siguiente reunión del CdA. Los criterios utilizados para poder acreditar una actividad como adecuada dentro del plan de Formación Continuada de la AEHH contemplarán al menos:

- Solvencia de la entidad promotora.
- Solvencia científica y experiencia del director y el profesorado de la actividad docente.
- Utilidad y actualidad de los objetivos docentes, propuestos de forma explícita.
- Interés, actualidad y equilibrio del programa y de los contenidos teórico y práctico.
- Número mínimo y máximo de asistentes según el tipo de actividad.
- Número de horas lectivas adecuado a la actividad.
- Métodos previstos de control de asistencia.
- Formulario de evaluación de los asistentes.
- Accesibilidad de la actividad (en la que se incluye, en su caso, la posible coincidencia de fechas con actividades ya acreditadas).
- Independencia comercial de la actividad.

Los evaluadores también dictaminarán si la actividad reúne los requisitos precisos para ser enviada a la Comisión de Formación Continuada del Sistema Nacional de Salud (Ministerio de Sanidad y Consumo-SEA-FORMEC). En tal caso, el propio CdA se hará cargo de tramitar la solicitud y de todas las gestiones posteriores precisas.

Aceptación

La aceptación de una actividad de formación se hará mediante correo electrónico del CdA al solicitante. En ella se especificarán el tipo y número de horas-crédito asignadas. El plazo entre la solicitud y la comunicación de dicha resolución no deberá sobrepasar los 30 días. Las solicitudes desestimadas igualmente recibirán comunicación en tal sentido, con el mismo plazo máximo.

Asignación de horas-crédito

La asignación del número de horas-crédito y del tipo de éstas será realizada por el CdA. Como ya se indi-

có, se asignará 1 h-crédito ajustada por cada hora de enseñanza en actividades presenciales. A los congresos y reuniones cuya programación cubra un día entero no podrán asignárseles más de 6 h-crédito diarias, a menos que se garantice la presencia continuada de docentes y discentes durante mayor número de horas.

Las estancias continuadas en centros de prestigio, siempre que duren más de un mes y que previamente se haya presentado y aceptado el programa concreto de actividades a realizar, serán valoradas con 40 h-crédito mensuales, siendo el máximo de horas-crédito obtenibles por esta vía de 100.

El cálculo de horas-crédito de las actividades no presenciales se hará según el tiempo promedio calculado para su completo desarrollo, y queda a cargo del CdA.

Derechos y obligaciones de la entidad organizadora

Una vez que se acredite una actividad, la entidad promotora tendrá el derecho de hacer figurar en el programa el logotipo de la AEHH y el siguiente texto:

**Actividad acreditada por el Comité de Acreditación
de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia
con _____ horas-crédito del tipo _____**

La lista de actividades acreditadas será enviada mensualmente a la Comisión de Formación Continuada de la AEHH, con el fin de que puedan figurar en el catálogo de actividades acreditadas y sean dadas a conocer a los miembros de la AEHH interesados. Con objeto de que este catálogo sea lo más completo posible, los organizadores deben solicitar la acreditación con la debida antelación.

Las entidades organizadoras de actividades de formación continuada acreditadas por el CdA vienen obligados a enviar a ésta, a la conclusión de la actividad docente, las hojas de evaluación de la actividad cumplimentadas, con el visto bueno del director del curso. En el caso de las actividades no presenciales, los discentes podrán dirigirse directamente al CdA. Estas hojas de evaluación serán la base para la asignación final de las horas-crédito a cada participante.

También deben informar individualmente a los profesores de los resultados de las evaluaciones de sus presentaciones realizadas por los discentes.

Control de la calidad de las actividades

El CdA podrá evaluar, por alguno de sus miembros o por persona delegada (incluyendo personal facultativo o entidades auditoras externas) el desarrollo de la actividad acreditada. Esta evaluación adaptará la forma de informe, enviado al CdA por el evaluador al final de la

actividad. En este informe se tendrán en cuenta tanto aspectos científicos como organizativos del desarrollo de la actividad. Si el citado informe fuera desfavorable, el CdA retirará la acreditación y anulará la emisión de certificados.

Certificación de asistentes a actividades de formación continuada

CERTIFICADO INDIVIDUAL DE ACTIVIDADES

El CdA emitirá un certificado personal para cada uno de los asistentes a las actividades de formación previamente acreditadas, donde se harán constar el tipo y el número de horas-crédito obtenidas. Para ello, el citado Comité tendrá en cuenta las evaluaciones que las entidades promotoras habrán enviado (ver apartado anterior). Estos datos quedarán incorporados al fichero personal de los miembros de la AEHH.

Este certificado se considerará como único documento válido y necesario a efectos de acreditación y recertificación personales. No obstante, la entidad organizadora puede entregar otros tipos de diploma de asistencia.

Los profesores de las actividades acreditadas también recibirán una certificación emitida por el Comité para hacer constar tal hecho. Estas certificaciones suponen la adjudicación de las horas-crédito correspondientes a la totalidad de las asignadas al curso o actividad en la que participaron (siendo el máximo de 7 h-crédito).

Las normas para la convalidación oficial de las horas-crédito obtenidas en actividades organizadas por otras entidades se adoptarán en cada caso.

Certificado de actualización profesional

Los miembros de la AEHH y otros profesionales afines pueden solicitar del CdA un certificado general del tipo y número de horas-crédito obtenidas en un determinado período de tiempo.

Derechos de los profesionales acreditados

Además de la propia satisfacción personal –intangible, pero real– de cumplir el deber ético de estar al día y de la expresión de una actitud intelectual, los profesionales que consigan la certificación periódica podrán acreditar tal hecho ante la instancia estatal o comunitaria que regule oficialmente la Formación Continuada en su día. Además, tendrán el derecho de hacer pública su condición de “Profesional (hematólogo, etc.) acreditado/a por la AEHH” y exhibir el diploma correspondiente.

También recibirán periódicamente información sobre las actividades de Formación Continuada organizadas o acreditadas por la AEHH. Una vez implantado el proceso, serán los profesionales acreditados los que, única o mayoritariamente, serán propuestos como

profesores de las actividades de formación. Del mismo modo, se exigirá que en toda solicitud de ayudas o becas de la AEHH figure al menos un profesional acreditado.

Régimen económico

Hay un régimen económico establecido para la acreditación de las actividades de Formación Continuada por el CdA.

Este régimen ha de permitir que la Comisión de Formación Continuada y la Comisión de Acreditación sean autosuficientes, deberán por tanto mantener una cuenta corriente específica, con los adecuados registros y auditorías, de los que dará cuenta a la junta directiva de la AEHH.

Las actividades preferentes, organizadas o consideradas como tales por el CdA, tendrán un trato económico diferenciado, a valorar en cada caso.

Acreditación previa de una actividad

Se establece una cuota fija de evaluación de la solicitud de acreditación, que se adjuntará a la solicitud y será independiente del resultado favorable o negativo de la evaluación. Las actividades organizadas oficialmente por la propia AEHH (tabla 3) están exentas de esta cuota.

Tabla 3. Actividades de Formación Continuada exentas de cuotas de tramitación y emisión de certificados

Cursos de la FEHH
 Congreso Anual de la AEHH
 Reunión Anual oficial de las Asociaciones Autonómicas y Grupos de Trabajo de la AEHH

FEHH: Fundación Española de Hematología y Hemoterapia; AEHH: Asociación Española de Hematología y Hemoterapia.

Certificación de asistencia

Se establecerá una cuota por participante, que puede estar incluida en los gastos de inscripción de cada actividad, que se satisfará a la entrega de las listas y hojas de evaluación de los asistentes; esta cuota cubre los gastos de archivo de los datos y emisión de certificados. La cuantía de la misma dependerá del número de participantes y será comunicada a los organizadores con la decisión favorable del CdA. No comportan cuota las certificaciones emitidas para el profesorado ni las que, en los casos precisos, se emitan para la entidad organizadora.

Certificación periódica personal

Se establecerá una cuota fija para la obtención del certificado global de acreditación periódica.