

# Técnicas de diagnóstico citogenético en Hematología: presente y futuro

COORDINADORES: M.<sup>ª</sup>J. CALASANZ. *Pamplona*  
I. GRANADA. *Barcelona*

## Resumen del simposio

El rendimiento del diagnóstico genético-hematológico, basándose exclusivamente en la realización del cariotipo (citogenética convencional), ha sido muy heterogéneo y en ocasiones como en los SLP limitados, por lo que se ha experimentado un extraordinario impulso en el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas: de citogenética molecular (hibridación *in situ* con fluorescencia –FISH–, hibridación genómica comparada –CGH–, cariotipo espectral –SKY–) y de genética molecular (reacción en cadena de la polimerasa –PCR–, análisis de mutaciones...). Además, se dispone de un mayor conocimiento de los mecanismos genéticos que subyacen a numerosas neoplasias hematológicas, impulsado por la publicación de la secuencia completa del genoma humano y de estrategias de análisis genético más sofisticadas (*arrays* de CGH, *arrays* de expresión, secuenciación automática, entre otros). Estos avances se traducen en una mayor rapidez en la caracterización molecular de las alteraciones cromosómicas nuevas o la descripción de nuevos marcadores genéticos (mutaciones) y, por tanto, en el hallazgo de nuevos marcadores biológicos (dianas terapéuticas); la redefinición de enfermedades (sobre la base del conocimiento de sus mecanismos moleculares), y el desarrollo de nuevos fármacos específicos que actúen sobre la diana molecular responsable de la enfermedad (ácido retinoico, imatinib, lenalidomida, etc.). Actualmente, en la rutina de un laboratorio de diagnóstico genético hematológico, es la combinación de citogenética convencional –cariotipo de bandas G–, FISH y análisis molecular –PCR y análisis de mutaciones–, lo que permite cada vez con más precisión, una aproximación diagnóstica, una estratificación de los pacientes en grupos de riesgo, una selección de tratamiento más específica y una monitorización terapéutica más sensible.

El objetivo de este simposio es presentar los avances más relevantes en el diagnóstico genético de leucemias y linfomas. Hemos seleccionado el MM, las leucemias mieloblásticas agudas con cariotipo normal, los linfomas y los síndromes mieloproliferativos Ph negativos, cuatro patologías, aunque no las únicas, que han requerido del refinamiento en las técnicas diagnósticas para llevar a cabo un correcto y, cada vez más, completo análisis. Afortunadamente, contamos con cuatro investigadores muy implicados en la investigación oncohematológica y con gran experiencia en el diagnóstico genético. La doctora Gutiérrez de CIC de Salamanca nos hablará de las implicaciones pronósticas de la utilización del FISH en el mieloma múltiple, así como de los esfuerzos en la elaboración de una nueva clasificación molecular en esta patología, basándose en los resultados de estudios de *arrays* de expresión, que explique la enorme heterogeneidad clínica de los pacientes con MM y que ayude a la elección de la terapia más adecuada.

El doctor Cervera, del Hospital La Fe de Valencia, nos informará del giro que ha tenido lugar en la rutina diagnóstica de las leucemias agudas mieloblásticas con cariotipo normal (aproximadamente entre un 40 y 50%), concretamente con el análisis de determinadas mutaciones (FLT3, NPM1, CEBPA, MLL, entre otras), cuya presencia permite delimitar subgrupos de riesgo dentro de este grupo que tradicionalmente estaba asociado a un riesgo intermedio. El doctor Martin Subero, del Institute of Human Genetics de Kiel, nos hablará del presente y futuro del diagnóstico genético de los linfomas, donde muchos de los subtipos están asociados a anomalías cromosómicas específicas, especialmente translocaciones que afectan al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IGH). En los linfomas el FISH se perfila como una de las técnicas más informativas en la rutina diagnóstica. Por último, el doctor Cigudosa del CNIO de Madrid nos ofrecerá una visión integradora de la genética y la hematología, presentando datos actuales y proponiendo ideas de futuro del posible escenario genético que subyace a estas patologías, que se intuye más complejo de lo esperado a la luz del hallazgo de cada vez más marcadores genéticos, que está obligando a revisar los actuales sistemas de clasificación de las neoplasias hematológicas (como ejemplo nos muestra la nueva clasificación de SMP ph negativos), para adecuarlos a grupos de riesgo y que permitan seleccionar a los pacientes que se beneficiarán de los nuevos fármacos dirigidos a dianas moleculares.

## DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN EL MIELOMA MÚLTIPLE Y OTRAS GAMMAPATÍAS MONOCLONALES

N.C. GUTIÉRREZ, A. AIRES, I. ISIDRO, T. PRIETO, J.M. HERNÁNDEZ, J.F. SAN MIGUEL

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

### Introducción

El mieloma múltiple (MM) es una neoplasia caracterizada por una acumulación incontrolada de células plasmáticas (CP) clonales en la médula ósea (MO). El diagnóstico del MM es relativamente sencillo, una vez se ha planteado la sospecha clínica, mediante una serie de exploraciones que están totalmente implantadas y estandarizadas en los laboratorios de todos los hospitales: la electroforesis/inmunofijación en suero y orina, el estudio de la médula ósea y la serie ósea. Aunque todos los mielomas para ser considerados como tales deben cumplir unos criterios diagnósticos bien establecidos, éstos no permiten vaticinar su curso clínico, que es particularmente dispar. Este hecho lleva a pensar que bajo el término de mieloma se engloben enfermedades diferentes desde el punto de vista genético y cuyo comportamiento pueda estar marcado por alteraciones moleculares que no influyen en los resultados de las técnicas de diagnóstico habitual del MM. En la actualidad, existe una amplia tecnología que aborda el estudio del genoma y del transcriptoma celular. La mayoría de estas herramientas de análisis se han utilizado en la investigación del MM y han confirmado su diversidad genética. A continuación, se revisarán los conocimientos más destacados a los que han dado lugar las técnicas de análisis genético, así como el papel de los mismos a la hora de realizar un diagnóstico del MM más acorde con una visión molecular de las enfermedades neoplásicas.

### Citogenética convencional

El análisis cromosómico mediante citogenética convencional, que ha generado información de primer orden en las hemopatías malignas, tanto en lo que se refiere a la biología como al pronóstico de las mismas, se ha visto limitado en el caso del MM. Esto se debe fundamentalmente al bajo índice proliferativo de las células mielomatosas, y a la infiltración desigual y generalmente escasa de la MO, lo cual se traduce en un reducido número de metafases analizables, que en una

buena parte son normales porque proceden de las células mieloides de la MO. También hay que añadir que los pocos cariotipos anormales que se encuentran suelen ser complejos, con múltiples alteraciones numéricas y estructurales que pueden afectar a cualquier cromosoma, si bien hay alteraciones especialmente recurrentes. Aunque el porcentaje de cariotipos anormales descritos es muy variable raramente supera el 30% en las distintas publicaciones<sup>1</sup>. El análisis cariotípico tiene la ventaja de que proporciona una información global del genoma y por tanto es una buena herramienta para determinar la ploidía del MM, pero su reducida resolución impide detectar algunas de las anomalías cromosómicas más importantes.

### Citogenética molecular

La introducción de la fluorescencia en los análisis cromosómicos ha supuesto en los últimos 20 años un avance extraordinario en el campo de la citogenética. Las técnicas de citogenética molecular que más se han utilizado en el estudio genético del MM han sido la hibridación *in situ* fluorescente (HISF) y la hibridación genómica comparada (HGC), así como sus versiones más avanzadas, la hibridación *in situ* multicolor y los *arrays*-HGC, respectivamente.

### Hibridación *in situ* fluorescente (HISF)

Esta técnica sorteja la mayoría de los problemas inherentes a la citogenética convencional, ya que tiene la ventaja de no precisar metafases y de poseer una elevada resolución que permite la detección de translocaciones crípticas. Ciertamente, su objetivo son las alteraciones específicas y no da una imagen global del genoma. Debido a la baja infiltración tumoral de los MM, la HISF se debe realizar siempre sobre células mielomatosas purificadas o bien combinarla con la detección inmunofluorescente de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas citoplasmáticas, con lo que se puede diferenciar las CP del resto de la celularidad acompañante de la MO. Hoy en día la HISF se ha convertido en la técnica de análisis genético más utilizada en el MM. La hibridación *in situ* multicolor supone una sofisticación de la HISF convencional, tanto en su modalidad en metafase como en interfase. La más utilizada en el MM ha sido el cariotipo espectral en colores (SKY), que hace posible la visualización de cada uno de los 24 cromosomas en colores diferentes. Su principal aportación ha sido descubrir nuevas alteraciones e identificar la procedencia de cromosomas marcadores encontrados en los cariotipos convencionales. No obstante, su ámbito de utilización se reduce a la investigación.

### Hibridación genómica comparada (HGC)

La HGC ha sido la primera técnica combinada de citogenética y HISF que ha permitido realizar un análisis global de las ganancias y pérdidas de material genómico en una única hibridación<sup>2</sup>. Una de sus limitaciones es que no permite la detección de translocaciones. Esta técnica ha mostrado alteraciones en el 70% de los MM<sup>3</sup>. La aparición de las técnicas de *arrays* que gracias a la combinación de la robótica y de la informática consiguen disponer miles de secuencias génicas en un soporte sólido, ha desarrollado el concepto de HGC y ha dado lugar a la tecnología de *array*-HGC<sup>4</sup>. Con esta metodología la hibridación ya no se hace sobre metafases normales, sino sobre miles de fragmentos de ADN, que abarcan casi todo el genoma y, por tanto, la resolución alcanzada es 100 veces superior a la conseguida con la HGC. Sin embargo, la complejidad de estas técnicas y el nivel de cualificación requerido para su manejo hacen que queden relegadas al ámbito de la investigación.

### Perfiles de expresión génica

La cuantificación de la expresión génica mediante la tecnología de *microarrays* ha hecho posible monitorizar simultáneamente el nivel de expresión de todos los genes que integran el genoma. Sin duda, los datos generados de estos estudios han sido los de más impacto en el campo genético del MM en los últimos 5 años, por lo novedosos y porque posiblemente ayuden a proporcionar una visión más integradora de las anomalías biológicas de la célula mielomatosa. En este sentido, las alteraciones genéticas más recurrentes en el mieloma y con más importancia a la hora de predecir su evolución reproducen un perfil de expresión singular fácilmente identificable mediante *microarrays* de expresión<sup>5</sup>. Por tanto, puede no ser aventurado decir que los *microarrays* de expresión podrían convertirse en la plataforma ideal para detectar la mayoría de las alteraciones genéticas relevantes y, al mismo tiempo, ofrecer información sobre otros aspectos biológicos de la célula mielomatosa que no son asequibles a las técnicas citogenéticas modernas.

### Translocaciones del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas

En muchos de los síndromes linfoproliferativos B un acontecimiento primario en su patogenia es la desregulación de un oncogén que, como resultado de su translocación al *locus* del gen (14q32) o, con menor fre-

cuencia, al *locus* de los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas –*IGL*– ( $\kappa$ , 2p11, o  $\lambda$ , 22q11), es yuxtapuesto al lado de un potente *enhancer* de *IGH*. En el MM las translocaciones (Tx) de *IGH* pueden clasificarse en primarias o secundarias. Las Tx primarias se consideran un suceso inicial durante la patogénesis del MM, mientras que las Tx secundarias están implicadas en la progresión. La mayoría de las Tx primarias son la consecuencia de errores en los procesos de remodelación del ADN específicos de las células B, especialmente durante el cambio de clase de las inmunoglobulinas y menos frecuentemente durante el proceso de hipermutación somática. Los puntos de ruptura ocurren sobre todo dentro o inmediatamente adyacentes a las regiones de cambio de *IGH* o a regiones JH. Por el contrario, las Tx secundarias podrían estar mediadas por otros tipos de mecanismos de recombinación que no van dirigidos específicamente a los procesos de modificación del ADN propios de las células B<sup>6</sup>.

A diferencia de otros síndromes linfoproliferativos B, en el MM hay una marcada diversidad de *loci* cromosómicos implicados en las Tx de *IGH* (presentes hasta en un 60% de los MM). En torno a un 40% de los MM tienen Tx de *IGH* que implican una de las siguientes parejas cromosómicas (Figura 1): 11q13 (*CCND1*), 4p16 (*FGFR3/MMSET*), 16q23 (*c-MAF*), 6p21 (*CCND3*) y 20q11 (*MAFB*). Aproximadamente, el 20% de los MM tienen Tx de *IGH*, que no implican a ninguna de estas regiones y que afectan a una amplia abanico de regiones cromosómicas<sup>17</sup>.

### t(11,14)

La prevalencia de esta translocación en los estudios de HISF es del 15-20% y es fácilmente detectable mediante cariotipo convencional. Los puntos de ruptura en 14q32 se sitúan dentro de la región JH o en la región de cambio. En 11q13, los puntos de ruptura están dispersos en un espacio de 330 kb centromérico al gen *CCND1*, sin evidencia de un agrupamiento en el “Major Translocation Cluster” (MTC) descrito para el linfoma de células del manto<sup>8</sup>. Como resultado de esta translocación, *CCND1* se yuxtapone al potente *enhancer* 3' de *IGH* en el derivativo 14, lo que motiva un aumento de su expresión, como se ha observado en los estudios de expresión génica y de RT-PCR en todos los MM con t(11,14). Se ha encontrado una correlación entre la t(11,14) y los MM oligosecretorios con morfología linfoplasmocitoide y expresión de CD20. Aunque en un principio los resultados en cuanto a la repercusión de esta Tx en el pronóstico fueron un tanto controvertidos, en la actualidad la mayoría de los trabajos coinciden en que los pacientes con la t(11,14) tienen una supervivencia similar o superior a los pacientes sin esta alteración.

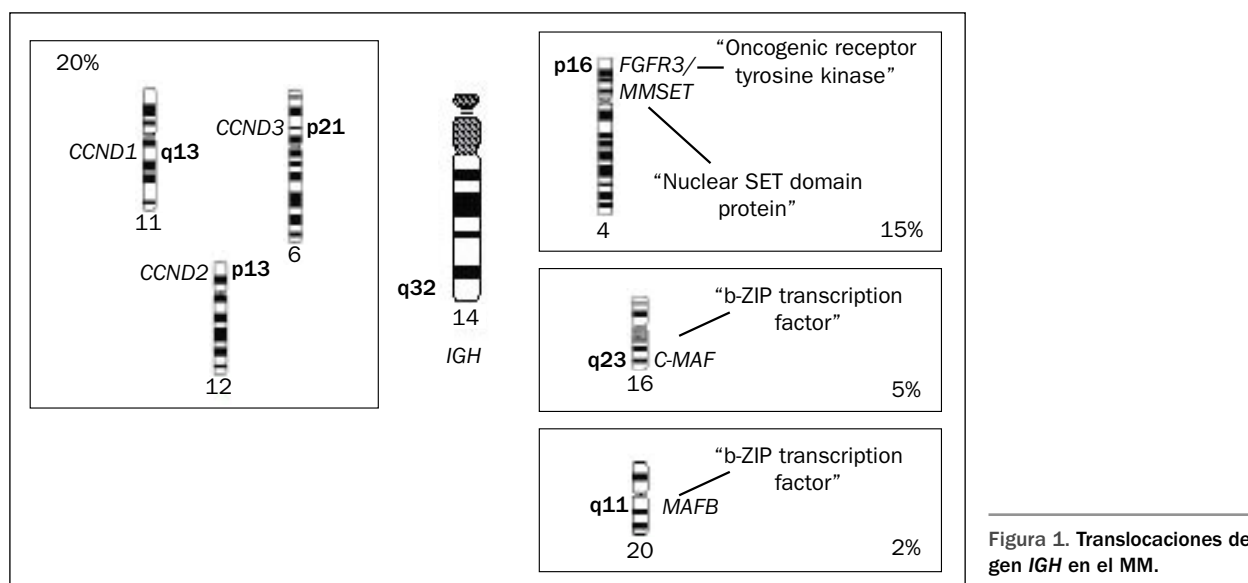


Figura 1. Translocaciones del gen IGH en el MM.

### t(4;14)

Aparece en aproximadamente el 15% de los mielomas mediante técnicas de HISE, sin embargo, esta translocación no se detecta en el cariotipo. En el *locus* de *IGH* todos los puntos de ruptura ocurren en la región de cambio y se produce una disociación entre el *enhancer* intrónico y el *enhancer* 3'. Esta translocación tiene como resultado la disregulación simultánea de 2 genes, el receptor 3 del factor de crecimiento fibroblástico (*FGFR3*), en el derivativo 14 y el *myeloma SET domain* (*MMSET*), en el derivativo 4<sup>o</sup>. *FGFR3* es uno de los receptores tirosincinasa de alta afinidad para la familia de ligandos FGF (factores de crecimiento fibroblástico). El aumento de expresión de *FGFR3* y de *MMSET* se produce como consecuencia de la t(4;14), ya que en CP normales no se expresan. No obstante, el perfil de expresión génica y la RT-PCR han demostrado que sólo el 75% de los MM con t(4;14) presentan una sobreexpresión simultánea de *MMSET* y *FGFR3*. En el 25% de los casos restantes sólo se observa un aumento en la expresión de *MMSET*, y la ausencia de expresión de *FGFR3* suele ir unida generalmente a la pérdida del derivativo 14<sup>10</sup>. Estos datos apuntan a que *MMSET* puede ser crítico en la transformación tumoral de las CP que tienen la t(4;14), mientras que *FGFR3* puede ser prescindible. Aproximadamente en el 10% de los casos el gen *FGFR3* que se transloca tiene mutaciones activantes que pueden estar implicadas en la progresión del MM. El pronóstico desfavorable que acarrea esta Tx se ha comprobado en varias series amplias de enfermos independientemente de la modalidad de tratamiento, y en muchos de estos trabajos, la t(4;14) se muestra como uno de los factores pronósticos independientes de mayor peso. Este impacto negativo en la supervivencia se debe fundamentalmente

a las recaídas precoces y no a una reducción en la tasa de respuestas.

### t(14;16)

La frecuencia de esta Tx es de 5-10% y al igual que la t(4;14) no se detecta en el cariotipo. La t(14;16) provoca un aumento en la expresión de *c-MAF*, que es un factor de transcripción bZIP<sup>11</sup>. Mediante *microarrays* de expresión y técnicas de RT-PCR cuantitativa se ha observado que la expresión aumentada de *c-MAF* está presente en la mitad de los MM. Esta proporción es mucho más frecuente que la esperada como consecuencia de la prevalencia de la t(14;16). El mecanismo por el cual se produce un aumento en la expresión de *c-MAF* en casos en los que no hay t(14;16) se desconoce. Los datos en cuanto a la influencia de esta Tx en el pronóstico son mucho más escasos que los disponibles de las t(11;14) y t(4;14), pero parece que su presencia produce un acortamiento en la supervivencia.

### t(6;14)

Esta Tx aparece en una pequeña proporción (3%) de los MM. Mediante análisis de *microarrays* se han visto altos niveles de ARNm de ciclina D3 en los pacientes con t(6;14)<sup>12</sup>.

### t(14;20)

*MAFB* es un factor de transcripción bZIP como *c-MAF* pero a diferencia de la t(14;16), las Tx de *MAFB* tienen

características estructurales que indican que son Tx secundarias<sup>6</sup>.

## Aneuploidía

Casi todos los MM y la mayoría de las gammopatías monoclonales de significado incierto (GMSI) son aneuploides, como lo demuestran la medida del contenido de ADN por citometría de flujo<sup>13</sup> y las técnicas citogenéticas<sup>14</sup>. De acuerdo con el estatus de ploidía evaluado mediante cariotipo, los pacientes con MM pueden agruparse en dos grandes categorías: grupo hiperdiploide (más de 46/47 cromosomas) y grupo no hiperdiploide, compuesto de casos hipodiploides (hasta 44/45 cromosomas), pseudodiploides (44/45 a 46/47) y casos casi tetraploides (más de 74)<sup>1</sup>. Los MM no hiperdiploides se caracterizan por una prevalencia muy elevada de Tx de *IGH* y de monosomía/deleción del cromosoma 13. Por el contrario, el grupo hiperdiploide está asociado con trisomías recurrentes que afectan especialmente a los cromosomas impares (3, 5, 7, 9, 11, 15 y 19), y con una frecuencia baja de alteraciones cromosómicas estructurales. Los MM hipodiploides se relacionan con una supervivencia más corta. Sin embargo, puesto que esta categoría de MM comprende anomalías genéticas de mal pronóstico es difícil concluir que la hipodiploidía sea un factor pronóstico independiente.

## Monosomía/deleción del cromosoma 13

Se trata de la pérdida de material genético más frecuente en el MM tanto si se utilizan técnicas de citogenética convencional<sup>15</sup> como de HSF<sup>16</sup>. Aproximadamente aparece en el 40-50% de los MM<sup>16</sup>. Esta alteración presenta una fuerte asociación con otras anomalías genéticas: más del 80% de los MM con t(4,14) o t(14;16), en torno al 65% de los casos con ganancias de 1q, el 70% de los que tienen pérdida de P53 y el 65% de los MM hipodiploides, tienen monosomía/deleción del 13. La variabilidad importante que existe en la proporción de CP clonales que portan la monosomía/deleción del cromosoma 13, con un rango que va desde el 20 al 100%, iría a favor de que esta alteración fuera un evento secundario. Los estudios de HSF destinados a mapear la región mínima comúnmente delecionada han puesto de manifiesto que en la mayoría de los casos la pérdida de material del cromosoma 13 es el reflejo de una monosomía y que las deleciones intersticiales son muy raras (10-20% de los casos)<sup>1</sup>. Clásicamente la monosomía del 13 se ha asociado con pronóstico adverso independientemente de la técnica

utilizada para su detección (cariotipo o HSF) y de la modalidad de tratamiento (quimioterapia convencional o quimioterapia a altas dosis). No obstante, según algunos autores la influencia negativa de la monosomía/deleción del cromosoma 13 no es tan marcada cuando se detecta únicamente por HSF en comparación a cuando se visualiza por citogenética. Estudios más recientes en los que se ha tenido en cuenta la presencia de las Tx de *IGH* y de las deleciones de *P53* no encuentran una disminución en la supervivencia de los pacientes que únicamente tienen monosomía 13 sin otras alteraciones concomitantes<sup>17,18</sup>.

## Deleción de 17p (P53)

La frecuencia de esta deleción es considerablemente más baja (5-10%) que la monosomía/deleción del cromosoma 13, lo que no ha impedido que en la mayoría de los estudios se perfile como una alteración de pronóstico desfavorable<sup>18,19</sup>. En los pacientes con MM en estadios avanzados y en progresión la proporción de las deleciones de *P53* es bastante más elevada.

## Ganancias de 1q

Las ganancias de 1q es una de las alteraciones cromosómicas más recurrentes en el MM, como lo demuestran tanto los estudios de citogenética como de HGC<sup>3</sup>. En la mayoría de los casos son el producto de isocromosomas, duplicaciones y translocaciones *jumping*<sup>20</sup>. El impacto en la supervivencia de esta alteración no se había explorado en profundidad hasta que los estudios de expresión génica mediante *microarrays*, realizados por el grupo de Arkansas, demostraron que el aumento de expresión del gen *CKS1B*, localizado en 1q21, imparte mayor agresividad al curso clínico del MM, lo que desemboca en una reducción significativa de la supervivencia. Esto llevó a explorar si la sobreexpresión de *CKS1B* podría estar relacionada con un incremento en el número de copias de este gen, y se comprobó mediante HSF que había una correlación significativa entre las ganancias y amplificaciones del BAC (*bacterial artificial chromosome*) que contiene el gen *CKS1B* y el alto nivel de expresión de dicho gen. A su vez se demostró que las ganancias de 1q21 detectadas mediante HSF también constituían un factor independiente de mal pronóstico<sup>21</sup>. Posteriormente, otros grupos no han reproducido este hallazgo ni cuando han analizado las ganancias de 1q mediante HSF ni cuando han estudiado el nivel de expresión de *CKS1B*<sup>22</sup>. En estos trabajos el impacto negativo en la supervivencia desaparece cuando se introducen en el análisis multi-

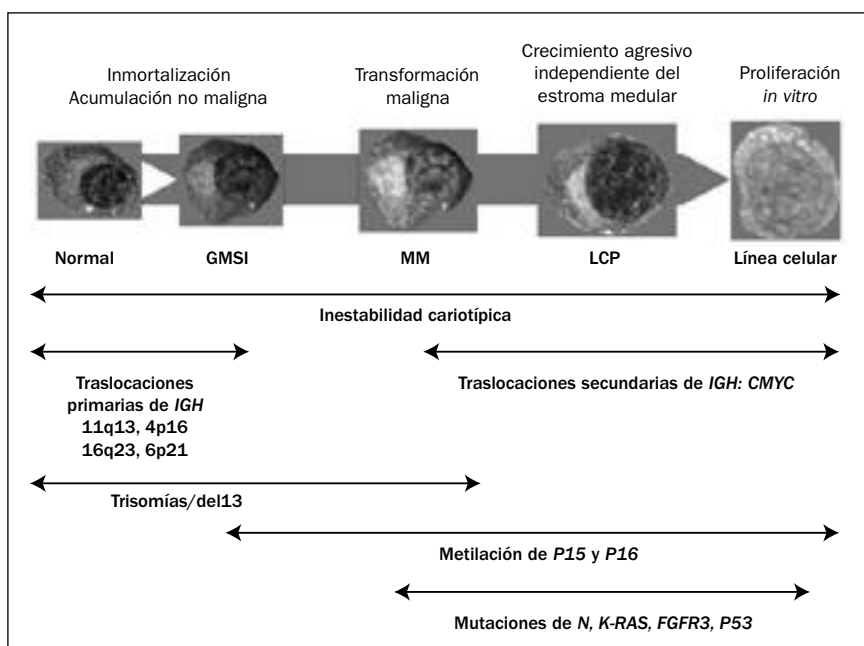


Figura 2. Patogénesis del MM en múltiples etapas. Las líneas horizontales indican la posible secuencia de los sucesos oncogénicos (modificación de Bergsagel et al.<sup>7</sup>). GMSI: gammopatía monoclonal de significado incierto; MM: mieloma múltiple; LCP: leucemia de células plasmáticas.

variante otras variables de mayor peso, lo que indica que su influencia en el pronóstico podría estar mediada probablemente por la estrecha asociación que existe entre las ganancias de 1q y otras variables de alto riesgo como la t(4;14) y el alto índice proliferativo.

### Cambios genéticos en las gammopatías monoclonales de significado incierto (GMSI). Patogénesis del MM en etapas

Al menos entre el 30-50% de los pacientes con MM parecen surgir de una GMSI previa. La posibilidad de realizar estudios de HSF en interfase sobre CP seleccionadas ha permitido eludir las dificultades de realizar análisis genéticos en las GMSI, donde el número de CP clonales en la MO es muy bajo. Varios estudios de HSF han demostrado la presencia de anomalías numéricas y estructurales en las GMSI<sup>23</sup>. Así, se ha observado que la prevalencia de translocaciones de *IGH* en las GMSI es similar a la detectada en los MM, lo cual apoya la hipótesis de que los reordenamientos de *IGH* son sucesos genéticos tempranos en el proceso de tumorigénesis que conduce al MM. Si bien la t(11;14) se ha observado en GMSI con una frecuencia similar a la presente en el MM, la prevalencia de la t(4;14) en GMSI que ha descrito el grupo francés es mucho más baja que en el MM<sup>24</sup>. Curiosamente, la existencia de casos de GMSI con la t(4;14) que permanecen estables a lo largo de los años apunta que esta anomalía cromosómica podría ser insuficiente para la progresión a MM. Respecto a la prevalencia de monosomía/delección del cromosoma 13 en las GMSI hay re-

sultados controvertidos: algunos de ellos<sup>23</sup> señalan una incidencia de monosomía/delección del cromosoma 13 en las GMSI comparable a la vista en los MM, mientras que otros<sup>24</sup> encuentran una proporción de monosomía/delección del 13 significativamente más baja en las GMSI. Esto último estaría a favor de la hipótesis de que la pérdida del cromosoma 13 puede tener una función relevante en la transición de GMSI a MM. De hecho, la monosomía/delección del 13 se encuentra con más frecuencia en pacientes con MM que han tenido una historia previa de GMSI que en pacientes con MM *de novo*<sup>24</sup>. Respecto a la ploidía, el porcentaje de GMSI hiperdiploides es similar al observado en los MM. Esto ilustra que la dicotomía de pacientes hiperdiploides y no hiperdiploides también aparece en las GMSI, y plantea la cuestión de si la inestabilidad cromosómica con o sin translocaciones de *IGH* podría ser un suceso inicial en el desarrollo del MM<sup>25</sup> (Figura 2).

Determinadas anomalías genéticas que incluyen desde translocaciones, mutaciones, deleciones y cambios epigenéticos, se han asociado con la progresión del MM (Figura 2). Un ejemplo son los reordenamientos de *c-MYC* que están mediados por translocaciones secundarias y que con frecuencia implican a más de dos cromosomas y, en ocasiones, a secuencias diferentes del gen *IGH*<sup>6</sup>. Las mutaciones activantes de *RAS* y *FGFR3* se consideran marcadores moleculares de progresión tumoral, ya que la frecuencia de estas mutaciones es rara en las GMSI. La desactivación de *P53* tanto por delección como por mutación es infrecuente en el MM y se asocia con estadios avanzados de la enfermedad. La metilación de los genes *P15* y *P16* se ha detectado en GMSI, pero su frecuencia es mucho más alta en los MM avanzados y en las formas extrame-

Tabla 1. Clasificación molecular del mieloma múltiple

| Grupo*  | Translocación específica         | Frecuencia | Expresión de ciclinas D | Firma genética**                                      | Pronóstico   | Otros rasgos de interés                     |
|---------|----------------------------------|------------|-------------------------|---|--------------|---|
| 1) PR   | Ninguna                          | 12%        | CCND2                   | ↑ CCNB1, CCNB2, MCM2, BUB1<br>↑ MAGEA6, MAGEA3, GAGE1 | Desfavorable | Alta frecuencia de cariotipos anormales     |
| 2) LB   | Ninguna                          | 11%        | CCND2                   | ↑ EDN1, IL6R<br>↓ DKK1, FRZB                          | Favorable    | Baja incidencia de lesiones óseas           |
| 3) MS   | t(4;14): FGFR3/MMSET             | 18%        | CCND2                   | ↑ FGFR3, MMSET, PBX1 PAX5                             | Desfavorable |   |
| 4) HY   | Ninguna                          | 26%        | CCND1                   | ↑ TRAIL, DKK1, FRZB<br>↓ CKS1B                        | Favorable    | Cariotipos hiperdiploides<br>Lesiones óseas |
| 5) CD-1 | t(11;14): CCND1 o t(6;14): CCND3 | 8%         | CCND1 o CCND3           | ↑ CEBPB, NID2, SET7                                   | Favorable    |   |
| 6) CD-2 | t(11;14): CCND1 o t(6;14): CCND3 | 17%        | CCND1 o CCND3           | ↑ CD20, PAX5, CD27, CXCR4                             | Favorable    |   |
| 7) MF   | t(14;16): c-MAF o t(14;20): MAFB | 8%         | CCND2                   | ↑ c-MAF, MAFB, CXCR1, ITGB7<br>↓ DKK1                 | Desfavorable | Baja incidencia de lesiones óseas           |

\*PR: proliferación; LB: low bone disease; MS: MMSET; HY: hiperdiploid; CD-1: CCND1/CCND3; CD-2: CCND1/CCND3; MF: MAF/MAFB. \*\*Las flechas hacia arriba y hacia abajo indican aumento y descenso de expresión, respectivamente.

dules de la enfermedad<sup>26</sup>. No obstante, la secuencia temporal de los numerosos eventos genéticos descritos en el MM está aún por definir.

### Clasificación molecular del MM basada en los perfiles de expresión génica

Los análisis de la expresión génica del MM mediante *microarrays* han venido a confirmar la enorme diversidad genética que manifiesta esta neoplasia. Recientemente, se ha propuesto una clasificación del MM en siete grupos diferentes, cada uno de los cuales posee una firma genética específica que, a su vez, se asocia con un comportamiento clínico característico<sup>27</sup>. Además, varios de estos grupos están marcados por una de las Tx de *IGH* o por el estatus de ploidía, con lo que se consigue una conexión importante entre las alteraciones genéticas, el transcriptoma celular y los rasgos clínicos y evolutivos de los pacientes con MM. En la Tabla 1 se resume esta clasificación que debe interpretarse como un intento de distinguir las entidades genéticas y clínicas que se agrupan bajo la neoplasia MM, pero con la precaución de que necesita todavía una amplia validación.

### Desregulación de los genes de las ciclinas D: posible suceso común en la patogénesis del MM

Como hemos visto, el MM se caracteriza por una marcada inestabilidad cariotípica y por no tener una altera-

ción cromosómica específica. Aparentemente no hay un mecanismo genético común que explique la patogénesis del MM. Sin embargo, se ha especulado que aunque las diferentes Tx de *IGH* que se observan en el MM inducen la sobreexpresión de oncogenes diferentes, es posible que todas las Tx de *IGH* implicadas en el MM converjan en una vía patogénica común que resulte en el bloqueo de la diferenciación y en un aumento de la supervivencia y de la proliferación celular. Así, el análisis de expresión génica ha demostrado que la expresión de los genes *CCND1*, *CCND2* y *CCND3* está incrementada en prácticamente todos los pacientes con MM. Este hecho podría considerarse como un potencial evento común en la patogénesis del MM<sup>28</sup>. Aproximadamente el 25% de los MM expresan niveles elevados de una de estas ciclinas como consecuencia directa de una Tx de *IGH* como la t(11;14) y la t(6;14), que directamente desregulan *CCND1* y *CCND3* respectivamente, o como efecto indirecto de una de las Tx de *IGH* con los genes *MAF* (c-MAF en 16q23 y *MAFB* en 20q23), que codifican factores de transcripción que actúan sobre la ciclina D2.

Casi el 40% de los MM sobreexpresan ciclina D1 a través de una desregulación bialélica de *CCND1* y sin una aparente t(11;14), y la mayoría de los restantes MM, incluidos aquellos con la t(4;14), muestran un aumento de expresión de la ciclina D2. La expresión aumentada de una de estas ciclinas D facilitaría la activación de las cinasas dependientes de ciclinas CDK4 (o CDK6), las cuales subsecuentemente fosforilan e inactivan a RB con lo que el factor de transcripción E2F se libera e induce la progresión del ciclo celular. Los niveles de expresión de las ciclinas D también se han incorporado a la clasificación molecular antes mencionada (Tabla 1)<sup>7,27</sup>.

## Conclusiones

En los últimos años el desarrollo de la metodología de análisis genético ha sido espectacular, pero al mismo tiempo se ha diversificado de tal manera que los datos generados se hacen en numerosas ocasiones inabarcables y de difícil integración. Resulta inviable estudiar genéticamente los MM con todas las técnicas disponibles en la actualidad, fundamentalmente porque la muestra tumoral en el MM es particularmente escasa y también porque muchas de estas tecnologías son lo suficientemente sofisticadas como para requerir personal cualificado, lo cual no es operativo para la mayoría de los laboratorios. Por tanto, y puesto que no se dispone de una técnica que suministre toda la información genética relevante, no hay otra alternativa que optar por aquellas que nos puedan reportar una mejor categorización del MM en clases con un comportamiento y evolución predecibles, y así poder abordar su tratamiento de una forma más racional. En este sentido, la HISE cumple una serie de requisitos, como se ha señalado en esta revisión, que la convierten en la técnica de elección para el estudio genético del MM en la mayoría de los laboratorios. La posibilidad de que haya pacientes con MM que presenten cariotipos complejos sin la presencia de las alteraciones de mal pronóstico habitualmente exploradas mediante HISE, como son la t(4;14), t(14;16) y la delección de P53, es tan escasa que en nuestra opinión no resulta rentable realizar estudios citogenéticos convencionales en todos los pacientes con MM.

En estos momentos, la técnica de HISE en interfase es la metodología que aporta más rendimiento en el estudio genético sistemático del MM por su facilidad de ejecución e interpretación, su rapidez y la posibilidad de llevarla a cabo en casos con muy poca muestra. Si la cantidad de muestra lo permite, la realización de estudios cariotípicos podría considerarse como un abordaje complementario a la HISE. Pero más bien, el papel de la citogenética convencional debería reconducirse a la aplicación de sus versiones más modernas (citogenética multicolor) en la búsqueda de nuevas alteraciones o puntos de ruptura recurrentes. En un futuro es posible que la tecnología de los *microarrays* permita explorar las alteraciones genéticas más importantes del MM en un único experimento.

Por otro lado, no hay que olvidar que la aparición de nuevos fármacos para el tratamiento del MM obliga a reevaluar si el valor pronóstico de las alteraciones genéticas más frecuentes se mantiene. Esto significa que la posición de muchos de los marcadores genéticos en el *ranking* de factores pronósticos puede verse modificada con la aparición de nuevos agentes terapéuticos que consigan revertir su influencia perniciosa.

## Referencias

1. Fonseca R, Barlogie B, Bataille R, et al. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res* 2004; 64: 1546-58.
2. Gutiérrez NC, Hernández JM, García JL, et al. Differences in genetic changes between multiple myeloma and plasma cell leukemia demonstrated by comparative genomic hybridization. *Leukemia* 2001; 15: 840-5.
3. Gutiérrez NC, García JL, Hernández JM, et al. Prognostic and biologic significance of chromosomal imbalances assessed by comparative genomic hybridization in multiple myeloma. *Blood* 2004; 104: 2661-6.
4. Carrasco DR, Tonon G, Huang Y, et al. High-resolution genomic profiles define distinct clinico-pathogenetic subgroups of multiple myeloma patients. *Cancer Cell* 2006; 9: 313-25.
5. 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.
6. Kuehl WM, Bergsagel PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 175-87.
7. Bergsagel PL, Kuehl WM. Molecular pathogenesis and a consequent classification of multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2005; 23: 6333-8.
8. Ronchetti D, Finelli P, Richelda R, et al. Molecular analysis of 11q13 breakpoints in multiple myeloma [In Process Citation]. *Blood* 1999; 93: 1330-7.
9. Chesi M, Nardini E, Lim RS, et al. The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 1998; 92: 3025-34.
10. Santra M, Zhan F, Tian E, et al. A subset of multiple myeloma harboring the t(4;14)(p16;q32) translocation lacks FGFR3 expression but maintains an IGH/MMSET fusion transcript. *Blood* 2003; 101: 2374-6.
11. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan O, et al. Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 1998; 91: 4457-63.
12. Shaughnessy J Jr, Gabrea A, Qi Y, et al. Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 2001; 98: 217-23.
13. García-Sanz R, Orfao A, González M, et al. Prognostic implications of DNA aneuploidy in a series of 156 untreated MM patients. *Br J Haematol* 1995; 90: 106-12.
14. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, et al. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 1998; 12: 960-9.
15. Gutiérrez NC, Hernández JM, García JL, et al. Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica* 2000; 85: 1146-52.
16. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, et al. Biological and prognostic significance of interphase fluorescence in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative oncology group study. *Cancer Res* 2002; 62: 715-20.
17. Avet-Loiseau H, Attal M, Moreau P, et al. Genetic abnormalities and survival in multiple myeloma: the experience of the Intergroupe Francophone du Myelome. *Blood* 2007.
18. Gutiérrez NC, Castellanos MV, Martín ML, et al. Prognostic and biological implications of genetic abnormalities in multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation: t(4;14) is the most relevant adverse prognostic factor,

- whereas RB deletion as a unique abnormality is not associated with adverse prognosis. *Leukemia* 2007; 21: 143-50.
19. Gertz MA, Lacy MQ, Dispenzieri A, et al. Clinical implications of t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy. *Blood* 2005; 106: 2837-40.
  20. Sawyer JR, Tricot G, Lukacs JL, et al. Genomic instability in multiple myeloma: evidence for jumping segmental duplications of chromosome arm 1q. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 42: 95-106.
  21. Hanamura I, Stewart JP, Huang Y, et al. Frequent gain of chromosome band 1q21 in plasma-cell dyscrasias detected by fluorescence in situ hybridization: incidence increases from MGUS to relapsed myeloma and is related to prognosis and disease progression following tandem stem-cell transplantation. *Blood* 2006; 108: 1724-32.
  22. Fonseca R, Van Wier SA, Chng WJ, et al. Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma. *Leukemia* 2006; 20: 2034-40.
  23. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, et al. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 2002; 100: 1417-24.
  24. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, et al. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Intergroupe Francophone du Myelome*. *Blood* 1999; 94: 2583-9.
  25. Chng WJ, Van Wier SA, Ahmann GJ, et al. A validated FISH trisomy index demonstrates the hyperdiploid and nonhyperdiploid dichotomy in MGUS. *Blood* 2005; 106: 2156-61.
  26. Mateos MV, García-Sanz R, López-Pérez R, et al. p16/INK4a gene inactivation by hypermethylation is associated with aggressive variants of monoclonal gammopathies. *Hematol J* 2001; 2: 146-9.
  27. Zhan F, Huang Y, Colla S, et al. The molecular classification of multiple myeloma. *Blood* 2006; 108: 2020-8.
  28. 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.

## PRESENT AND FUTURE OF CYTOGENETIC DIAGNOSTICS IN LYMPHOMAS

J.I. MARTÍN-SUBERO<sup>1</sup>, S. GESK<sup>1</sup>,  
M.J. CALASANZ<sup>2</sup>, L. HARDER<sup>1</sup>, R. SIEBERT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute of Human Genetics. University Hospital Schleswig-Holstein Campus Kiel. Christian-Albrechts University. Kiel (Germany).* <sup>2</sup>*Department of Genetics. University of Navarra. Pamplona*

In 1976, Lore Zech and collaborators described the first recurrent chromosomal change in lymphomas, the translocation t(8;14) associated to Burkitt lymphoma<sup>1</sup>. Twenty-five years later, a comment to the World Health Organization (WHO) of hematological disorders states that the detection of the t(8;14)(q24;q32) or variants is the “gold standard” to diagnose a Burkitt lymphoma<sup>2</sup>. This example underlines not only the his-

torical but also the actual importance of cytogenetics in the diagnosis of lymphomas. The WHO classification also highlights that specialists who undertake the diagnosis of hematological malignancies should be familiar with the types and significance of the different cytogenetic markers that can be detected<sup>2</sup>. In the present short review, a summary of the most common chromosomal changes associated with lymphoid disorders is provided along with an outline of currently used techniques and a prospect for future directions.

Many lymphoma subtypes are associated with characteristic chromosomal abnormalities, e.g., t(8;14)(q24;q32) and variants t(2;8) and t(8;22) with Burkitt lymphoma/leukemia (BL), t(11;14)(q13;q32) with mantle cell lymphoma (MCL), t(14;18)(q32;q21) with follicular lymphoma (FL), t(11;18)(q21;q21) with MALT lymphoma or t(2;5)(p23;q35) with anaplastic large cell lymphoma (ALCL)<sup>3</sup> (Table 1). Consequently, these alterations constitute powerful diagnostic markers. The pathogenetic effect of these rearrangements depends on genes located in their respective chromosomal breakpoints, which become deregulated, or less frequently chimerized (e.g. fusion genes), as a result of the chromosomal change. These genes, like MYC or BCL2, play prominent roles in cell differentiation, proliferation or apoptosis, and thus, their deregulated expression leads to aberrant cell growth and transformation<sup>4</sup>.

In addition to the diagnostic role of chromosomal changes in lymphomas, it is also known that certain chromosomal aberrations are associated with clinical outcome. These frequently comprise copy number changes, like deletions of the TP53 gene in chromosomal band 17p13, but also balanced rearrangements like the t(8;14)(q24;q32) as secondary change in diffuse large B-cell lymphoma<sup>3,5</sup>.

Current methods for the routine detection of chromosomal changes in lymphomas are based on conventional cytogenetic, molecular cytogenetic and molecular genetic techniques. A summary of the cytogenetic diagnostic process is shown in (Figure 1).

### Conventional cytogenetic methods

Conventional cytogenetic analysis is based on the study of metaphase chromosomes by staining techniques, like R or G banding. Since it needs tumor metaphases to be performed, viable tumor cells have to be obtained from fresh material and cultured in vitro. Suitable mitogens can be applied to stimulate growth of the tumor cells and yield tumor metaphases. In contrast to hematological tumors of the myeloid lineage, obtaining high-quality metaphases from lymphoproliferative disorders is often difficult, particularly from

Table 1. Examples of the most recurrent cytogenetic markers associated with the diagnosis of lymphoid malignancies

| Hematological malignancy                    | Chromosomal aberration(s)  | Gene(s) involved  |
|---|--|---|
| <b>B-cell neoplasms</b>                     |  |   |
| Precursor B lymphoblastic leukemia (B-ALL)  | t(1;19)(q23;p13)<br>t(12;21)(p13;q22)<br>t(9;22)(q34;q11)<br>t(4;11)(q21;q23)                | PBX1/TCF3<br>TEL(ETV6)/AML1<br>ABL/BCR<br>AF4/MLL       |
| B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) | del(13q14), +12/+12q<br>del(11q22-23)<br>del(17p13)  | unknown<br>ATM (others?)<br>TP53 (others?)              |
| Follicular lymphoma (FL)                    | t(14;18)(q32;q21) and variants<br>t(2;18) and t(18;22)                                       | IGH/BCL2<br>IGK/BCL2 and BCL2/IGL                       |
| Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL)       | t(14q32)<br>t(3q27)  | IGH<br>BCL6   |
| Mantle cell lymphoma (MCL)                  | t(11;14)(q13;q32)  | CCND1/IGH   |
| MALT lymphoma (MALT)                        | t(11;18)(q21;q21)<br>t(14;18)(q32;q21)<br>t(1;14)(p22;q32)                                   | API2/MALT1<br>IGH/MALT1<br>BCL10/IGH                    |
| Burkitt lymphoma/leukemia (BL)              | t(8;14)(q24;q32) and variants<br>t(2;8) and t(8;22)  | MYC/IGH<br>IGK/MYC and MYC/IGL                          |
| Plasma cell myeloma (PCM)                   | t(11;14)(q13;q32)<br>t(4;14)(p16;q32)<br>t(14;16)(q32;q23)<br>t(8;14)(q24;q32)<br>del(13q14) | CCND1/IGH<br>FGFR3/IGH<br>IGH/MAF<br>MYC/IGH<br>unknown |
| Classical Hodgkin lymphoma (cHL)            | Amplifications in 2p13-16<br>Amplifications in 9p24<br>t(14q32)                              | REL<br>JAK2 and others<br>IGH                           |
| <b>T-cell neoplasms</b>                     |  |   |
| Precursor T lymphoblastic leukemia (T-ALL)  | Rearrangements in 14q11<br>Rearrangements in 7q35  | TCRA-D<br>TCRB  |
| T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL)      | inv(14)(q11q32) and t(14;14)   | TCRA-D/TCL1   |
| Anaplastic large cell lymphoma (ALCL)       | Rearrangements of 2p23,<br>commonly t(2;5)(p23;q35)  | ALK<br>ALK/NPM  |

low-grade malignancies. Banding analysis is a screening method that allows both numerical and structural abnormalities to be detected. Nevertheless, the complete resolution of the karyotype can be hampered by chromosomal complexity or cryptic cytogenetic rearrangements, e.g. a reciprocal translocation involving subtelomeric regions or small imbalances.

of false negative results, like in the t(8;14)(q24;q32) or t(11;14)(q13;q32) translocations<sup>6,7</sup>. Furthermore, changes such as t(14;18)(q32;q21) and t(2;5)(p23;q35) translocations can be found in healthy individuals, so that the high sensitivity of the PCR technique can result in a degree of false-positive findings<sup>8</sup>.

## Molecular genetic methods

Molecular genetic methods for the detection of chromosomal changes in hematological neoplasms are mainly based on the polymerase chain reaction (PCR). These approaches are predominantly used for the detection of recurrent translocations leading to fusion-genes. The main advantage of PCR-assays is their high sensitivity. Nevertheless, the reliability of PCR-based methods for the detection of lymphoma-associated translocations is heavily influenced by the spreading of chromosomal breakpoints over large genomic regions. This can lead to a high proportion

## FISH-based methods

Molecular cytogenetics comprises a number of techniques based on fluorescence in situ hybridization (FISH). Basically, a fragment of labeled single stranded (ss) DNA called “probe” is hybridized onto a ssDNA sample, where the probe will find its complementary sequence called “target”. As the probe is labeled with a fluorescent substance, it will produce fluorescent signals at the place where the target is located within the nucleus. Molecular cytogenetic methods have evolved dramatically during the last years leading to the development of multiple variants. Among those, single- and double-color FISH using satellite and locus-specific

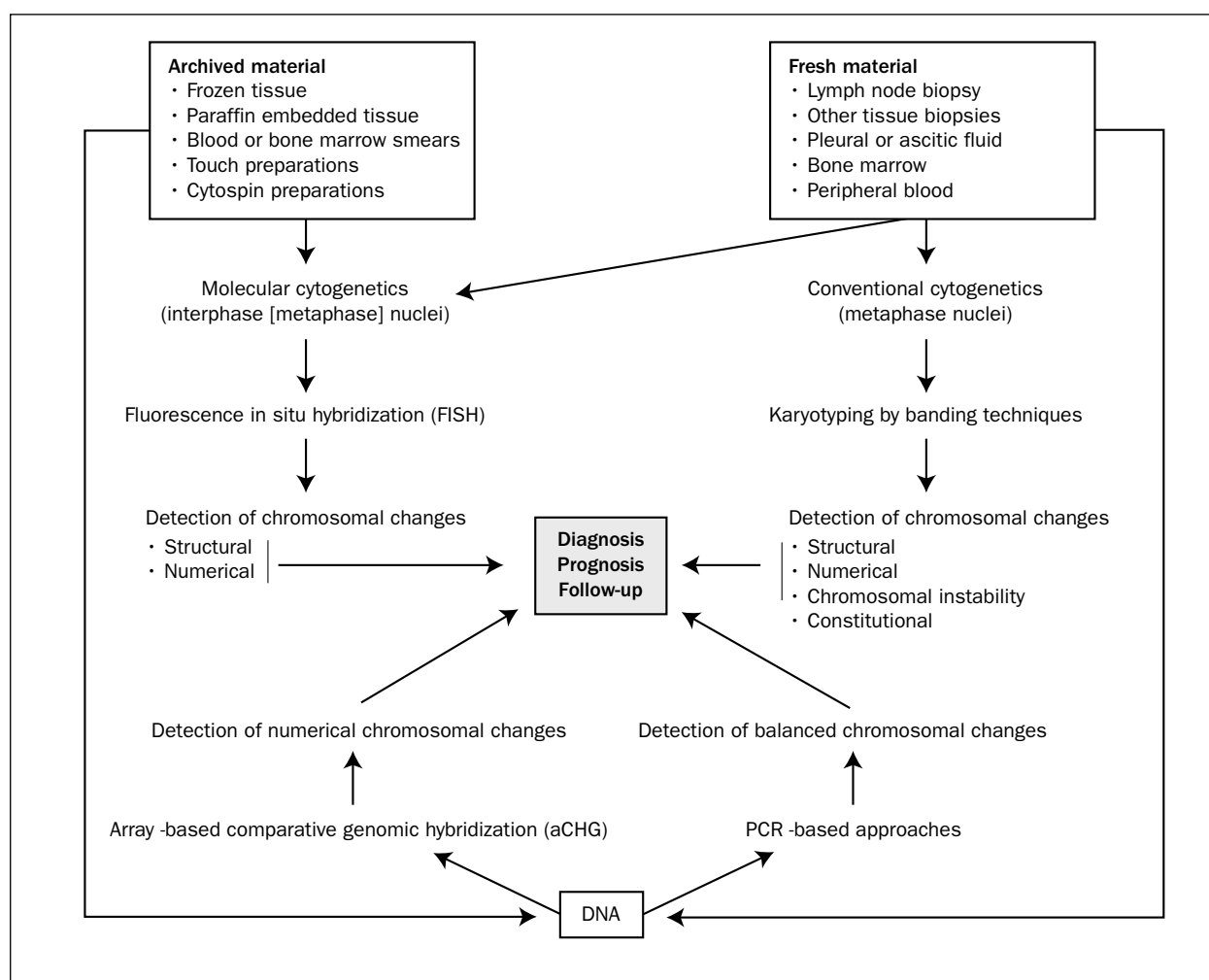


Figure 1. Simplified workflow for the detection of chromosomal changes in the lymphoma diagnostic setting.

ic probes have special diagnostic applications. These probes can be applied to both metaphase and interphase cells and can detect various types of numerical or structural chromosomal aberrations. For the detection of lymphoma-associated translocations by conventional interphase FISH, there are two main strategies. On the one hand, two differentially labeled probes spanning the respective breakpoints in both translocation partners (i.e. double-fusion probes) can be applied to detect a specific translocation with high sensitivity. On the other hand, two-color probes flanking the chromosomal breakpoints in one specific locus (i.e. break-apart probes) allow the detection of all the rearrangements of one gene with several translocation partners (e.g. the IGH locus). Genomic imbalances can be detected simply by comparing the number of signals of a locus-specific probe with that of a differentially labeled control probe hybridized simultaneously<sup>9</sup>.

An important aspect of interphase FISH is its suitability to study material embedded in paraffin. This

is particularly important in the context of surgical biopsies (e.g. lymph nodes), which reach the laboratory in an unfixed state only in few diagnostic centers. Therefore, the application of FISH in paraffin-embedded material widely increases the application range of this technique in the lymphoma diagnostic setting<sup>10</sup>.

### Advanced FISH-based methods

Commercially available as well as other widely used conventional FISH assays are restricted to two, seldom three differently labeled probes. Thus, a maximum of three genetic loci or two chromosomal aberrations can be targeted simultaneously. To enhance informativity, multicolor interphase FISH approaches have been developed, which allow the detection of multiple lymphoma-related rearrangements simultaneously<sup>11,12</sup>. Other FISH-based techniques, such as multicolor karyotyping (M-FISH and SKY) allow to

visualize each metaphase chromosome in a different color<sup>13</sup>. Although multiple studies using multicolor karyotyping were published in the late nineties and early in this decade, they are rarely used in the lymphoma diagnostic process today. Its main application is the characterization of complex karyotypes in the research setting.

As the FISH technique does not destroy cell and tissue structure, FISH can be combined with assessment of morphology, and furthermore, also with fluorescence immunophenotyping. A technique combining these three features was developed in the early nineties and was coined FICTION (Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasms)<sup>12,14</sup>. This technique allows the detection of genetic aberrations in immunologically characterized cell populations, even if they present a minority in the tissue studied. Using this approach, the sensitivity of interphase FISH can be even enhanced because only certain cell subpopulations are targeted. For example, this technique is especially suited to study Hodgkin lymphomas (HL), in which the percentage of tumor cells in patient biopsies is certainly very low (ranging mostly between 1-0,1%)<sup>15-17</sup>.

### Array-based methods

There are currently two main strategies to detect chromosomal changes with microarrays: array-based comparative genomic hybridization (CGH) and SNP-chips. The former is based on the competitive hybridization of differentially labeled tumor and normal DNA onto microarrays containing spotted DNA fragments (frequently BAC clones or oligonucleotides) and allows to obtain a comprehensive overview of chromosomal imbalances in a given lymphoma sample. Several array-CGH studies have been published in lymphomas, which have lead to a better characterization of chromosomal imbalances and the identification of novel lymphoma-related genes<sup>18,19</sup>. SNP-chip analyses are usually based on a one-color microarray hybridization, and the fluorescence intensities are then compared to those obtained in normal controls with a dedicated software, so that an overview of chromosomal imbalances can be obtained. Furthermore, SNP-chips are also able to detect the so called "partial uniparental disomies", e.g. loss of heterozygosity without loss of genetic material, which is a novel type of chromosomal change in lymphomas<sup>20</sup>.

In spite of the great advantages of microarray-based genomic profiling in terms of resolution and genomic coverage, they cannot detect balanced chromosomal

changes and the proportion of aberrant cells in the sample has to be over 30-50% to obtain reliable results.

### Technical comparison

Several lines of evidence from different groups suggest that, among the methods described above, interphase FISH is one of the most advantageous for the routine diagnosis and follow-up of lymphoma patients, like the routine detection of e.g. t(8;14) and t(11;14) translocations<sup>6,7</sup>. The main virtues of the FISH technique are: a) does not require tumor metaphases and therefore both archived and fresh material can be used, b) nuclear morphology is maintained, c) depending on the probe design and type of alteration detected, the diagnostic cut-off can be up to <1%, d) allows quantification of the tumor clone, e) is not highly influenced by spreading of chromosomal breakpoints, f) rapidity of the analysis, g) low labor-intensiveness, and h) suitability for automation<sup>9</sup>. However, a major disadvantage of FISH is that only the chromosomal changes that are searched for can be detected whereas the rest of the genome remains not investigated. Therefore, it is important not to rule out screening techniques, especially conventional cytogenetics, which is still the "gold standard" for obtaining an overview of chromosomal changes. Eventually, array-CGH can also be applied in the diagnostic setting to obtain a high resolution picture of chromosomal imbalances.

### Future directions

In our opinion, the future of the detection of chromosomal changes in lymphomas will be two-fold. On the one hand, it will be characterized by the application of current methods (i.e. conventional cytogenetics, FISH, arrayCGH and PCR) in combination with more and more advanced upcoming techniques. For instance, the development of the next generation of in depth sequencers will allow to sequence complete lymphoma genomes in the near future. This will certainly lead to the detection of novel genetic changes beyond the power of any of the current methods. On the other hand, the application of highly advanced screening methods will lead to the discovery of few highly informative genetic markers that will be studied in the clinical setting with more accessible and cheaper techniques (e.g. FISH or PCR) for a better diagnosis, prediction of prognosis and therapy stratification according to risk groups in lymphoma patients.

## Acknowledgements

The authors's own studies on lymphomas have been supported by the KinderKrebs Initiative Buchholz, the Deutsche Krebshilfe, the Schleswig-Holsteinische Krebsgesellschaft and the Lymphoma Research Foundation. We would also like to thank the technical staff of our departments as well as clinicians, hematologists, pathologists and geneticists world-wide with whom we closely collaborate in the field of lymphoma diagnostics.

## References

- Zech L, Haglund U, Nilsson K, Klein G. Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 1976; 17: 47-56.
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Müller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-49.
- Chaganti RS, Nanjangud G, Schmidt H, Teruya-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: biologic and clinical significance. *Semin Hematol* 2000; 37: 396-411.
- Willis TG, Dyer MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 2000; 96: 808-22.
- Hummel M, Bentink S, Berger H, Klapper W, Wessendorf S, Barth TF, et al. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. *N Engl J Med* 2006; 354: 2419-30.
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, et al. Application of interphase fluorescence in situ Hybridization for the detection of the Burkitt translocation t(8;14)(q24;q32) in B-cell lymphomas. *Blood* 1998; 91: 984-90.
- Siebert R, Matthiesen P, Harder S, Zhang Y, Borowski A, Zühlke-Jenisch R, et al. Application of interphase cytogenetics for the detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphomas. *Ann Oncol* 1998; 9: 519-26.
- Janz S, Potter M, Rabkin CS. Lymphoma and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chromosomes Cancer* 2003; 36: 211-23.
- Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Grote W, Siebert R. Interphase cytogenetics of hematological neoplasms under the perspective of the novel WHO classification. *Anticancer Res* 2003; 23 (2A): 1139-48.
- Ventura RA, Martín-Subero JI, Jones M, McParland J, Gesk S, Mason DY, et al. FISH analysis for the detection of lymphoma-associated chromosomal abnormalities in routine paraffin-embedded tissue. *J Mol Diagn* 2006; 8:141-51.
- Gesk S, Martín-Subero JI, Harder L, Luhmann B, Schlegelberger B, Calasanz MJ, et al. Molecular cytogenetic detection of chromosomal breakpoints in T-cell receptor gene loci. *Leukemia* 2003; 17: 738-45.
- Martín-Subero JI, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, et al. Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. *Am J Pathol* 2002; 161: 413-20.
- Schröck E, Padilla-Nash H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence in situ hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 2000; 37: 334-47.
- Weber-Matthiesen K, Winkemann M, Müller-Hermelink A, Schlegelberger B, Grote W. Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem* 1992; 40: 171-5.
- Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, et al. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 1474-7.
- Martín-Subero JI, Klapper W, Sotnikova A, Callet-Bauchu E, Harder L, Bastard C, et al. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res* 2006; 66: 10332-8.
- Wlodarska I, Nooyen P, Maes B, Martín-Subero JI, Siebert R, Pauwels P, et al. Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2003; 101: 706-10.
- Mestre-Escorihuela C, Rubio-Moscardo F, Richter JA, Siebert R, Climent J, Fresquet V, et al. Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* 2007; 109: 271-80.
- Rubio-Moscardo F, Climent J, Siebert R, Piris MA, Martín-Subero JI, Nielaender I, et al. Mantle-cell lymphoma genotypes identified with CGH to BAC microarrays define a leukemic subgroup of disease and predict patient outcome. *Blood* 2005; 105: 4445-54.
- Nielaender I, Martín-Subero JI, Wagner F, Martínez-Climent JA, Siebert R. Partial uniparental disomy: a recurrent genetic mechanism alternative to chromosomal deletion in malignant lymphoma. *Leukemia* 2006; 20: 904-5.

## DIAGNÓSTICO GENÉTICO EN LEUCEMIAS AGUDAS MIELOBLÁSTICAS CON CARIOTIPO NORMAL

J. CERVERA<sup>1</sup>, F. MOSCARDÓ<sup>1</sup>, P. BOLUFER<sup>2</sup>, E. BARRAGÁN<sup>2</sup>, A. VALENCIA<sup>1</sup>, E. SUCH<sup>1</sup>, J.C. PAJUELO<sup>2</sup>, E. DE TOMÁS E<sup>1</sup>, P. MONTESINOS<sup>1</sup>, M.A. SANZ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Universitario La Fe. Valencia. <sup>2</sup>Laboratorio de Biología Molecular. Servicio de Biopatología Clínica. Hospital Universitario La Fe. Valencia

## Introducción

Los hallazgos citogenéticos al momento del diagnóstico en la leucemia mieloblástica aguda (LMA) son considerados en la actualidad como uno de los factores pronósticos más importantes en esta patología. Diversos estudios llevados a cabo en series amplias así lo

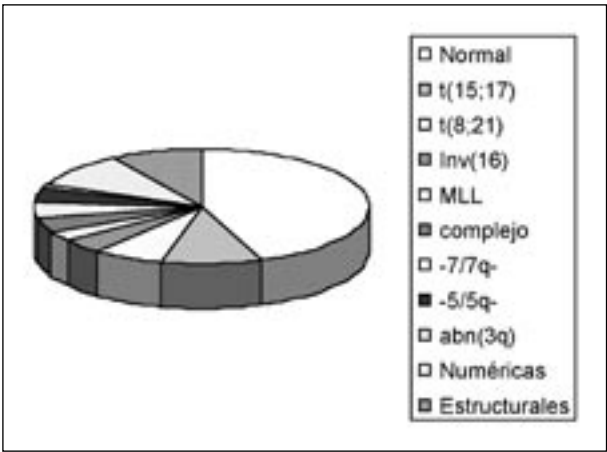


Figura 1. Principales alteraciones citogenéticas en la LMA de novo.

demuestran y, con algunas variaciones, han permitido estratificar a los pacientes en tres grupos de riesgo (favorable, intermedio y desfavorable) en función de las alteraciones encontradas en el cariotipo<sup>1-4</sup>.

Sin embargo, el grupo de riesgo citogenético intermedio, que comprende a la mayoría de pacientes con LMA, es un grupo altamente heterogéneo en el que, con toda probabilidad, se agrupan entidades diferentes en cuanto a etiopatogenia, pronóstico y respuesta al tratamiento. Dentro de este grupo destacan por su frecuencia aquellos pacientes que no presentan ninguna anomalía cromosómica detectable al microscopio. Así, entre el 40 y 50% de los pacientes con LMA (25% en el caso de los niños) tienen un cariotipo normal en el momento del diagnóstico<sup>1-4</sup> (Figura 1).

Los avances recientes en la caracterización molecular de estos pacientes han permitido la identificación de diversas alteraciones moleculares que pudieran desempeñar un papel determinante en la leucemogénesis y que han ayudado a delimitar diversos subgrupos de

riesgo dentro del grupo de pacientes con cariotipo normal (Tabla 1). En este artículo se revisarán las principales alteraciones moleculares descritas en los pacientes con cariotipo normal, con especial énfasis en su relevancia pronóstica y terapéutica.

Mutaciones

Mutaciones de FLT3

La diferenciación y crecimiento de las células hematopoyéticas es el resultado de la interacción de diversos factores de crecimiento y sus respectivos receptores. Entre estos últimos se encuentra el receptor tirosinasa FMS-like (FLT3) que pertenece a la familia de los receptores tirosinasa de clase III. FLT3 se expresa normalmente en las células hematopoyéticas progenitoras y media la diferenciación y proliferación de las mismas. La interacción de FLT3 con su ligando da como resultado la activación del receptor a través de su dimerización y posterior autofosforilación de los residuos tirosinasa<sup>5</sup>. Esta activación induce vías de señalización celular que intervienen en la proliferación y apoptosis, que incluyen STAT5, RAS o MAPK, y se ha comprobado que es capaz de aumentar la capacidad proliferativa de las células de LMA *in vitro*<sup>5</sup>.

El gen que codifica FLT3 se encuentra en el cromosoma 13q12 y comprende 24 exones. Al igual que otros receptores tirosinasa de clase III, FLT3 está compuesto por cinco dominios extracelulares inmunoglobulina *like*: un dominio transmembrana, un dominio yuxtamembrana, dos dominios tirosinasa intracelulares y un dominio C-terminal intracelular. Se han descrito mutaciones asociadas a LMA que dan como resultado una activación constitutiva del receptor. Entre las alteraciones más importantes destacan por su frecuencia e implicación pronóstica las duplicaciones

| Tabla 1. Genes con alteraciones recurrentes en LMA con cariotipo normal |  |                          |                         |                    |
|---|--|--------------------------|-------------------------|--------------------|
| Símbolo   | Nombre del gen   | Localización cromosómica | Alteración              | Impacto pronóstico |
| FLT3  | Fms-related tyrosine kinase 3                          | 13q12                    | Duplicaciones en tándem | Adverso            |
| NPM1  | Nucleophosmin  | 5q35                     | Mutación                | Favorable          |
| CEBPA   | CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha          | 19q13.1                  | Mutación                | Favorable          |
| MLL   | Myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia             | 11q23                    | Duplicaciones en tándem | Adverso            |
| EVI1  | Ecotropic viral integration site                       | 3q26                     | Sobreexpresión          | Adverso            |
| BAALC   | Brain and acute leukemia gene, cytoplasmic             | 8q22.3                   | Sobreexpresión          | Adverso            |
| WT1   | Wilms' tumor gene                                      | 11p13                    | Sobreexpresión          | Adverso            |
| ERG   | v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene-like (avian) | 21q22.3                  | Sobreexpresión          | Adverso            |
| MN1   | meningioma 1   | 22q11                    | Sobreexpresión          | Adverso            |
| ABCG2   | ATP-binding cassette, sub-family G, member 2           | 4q22                     | Sobreexpresión          | Adverso            |

internas en tándem de FLT3 (FLT3-ITD). FLT3-ITD se observa en la LMA con un prevalencia entre el 20 y 27%<sup>6-10</sup>, siendo especialmente frecuentes en los pacientes con t(15;17) o con cariotipo normal. Entre estos últimos FLT3-ITD se encuentra entre el 28 y 33% de los casos<sup>6-10</sup>. La duplicación afecta a un segmento de la secuencia codificadora del dominio yuxtamembrana (exones 14 y 15), la longitud puede variar entre 3 y 400 nucleótidos y, aunque en ocasiones se acompaña de la inserción de algunos nucleótidos, no suele afectar a la pauta de lectura<sup>11</sup>. El otro tipo de alteraciones encontradas son las mutaciones puntuales, entre las que destaca la mutación Asp 835 (FLT3-D835) que afecta al dominio tirosinasa de FLT3. Ésta sucede con una frecuencia de en torno al 7% en los pacientes con LMA, aunque puede alcanzar hasta el 14% de los pacientes con cariotipo normal<sup>5,7,11</sup>, y su relación con el pronóstico está mucho más cuestionada<sup>6-8</sup>. Finalmente, también se han descrito mutaciones puntuales localizadas en el dominio yuxtamembrana, cuya incidencia global en la LMA se sitúa en torno al 2%, no habiendo sido establecida para los casos con cariotipo normal<sup>11</sup>.

Existe una relación entre la presencia de mutaciones de FLT3 y determinadas características biológicas de la LMA al diagnóstico. Así, los pacientes con FLT3-ITD suelen debutar con una cifra mayor de leucocitos totales y con un porcentaje de blastos, tanto en sangre periférica como en médula ósea, mayor que el de los pacientes FLT3-ITD negativos. Asimismo, la incidencia de FLT3-ITD parece ser menor en los pacientes con LMA secundaria<sup>6</sup>.

Si bien existen algunas discrepancias, casi todos los estudios coinciden en otorgar un papel pronóstico adverso a la presencia de FLT3-ITD<sup>6-8,10</sup>. Aunque, en general, la tasa de remisiones completas (RC) es inferior en los pacientes con FLT3-ITD, ningún estudio ha demostrado que tales diferencias sean significativas<sup>6-8,10</sup>. Por el contrario, la peor evolución de los pacientes con mutaciones de FLT3 parece determinada fundamentalmente por un mayor riesgo de recaída (RR) y una menor supervivencia libre de enfermedad (SLE).

Sin embargo, resultados recientes sugieren que la mera presencia de FLT3-ITD no es suficiente para determinar un pronóstico adverso. Así, Thiede *et al.*<sup>7</sup> establecieron una relación o *ratio* entre la cantidad del alelo mutado y el alelo *wild-type*. La mediana de esta *ratio* fue de 0,78, con extremos entre 0,03 y 32,56, y se observó una peor SLE y supervivencia global (SG) de los pacientes con una *ratio* superior a 0,78 con respecto a los pacientes sin mutaciones de FLT3. Para los pacientes con una *ratio* inferior a 0,78, la SLE y SG fue similar a la observada en pacientes sin mutaciones de FLT3. De forma significativa, todos los pacientes estudiados con leucemia promielocítica aguda (LPA) y mutaciones FLT3-ITD mostraron una *ratio* baja. Por otra

parte, 15 pacientes presentaron un cociente superior a 2. De ellos, 14 fallecieron durante el primer año de diagnóstico. Una *ratio* más elevada se asoció con un mayor número de leucocitos totales y de blastos en médula ósea. En el análisis multivariante, el cociente entre el alelo mutado y el *wild-type* resultó un factor pronóstico independiente para SLE y SG. En consonancia con estos resultados, en un estudio del CALGB (Cancer and Leukemia Group B) se ha demostrado el carácter especialmente peyorativo de la ausencia del alelo *wild-type* en los pacientes con FLT3-ITD, cuya incidencia se sitúa en torno al 10%, siendo éste el principal factor pronóstico independiente<sup>12</sup>. Finalmente, algunos estudios han sugerido que el número de mutaciones encontradas en cada paciente<sup>8</sup> o la longitud de los segmentos duplicados<sup>13</sup> podrían asimismo tener influencia pronóstica.

En contraste con las FLT3-ITD, y a pesar que los datos son en ocasiones contradictorios y el análisis dificultoso por su baja incidencia, las mutaciones FLT3-D835 no aparecen acompañarse de un pronóstico adverso en los pacientes de riesgo citogenético intermedio o cariotipo normal<sup>6-8</sup>. De hecho, existen evidencias de que aunque ambas alteraciones suponen una activación constitutiva del receptor, la cascada de señales que originan y, por tanto, las vías sobre las que actúan no son equivalentes<sup>11</sup>.

### Mutaciones de NPM1

La nucleofosmina (NPM) es una fosfoproteína que constantemente se traslada entre el núcleo y el citoplasma y que, en condiciones normales, tiene una localización predominantemente nucleolar. Entre las funciones que se le atribuyen están la regulación de la duplicación del centrosoma, el ensamblaje y transporte de partículas preribosómicas a través de la membrana nuclear o la prevención de la agregación de proteínas en el nucleolo. Pero, además, la NPM regula la estabilidad y actividad transcripcional de p53 después de diferentes tipos de estrés, como la exposición a citostáticos, uniéndose a distintas proteínas, tales como el propio p53 o aquellas que interaccionan con p53 o lo regulan, como pueden ser Rb, P19<sup>ARF</sup> o HDM2. Por tanto, dado que la NPM puede tener una función potencial como supresor de tumores, las alteraciones en su movimiento entre núcleo y citoplasma pueden desempeñar un papel crítico en la transformación maligna<sup>14</sup>.

El gen *NPM1* se encuentra en el cromosoma 5q35 y se sabía de su implicación en diversas translocaciones cromosómicas asociadas a linfomas o leucemias que dan como resultado proteínas de fusión que retienen la porción amino terminal de NPM. Entre ellas destacan NPM-ALK (t[2;5](p23;q35)) en el linfoma anaplásico

de células grandes, NPM-RAR $\alpha$  (t[5;17][q35;q21]) en algunas formas poco frecuentes de LPA y NPM-MLF1 (t[3;5][q25;q35]) descrita en algunos casos de LMA.

Falini *et al.* estudiaron la localización subcelular de la proteína NPM mediante métodos inmunohistoquímicos en 591 pacientes con LMA *de novo*<sup>14</sup>. En 208 pacientes (35%) se detectó NPM citoplasmática que no se observaba en pacientes con LMA secundaria ni en otros tumores, incluyendo otras neoplasias hematológicas. La NPM citoplasmática se encontró en el momento del diagnóstico y de la recaída en 25 pacientes analizados en estos dos momentos y apareció en todos los subtipos FAB excepto M3, M4Eo y M7, asociándose a una baja expresión de los antígenos CD34 y CD133. La presencia de NPM citoplasmática fue especialmente frecuente en los pacientes con cariotipo normal (142 de 230 pacientes; 62%), no se observó en los casos de anomalías citogenéticas específicas y mostró una clara asociación con las FLT3-ITD que se presentaron con el doble de prevalencia con respecto a las otras LMA.

Además, Falini *et al.* demostraron que, exceptuando sólo un paciente, en todos los casos en los que se observaba un patrón de NPM citoplasmática se encontraban mutaciones en el exón 12 de *NPM1*, dando como consecuencia un cambio en la pauta de lectura y una proteína anormalmente alargada que era retenida en el citoplasma<sup>14</sup>. En principio se describieron 6 mutaciones distintas de *NPM1*, aunque en trabajos posteriores se han descrito otras con frecuencias inferiores. Prácticamente todas las mutaciones consisten en la inserción de 4 bases bien entre los nucleótidos 960-961 o 964-965. La mutación A que consiste en la duplicación de 4 bases TCTG es el cambio más común. El 97% de todas las mutaciones ocurren en el nucleótido en posición 960 y suponen la pérdida de dos residuos triptófano en las posiciones 288 y 290 (o sólo 290), los cuales son esenciales para la translocación nuclear de la proteína<sup>14</sup>. El estado de la mutación es heterocigoto en casi todos los casos. Existen evidencias de que las mutaciones de *NPM1* son un evento anterior a la adquisición de mutaciones de *FLT3*, sugiriendo que las mutaciones de *NPM1* pudieran ser un evento primario en la leucemogénesis<sup>15</sup>.

Varios trabajos han analizado el impacto de las mutaciones de *NPM1* en el pronóstico de los pacientes con LMA, así como su relación con las distintas características clínico-biológicas<sup>16-21</sup>. La incidencia de mutaciones de *NPM1* oscila entre 25 y 53% de las LMA, siendo significativamente más frecuente en los pacientes con cariotipo normal (entre 46 y 67%)<sup>16-21</sup>. Las mutaciones de *NPM1* se asocian con los subtipos FAB M4 y M5 fundamentalmente, sin que se observen en la LMA M3. Suelen tener una cifra de leucocitos más alta, son más frecuentes en mujeres, se asocian a una cifra de plaquetas más elevada, muestran una cifra ma-

yor de blastos en médula ósea y una expresión menor de CD34<sup>16-21</sup>. Como se ha comentado anteriormente, existe una clara asociación entre las mutaciones de *FLT3* y las de *NPM1*. Las mutaciones de *CEBPA* ocurren con una incidencia similar en pacientes con y sin mutaciones de *NPM1*, mientras que la asociación con duplicaciones parciales en tándem de MLL (MLL-PTD) es extremadamente rara<sup>11</sup>.

En el trabajo original de Falini *et al.* se demostró la influencia pronóstica favorable de la localización citoplasmática de NPM1 para la obtención de remisión completa<sup>14</sup>. Desde el punto de vista de la evolución de los pacientes, la mayoría de trabajos otorgan un papel favorable a las mutaciones de *NPM1*. No obstante, ese pronóstico favorable se observa fundamentalmente en los pacientes con mutaciones de *NPM1* pero sin FLT3-ITD, que alcanzan tasas de RC, SLE y SG<sup>16-19</sup> netamente superiores a las observadas en pacientes con mutaciones concomitantes de *NPM1* y FLT3-ITD. De hecho, sólo dos trabajos no han demostrado un pronóstico favorable de las mutaciones de *NPM1* y ambos tienen en común que el grupo de pacientes con mutaciones de *NPM1* pero sin FLT3-ITD no fue analizado como tal<sup>19,21</sup>. Por tanto, las mutaciones de *NPM1* definirían un grupo de mejor pronóstico dentro de los pacientes con LMA con cariotipo normal, siempre que no se asocien a duplicaciones en tándem de *FLT3*.

### Mutaciones en CEBPA

Los factores de transcripción pertenecientes a la familia CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) participan en el equilibrio entre proliferación celular y detención mitótica del crecimiento durante la diferenciación terminal. Dentro de esta familia de proteínas destaca *CEBPA*<sup>22,23</sup>. *CEBPA* está formada por un dominio de unión al ADN compuesto por una región básica (b) positivamente cargada y en contacto con el ADN y una cremallera de leucina (ZIP) en su extremo C-terminal que media en la dimerización<sup>22,23</sup>. La región terminal N está menos conservada y contiene dos dominios reguladores y de transactivación, TAD1 y TAD2, ambos incluidos en una proteína de 42 kDa. Otra proteína más corta, de 30 kDa, que se inicia en el codón 120, contiene sólo el dominio TAD2<sup>22,23</sup>.

*CEBPA* ejerce una regulación positiva durante la diferenciación granulocítica, produciendo su expresión la diferenciación de los neutrófilos. De hecho, en ratones transgénicos con *CEBPA* mutado no se observan granulocitos maduros, mientras que el resto de células hematopoyéticas se encuentran en las proporciones habituales<sup>22,23</sup>. Al parecer, ejerce una regulación negativa de c-Myc que permite a los precursor-

res entrar en la vía de diferenciación granulocítica, a la vez que activa transcripcionalmente a los promotores de diversos factores de crecimiento granulomonocíticos<sup>22,23</sup>.

El gen *CEBPA* se localiza en el cromosoma 19q13.1. Se han descrito mutaciones de este gen en pacientes con LMA con una frecuencia de entre el 7 y el 11% (15-19% en pacientes con cariotipo normal) y que resultan en una inactivación de *CEBPA*<sup>22,23</sup>. Estas mutaciones se pueden dividir en tres grupos dependiendo de sus efectos sobre la expresión y estructura de *CEBPA*. El primer grupo comprende mutaciones “sin sentido” del extremo N-terminal que generan la ausencia de la proteína de 42 kDa y que dan como resultado una pérdida del potencial de transactivación de *CEBPA*. Mientras, la proteína de 30kDa es normalmente expresada ejerciendo un efecto dominante negativo y ocasionando un bloqueo madurativo de los granulocitos<sup>22,23</sup>. El segundo grupo incluye mutaciones localizadas en el dominio bZIP de la región C-terminal que también generan una pérdida de la capacidad de transactivación del gen pero no son responsables de un efecto dominante negativo ni ocasionan un bloqueo en la maduración<sup>22</sup>. Finalmente, un tercer grupo comprende dos grandes delecciones en la parte media de la secuencia codificadora induciendo un codón de parada antes del dominio bZIP<sup>23</sup>. Algunos pacientes presentan mutaciones heterocigotas, mientras que otros presentan mutaciones bialélicas del extremo C-terminal o incluso mutaciones concomitantes de los extremos C- y N-terminal<sup>11</sup>.

Las mutaciones de *CEBPA* parecen relacionarse con una menor proporción de blastos en sangre periférica al diagnóstico, recuentos más bajos de plaquetas, menor afectación extramedular, menor incidencia de mutaciones de *FLT3* y *MLL-PTD*, y cariotipo de riesgo intermedio<sup>24</sup>. Respecto a las tasas de RC no parece que difieran entre los pacientes con y sin mutaciones de *CEBPA*<sup>24,25</sup>. Por el contrario, los pacientes con mutaciones de *CEBPA* tienen un curso clínico favorable con mejores porcentajes de SG, SLEV y SLE a los 5 años que el resto de pacientes del grupo de riesgo citogenético intermedio<sup>23</sup> o con cariotipo normal<sup>24,25</sup>. Mediante análisis multivariante se ha demostrado el valor pronóstico independiente de las mutaciones de *CEBPA*<sup>24,25</sup>. Sin embargo, al igual que ocurre con las mutaciones de *NPM1*, parece que el valor pronóstico favorable de las mutaciones de *CEBPA* se pierde cuando éstas se acompañan de *FLT3-ITD* en un mismo paciente<sup>24,25</sup>. Por último, se ha sugerido que el valor pronóstico de los distintos tipos de mutaciones de *CEBPA* podría ser distinto, siendo más favorable en aquellos casos con mutaciones del extremo N-terminal<sup>24</sup>, si bien estos hallazgos precisan de confirmación en series independientes.

### Duplicaciones parciales en tándem de *MLL* (*MLL-DPT*)

El gen *MLL/ALL1/HRX* está localizado en la banda 11q23, presenta un tamaño aproximado de 100 kb y codifica una proteína que regula de forma positiva el mantenimiento de la expresión de los genes *HOX*, necesarios para la formación de los patrones de desarrollo y diferenciación celular. El gen consta de tres dominios de función conocida, uno de ellos induce represión transcripcional, otro codifica para una proteína de tipo “dedos de Zinc”, mientras que el tercero es un dominio de activación transcripcional.

Las duplicaciones en tándem de *MLL* fueron las primeras alteraciones moleculares descritas en la LMA con citogenética normal<sup>11</sup>. La mayor parte de estos reordenamientos se detectan en una región de 8,3 kb situada entre los exones 5 y 11. Menos frecuentemente la región duplicada se extiende entre los exones 5 y 12. Las DPT siempre suponen la duplicación del extremo N-terminal de la proteína *MLL* y, a diferencia de los reordenamientos con otros genes que suponen la creación de distintas proteínas quiméricas de fusión, las *MLL-DPT* retienen todos los dominios funcionales de la proteína *MLL* silvestre<sup>11</sup>. Se ha sugerido que el mecanismo leucemogénico inducido por este gen podría ser el resultado de la actuación simultánea de un efecto de ganancia de función y pérdida concomitante de función del otro alelo de *MLL* (haploinsuficiencia). El silenciamiento de este último parece estar mediado por mecanismos epigenéticos (metilación y modificación de histonas) y puede ser revertido farmacológicamente, lo que pudiera tener implicaciones terapéuticas<sup>26</sup>. Las *MLL-DPT* se detectan aproximadamente entre el 5 y 10% de las LMA con citogenética normal y en el 90% de las LMA que presentan trisomía del 11 como anomalía cromosómica única. No parece que existan diferencias significativas en la forma de presentación de los pacientes con o sin *MLL-DPT*<sup>27,28</sup>. Entre el 30 y el 40% de los pacientes con *MLL-DPT* presentan además *FLT3-ITD* asociadas, mientras que las mutaciones concomitantes de *NPM* o *CEBPA* son raras. En dos estudios recientes realizados en 81 y 221 LMA se ha observado una menor SLE<sup>27,28</sup> en los pacientes con *MLL-DPT*. Sin embargo, ningún estudio ha incluido otras alteraciones moleculares en los análisis multivariantes de supervivencia y, por tanto, el carácter pronóstico independiente de la presencia de *MLL-DPT*, en particular frente a *FLT3-ITD*, está por determinar.

### Sobreexpresión de genes

#### Expresión de *EVI1*

El gen *EVI1* (*Ecotropic viral integration site*) es un proto-oncogén que se encuentra localizado en 3q26 y codifi-

ca una proteína nuclear de 145 kDa que tiene dominios en dedo de zinc, semejantes a los de los reguladores transcripcionales. *EVI1* está implicado en la patogénesis de la LMA y SMD con reordenamientos de 3q26. Los reordenamientos de 3q26 se caracterizan por estar asociados a un pésimo pronóstico con muy mala respuesta a la quimioterapia. El papel que *EVI1* desempeña en el proceso de la leucemogénesis es desconocido, aunque diversos estudios han demostrado que una expresión inadecuada de *EVI1* en las células hematopoyéticas inmaduras interfiere con el desarrollo normal de la serie eritroide y granulocítica.

Actualmente se sabe que *EVI1* puede formar mediante *splicing* alternativo un transcrito de fusión con el gen *MDS1*. *MDS1-EVI1* codifica una proteína larga que contiene la proteína *EVI1* completa con una extensión N terminal única adicional. Aunque ambas proteínas, *EVI1* y *EVI1-MDS1*, están relacionadas, podrían tener funciones opuestas<sup>29</sup>.

Diversos estudios han descrito una expresión aberrante de *EVI1* sin que exista evidencia de alteraciones de 3q26, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos para la activación de este gen. Entre estos estudios destaca un análisis realizado sobre 319 pacientes con LMA *de novo*, en el que se buscó la expresión de *EVI1* mediante técnicas de PCR en tiempo real utilizando sondas que permitían diferenciar entre *EVI1* y *MDS1-EVI1*<sup>29</sup>. De los 319 pacientes, 44 (14%) expresaron niveles altos de *EVI1*, *MDS1-EVI1* o ambos. De estos 44 pacientes, sólo 6 (14%) expresaron únicamente *EVI1*, 26 (59%) expresaron *EVI1* y *MDS1-EVI1* y 12 (27%) *MDS1-EVI1* solamente. De los 44 pacientes con expresión de *EVI1* y/o *MDS1-EVI1* sólo 4 (9%) tenían alteraciones de 3q26. Ninguno de los 275 pacientes negativos para *EVI1* o *MDS1-EVI1* presentó alteraciones de 3q26. Quince de 32 pacientes (47%) con expresión de *EVI1* (*EVI1* solo o *EVI1* y *MDS1-EVI1*) presentaron anomalías cromosómicas de mal pronóstico frente al 8% de los pacientes que sólo expresaron *MDS1-EVI1* y el 12% de los que no expresaron *EVI1* ni *MDS1-EVI1*. No se observaron casos de t(15;17), t(8;21) o inv(16) en los pacientes que expresaron *EVI1*, lo que contrasta con una prevalencia de estas anomalías del 33% en los pacientes con *MDS1-EVI1* y del 19% en los que no expresaban tampoco *MDS1-EVI1*. Respecto al grupo de riesgo citogenético intermedio, sólo 16 pacientes de 212 (8%) presentaron expresión de *EVI1*, y de ellos tan sólo 5 tenían un cariotipo normal. Se observó una frecuencia especialmente alta de casos de expresión de *EVI1* y *MDS1-EVI1* en los pacientes con reordenamientos de *MLL* (57%), raramente se observó coincidencia con alteraciones de *FLT3* y tampoco se encontró una correlación significativa con la edad, sexo, cifra total de leucocitos o plaquetas y otras variables<sup>29</sup>.

La expresión de *EVI1*, solo o en combinación con *MDS1-EVI1*, se asoció con un mal pronóstico, con ta-

sas de SG, SLEV y SLE claramente inferiores, significación pronóstica que también se mantuvo en el grupo de cariotipo de riesgo intermedio. Sin embargo, el porcentaje de pacientes con expresión aberrante de *EVI1* y cariotipo normal parece ser reducido<sup>29</sup>.

### Expresión de BAALC

El gen *BAALC* (*brain and acute leukemia, cytoplasmic*) se localiza en 8q22.3 y se expresa fundamentalmente en tejidos derivados del neuroectodermo y en los precursores hematopoyéticos. En neoplasias hematológicas la hiperexpresión de *BAALC* se ha observado en LMA, leucemia linfoblástica aguda, crisis blásticas de leucemia mieloide crónica (LMC), pero no en LMC en fase crónica o en leucemia linfocítica crónica. Aunque con algunas diferencias metodológicas, diversos estudios han mostrado que en la LMA la hiperexpresión de *BAALC* en médula ósea o sangre periférica de pacientes *de novo* menores de 60 años y cariotipo normal es un factor pronóstico independiente en cuanto a la resistencia a la terapia de inducción, SG y RR<sup>11,30</sup>.

### Expresión de WT1

El gen del tumor de Wilms (*WT1*), originalmente relacionado con la patogénesis del tumor renal de Wilms, se localiza en 11p13 y codifica un factor de transcripción. Este gen tiene una expresión tejido-dependiente asociada principalmente al sistema genitourinario, siendo prácticamente indetectable en las células de médula ósea normal, sangre periférica y en otros tejidos normales. Además, *WT1* se ha relacionado con la regulación de la diferenciación y proliferación de las células sanguíneas durante la hematopoyesis.

El gen *WT1* se expresa en un 80-93% de las LMA. Por ello, diversos estudios han abordado la evaluación cuantitativa de *WT1* como un marcador "panleucémico" de enfermedad residual. En un reciente estudio se ha mostrado mediante un análisis multivariante el desfavorable impacto de la hiperexpresión de *WT1* en la probabilidad de recaída en pacientes adultos con LMA *de novo*. A pesar de la asociación con *FLT3*-ITD, la hiperexpresión de *WT1* ha mostrado un valor pronóstico independiente<sup>31</sup>. Estos estudios, sin embargo, precisan de confirmación en series independientes.

### Otros genes

La expresión aberrante de algunos genes, como *ERG* (ETS-related gene)<sup>32</sup>, *MN1* (meningioma 1)<sup>33</sup> o *ABCG2* (que codifica la proteína de resistencia del cáncer de mama, BCRP)<sup>34</sup>, ha mostrado en estudios

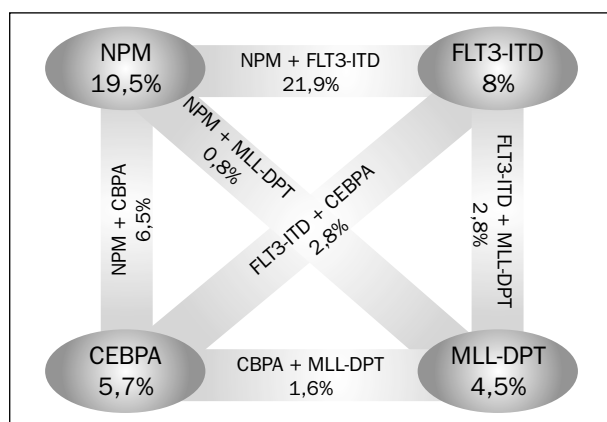


Figura 2. Mutaciones aisladas de NPM, FLT3-ITD, CEBPA y MLL-DPT, y sus distintas combinaciones en 245 pacientes con cariotipo normal. Döhner et al.<sup>17</sup>.

relativamente pequeños tener un significado pronóstico adverso. Estos resultados, sin embargo, requieren de validación en otras series. En contraste, recientemente se ha demostrado la ausencia de valor pronóstico de las mutaciones de *NRAS* en la LMA con cariotipo normal<sup>35</sup>.

## Conclusiones

Desde el punto de vista citogenético, los pacientes con cariotipo normal constituyen el grupo más numeroso dentro de la LMA. La ausencia de otros factores pronósticos clínicamente relevantes en este subgrupo de pacientes ha motivado en los últimos años una extensa búsqueda de nuevas alteraciones moleculares que pudieran ayudar a profundizar en los mecanismos de la leucemogénesis y, al mismo tiempo, ofrecer una estimación más precisa del pronóstico. Todo ello ha permitido constatar que la LMA con cariotipo normal presenta una notable heterogeneidad molecular. Así, se han descrito mutaciones de genes como *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* o *MLL*, entre otros, o la expresión aberrante de algunos genes como *EV11*, *BAALC*, *WT1*, *ERG*, *MN1* o *ABCG2*. Además, estas alteraciones no siempre son excluyentes entre sí, pudiendo coexistir varias de ellas en un mismo individuo (Figura 2). En este sentido, son necesarios estudios que permitan conocer el peso pronóstico relativo que cada una de estas alteraciones representa para una mejor estratificación del riesgo. Por otra parte, aunque la mayoría de los pacientes con LMA y cariotipo normal presentan al menos una de las alteraciones genéticas que se han mencionado, casi una cuarta parte de los mismos carece de mutaciones de *FLT3*, *NPM1*, *CEBPA* o *MLL*<sup>17</sup>. Ello viene a subrayar la enorme tarea todavía pendiente en la caracterización molecular de la LMA, a la que sin duda

se sumarán nuevos genes, así como diversas alteraciones epigenéticas o determinados perfiles de expresión molecular.

El conocimiento más profundo de las alteraciones moleculares que subyacen en la LMA con cariotipo normal sin duda tendrá un impacto importante en el tratamiento de estos pacientes, no sólo en cuanto a una mejor estimación del pronóstico individual sino también con el desarrollo de nuevas terapias dirigidas contra dianas moleculares específicas.

## Bibliografía

1. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood* 1998; 92 (7): 2322-33.
2. Grimwade D, Walker H, Harrison G, Oliver F, Chatters S, Harrison CJ, et al. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* 2001; 98 (5): 1312-20.
3. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood* 2000; 96 (13): 4075-83.
4. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* 2002; 100 (13): 4325-36.
5. Small D. FLT3 Mutations: Biology and Treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 178-84.
6. Frohling S, Schlenk RF, Breitnick J, Benner A, Kreitmeier S, Tobis K, et al. Prognostic significance of activating FLT3 mutations in younger adults (16 to 60 years) with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the AML Study Group Ulm. *Blood* 2002; 100 (13): 4372-80.
7. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood* 2002; 99 (12): 4326-35.
8. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, 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 (6): 1752-9.
9. Gale RE, Hills R, Kottaridis PD, Srirangan S, Wheatley K, Burnett AK, et al. No evidence that FLT3 status should be considered as an indicator for transplantation in acute myeloid leukemia (AML): an analysis of 1135 patients, excluding acute promyelocytic leukemia, from the UK MRC AML10 and 12 trials. *Blood* 2005; 106 (10): 3658-65.
10. Moreno I, Martin G, Bolufer P, Barragan E, Rueda E, Roman J, et al. Incidence and prognostic value of FLT3 internal tan-

- dem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2003; 88 (1): 19-24.
11. Mrózek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman S, Bloomfield C. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukaemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood* 2007; 109 (2): 431-48.
  12. Whitman SP, Archer KJ, Feng L, Baldus C, Becknell B, Carlson BD, et al. Absence of the wild-type allele predicts poor prognosis in adult de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics and the internal tandem duplication of FLT3: a cancer and leukemia group B study. *Cancer Res* 2001; 61 (19): 7233-9.
  13. Stirewalt DL, Kopecky KJ, Meshinchi S, Engel JH, Pogossova-Agadjanyan EL, Linsley J, et al. Size of FLT3 internal tandem duplication has prognostic significance in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2006; 107 (9): 3724-26. [Epub 2005 Dec 20].
  14. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med* 2005; 352 (3): 254-66.
  15. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schai M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107 (10): 4011-20.
  16. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2006; 107 (10): 4011-20.
  17. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood* 2005; 106 (12): 3740-6.
  18. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* 2005; 106 (12): 3733-9.
  19. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood* 2005; 106 (10): 3618-20.
  20. Verhaak RG, Goudswaard CS, Van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood* 2005; 106 (12): 3747-54.
  21. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005; 106 (8): 2854-61.
  22. Gombart AF, Hofmann WK, Kawano S, Takeuchi S, Krug U, Kwok SH, et al. Mutations in the gene encoding the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein alpha in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias. *Blood* 2002; 99 (4): 1332-40.
  23. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood* 2002; 100 (8): 2717-23.
  24. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmeier J, Benner A, Kreitmeier S, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol* 2004; 22 (4): 624-33 [Epub 2004 Jan 15].
  25. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res* 2005; 11(4): 1416-24. Erratum in: *Clin Cancer Res* 2005; 11 (15): 5659.
  26. Whitman SP, Liu S, Vukosavljevic T, Rush LJ, Yu L, Liu C, et al. The MLL partial tandem duplication: evidence for recessive gain-of-function in acute myeloid leukemia identifies a novel patient subgroup for molecular-targeted therapy. *Blood* 2005; 106 (1): 345-52 [Epub 2005 Mar 17].
  27. Dohner K, Tobis K, Ulrich R, Frohling S, Benner A, Schlenk RF, et al. Prognostic significance of partial tandem duplications of the MLL gene in adult patients 16 to 60 years old with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: a study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *J Clin Oncol* 2002; 20(15):3254-3261.
  28. Shiah HS, Kuo YY, Tang JL, Huang SY, Yao M, Tsay W et al. Clinical and biological implications of partial tandem duplication of the MLL gene in acute myeloid leukemia without chromosomal abnormalities at 11q23. *Leukemia* 2002; 16 (2): 196-202.
  29. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, Erpelinck C, van Putten WL, Valk PJ, Van der Poel-van de Luytgaarde, Hack R, et al. High EVI1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia: a study of 319 de novo AML patients. *Blood* 2003; 101 (3): 837-45.
  30. Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehninger G. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol* 2006; 24 (5): 790-7 [Epub 2006 Jan 17].
  31. Barragan E, Cervera J, Bolufer P, Ballester S, Martin G, Fernández P, Collado R, Sayas MJ, Sanz MA. Prognostic implications of Wilms' tumor gene (WT1) expression in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2004; 89 (3): 926-33.
  32. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Whitman SP, et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol* 2005; 23 (36): 9234-42 [Epub 2005 Nov 7].
  33. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Dohner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, Ganser A. High meningioma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood* 2006; 108 (12): 3898-905 [Epub 2006 Aug 15].
  34. Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, Geromin A, Chiarvesio A, Michelutti A, et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica* 2006; 91 (6): 825-8 [Epub 2006 May 16].
  35. Bacher U, Haferlach T, Schoch C, Kern W, Schnittger S. Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients. *Blood* 2006; 107 (10): 3847-53 [Epub 2006 Jan 24].

## CITOGENÉTICA Y HEMATOLOGÍA: UNA VISIÓN INTEGRADORA

M.<sup>a</sup>J. CALASANZ<sup>1</sup>, J. SUELA<sup>2</sup>,  
S. ÁLVAREZ DE ANDRÉS<sup>2</sup>, J. CRUZ CIGUDOSA<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética. Universidad de Navarra. Pamplona. <sup>2</sup>Grupo de Citogenética Molecular. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid

## Introducción

Hace 15 años una persona que tuviera una leucemia promielocítica aguda (LPA) estaba prácticamente condenada a muerte. Hoy, la tasa de curación de este tipo de leucemia es superior al 90%<sup>1</sup>. Este enorme salto se debe a la conjunción de varios elementos, entre los que destacan los primeros ensayos clínicos con biomoléculas que inducían la diferenciación, en este caso la administración de ácido retinoico y, de forma especial, la identificación de un marcador citogenético, la translocación entre los cromosomas 15 y 17, que se asociaba de forma específica con este tipo de leucemia. Así, de forma casi simultánea se vio que uno de los genes afectados por esta translocación codifica el receptor celular para el ácido retinoico y que la administración de altas dosis de este fármaco, cuya vía en los precursores mieloides de la médula ósea estaba alterada debido a esa misma translocación, solucionaba el problema de forma más satisfactoria para la supervivencia del paciente<sup>1</sup>.

De manera similar, el diagnóstico de una leucemia mieloide crónica (LMC), cuyas células hematopoyéticas presentaban el marcador cromosómico Philadelphia (Ph+) conllevaba, hasta el reciente año 2000, un pronóstico fatal dilatado en un periodo de no más de 5 años. Esta situación también cambió radicalmente tras la rápida inclusión del inhibidor específico de la actividad tirosinasa (imatinib mesilato) como terapia de primera línea en pacientes con LMC Ph+<sup>2,3</sup>. Ahora ya pertenece al dominio de conversación común entre los profesionales y entre los pacientes que las leucemias tienen casi siempre alteraciones genéticas y que estas alteraciones pueden emplearse para dirigir u orientar el tratamiento.

En los últimos años, la utilización de nuevas técnicas de citogenética y genética molecular ha permitido la caracterización de muchas de las alteraciones genéticas recurrentes identificadas en casi todas las neoplasias hematológicas, permitiéndonos un mayor entendimiento de su patofisiología. Esto ha sido posible gracias al desarrollo de técnicas como las bandas G, la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), el cariotipo espectral (SKY), la hibridación genómica comparativa (CGH), los análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH), la secuenciación automática y los estudios de expresión. Avances tecnológicos como el proyecto Genoma, nuevas técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el desarrollo de modelos animales y la mayor disponibilidad de la información biológica en bases de datos públicas han facilitado la identificación y caracterización de genes implicados en el desarrollo leucémico. Estos avances no sólo han permitido una mayor capacidad para predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento de estos pacientes, sino para el desarrollo de terapias dirigidas frente a estas dianas

moleculares. En concreto, en el simposio del que forma parte esta ponencia, se ha hablado de las alteraciones cromosómicas y moleculares que tienen lugar en el mieloma múltiple, los linfomas y las leucemias mieloides agudas. Esta última ponencia se ocupará de resumir brevemente los datos genéticos actualizados correspondientes a los síndromes mieloproliferativos crónicos (SMP) con el objetivo más general de indicar o sugerir los pasos futuros a dónde nos conduce la integración de la genética, ya sea citogenética, molecular o epigenética, en el diagnóstico y manejo terapéutico de las neoplasias hematológicas.

## Síndromes mieloproliferativos crónicos BCR-ABL negativos

Los síndromes mieloproliferativos crónicos son un grupo heterogéneo de enfermedades caracterizadas por la proliferación clonal en la médula de uno o más linajes mieloides. Como consecuencia, se acumulan células maduras (granulocitos, eritrocitos y/o plaquetas) en sangre periférica y, frecuentemente, se asocian con esplenomegalia y hepatomegalia. Al margen de la LMC, cuya patología molecular es conocida y con una terapia molecular ya definida, el resto de SMP constituyen el grupo de SMP BCR-ABL (–) según la clasificación propuesta por la Organización Mundial de la Salud<sup>4</sup>. Están subdivididos en SMP clásicos, donde se incluye a la trombocitemia esencial, la mielofibrosis con metaplasia mieloide o mielofibrosis crónica idiopática y la policitemia vera, y SMP atípicos, donde se incluyen las enfermedades eosinofílicas, la mastocitosis sistémica, leucemia mieloide crónica atípica, leucemia mielomonocítica crónica, leucemia mielomonocítica juvenil y leucemia neutrofílica crónica, entre otros. Basado en cuanto se conoce de alteraciones citogenéticas y moleculares<sup>5</sup> es posible reordenar o completar esa clasificación tal como presentamos en la Tabla 1. El mensaje de este resumen es claro. En SMP hay mutaciones de diferente etiología (translocaciones que originan fusiones, cambios de secuencia, deleciones, etc.) que tienen como resultado la activación de oncogenes. Surgen entonces algunas preguntas: ¿cómo las detectamos? ¿cuántas hay?

## ¿Qué tipo de diagnóstico genético ha de emplearse en hematología?

Ésta es una pregunta antigua cuya respuesta ha enfrentado de forma tradicional a los profesionales implicados en el diagnóstico genético de las neoplasias hematológicas. Empeñados históricamente en la defensa y la

Tabla 1. Clasificación molecular de los SMP

| Clásicos                           |                  |                      |                         |       |
|------------------------------------|------------------|----------------------|-------------------------|-------|
|                                    | Genes implicados | Alteración molecular | Técnica de detección    | Frec. |
| Leucemia mieloide crónica          | ABL1             | Fusión BCR-ABL1      | RT-PCR, FISH, cariotipo | 100%  |
| Policitemia vera                   | JAK2             | Mutación V617F       | Secuenciación           | 100%  |
| Trombocitemia esencial             | JAK2             | Mutación V617F       | Secuenciación           | 50%   |
| Mielofibrosis idiopática           | JAK2             | Mutación V617F       | Secuenciación           | 55%   |
| Atípicos                           |                  |                      |                         |       |
| Definidos molecularmente           |                  |                      |                         |       |
|                                    | Genes implicados | Alteración molecular | Técnica de detección    | Frec. |
| MS y LEC con reordenamiento PDGFRA | PDGFRA           | Fusiones: PDGFRA     | RT-PCR, FISH            | 100%  |
| LEC y SMP conreordenamiento PDGFRB | PDGFRB           | Fusión: PDGFRB       | Cariotipo, FISH         | 100%  |
| MS con mutación C-KIT              | C-KIT            | Mutación D816V       | Secuenciación           | 100%  |
| SMP asociado a 8p11/FGFR18         | FGFR1            | Fusiones: FGFR1      | Cariotipo, FISH         | 100%  |
| Definidos por clínica y patología  |                  |                      |                         |       |
|                                    | Genes implicados | Alteración molecular | Técnica de detección    | Frec. |
| Leucemia neutrofílica crónica      | JAK2             | Mutación V617F       | Secuenciación           | 20%   |
| Leucemia mielomonocítica crónica   | JAK2             | Mutación V617F       | Secuenciación           | 3%    |
| Leucemia mielomonocítica juvenil   | PTPN11           | Mutaciones           |                         | 30%   |
|                                    | NF1              |                      |                         | 15%   |
|                                    | RAS              |                      |                         | 15%   |
| L. basofílica crónica              | -                | -                    |                         | -     |
| Síndrome hipereosinofílico         | -                | -                    |                         | -     |
| LEC sin definición molecular       | -                | -                    |                         | -     |
| MS sin definición molecular        | -                | -                    |                         | -     |
| SMP no clasificado                 | -                | -                    |                         | -     |

MS: mastocitosis sistémica; LEC: leucemia eosinofílica crónica; SMP: síndrome mieloproliferativo; FISH: hibridación in situ con fluorescencia.

búsqueda de la mejor técnica genética para su empleo diagnóstico, ahora todos convenimos en que las técnicas, en sí mismas, no son una respuesta sino una herramienta. La pregunta adecuada es ¿cómo se diagnostica mejor y más precozmente una mutación en nuestro campo? Para clarificar esta respuesta se han mantenido reuniones de los Grupos de Citogenética y Biología Molecular de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia y se ha elaborado una guía consensuada y adaptada a la clínica que será pronto editada. Como ejemplo, en la Tabla 1 se sugieren las técnicas de detección más adecuadas para tipo de mutación en SMP.

En general, en términos de detección de mutaciones, se aprecia en la literatura reciente una tendencia a las secuenciaciones masivas de genes o regiones genómicas de interés. Thomas *et al.*<sup>6</sup> investigaron la presencia de 238 mutaciones conocidas que afectan a 17 oncogenes en 1.000 muestras tumorales correspondientes a 17 tipos de cáncer. Catorce de los 17 oncogenes estaban mutados en al menos un caso y el 30% de las muestras analizadas presentaron al

menos una de las mutaciones. Estos autores identificaron nuevas mutaciones en nuevos tipos de tumores y observaron un inesperado y elevado número de mutaciones coincidentes. Greenman *et al.*<sup>7</sup> estudiaron 1.000 mutaciones somáticas en los exones de 518 proteinquinasas en 210 muestras de varios tipos de tumores. Encontraron una gran variabilidad en el número y el patrón de mutaciones en cada muestra individual y han introducido los conceptos de mutaciones “pasajero” y mutaciones “conductoras”. Las primeras van “acompañando” al cáncer y tienen su origen más probable en la inestabilidad genómica y las segundas se centran en únicamente 120 genes y son las que contribuyen de forma más decisiva al desarrollo tumoral. Finalmente, Sjöblom *et al.*<sup>8</sup> han realizado un análisis sistemático y exhaustivo de un elevado número de genes (ellos estudian 13.023) en un reducido grupo de tumores (11 muestras de mama y 11 de colon) y han demostrado que 189 genes (el 2% del total estudiado) aparecen mutados y que cada tumor acumula una media de 11 mutaciones.

Respondiendo a la pregunta, aunque la secuenciación completa es, probablemente, el camino más seguro, no está al alcance de un laboratorio clínico, por ello necesitamos alimentarnos intelectualmente de los trabajos genómicos a gran escala y trasladar a la rutina aquellas mutaciones cuya incidencia o relevancia biológica esté contrastada. La espera de “noticias” no debe ser contemplativa. En los laboratorios deben seguir incorporándose datos de determinaciones del cariotipo (la mayoría de las fusiones descritas en SMP se descubrieron por translocaciones cromosómicas) y de genética molecular (secuenciación, metilación, etc.). No nos podemos permitir el lujo de prescindir de ninguna de ellas.

### ¿Cuántas alteraciones genéticas son esenciales para desarrollar un tumor?

Existen modelos celulares donde un único evento genético (como la fusión del gen MLL con el gen ENL, resultado de la translocación t[11;19][q23;p13]) recapitula todo el proceso biológico y patológico de la leucemia mieloide aguda (LMA)<sup>9</sup>. Sin embargo, como se ha visto a lo largo de las anteriores ponencias, aceptamos que existen diferentes mecanismos de oncogénesis y hay, de hecho, más evidencias que indican que son más de uno los mecanismos responsables del establecimiento y desarrollo del clon tumoral. En el caso concreto de las LMA está bastante aceptada la hipó-

tesis de los dos *hits* propuesta por D. Gary Gilliland<sup>10</sup>. Esta teoría propone que para el desarrollo del fenotipo leucémico es necesaria la cooperación de mutaciones que confieren a la célula una ventaja proliferativa (mutaciones tipo I, como la activación constitutiva de RAS o de genes con actividad tirosincinasa) (Figura 1), con mutaciones que alteran la actividad de los factores de transcripción y bloquean los procesos de diferenciación (mutaciones tipo II) (Figura 1). Las mutaciones en RAS o de las tirosincinasas conferirían una ventaja proliferativa y de supervivencia a las células y las proteínas de fusión, como AML1/ETO, PML/RAR $\alpha$  o mutaciones puntuales en AML1 o C/EBP $\alpha$  alterarían la diferenciación. A favor de esta hipótesis estaría la frecuente observación de FLT-ITD en pacientes con reordenamientos como la t(8;21), t(15;17), inv(16) o mutaciones de MLL (translocaciones o duplicaciones). Estos resultados no excluyen la necesidad de mutaciones adicionales. Incluso es posible que, la presencia de mutaciones adquiridas, o constitutivas, en las vías de reparación de ADN o del TP53-Rb, contribuyan al desarrollo de estos dos *hits*.

Además de esta hipótesis, y reflejando al menos parcialmente los hallazgos del gran número de mutaciones detectadas de forma simultánea en un solo tumor, hemos de tener en cuenta la aparición de la inestabilidad genómica como un rasgo característico del desarrollo tumoral. Nuestros grupos<sup>11,12</sup> han demostrado que las células leucémicas en LMA son afectadas por una inestabilidad genómica generalizada que resulta

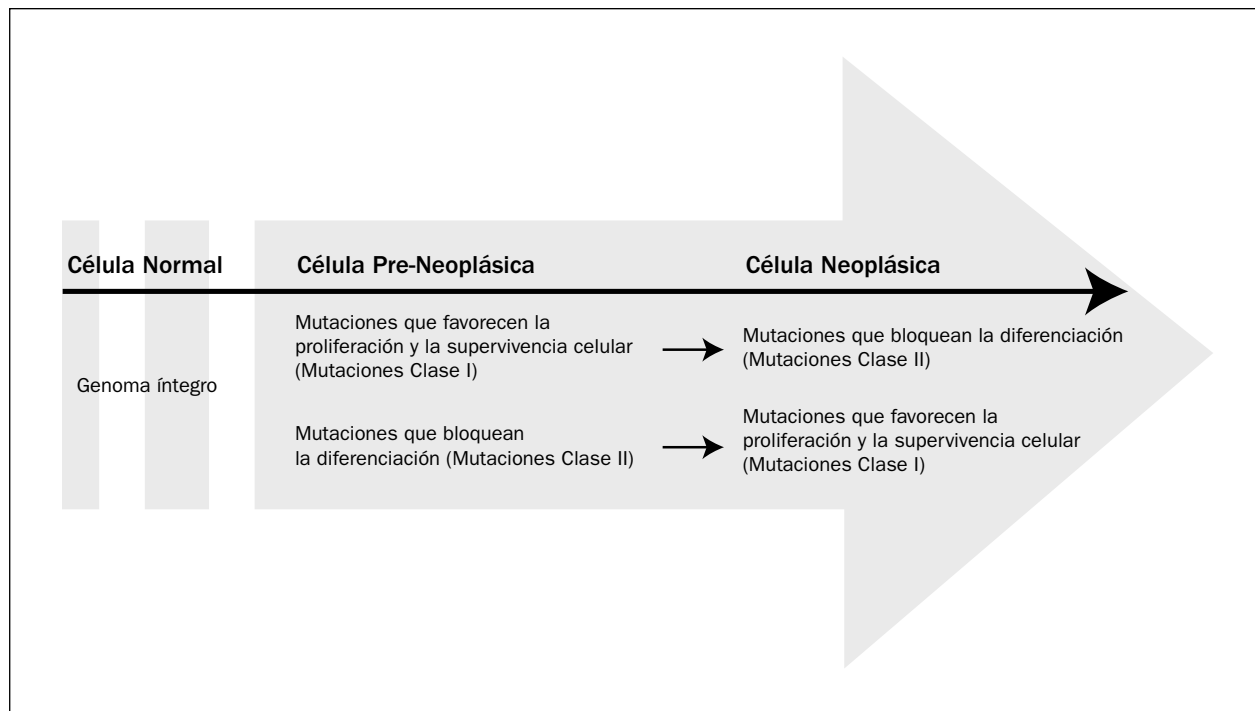


Figura 1. Representación esquemática de la hipótesis de los dos hits como mecanismo oncogénico en la leucemia mieloide aguda.

en la pérdida y/o ganancia de regiones cromosómicas. Estas regiones cromosómicas no son muy recurrentes pero su número nos indica el daño genómico que carga el clon tumoral y tiene un valor pronóstico independiente, al margen de la existencia de mutaciones tipo I o II<sup>11</sup>. Sí es posible encontrar algunas regiones alteradas recurrentemente en los casos con gran inestabilidad, en concreto hemos identificado el gen de la neurofibromatosis tipo I (NF1) como el objetivo preferente de las alteraciones genómicas y genéticas en este subgrupo de pacientes de LMA<sup>12</sup>.

En este escenario, por lo tanto, no es posible responder a la pregunta sobre el número de mutaciones necesarias pero sí podemos avanzar que son más de las esperadas y la foto final será más compleja de la prevista.

## Bibliografía

1. Sanz MA. Treatment of acute promyelocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 147-55.
2. Goldman JM, Melo JV. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 1084-6.
3. O'Hare T, Corbin AS, Druker BJ. Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Curr Opin Genet Dev* 2006; 16 (1): 92-9.
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW (eds.); World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid tissues. IARC Press: Lyon; 2001.
5. Tefferi A, Gilliland DG. Oncogenes in myeloproliferative disorders. *Cell Cycle* 2007; 6 (5): 550-66.
6. Thomas RK, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nat Genetics* 2007; 39 (3): 357-1.
7. Greenman C, et al. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 2007 446: 153-8.
8. Sjöblom T, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 2006; 314: 268-74.
9. Barabe F, Kennedy JA, Hope KJ, Dick JE. Modeling the initiation and progression of human acute leukemia in mice. *Science* 2007; 316: 600-4.
10. Kelly L, Clark J, Gilliland DG. Comprehensive genotypic analysis of leukemia: clinical and therapeutic implications. *Curr Opin Oncol* 2002; 14: 10-1.
11. Suela J, et al. DNA profiling analysis of 100 consecutive de novo acute myeloid leukemia cases reveals patterns of genomic instability that affect all cytogenetic risk groups. *Leukemia* 2007; [Epub ahead of print] PMID: 17377590.
12. Suela J, et al. Neurofibromatosis 1, and Not TP53, seems to be the main target of chromosome 17 deletions in de novo acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2007; 25 (9): 1151-52.