

Hibridación *in situ* por fluorescencia en las hemopatías malignas: resultados en Cuba

Lavaut-Sánchez K, Hernández-Aguilar N, Ruíz-Moleón V.
Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana. Cuba
Email: klavaut@infomed.sld.cu

RESUMEN

El desarrollo de la citogenética molecular a través de la hibridación *in situ* por fluorescencia (*FISH*, por sus siglas en inglés) se convirtió en un avance importante en el diagnóstico de las neoplasias hematológicas. Es una herramienta más para definir el diagnóstico, predecir el pronóstico y evaluar respuesta al tratamiento de estas enfermedades. Se realizó un estudio descriptivo para identificar las alteraciones cromosómicas con el uso de esta técnica, con sondas fluorescentes específicas, en 313 muestras de sangre medular de pacientes con neoplasias hematológicas, recibidas en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología, en el período comprendido entre julio de 2014 y diciembre de 2016. Con la sonda LSI BCR/ABL se observaron 36 casos positivos de leucemia mieloide crónica y los 16 pacientes con leucemia linfocítica aguda fueron negativos. Se marcaron con sonda PML/RARA 38 muestras con diagnóstico de leucemia promielocítica al inicio de la enfermedad y 24 fueron positivas. Con la sonda ETV6/RUNX1 resultaron positivas 17 muestras. Se observaron 3 casos positivos a la delección 7q31 y tres muestras a la delección 13q14. Con la incorporación del *FISH* en el laboratorio nos ha permitido una mayor especificidad, sensibilidad y rapidez en la caracterización genética de las hemopatías malignas.

Palabras clave: leucemia, hibridación *in situ* por fluorescencia, citogenética.

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias hematológicas se caracterizan por presentar heterogeneidad genética. Las alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales, pueden comportarse como un

mecanismo de activación de protooncogenes o inactivación de genes supresores de tumores los cuales promueven la inestabilidad genómica.

El análisis citogenético es una importante herramienta para definir el diagnóstico, pronóstico y evaluar respuesta al tratamiento; así como para el conocimiento de las bases genéticas de su patogénesis.

La utilización de la citogenética convencional por banda G es muy útil en el diagnóstico de estas alteraciones cromosómicas. Sin embargo, en ocasiones la mala morfología de los cromosomas, la no obtención de metafases, la presencia de cariotipos complejos o la presencia de alteraciones crípticas imposibilitan realizar el diagnóstico con el empleo de dicha técnica.

Con el desarrollo de la hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH), la cual es una técnica de citogenética molecular que complementa el análisis estructural de la citogenética convencional con la especificidad y sensibilidad de las técnicas de biología molecular, permite el análisis de un gran número de células de forma rápida y la identificación de cambios estructurales más sutiles por debajo de la resolución de la citogenética convencional.

El FISH utiliza una sonda de ADN marcada con fluorescencia, con el fin de localizar una secuencia complementaria en el ADN de la muestra de interés. Es una técnica muy sensible y específica, que permite analizar metafases y células en interfase.

En este trabajo presentamos la detección de alteraciones cromosómicas en pacientes con neoplasias hematológicas a través de la técnica de FISH.

MATERIALES Y MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo para identificar las alteraciones cromosómicas por técnica de FISH, en 313 muestras de sangre medular (MO) de pacientes con neoplasias hematológicas, recibidas en el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Hematología e Inmunología, en el período comprendido entre julio de 2014 y diciembre de 2016.

La técnica se realizó con sondas comerciales marcadas directamente con diversos fluorocromos, se utilizó cada una de las sondas teniendo en cuenta la impresión diagnóstica del paciente en el momento que se recibe la muestra en el laboratorio.

Preparación de las muestras

Las muestras fueron cultivadas por técnica de citogenética convencional y posteriormente se realizó el procedimiento descrito por el fabricante para el FISH.

Análisis

Las señales de hibridación se analizaron en un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51. Los núcleos donde el marcaje era evidente fueron los seleccionados para el conteo de las señales. Se descartaron los que aparecían sobrelapados o con un marcaje débil.

En cada muestra se analizaron 200 núcleos. El resultado se consideró positivo cuando la alteración cromosómica estuvo presente en más del 10 % de los núcleos observados.

RESULTADOS

De 72 muestras marcadas con sonda LSI BCR/ABL, 56 correspondían a un posible diagnóstico de leucemia mieloide crónica y de ellas, 36 resultaron positivas, en 31 muestras se observó un patrón típico de hibridación y cinco con patrón atípico (en 2 deleciones de secuencias del cromosoma 9 derivativo, 1 con doble cromosoma Filadelfia y 2 con isocromosoma doble del Filadelfia) (tabla). En cuanto a la deleción, la misma es submicroscópica y no puede ser identificada por citogenética convencional, aunque existe controversia en la literatura acerca de su implicación en el pronóstico; estudios recientes muestran que este efecto adverso puede desaparecer en los pacientes en fase crónica bajo terapia con imatinib. Los patrones atípicos relacionados con el cromosoma Filadelfia sí se asocian a progresión de la enfermedad y resistencia a la terapia.¹ Las 16 muestras restantes marcadas con LSI BCR/ABL fueron pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA) al inicio de la enfermedad, todas fueron negativas.

Se marcaron con sonda LSI PML/RARA para la detección de la t(15;17) un total de 63 muestras con diagnóstico de leucemia promielocítica. De ellas, 38 eran estudios al inicio de la enfermedad y resultaron positivas 24, en dos se observaron patrones atípicos, en una muestra estaba involucrado un tercer cromosoma en la translocación (15; 17; v) y en otra muestra se detectó deleción terminal del brazo largo del cromosoma 17 derivativo, por lo que con la sonda estudiada se pudo precisar variantes complejas y deleciones submicroscópicas que tienen utilidad diagnóstica y en el manejo de la enfermedad.²

Tabla. Estudios de hibridación *in situ* por fluorescencia en las hemopatías malignas

Estudios (#)	Alteración cromosómica	Sondas	Positivos	Negativos
72	t (9;22)	LSI BCR/ABL Dual color	36	36
63	t (15;17)	LSI PML/RARA Dual color	24	39
40	t(12;21)	LSI ETV6/RUNX1 Dual Color	8	32
40	t (8;21)	RUNX1/RUNX1T1 Dual Color	5	36
8	rearrreglos en el locus CFBF (16q22)	CBFB Break	1	7
3	rearrreglos en el gen MLL (11q23)	LSI MLL Dual Color	1	2
20	deleción del gen RB1	LSI RB1(13q14) señal naranja	3	17
16	deleción del gen TP53	LSI TP53(17p13.1) señal naranja	1	15
38	deleción 7q31	LSID7S486 Spectrum Orange/CEP 7 Spectrum Green	3	35
8	deleción 5q33-34	LSICSF1R Spectrum Orange /D5S23,D5S721 Spectrum Green	-	8
5	rearrreglos en el gen IgH (14)		-	5

De las 40 muestras marcadas con sonda ETV6/RUNX1 para detectar la traslocación (12;21) en pacientes con LLA de células B, ocho resultaron positivas al gen de fusión y en 4 de ellas se observaron alteraciones cromosómicas adicionales (ACA) (deleción del cromosoma 12 normal y duplicación del 21q derivativo). Existe controversia si las ACA pueden influir en el pronóstico de la enfermedad, aunque la mayoría de los estudios concuerdan que la dup 21q der implica un pronóstico desfavorable y conlleva un tratamiento más agresivo.³ En las muestras negativas a la traslocación se detectó la hiperdiploidía como la alteración cromosómica numéricas más frecuente en este tipo de leucemia.

La evaluación citogenética en los SMD reviste importancia por su implicación pronóstica, basado en el IPSS (del inglés: International Prognostic Scoring System) descrito en 1997y su revisión en

el 2012 (IPSS- R). En el estudio se detectaron dos muestras con delección 7q31 y una con monosomía del cromosoma 7 que se asocian a peor pronóstico de la enfermedad.⁴

En la leucemia linfocítica crónica (LLC) existe un bajo índice mitótico, el FISH es capaz de superar esta dificultad. Esto permite el establecimiento de grupos de riesgo citogenético, entre los que se destacan las deleciones: 13q14.3 asociada a buen pronóstico y 17p13 de pronóstico desfavorable. En el estudio se detectaron tres muestras con delección 13q y una con 17p.⁵

CONCLUSIONES

La introducción del FISH en el laboratorio como una herramienta más en el diagnóstico de las hemopatías malignas nos permitió una mejor caracterización genética de estas enfermedades, a partir de la detección de alteraciones cromosómicas no visibles por citogenética convencional con una mayor sensibilidad, especificidad y rapidez.

BIBLIOGRAFÍA

1. Achkar WA, Wafa A, Moassass F, Klein E, Liehr T. Multiple copies of BCR-ABL fusion gene on two isodicentric Philadelphia chromosomes in an imatinib mesylate-resistant chronic myeloid leukemia patient. *Oncol Lett.* 2013 May; 5(5): 1579–82.
2. Zhang R, Kim YM, Wang X, Li Y, Pang H, Lee JY et al. Coexistence of t(15;17) and t(15;16;17) detected by fluorescence *in situ* hybridization in a patient with acute promyelocytic leukemia: A case report and literature review. *Oncol Lett.* 2014 Sep; 8(3): 1001–1008.
3. Fonzar MA, Marques-Salles TJ, Mkrtychyan H, Soares-Ventura EM, Pereira E, Cartaxo MT et al. Extra Copies of der (21) t (12;21) plus Deletion of *ETV6* Gene due to dic (12;18) in B-Cell Precursor ALL with Poor Outcome. *Case Rep Genet.* 2012; 2012: 186532. doi: 10.1155/2012/186532
4. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 2016 May; 127(20):2391-405.
5. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic Abnormalities in Chronic Lymphocytic Leukemia: Where We Are and Where We Go. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: doi: 10.1155/2014/435983.