

Caracterització genètica de la
leucèmia mieloide aguda
mitjançant tècniques de
citogenètica i biologia molecular

Sílvia Casas Fontdevila

La Dra. Anna Aventín Artisan del Departament d'Hematologia de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona i la Dra. M^aDolors Coll Sandiumenge del Departament de Biologia Cel.lular, Fisiologia i Immunologia de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEN

que Sílvia Casas Fontdevila ha realitzat sota la seva direcció el treball *Caracterització genètica de la leucèmia mieloide aguda mitjançant tècniques de citogenètica i biologia molecular* per assolir el títol de Doctor per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Aquest treball s'ha dut a terme al Departament d'Hematologia de l'Hospital de Sant Pau de Barcelona.

Bellaterra, maig 2003

Dra. Anna Aventín Artisan

Dra. M^a Dolors Coll Sandiumenge

Sílvia Casas Fontdevila

Índex

Llistat de les publicacions originals	6
Abreviacions	7
1 Introducció	9
1.1 Hematopoesi	9
1.2 Leucèmia mieloide aguda	11
1.2.1 <i>Etiologia</i>	11
1.2.2 <i>Biologia</i>	13
1.2.2.1 <i>Mecanismes d'oncogenesi</i>	13
1.2.2.2 <i>Patogènesi</i>	16
1.2.3 <i>Classificació</i>	20
1.2.4 <i>Anomalies cromosòmiques recurrents</i>	21
1.2.4.1 <i>Valor diagnòstic</i>	21
1.2.4.2 <i>Valor pronòstic</i>	24
1.3 Estudi genètic-molecular de la leucèmia mieloide aguda	25
1.3.1 <i>Mètodes d'estudi genòmic</i>	25
1.3.1.1 <i>Anàlisi citogenètica convencional</i>	25
1.3.1.2 <i>Hibridació in situ fluorescent</i>	27
1.3.1.3 <i>Hibridació in situ fluorescent multicolor</i>	32
1.3.1.4 <i>Hibridació genòmica comparada</i>	36
1.3.1.5 <i>Tècniques de genètica molecular</i>	40
1.3.2 <i>Mètodes d'estudi d'expressió gènica</i>	43
1.3.2.1 <i>Transcriptasa inversa-reacció en cadena de la polimerasa</i>	43
1.3.2.2 <i>ADN array</i>	48
1.4 Objectius	58
2 Materials i mètodes	59
2.1 Pacients	59
2.2 Mètodes d'estudi genòmic	59
2.2.1 <i>Anàlisi citogenètica convencional</i>	61

2.2.2	<i>Hibridació in situ fluorescent</i>	62
2.2.3	<i>Hibridació in situ fluorescent múltiple</i>	67
2.2.4	<i>Extracció d'ADN genòmic</i>	69
2.2.5	<i>Hibridació genòmica comparada</i>	69
2.2.6	<i>Southern-blot</i>	72
2.3	<i>Mètodes d'estudi d'expressió gènica</i>	73
2.3.1	<i>Extracció de l'ARN total</i>	73
2.3.2	<i>Mostra de referència</i>	74
2.3.3	<i>Transcriptasa inversa-reacció en cadena de la polimerasa</i>	74
2.3.4	<i>cADN array</i>	75
2.3.5	<i>Transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa a temps real</i>	79
2.4	<i>Anàlisi estadística</i>	82
3	Resultats	83
3.1	<i>Revisió de les diferents tècniques de citogenètica i biologia molecular utilitzades en el diagnòstic de la leucèmia mieloide aguda</i>	83
	Estudi 0	84
3.2	<i>Anàlisi d'anomalies cromosòmiques mitjançant hibridació in situ fluorescent i hibridació in situ múltiple</i>	92
3.2.1	<i>Duplicació parcial en tàndem del gen MLL</i>	92
	Estudi I	93
3.2.2	<i>Inversió del cromosoma 16 associada a translocació</i>	98
	Estudi II	99
3.2.3	<i>Translocació t(5;11)(q35;p15.5)</i>	102
	Estudi III	103
3.3	<i>Detecció de guanys i pèrdues de material genètic</i>	104
3.3.1	<i>Anàlisi citogenètica convencional</i>	104
3.3.2	<i>Hibridació genòmica comparada</i>	104
3.3.3	<i>Hibridació in situ múltiple</i>	105
	Estudi IV	106
3.4	<i>Anàlisi d'expressió de gens apoptòtics</i>	134
3.4.1	<i>cADN array</i>	134
3.4.2	<i>Validació dels resultats</i>	135
	Estudi V	136
3.5	<i>Anàlisi d'expressió dels gens HOXA9, DEK, CBL i CSF1R</i>	173
3.5.1	<i>Quantificació de l'expressió relativa dels gens</i>	173
3.5.2	<i>Anàlisi d'associació entre expressió gènica i paràmetres d'interès</i>	173

Estudi VI	175
4 Discussió	182
4.1 Caracterització d'alteracions genètiques en l'estudi diagnòstic de la leucèmia mieloide aguda	182
4.1.1 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent	182
4.1.1.1 Alteracions genètiques identificades mitjançant hibridació <i>in situ</i> fluorescent i el seu interès clínic ..	183
4.1.2 Hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiple	188
4.1.2.1 Aspectes metodològics	188
4.1.2.2 Alteracions genètiques identificades mitjançant hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiple	193
4.1.3 Hibridació genòmica comparada	195
4.1.3.1 Aspectes metodològics	195
4.1.3.2 Identificació de guanys i pèrdues de material genètic mitjançant hibridació genòmica comparada	197
4.2 Caracterització de perfils de desregulació de l'expressió gènica en la leucèmia mieloide aguda	203
4.2.1 <i>c</i> ADN array	203
4.2.1.1 Aspectes metodològics	204
4.2.1.2 Anàlisi del perfil d'expressió genètica d'apoptosi en la leucèmia mieloide aguda	207
4.2.2 Transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa a temps real	213
4.2.2.1 Aspectes metodològics	213
4.2.2.2 Anàlisi d'expressió dels gens apoptòtics <i>MCL1</i> , <i>MYC</i> , <i>BAX</i> i <i>DAPK1</i>	217
4.2.2.3 Anàlisi d'expressió dels gens relacionats amb la leucèmia mieloide aguda (<i>HOXA9</i> , <i>DEK</i> , <i>CBL</i> i <i>CSF1R</i>)	218
5 Conclusions	223
6 Referències	225

Llistat de les publicacions originals

La tesi presentada es basa en les següents publicacions i treballs, els quals es troben referenciats al text mitjançant la simbologia indicada:

- 0 Aventin A, Casas S. Leucemia mieloide aguda: Caracterización genética. *Haematologica* 2001;86(Sup 1 1):219-26.
- I Aventin A, La Starza R, Casas S, Nomdedeu J, Queipo de Llano MP, Cimino G, Lo Coco F, Sierra J, Mecucci C. MLL tandem duplication in two cases of acute myelocytic leukemia with unbalanced translocations: der(16)t(11;16)(q23;p13) and der(18)t(11;18)(q22;p11.2). *Cancer Genet Cytogenet* 2003;142:8-12.
- II Aventin A, Espadaler M, Casas S, Duarte J, Nomdedeu J, Sierra J. Chromosome 16 inversion-associated translocations in acute myeloid leukemia elucidated using a dual-color CBFβ DNA probe. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;134:142-4.
- III Casas S, Aventin A, Nomdedeu J, Sierra J. Identification of t(5;11)(q35;p15.5) in adult acute myelocytic leukemia with normal karyotype. *Cancer Genet and Cytogenet* 2003; acceptat, pendent de publicació.
- IV Refined genetic diagnosis by using comparative genomic hybridization technique in acute myeloid leukemia. Casas S, Aventin A, Fuentes F, Vallespi T, Granada I, Carrio A, Martinez JA, Sole F, Teixidor M, Bernues M, Duarte J, Hernandez JM, Brunet S, Coll MD, Sierra J. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; pendent de publicació.
- V Casas S, Ollila J, Aventin A, Vihinen M, Sierra J, Knuutila S. Changes in apoptosis-related pathways in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet and Cytogenet* 2003; acceptat, pendent de publicació.
- VI Casas S, Nagy B, Elonen E, Aventin A, Larramendy ML, Sierra J, Ruutu T, Knuutila S. Aberrant expression of *HOXA9*, *DEK*, *CBL* and *CSF1R* in acute myeloid leukemia. *Leukemia and Lymphoma* 2003; acceptat, pendent de publicació.

Abreviacions

ADN	Àcid desoxirribonucleic
cADN	Àcid desoxirribonucleic complementari
ARN	Àcid ribonucleic
mARN	Àcid ribonucleic missatger
CCD	<i>Charge-coupled device</i>
CEP	Cromosoma centromer específic
CGH	Hibridació genòmica comparada
COBRA	Marcatge en relació binària combinada
DEAC	Dietilamino-coumarin
<i>dm</i>	<i>double minute</i>
DOP-PCR	Primers oligonucleòtids degenerats-reacció en cadena de la polimerasa
DPT	Duplicació parcial en tàndem
dUTP	Deoxiuridina 5' trifosfat
FAB	<i>French American and British</i>
ISCN	<i>International System for Human Cytogenetic Nomenclature</i>
ISH	Hibridació <i>in situ</i>
FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent
FITC	Fluoresceïna isotiocianat
LLA	Leucèmia limfoide aguda
LMA	Leucèmia mieloide aguda
t-LMA	Leucèmia mieloide aguda associada al tractament
LSI	Seqüència d'ADN específica o única
M-FISH	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiple
MO	Medul·la òssia
M-TEL	Hibridació <i>in situ</i> fluorescent múltiple telomèrica
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
pb	Parells de bases
QRT-PCR	Transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa
RT	Transcripció inversa
SKY	Cariotip espectral
SMD	Síndrome mielodisplàsic
SP	Sang perifèrica

TA	Temperatura ambient
TEL	Subtelomèrica
Tm	Temperatura de fusió
WCP	Seqüència cromosòmica múltiple o de pintat cromosòmic
WHO	<i>World Health Organization</i>

1 Introducció

1.1 Hematopoesi

L'hematopoesi és la formació de les cèl.lules sanguínies. Les primeres cèl.lules hematopoètiques apareixen durant el desenvolupament embrionari dins el sac vital.lí a partir de cèl.lules mesodèrmiques especialitzades. Aquesta hematopoesi vital.línia està relacionada amb la formació de vasos sanguinis. Posteriorment, les cèl.lules hematopoètiques colonitzen el fetge fetal, el qual serà l'òrgan hematopoètic principal durant el primer trimestre de gestació. En etapes més avançades, l'hematopoesi es desplaça a l'interior de les cavitats del teixit ossi en desenvolupament, formant la medul.la òssia (MO), la qual serà l'òrgan hematopoètic definitiu durant les posteriors etapes prenatales i postnatales. A partir de la MO, les diferents cèl.lules hematopoètiques s'alliberen progressivament a la circulació sanguínia per tal de produir l'hemostàsia necessària i assegurar la vigilància immunològica de l'organisme.

L'hematopoesi a la MO és un procés continu i jeràrquic que s'origina a partir d'un petit nombre de cèl.lules progenitores multipotencials. Aquestes es poden dividir i diferenciar a cèl.lules compromeses del llinatge mieloide o limfoide, que a la vegada divergeixen cap a diferents sèries cel.lulars diferenciades (Fig. 1). El llinatge mieloide està format per cèl.lules de la sèrie eritroide, megacariocítica, granulocítica i monocítica. Les cèl.lules de la sèrie eritroide són els hematies, transportadors de O₂ i CO₂ per la sang. Els neutròfils, basòfils i eosinòfils són cèl.lules de la sèrie granulocítica que tenen funcions de defensa i inflamació. La sèrie monocítica inclou monòcits

i histiòcits, els quals tenen funció d'immunovigilància, digestió i neteja. Els megacariòcits i les plaquetes, són cèl.lules de la sèrie plaquetària que intervenen en l'hemostasia i la inflamació. Per altra banda, el llinatge limfoide inclou els limfòcits B, els limfòcits T i les cèl.lules NK, les quals desencadenen la resposta immunològica humoral i cel.lular.

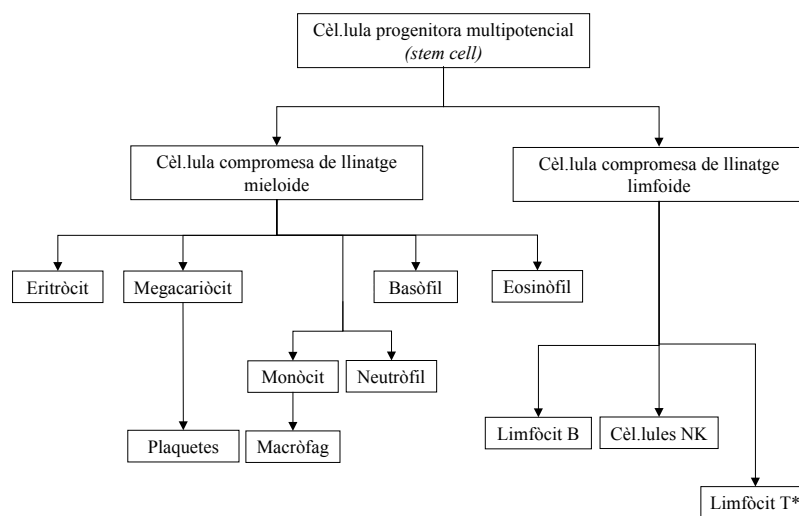


Figura 1. Esquema de l'hematopoesi. *, maduració cel.lular fora de MO

La major part del component cel.lular de la MO està representat pels precursors de les sèries granulocítica i eritroide en diferents estadis de maduració, en una proporció de 3:1.

L'hematopoesi està regulada per diferents factors que proporcionen l'ambient necessari a la MO per la proliferació, diferenciació i supervivència de les cèl.lules hematopoètiques. Les cèl.lules estromals, la matriu extracel.lular i diferents molècules reguladores, són factors que exerceixen una influència important en l'ambient hematopoètic. Les cèl.lules hematopoètiques s'activen en resposta als senyals extracel.lulars rebuts a través de receptors de membrana o de contactes cèl.lula a cèl.lula, que a

través de l'acció de proteïnes citoplasmàtiques duen a canvis en els factors de transcripció per la regulació de l'expressió gènica.

1.2 Leucèmia mieloide aguda

La leucèmia mieloide aguda (LMA) es caracteritza per una proliferació continuada d'una clona cel.lular immadura de la sèrie mieloide (mieloblast). Aquesta proliferació envaeix la MO i interfereix el creixement i divisió de les cèl.lules hematopoètiques normals. Tot i que normalment la malaltia segueix un curs agut, s'anomena leucèmia aguda pel tret d'immaduresa de la cèl.lula hematopoèica que prolifera, fet que la diferencia de les leucèmies cròniques on la proliferació es dona en cèl.lules més madures.

La incidència de les leucèmies agudes és de 4 individus afectes per cada 100.000 habitants i any, dels quals, un 70 % corresponen a LMA. Mentre que la leucèmia limfoide aguda (LLA) es dona principalment en nens (el 75 % dels casos tenen una edat inferior als 6 anys), la majoria dels pacients diagnosticats de LMA són adults amb una mitjana d'edat de 60 anys (World Health Organization, 2001).

1.2.1 Etiologia

S'han assenyalat diversos factors, tant genètics com ambientals, que donarien una certa predisposició a patir LMA (Sandler i Ross, 1997).

Pel què fa als factors genètics, diverses indicacions els relacionen amb un increment de la susceptibilitat a desenvolupar leucèmies agudes. La freqüència de leucèmies agudes és major en individus amb síndromes genètiques (Ribera et al., 2000), on s'inclouen cromosomopaties, com el síndrome de Down, Klinefelter, Bloom o Fanconi, i immunodeficiències com l'ataxia-telangiectasia, síndrome de Wiskott-Aldrich, agammaglobulinèmies o el síndrome de Schwachman. Destacar també, que algunes d'aquestes malalties com el síndrome de Bloom i l'ataxia-telangiectasia, estan relacionades amb anomalies en la reparació de l'ADN així com amb mecanismes de supressió tumoral (Mizutani, 1998). Una

indicació addicional seria la relació del desordre plaquetari de tipus familiar causat per una pèrdua al·lèlica del gen *RUNX1* (també anomenat *AML1*) amb una major predisposició a patir LMA (Song et al., 1999). D'altra banda, mentre que existeixen pocs casos de leucèmies agudes familiars (Horwitz, 1997), s'ha detectat un augment del risc de leucèmies agudes infantils en casos amb historials familiars amb neoplàsies (Perrillat et al., 2001). Finalment, una evidència addicional de la importància dels factors genètics en la predisposició a leucèmies agudes és la identificació de polimorfismes en enzims metabòlics associats a una major susceptibilitat a la malaltia (Morgan i Smith, 2002).

Existeix un ampli ventall de factors ambientals associats al desenvolupament de les leucèmies agudes. Exposicions a radiacions ionitzants, per exemple en l'àrea d'acció de bombes nuclears, per fuges radioactives en centrals nuclears, o en tractaments per radioteràpia, incrementen la incidència de leucèmies en els individus afectats (Dainiak, 2002). Tanmateix, diversos fàrmacs i substàncies tòxiques són considerats com factors ambientals amb efecte leucemogènic. Entre aquests, els més destacables són el benzol i els seus derivats, pesticides, fàrmacs immunosupresors i els compostos citostàtics (Ribera et al., 2000). Concretament, els compostos citostàtics com els agents alquilants i els inhibidors de l'enzim ADN topoisomerasa II, tot i ser utilitzats com a substàncies quimioteràpiques, tenen efecte genotòxic, produint des de mutacions puntuals a l'àcid desoxirribonucleic (ADN) fins a trencaments de cromàtida o pèrdues cromosòmiques, i poden generar leucèmies agudes relacionades amb el tractament (t-LMA) (Felix, 1998). Els virus es troben també entre els factors ambientals que causen leucèmia aguda, almenys en animals. Així, els retrovirus hi podrien contribuir de manera semblant a com passa en algunes hemopaties d'origen víric, per exemple en la leucèmia-linfoma T d'adult que és causada pel virus HTLV-1 (Mortreux et al., 2003). Finalment, d'altres factors ambientals, com la dieta (Ross et al., 2002) o

l'hàbit de fumar (Pogoda et al., 2002), s'estan estudiant també com a factors epidemiològics de la LMA.

1.2.2 Biologia

Les característiques biològiques que diferencien a la cèl.lula neoplàsica en la LMA són la capacitat de proliferar d'una manera continuada i una diferenciació aturada o anòmala. Aquestes cèl.lules presenten canvis en els senyals cel.lulars que actuen sobre la proliferació, apoptosi i diferenciació, causades principalment per alteracions genètics que afecten a la transcripció i a l'expressió de diferents proteïnes.

1.2.2.1 Mecanismes d'oncogènesi

Els mecanismes clàssics d'oncogènesi inclouen l'activació de protooncogens i la inactivació de gens supressors de tumors. En una situació normal, els protooncogens són gens que estimulen la proliferació cel.lular, mentre que els gens supressors de tumors inhibeixen casos de proliferació cel.lular inadequada. Quan es dona una alteració en un protooncogen (oncogen) s'activa la seva funció, en canvi, una alteració en un gen supressor de tumors produeix una inactivació d'aquest. Per tal que l'alteració d'un gen supressor de tumors passi al fenotip de la cèl.lula és necessari la inactivació dels dos al.lels del gen (Knudson, 1971), recordant al mecanisme d'herència recessiva. Recentment però s'ha suggerit que la funció d'un gen supressor de tumors es pot suprimir per haploinsuficiència, o sigui, per alteració d'un sol dels dos al.lels del gen (Krug et al., 2002). D'altra banda, l'activació dels oncogens podria correlacionar-se amb una herència dominant, ja que un sol al.llel anormal és suficient per alterar la funció cel.lular d'aquest (Whitmire et al., 1973).

A banda de l'alteració en la regulació de la proliferació, una cèl.lula neoplàsica pot presentar una elevada inestabilitat genòmica. Aquestes observacions van conduir en el seu moment a la identificació dels gens responsables de l'estructura genètica i el control de la transmissió correcta de

la informació entre cèl.lules. Alteracions en aquests gens donarien una reparació inadequada de possibles errors en la replicació, que passarien a les cèl.lules filles introduint així canvis en la informació genètica transmesa. Les cèl.lules amb alteracions en aquests gens per inactivació dels dos al·lels, presenten una major predisposició a adquirir canvis genètics, podent-se afectar gens supressors de tumors o protooncogens.

Existeixen diferents mecanismes que poden contribuir a alterar la funció d'un gen. Un d'ells és l'amplificació, la qual es detecta per un increment desmesurat en el nombre de còpies del gen i generalment per un augment en el nivell d'expressió a la cèl.lula. Així, una amplificació es considera un mecanisme d'activació gènica, i conseqüentment es dona principalment en oncogens. Mentre es continua estudiant el mecanisme que condueix a l'amplificació, sembla que aquest es podria donar davant d'una exposició a agents tòxics, radioactius, carcinogènics o per una situació d'estrès, donant un avantatge proliferatiu a la clona portadora de l'amplificació (Cooperman i Klinger, 1981; Rechavi et al., 1990). En LMA, tot i que l'activació d'oncogens per amplificació no és el mecanisme tumoral més freqüent, cal destacar la identificació d'amplificacions recurrents en els gens *MYC*, *RUNX1*, *MYB* i *MLL* entre d'altres (Mohamed et al., 1993; Crossen et al., 1999; Streubel et al., 2001).

Un mecanisme diferent a l'amplificació, però que produeix també una sobreexpressió del gen, és la transposició a un domini actiu de cromatina. En aquest nou entorn, el promotor està desregulat de tal manera que passa a ser hiperactiu. Aquest fet es dona per exemple en situacions on el gen es trobi sota la influència d'un altre promotor més potent. Un exemple en LMA de sobreexpressió d'un oncogen a través d'aquest mecanisme és l'activació de *EVII* en els reordenaments cromosòmics $inv(3)(q21q26)$ i $t(3;3)(q21;q26)$ (Ogawa et al., 1996).

La substitució, guany o pèrdua d'un nucleòtid en la seqüència de l'ADN pot alterar de manera diferent la fisiologia d'un gen. Certes mutacions puntuals poden activar l'oncogenitat de protooncogens, mentre que d'altres

anul·larien a gens supressors de tumors. El resultat en cada cas depèn de en quin part de l'estructura del gen es dona la mutació. Per exemple, mutacions en el promotor podrien donar amplificacions del gen, mentre que modificacions a la zona codificant o exònica alterarien la traducció a proteïna. Tanmateix, certes mutacions a la zona no codificant d'un gen o intrònica poden ser també oncogèniques ja que introdueixen modificacions en el procés de *splicing* del gen. En el cas de la LMA, les mutacions puntuals són freqüents en gens codificants per proteïnes tirosin-quinases, les quals activen constitutivament la funció de la proteïna oncogènica (Scheijen i Griffin, 2002). Gran part d'aquestes tirosin-quinases, com els gens *ABL1*, *FES*, *FLT3*, *CSF1R* i *KIT*, de manera normal estan relacionades amb la regulació l'hematopoesi o de la funció cel·lular. D'altra banda, s'han descrit també en LMA mutacions que inactiven la funció de gens supressors de tumors com el cas de *WT1* o *CEBPb* (Krug et al., 2002).

Reordenaments cromosòmics, com les translocacions i les inversions, produeixen la unió de dues seqüències diferents donant un gen de fusió. El gen quimèric resultant normalment s'expressa donant una proteïna de fusió que presentarà unes funcions i capacitats úniques respecte a les proteïnes normals, les quals la fan oncogènica. Cal destacar que aquest és el mecanisme d'oncogenesi més freqüent en LMA. Gens codificadors per factors de transcripció es solen trobar sempre en un dels dos punts de trencament, i la proteïna de fusió normalment interfereix en la funció normal d'un o d'ambdós dels gens reordenats [per revisió veure (Look, 1997; Alcalay, et al., 2001; Crans i Sakamoto, 2001; Scandura et al., 2002)]. A través d'aquest mecanisme es poden activar protooncogens o inhibir gens supressors de tumors ja que la proteïna de fusió pot originar factors de transcripció que alterin l'expressió d'aquests (Krug et al., 2002).

Així mateix, l'inactivació d'un supressor de tumors també pot venir donada per la pèrdua de part de la seqüència del gen, tant per delecions cromosòmiques com per pèrdues cromosòmiques o aneuploidies, donant una haploinsuficiència del gen.

A banda de les alteracions genètiques descrites anteriorment, recentment s'han postulat les alteracions de tipus epigenètic com a mecanisme addicional associat a l'inactivació de la funció d'un gen en cancer (Baylin et al., 1998). Els gens afectats, normalment gens supressors de tumors, presenten a les regions properes al promotor una estructura de la cromatina que reprimeix la iniciació de la transcripció. Aquestes regions es caracteritzen per una hipermetilació de les zones riques en citosina i guanina que s'origina per una desacetilació de les histones (Robertson, 2001; Rountree et al., 2001). En una situació normal, una cèl.lula hereta la informació de l'expressió gènica mitjançant la metilació (*imprinting*). Alteracions en aquest patró, junt amb l'adquisició d'alteracions genètiques en gens importants per la fisiologia de la cèl.lula, portaria a la progressió tumoral. En aquest sentit, actualment s'està potenciant l'estudi de patrons de metilació i la detecció d'alteracions en els gens reguladors del procés (gens relacionats amb la metilació, acetilació i desacetilació de l'ADN) en relació al desenvolupament de diverses neoplàsies, inclosa la LMA (Issa et al., 1996; Rush et al., 2001; Jones i Saha, 2002).

1.2.2.2 Patogènesi

El desenvolupament de la LMA està relacionat amb alteracions que promouen la proliferació, inhibeixen la funció d'apoptosi i modifiquen la diferenciació normal de la cèl.lula mieloide (Kitada et al., 2002; Krug et al., 2002; Steinman, 2002). Així, les rutes de senyalització associades a la proliferació, apoptosi i diferenciació es troben normalment alterades en diferents tipus de neoplàsies. En el cas de la LMA, aquestes alteracions es donen en gran part per la presència de gens de fusió [per revisió veure (Alcalay et al., 2001; Scandura et al., 2002)]. Destacar que en LMA, generalment en una fusió un dels dos gens codifica per un factor de transcripció, mentre que l'altre, tot i ser més variable, sovint és un gen que controla el cicle cel.lular o l'apoptosi.

L'apoptosi, o mort cel·lular programada, és una funció complexa formada per diferents vies de senyalització. Tot i que és un procés conservat evolutivament, cada tipus cel·lular segueix diferents estratègies per activar l'apoptosi. En general, les cèl·lules poden entrar en apoptosi mitjançant diferents vies de senyalització iniciades a nivell extracel·lular o a partir de la mateixa cèl·lula (Strasser et al., 2000). Les vies intrínseques es caracteritzen per la sortida de citocrom *c* de la mitocondria, el qual és necessari per l'activació de les caspases. Les vies extrínseques s'inicien a la membrana cel·lular per l'unió lligand-receptor, la qual activa la senyalització cel·lular del receptor. Diverses evidències associen la desregulació de l'apoptosi amb el desenvolupament de la LMA. S'han observat nivells anormals de proteïnes apoptòtiques en línies cel·lulars que presentaven el gen de fusió *AML1(RUNX1)/ETO (CBFA2T1)* (Klampfer et al., 1996; Banker et al., 1998; Shikami et al., 1999), translocacions del gen *PML* donen resistència davant de senyals d'apoptosi (Pandolfi, 2001), mentre que translocacions del gen *MLL* interfereixen en l'apoptosi per mecanismes independents a la via de senyalització de P53 (Adler et al., 1999). La P53, proteïna que té la funció de controlar l'estabilitat genòmica i regular l'apoptosi, s'ha relacionat també amb el desenvolupament de la LMA. S'han identificat tant alteracions genètiques com epigenètiques de *P53*, sobretot en les t-LMA (Horiike et al., 1999; Christiansen et al., 2001) i en LMA amb cariotips amb delecions de la regió cromosòmica 17p13.1 (Fenaux et al., 1991; Lai et al., 1995). Així mateix, s'han trobat nivells elevats de les proteïnes apoptòtiques BCL2 i MCL-1, i nivells inferiors de BAX, sense detectar-se cap alteració en aquests gens, fet que fa pensar en alteracions dels seus factors de transcripció (Kitada et al., 2002).

A més de la relació d'una apoptosi anormal amb el desenvolupament de la LMA, aquesta s'ha associat també amb resistència al tractament. Fàrmacs com l'ATRA (Andreeff et al., 1999), la fludarabina o l'Ara-C (Tosi et al., 1994) es basen en estimular l'apoptosi de les cèl·lules neoplàsiques per tal de reduir el procés tumoral. No obstant, una cèl·lula tumoral amb alteracions en

les vies de senyalització de l'apoptosi presentarà resistència a aquest tipus de tractament (Smith et al., 1998; Marie, 2001). En aquest sentit, és de gran interès l'estudi dels gens i de les vies de senyalització relacionats amb l'apoptosi per tal de conèixer amb més precisió el procés de patogènesi de la LMA, i sobretot per poder obtenir informació essencial per la investigació i disseny de nous fàrmacs (Kornblau et al., 1999a).

El cicle cel.lular és un procés on les cèl.lules quiescents (G0) entren en un estat interfàsic, format per tres fases: G1 o *Gap 1* (fase de transcripció i síntesi de proteïnes), S o Síntesi (fase de duplicació d'ADN) i G2 o *Gap 2* (fase de transició). Posteriorment es dona una fase M o Mitosis on la cèl.lula es divideix donant dues cèl.lules filles. L'alteració d'aquest procés en el desenvolupament de tota neoplàsia es dona per un mal funcionament dels sistemes encarregats del seu control. La regulació s'exerceix en tres punts concrets del cicle, un al final de G1 (es controla que tot estigui a punt per entrar a S), un altre al final de G2 (control per entrar a M) i finalment un al mig de M (control de metafase per assegurar una divisió correcta) (Fig. 2). La progressió del cicle depèn de la presència de diferents ciclines i de quinases depenents de ciclines (CDKs) durant les diferents fases. Per exemple, en G1 les ciclines D i E indueixen la fosforilació de diferents inhibidors de la transcripció per gens necessaris en la fase S, com *RB-1*, *PI30* i *PI07*. Aquests al estar fosforilats deixen d'interaccionar amb l'ADN, alliberen factors de transcripció E2F i es comença la transcripció. A G1, les ciclines D i E estan regulades negativament per inhibidors de les quinases depenents de ciclines (CDKIs), com les INK4 i les KIPs. Així, qualsevol alteració que doni com a resultat una sobreexpressió dels activadors, o una sotaexpressió dels inhibidors, provocarà una proliferació cel.lular continuada i incontrolada, desencadenant una clona cel.lular neoplàsica. En el cas de la LMA, s'han detectat alteracions en la funció de varis gens que actuen en el cicle cel.lular (Krug et al., 2002; Steinman, 2002). Destacar per exemple la sotaexpressió de *RB-1* en un 27 % dels casos (Sauerbrey et al., 1998), i la

inactivació de *IK4A* i *IK4B* en un 79 % dels casos ja sigui per hipermetilació del promotor dels gens o per deleció del locus (Chim et al., 2001).

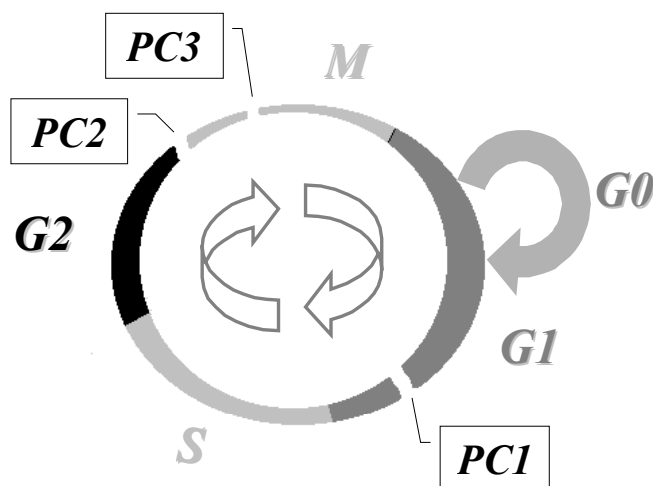


Figura 2. Esquema del cicle cel·lular, on s'indiquen les diferents fases (G1, S, G2 i M) i els punts de control (PC1, PC2 i PC3).

En la LMA, el mieloblast presenta una diferenciació aturada o anòmala. Els diferents tipus de morfologies resulten segons en quin moment de l'hematopoesi es produeix l'alteració, i segons el llinatge mieloide afectat. Anomalies en el procés de diferenciació vindrien donades per alteracions en els factors de transcripció cel·lulars, així com en factors de creixement i citoquines, i en els seus receptors. Tot i que és freqüent trobar nivells elevats de receptors per factors de creixement en els tumors sòlids (Robertson et al., 2000), aquest fet no és tant comú en el cas de les leucèmies agudes (Padro et al., 2002; Testa et al., 2002). En certs casos s'ha detectat la sobreexpressió de citoquines i factors de creixement (Fraser et al., 1994; Majka et al., 2001), i alteracions en els receptors de factors estimuladors de colònies (Shimizu et al., 2000). No obstant, si que s'ha identificat en LMA mutacions recurrents en els gens codificants pels receptors FLT3 i KIT (Scheijen i Griffin, 2002). Les evidències més importants però venen donades per alteracions en factors de transcripció a causa de la formació d'un gen de fusió (Alcalay et al.,

2001; Scandura et al., 2002). Entre aquests destacar la capacitat de les proteïnes de fusió AML1(RUNX1)/ETO(CBFA2T1) (Okuda et al., 1998; Yergeau et al., 1997), CBFb/MYH11 (Castilla et al., 1999) i PML/RARa (Grignani et al., 2000) per bloquejar la diferenciació mieloide.

1.2.3 Classificació

El criteri principal pel diagnòstic de la LMA és l'estudi morfològic, citoquímic i immunològic de la cèl.lula blàstica mieloide que prolifera a la MO. Segons les dades obtingudes i seguint les bases proposades pel grup cooperatiu FAB (*French-American-British*) les LMA es classifiquen en vuit subtipus diferents (de M0 a M7) (Benett et al., 1976; 1985). Junt amb la classificació FAB, l'estudi citogenètic va ésser posteriorment reconegut en la classificació MIC (Second MIC Cooperative Study Group, 1988). La LMA es caracteritza per presentar menys del 50 % de cèl.lules de la sèrie eritroide i més del 30 % de cèl.lules blàstiques respecte les cèl.lules nucleades totals, excepte el subtipus M6 que presenta més del 50 % respecte les cèl.lules eritroides.

En el subtipus M0, la cèl.lula blàstica que prolifera no presenta trets morfològics ni citoquímics mieloides, tot i que aquests si que es demostren per estudis immunofenotípics. En els subtipus M1 i M2, la proliferació neoplàsica prové de la sèrie granulocítica amb diferents graus de diferenciació. La M3 és específicament promielocítica. Les sèries granulocítica i monocítica són les que caracteritzen al subtipus M4, el qual presenta entre el 20 i el 25 % dels casos, eosinòfils atípics, i es denomina M4Eo. Els subtipus M5a i M5b presenten cèl.lules de la sèrie monocítica indiferenciades i poc diferenciades, respectivament. Alguns autors han proposat també el subtipus M5c per diferenciar els casos poc freqüents de proliferació en histiòcits. Els blastes del subtipus M6 són de la sèrie granulocítica, amb dismòrfa freqüentment associada a la sèrie eritroide. Finalment, per la classificació del subtipus M7 es necessita la confirmació de

l'origen megacariocític mitjançant estudis immunològics o citoquímica ultraestructural.

Recentment, amb la classificació proposada per la WHO (*World Health Organization*) s'intenta reconèixer diferents subtipus de LMA que presenten trets biològics d'importància clínica (World Health Organization, 2001). En aquest sentit, les LMA es classifiquen en quatre categories diferents: LMA amb anomalies genètiques recurrents, LMA amb displàsia multilíneal, LMA relacionada amb el tractament, i LMA no classificada segons els criteris anteriors. En les primeres categories es valora factors biològics amb importància pel pronòstic de la LMA, mentre que en l'última s'inclouen LMA basades en els criteris morfològics FAB introduint algunes modificacions importants, com considerar suficient el criteri diagnòstic de LMA la proporció del 20 % de leucoblasts a MO.

1.2.4 Anomalies cromosòmiques recurrents

1.2.4.1 Valor diagnòstic

Com s'ha esmentat anteriorment, les dades obtingudes de l'estudi citogenètic són utilitzades en el diagnòstic de la LMA. La importància ve determinada pel fet que certes alteracions cromosòmiques s'han trobat associades a determinats trets morfològics. Existeix per tant, certes anomalies cromosòmiques característiques de subtipus de LMA, entre les quals les més evidents són, la $t(8;21)(q22;q22)$ característica de M2, la $inv(16)(p13q22)$ o la $t(16;16)(p13;q22)$ de M4Eo i la $t(15;17)(q22;q21)$ de M3 (Taula 1). No obstant, l'associació d'una alteració cromosòmica a un subtipus concret no comporta que totes les LMA diagnosticades segons aquests subtipus hagin de presentar l'anomalia cromosòmica associada. D'altra banda, certes alteracions cromosòmiques tot i ser freqüents, s'observen en tots els subtipus de LMA sense mostrar associació específica. Aquest és el cas de la trisomia del cromosoma 8, monosomia dels cromosomes 7 o 5, i deleció de les regions cromosòmiques 7q o 5q.

Taula 1. Algunes de les principals alteracions cromosòmiques equilibrades recurrents

<i>Alteració cromosòmica</i>	<i>Gen de fusió</i>	<i>Associació a FAB</i>
Translocacions 11q23 (MLL)		
t(6;11)(q27;q23)	<i>MLL-AF6 (MLLT4)</i>	M4, M5
t(9;11)(p22;q23)	<i>MLL-AF9 (MLLT3)</i>	M4, M5
t(10;11)(p12;q23)	<i>MLL-AF10 (MLLT10)</i>	M4, M5
t(11;17)(q23;q21)	<i>MLL-AF17 (MLLT6)</i>	M4, M5
t(11;19)(q23;p13.1)	<i>MLL-ELL</i>	M4, M5
t(11;19)(q23;p13.3)	<i>MLL-ENL (MLLT1)</i>	M4, M5
Altres t(v;11)(v;q23)	<i>MLL-v</i>	M4, M5
Translocacions 21q22 (RUNX1)		
t(8;21)(q22;q22)	<i>AML1 (RUNX1)-ETO (CBPA2T1)</i>	M2
t(3;21)(p11;q22)	<i>AML1 (RUNX1)-EVII</i>	-
Translocacions 17q21 (RARA)		
t(15;17)(q22;q21)	<i>PML-RARa</i>	M3
t(11;17)(q23;q21)	<i>PLZF145-RARa</i>	M3
t(11;17)(q23;q21)	<i>NUMA1-RARa</i>	M3
t(5;17)(q35;q21)	<i>NPM1-RARa</i>	M3
Reordenaments 8p11 (MOZ)		
t(8;16)(p11;p13)	<i>MOZ-CBP (CREBBP)</i>	M4, M5
inv(8)(p11q13)	<i>MOZ-TIF2 (NCOA2)</i>	M0, M1, M5
t(8;22)(p11;q13)	<i>MOZ-EP300</i>	M5
Translocacions 11p15 (NUP98)		
t(7;11)(p15;p15)	<i>NUP98-HOXA9</i>	M2, M4
	<i>NUP98-HOXA13</i>	-
inv(11)(p15q22)	<i>NUP98-DDX10</i>	-
t(1;11)(q23;p15)	<i>NUP98-PMX1</i>	M2
t(2;11)(q31;p15)	<i>NUP98-HOXD11</i>	-
	<i>NUP98-HOXD13</i>	-
t(11;12)(p15;q13)	<i>NUP98-HOXC13</i>	-
t(9;11)(p22;p15)	<i>NUP98-LEDGF</i>	-
t(5;11)(q35;p15.5)	<i>NUP98-NSD1</i>	-
t(8;11)(p11.2;p15)	<i>NUP98-NSD3 (WHSC1L1)</i>	-
Translocacions 12p13 (ETV6)		
t(1;12)(q25;p13)	<i>TEL (ETV6)-ABL2</i>	M4
t(12;15)(p13;q25)	<i>TEL(ETV6)-TRKC (NTRK3)</i>	M2
t(12;22)(p13;q13)	<i>TEL(ETV6)-NMI</i>	M3
Altres reordenaments		
inv(16)(p13q22) / t(16;16)(p13;q22)	<i>CBFb-MYH11</i>	M4Eo
t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK-CAN (NUP214)</i>	M2 amb basofília
t(16;21)(p11;q22)	<i>TLS (FUS)-ERG</i>	-
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR-ABL1</i>	M1
t(3;5)(q25;q34)	<i>MLF1-NPM1</i>	-
inv(3)(q21q26) / t(3;3)(q21;q26)	<i>EVII *, RPN1</i>	Dismegacariopoesi amb increment del nombre de plaquetes

v, cromosoma partner/gen de fusió variable; *, sobreexpressió de *EVII*

Taula 2. Algunes de les principals alteracions cromosòmiques no equilibrades recurrents

Isocromosomes	Monosomies	Trisomies	Delecions	Amplificacions
i(1)(q10)	-5	+4	del(5)(qv)	8q24 (<i>MYC</i>)
i(11)(q10)	-7	+8	del(7)(qv)	21q22.3 (<i>RUNXI</i>)
i(14)(q10)	-20	+11	del(12)(pv)	11q23 (<i>MLL</i>)
i(17)(q10)	-21	+13	del(13)(q12q14)	6q22 (<i>MYB</i>)
i(21)(q10)	-22	+14	del(20)(q12q13)	
i(X)(q13)	-X,-Y	+21		

v, punt de trencament variable

La majoria d'anomalies cromosòmiques recurrents en LMA són reordenaments equilibrats, sense donar pèrdua o guany de material genètic, on els extrems de les regions cromosòmiques afectades queden fusionats. En aquests casos, la caracterització a nivell molecular implica el coneixement dels gens alterats, així com del gen de fusió resultant (Taula 1). A la taula 2 s'assenyalen alguns dels principals reordenaments cromosòmics recurrents de tipus no equilibrats, on en pocs casos s'ha arribat a identificar la lesió molecular que representen. Teòricament la pèrdua o guany d'una regió cromosòmica indicaria la inactivació d'un gen supressor de tumor o l'activació d'un protooncogen, respectivament. Aquesta associació és clara quan la regió afectada és relativament curta, per exemple, en una amplificació (Mohamed et al., 1993; Crossen et al., 1999; Streubel et al., 2001). No obstant, la implicació molecular del reordenament cromosòmic en la resta de casos seria complex, i podria involucrar a varis gens.

L'estudi molecular ha permès també la identificació d'alteracions genètiques recurrents en LMA. Per exemple, part de la seqüència dels gens *MLL* i *FLT3* poden presentar una duplicació parcial en tàndem (DPT) (Caligiuri et al., 1994; Kiyoi et al., 1998). Concretament, en el cas del gen *MLL*, la seqüència de l'exó 3 al 5 es duplica i s'inserta dins la regió típica de trencament del gen *MLL* en les translocacions 11q23, la qual compren de

l'exó 9 al 11. Com a resultat de la inserció, i segons el punt on es dona, es produeix una fusió de l'exó 3 amb l'exó 9, 10 ó 11 del mateix gen. Aquest reordenament es considera un mecanisme per l'activació de l'oncogen *MLL*. Alhora, s'ha identificat una deleció parcial de la seqüència del gen *KIT* associada a pacients amb inv(16)(p13q22) (Gari et al., 1999), així com una mutació a la línia cel.lular Kasumi-1 portadora de la t(8;21)(q22;q22) (Beghini et al., 2002). És de destacar també, la detecció de mutacions puntuals del gen *RUNX1* (Osato et al., 1999; Carnicer et al., 2002), les quals s'associen als subtipus M0 i M7 (Preudhomme et al., 2000; Langabeer, et al., 2002). De manera semblant, mutacions puntuals del gen *CEBPa* s'han associat a M2 (Pabst et al., 2001). Menys freqüents són les mutacions dels gens *WT1* (King-Underwood et al., 1996) i *CSF3* (Forbes et al., 2002).

1.2.4.2 Valor pronòstic

La identificació d'alteracions genètiques en pacients de LMA és un factor predictiu del pronòstic de la malaltia (Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982, 1984). L'associació clínica de les diferents anomalies cromosòmiques recurrents es dur a terme mitjançant l'estudi estadístic de sèries llargues. Així, el resultat és l'estratificació dels pacients segons l'alteració genètica en subgrups de LMA de pronòstic favorable, mitjà i desfavorable. Al basar-se en un criteri estadístic, l'assignació del pronòstic d'una alteració pot variar en funció de l'estudi consultat. No obstant, és àmpliament acceptat que d'entre les alteracions genètiques associades a un pronòstic favorable s'inclouen la t(8;21)(q22;q22), la inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) i la t(15;17)(q22;q21), mentre que les associades a un pronòstic desfavorable serien la monosomia 5 ó 7, delecions a 5q, inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26) i cariotips complexos (Grimwade et al., 1998). Dins el grup de pronòstic mitjà s'inclouen els cariotips normals, la trisomia 21 ó 22, i delecions a 9q (Grimwade et al., 1998). L'assignació de la trisomia 8, delecions a 7q o de les translocacions de la regió 11q23 fluctua segons les sèries entre els grups

de pronòstic mitjà i desfavorable (Bloomfield et al., 1998; Grimwade et al., 1998; Mrozek i Bloomfield, 1998). Cal assenyalar, que tant les trisomies 8 i 22 com la deleció de 9q són alteracions cromosòmiques que es detecten normalment associades a $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22)$ o a $t(15;17)(q22;q21)$ (Langabeer et al., 1998). Destacar, que el grup pronòstic mitjà inclou normalment una proporció elevada i heterogènia d'anomalies genètiques que no s'han pogut associar a cap dels altres dos grups, ja sigui per la seva baixa freqüència, o per heterogeneïtat molecular de l'alteració. Conseqüentment, els pacients classificats dins el grup de pronòstic mitjà presentaran també un pronòstic més heterogeni respecte els altres grups. Recentment s'ha observat que la presència de delecions submicroscòpiques en els gens de fusió específics de diferents neoplàsies hematològiques podrien alterar la indicació de pronòstic (Kolomietz et al., 2001). En aquest sentit, tots els avenços tècnics que s'aconsegueixin en el diagnòstic genètic permetran millorar la determinació del pronòstic del pacient de LMA, sobretot dins el grup heterogeni de pronòstic mitjà. Així, la incorporació de noves metodologies, i la seva aplicació junt amb les tècniques convencionals de diagnòstic genètic, hauria de ser l'objectiu principal per tal d'aconseguir en un futur un tractament més individualitzat dels pacients de LMA.

1.3 Estudi genètic-molecular de la leucèmia mieloide aguda

1.3.1 Mètodes d'estudi genòmic

1.3.1.1 Anàlisi citogenètica convencional

a) Principis del mètode

L'anàlisi citogenètica es basa en l'ordenació dels 23 parells de cromosomes o cariotip (Fig. 3). El bandeig cromosòmic, introduït com a tècnica citogenètica al final dels anys 60, va permetre classificar els cromosomes, no només pel seu tamany o posició centromèrica, sinó també

pel seu patró de bandes específic (Caspersson et al., 1968). Majoritàriament existeixen dos mètodes de bandeig, les bandes G (amb tinció de Giemsa o Wright) i les bandes R (amb tinció de Giemsa o amb taronja d'acridina). L'avantatge principal és que s'obté una valoració global dels possibles reordenaments cromosòmics en el genoma. No obstant, l'anàlisi citogenètica, principalment quan s'estudien mostres de tumors sòlids o limfomes, presenten limitacions al obtenir preparacions amb cromosomes de morfologia pobre i amb un patró de bandes dolent, o al presentar un baix índex mitòtic després d'un cultiu a curt terme. Aquestes limitacions es van veure superades en part per la introducció del mètode de sincronització cel·lular o bandeig d'alta resolució, la qual generava cromosomes més estesos i amb un patró de bandes més ampli.

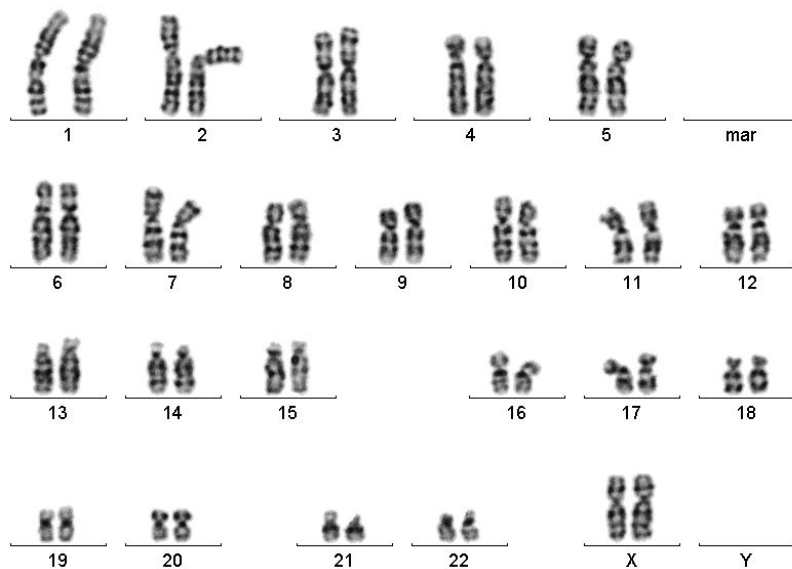


Figura 3. Cariotip per bandes G

b) Aplicació

Durant dècades, la citogenètica ha estat l'únic mètode per analitzar els canvis genètics en una població cel·lular. La primera anomalia genètica

associada a una neoplàsia (Nowell i Hungerford, 1960) es va diagnosticar mitjançant aquesta tècnica (Rowley, 1973). Aquest no va ser un fet aïllat, sinó que des de llavors, la identificació d'alteracions cromòmiques recurrents específiques o característiques de diferents neoplàsies ha estat creixent exponencialment. Mitjançant la introducció del mètode de sincronització cel·lular es va aconseguir una major precisió diagnòstica, podent detectar reordenaments cromosòmics més subtils així com una definició superior dels punts de trencament.

Com s'ha esmentat anteriorment, l'anàlisi citogenètica és essencial pel diagnòstic de la LMA. Així mateix, certes alteracions cromosòmiques presenten un impacte pronòstic independent (Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982, 1984). Malgrat això, amb l'aparició de les tècniques de citogenètica molecular s'han confirmat les limitacions diagnòstiques de la citogenètica convencional, ja que moltes alteracions poden quedar ocultes en un estudi citogenètic (Rigolin et al., 2001; Cuneo et al., 2002), o es poden donar a nivell submicroscòpic, i per tant només podran ser identificades amb l'aplicació d'aquestes últimes tècniques. En aquest sentit, serà essencial la combinació de diferents metodologies per tal d'aconseguir un diagnòstic genètic més precís, que a la vegada ajudarà a classificar acuradament els pacients de LMA en veritables grups pronòstics.

1.3.1.2 Hibridació in situ fluorescent

a) Principis del mètode

El principi del mètode de la hibridació *in situ* (ISH) es basa en la capacitat que té una cadena d'oligonucleòtids a hibridar amb una de complementària (John et al., 1969; Gall i Pardue, 1969). La ISH fluorescent (FISH) no és més que un progrés de la metodologia al substituir la utilització de radioisòtops per fluorocroms (Cremer et al., 1988; Lichter et al., 1988). Per una banda, la diana d'hibridació és l'ADN genòmic, tant de cromosomes en metafase, com de nuclis en interfase de cèl·lules que es troben fixades en un portaobjectes. En aquest sentit, és possible utilitzar extensions de sang

perifèrica (SP) o de MO i seccions de teixit fixats. Per altra banda, la sonda test és ADN marcat fluorescentment per incorporació indirecta de fluorocroms a través de la unió covalent dels nucleòtids amb biotina o dioxigenina, o directament per conjugació amb fluorocroms. En el cas del marcatge indirecte, i després que la sonda s'ha hibridat amb la seva seqüència complementària, es realitza la detecció per unió del fluorocrom amb anticossos com l'esteptavidina o antidioxigenina. La cohibridació de sondes marcades diferencialment permet l'estudi simultani de diferents seqüències d'ADN. La imatge fluorescent d'hibridació es visualitza utilitzant un microscopi de fluorescència equipat amb filtres específics per l'excitació dels fluorocroms.

Les sondes utilitzades per FISH es poden classificar segons la diana d'hibridació en sondes d'estructures cromosòmiques o de seqüències repetitives, sondes de pintat cromosòmic (WCP), i sondes de seqüències d'ADN específiques o úniques (LSI) (Fig. 4). Exemples de sondes de seqüències repetitives són les anomenades cromosoma centromèriques específiques (CEP) i les pantelomèriques, les quals hibriden sobre regions cromosòmiques formades per seqüències curtes altament repetitives. En el cas de les sondes CEP, la diana són seqüències α - i β -satèl.lit localitzades als centròmers. La hibridació amb sondes CEP permet detectar alteracions cromosòmiques numèriques, tant en metafase com en nuclis interfàsics. En el cas de la sonda pantelomèrica, la diana és el conjunt de telòmers de tots els cromosomes, ja que hibrida amb seqüències (TTAGGG) repetitives en tàndem presents als extrems de cada cromosoma. El segon tipus de sondes per FISH, les WCP, són sondes complexes formades per llibreries d'ADN clonat derivades d'un cromosoma específic. Generalment es tracta de cromosomes *flow-sorted* o microdisseccionats, que s'amplifiquen i es marquen per reacció en cadena de la polimerasa (PCR) emprant primers oligonucleòtids degenerats (DOP-PCR), generant una sonda que pinta la totalitat del cromosoma en qüestió (Ried et al., 1998). La hibridació amb sondes WCP és útil per confirmar citogenèticament anomalies

cromosòmiques estructurals o numèriques, destacant que l'anàlisi és només informatiu en cèl.lules en metafase. Finalment, la diana d'hibridació de les sondes LSI són seqüències específiques presents en un locus. Segons la llargada de la sonda, el vector de clonació utilitzat poden ser des de plàsmids (1-10 kb), fins a vectors cromosòmics artificials de llevat o de bacteries (80 kb-1 Mb). La utilització d'aquest tipus de sondes és principalment l'estudi de reordenaments estructurals específiques i canvis en el nombre de còpies de seqüències d'ADN d'un locus concret, essent informatiu tant l'anàlisi de metafases com de nuclis cel.lulars en interfase.

Respecte l'anàlisi convencional, la utilització de la tècnica FISH aporta diversos avantatges per la realització de diagnòstics citogenètics [per revisió veure (Gozzetti i Le Beau, 2000)]. Una d'elles, i tenint en compte que l'anàlisi d'un gran nombre de cèl.lules es realitza fàcilment en pocs minuts, és la rapidesa diagnòstica. Tanmateix, l'eficiència d'hibridació i detecció és elevada, així com la sensibilitat i especificitat. El fet de poder dur a terme FISH en nuclis de cèl.lules en interfase, és una avantatge afegida que permet analitzar tant cèl.lules que no han entrat en divisió, com cèl.lules diferenciades. A més, combinant FISH interfàsica i estudis d'immnofenotip o de morfologia cel.lular per marcatge immunohistoquímic és possible analitzar subtipus cel.lulars concrets [per revisió veure (Werner et al., 1997)]. Cal destacar que la sensibilitat de la FISH depèn de si es realitza en metafase (1-3 Mb) (Wilkinson, 1999) o en interfase (50 kb-1 Mb) (Trask et al., 1989; Pinkel, 1999). Resolucions d'1 kb s'aconsegueixen només amb el mètode anomenat *fiber*-FISH (Florijn et al., 1995; Heiskanen et al., 1996).

Malgrat tot, la limitació més notable de la FISH és que queda restringida a l'estudi de seqüències d'ADN per les quals disposem de sonda. A més, la decisió d'utilitzar una sonda depèn de la necessitat d'informació citogenètica prèvia. Destacar també, que el nombre d'alteracions cromosòmiques que es poden analitzar simultàniament en una hibridació depèn de la composició de fluorocroms de les sondes que utilitzem. Finalment, per la detecció d'alteracions poc freqüents en nuclis en interfase,

com en el cas d'estudis per la malaltia mínima residual, la sensibilitat de la tècnica queda limitada per la proporció de falsos positius que poden aparèixer. En aquest sentit, existeixen diverses estratègies per tal d'incrementar la sensibilitat de la FISH en nucli interfàsic, com incloure una sonda com a control intern o utilitzar hibridacions duals.

b) Aplicació

L'aplicació de la metodologia FISH a l'estudi citogenètic és l'origen del terme citogenètica-molecular [per revisió veure (Kearney, 2001)], el qual fa referència a l'anàlisi de seqüències d'ADN a nivell cromosòmic o cel.lular. La tècnica de FISH ha esdevingut una important eina en el diagnòstic de neoplàsies que, combinada amb l'anàlisi per bandes G, permet precisar la identificació d'anomalies cromosòmiques específiques amb possible importància patogènica, tant en metafase com en nuclis de cèl.lules en interfase (Trask et al., 1989; Pinkel, 1999). En l'estudi diagnòstic de la LMA, la FISH s'utilitza com a suport de la citogenètica convencional en casos indicatius de ser portadors de translocacions subtils, com la $inv(16)/t(16;16)$, la $t(15;17)$ i en certes translocacions 11q23. A més, al emprar sondes LSI, la FISH permet detectar alteracions moleculars críptiques a la resolució del cariotip per bandes G (Aventín et al., 2000). Tanmateix, un cop detectades les lesions cromosòmiques d'importància, la FISH es pot aplicar a estudis de seguiment de l'evolució d'aquestes al llarg de la malaltia. A banda de l'aplicació diagnòstica, la FISH ha estat també utilitzada en recerca, per estudis de mapatge genòmic, per la identificació de regions amb canvis en el nombre de còpies d'ADN i per tal de definir punts de trencament en alteracions cromosòmiques estructurals.

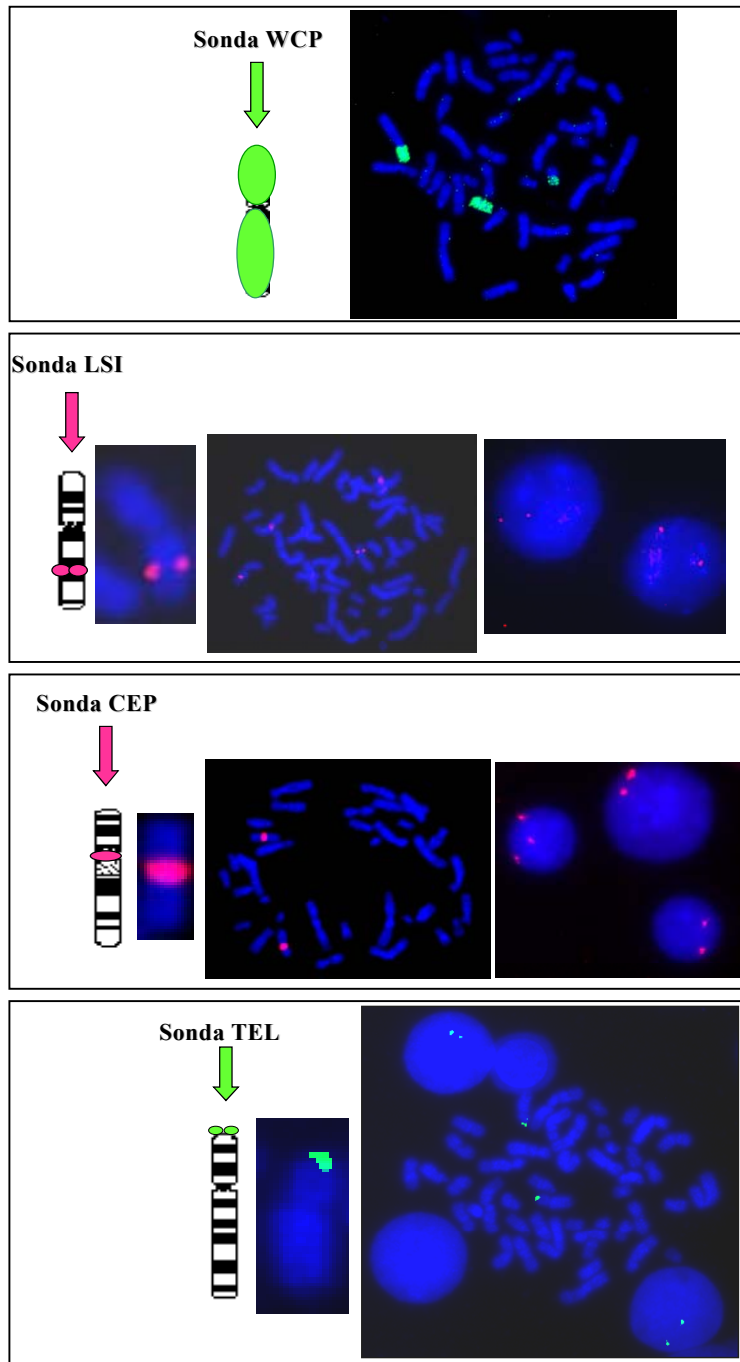


Figura 4. Esquemes i exemples de diferent tipus de sondes utilitzades en la FISH

1.3.1.3 Hibridació *in situ* fluorescent multicolor

a) Principis del mètode

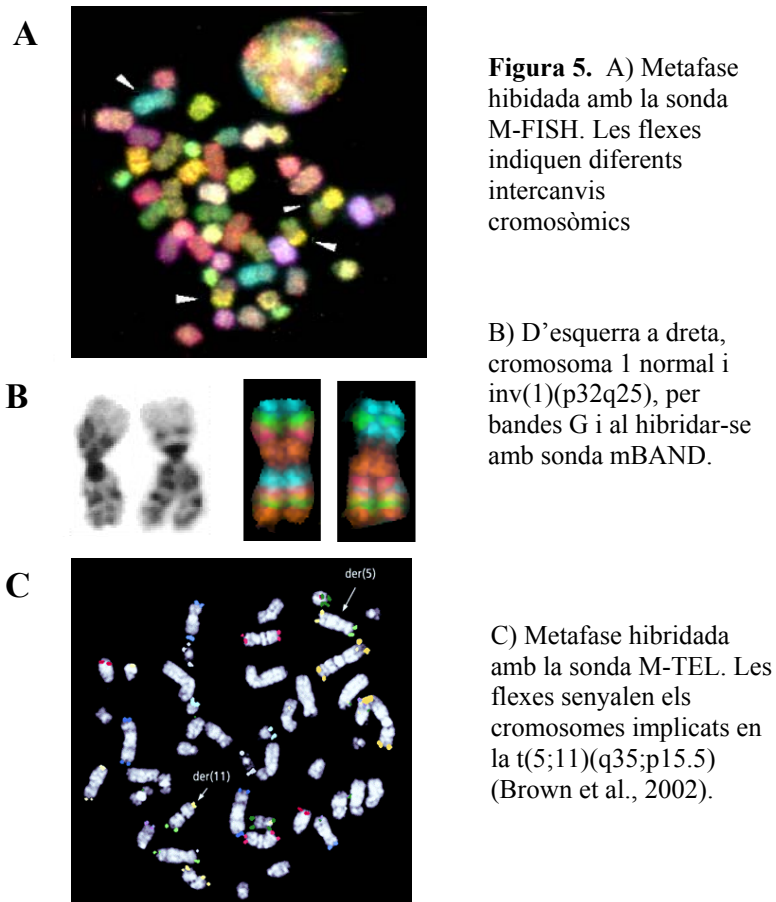
La multicolor-FISH, també anomenada 24-color FISH, consisteix en una FISH utilitzant una sonda formada per una barreja de sondes de pintat cromosòmic marcades amb cinc fluorocroms, i que si s'hibrida sobre metafase, marca cada parella de cromosomes homòlegs en una combinació diferent (Fig. 5a). L'ADN Cot-1 s'inclou en el disseny de la sonda per tal de bloquejar les seqüències repetitives. Semblant a la citogenètica convencional, la multicolor-FISH dóna una visió dels intercanvis cromosòmics de tot el genoma en un sol experiment. Depenent del mètode per generar la sonda i del sistema tècnic que s'utilitzi per la captura de les metafases hibridades, la multicolor-FISH s'anomena múltiple-FISH (M-FISH) (Speicher et al., 1996) o cariotip espectral (SKY) (Schrock et al., 1996). En la M-FISH, sondes d'ADN obtingudes per microdissecció s'amplifiquen per PCR i es marquen a continuació per *nick translation*. En l'anàlisi, els diferents plans de fluorescència de les preparacions hibridades es capturen per separat en un microscopi de fluorescència a través d'una càmera monocroma d'alta sensibilitat i d'una roda de filtres específica per cada fluorocrom. Posteriorment, es calcula el valor d'intensitat de fluorescència per cada fluorocrom i els plans s'alineen per donar la imatge M-FISH. D'altra banda, la sonda de SKY es genera amplificant sondes d'ADN, provinents de *flow-sorted* o de microdissecció, amb marcatge directe i DOP-PCR. L'anàlisi de SKY es realitza sobre l'espectre d'emissió total dels cinc fluorocroms, el qual s'adquireix a través d'un interferòmetre de Sagnac connectat a una càmera d'alta sensibilitat, resultant una única imatge que conté la informació espectral de cada fluorocrom.

L'avantatge principal de les tècniques de M-FISH i SKY és que permeten identificar translocacions cromosòmiques simples i complexes, monosomies i trisomies, cromosomes marcadors i *double minutes (dm)* en un únic experiment, podent ajudar a l'anàlisi citogenètica convencional, i amb

especial interès per la resolució de cariotips complexes (Schrock et al., 1996; Speicher et al., 1996). A més, s'han descrit com mètodes capaços de detectar anomalies cromosòmiques críptiques en pacients amb un cariotip aparentment normal (Kakazu et al., 1999; Uhrig et al., 1999). L'assignació de bandes és possible generant el revers de la imatge DAPI, no obstant, diferències en el grau de condensació cromosòmica poden portar a discordances de resultat respecte l'assignació per bandes G (Speicher et al., 1996).

Una limitació de les tècniques de M-FISH i SKY és la identificació ambigua de translocacions subtils (Veldman et al., 1997; Uhrig et al., 1999). En aquests casos és indicat confirmar l'origen del material cromosòmic intercanviat per FISH amb sondes de pintat cromosòmic específiques. Alhora, reordenaments intracromosòmics, com les inversions, no es poden detectar per aquest mètode. Aquest fet ha motivat l'aparició d'una sonda multicolor-FISH que dóna una hibridació en 43 colors generada per marcatge en relació binària combinada (*combined binary ratio labelling*, COBRA), anomenada PQ-COBRA-FISH, la qual distingeix simultàniament cromosomes i diferencia alhora braços p i q cromosòmics, podent identificar tant inversions pericèntriques com isocromosomes (Wiegant et al., 2000). L'opció alternativa per poder analitzar reordenament intracromosòmics és el cariotip per bandes de colors, anomenat bandeix de colors per encreuament d'espècies o Rx-FISH, on cada cromosoma obté un patró de bandes de colors al hibridar amb una sonda creada a partir de seqüències d'ADN no humanes (Muller et al., 1998). Així mateix, el bandeix de colors d'un cromosoma específic s'aconsegueix aplicant la tècnica de multicolour banding FISH (mBAND) (Chudoba et al., 1999), la qual utilitza una mescla de diferents sondes WCP parcials marcades combinatòriament amb cinc fluorocroms (Fig. 5b).

La sensibilitat de detecció dels mètodes de multicolor-FISH és limitada pel fet de realitzar l'anàlisi sobre metafase cromosòmica. Tot i que per la tècnica SKY es va proposar el límit de resolució entre 500 i 1500 kb



(Schrock et al., 1996), és difícil quantificar la sensibilitat del mètode com a nombre absolut, bàsicament perquè és influenciat per la condensació cromosòmica i per la composició de fluorescència dels dos cromosomes implicats en la translocació (Uhrig et al., 1999). En aquest sentit, s'aconseguiria augmentar la sensibilitat utilitzant set fluorocroms diferents en el marcatge de la sonda, reduint així la probabilitat de combinacions semblants entre cromosomes (Azofeifa et al., 2000). Fins i tot amb la modificació del mètode, translocacions cromosòmiques de < 2,6 Mb seran difícils de detectar (Holinski-Feder et al., 2000), quedant infrarepresentades

les translocacions que afectin a regions telomèriques distals. Per la detecció d'aquest tipus de translocacions, les quals poden ser presents en cariotips aparentment normals, serà adequada la múltiple-FISH telomèrica (M-TEL) on es combinen sondes subtelomèriques seguint el principi de la multicolor-FISH (Brown et al., 2001) (Fig. 5c).

b) Aplicació

Les tècniques de M-FISH i SKY s'han consolidat com a tècniques importants en el diagnòstic citogenètic ajudant a les tècniques convencionals. En estudis constitucionals, pre- i postnatals, les tècniques de M-FISH i SKY han permès la identificació de reordenaments cromosòmics críptics en individus que presentaven un cariotip aparentment normal i fenotip suggestiu de síndrome cromosòmica (Uhrig et al., 1999; Bezrookove et al., 2000). D'altra banda, en les neoplàsies hematològiques és on les tècniques de M-FISH i SKY s'han aplicat de manera més extensa, degut al fet que la detecció de reordenaments cromosòmics condiciona la identificació de gens amb importància patogènica (Schrock i Padilla-Nash, 2000). Els estudis realitzats de M-FISH i SKY en LMA han permès la caracterització detallada de cariotips anòmals i complexes (Stark et al., 2000; Miyagi et al., 2002; Schoch et al., 2002a). En aquest subgrup de pacients, s'ha detectat un gran nombre de translocacions cromosòmiques críptiques que ha portat a la identificació de nous reordenaments cromosòmics recurrents associats a LMA (Mohr et al., 2000; Hilgenfeld et al., 2001; Kerndrup i Kjeldsen, 2001; van Limbergen et al., 2002). Destacar també, que d'entre l'heterogeneïtat a nivell d'alteracions cromosòmiques que presenten els cariotips complexes, s'han pogut definir subclasses citogenètiques emprant la tècnica de M-FISH (van Limbergen et al., 2002). En el subgrup de pacients amb cariotip normal, les tècniques de M-FISH i SKY han permès també la identificació d'alteracions cromosòmiques no detectades prèviament per citogenètica convencional, algunes d'elles recurrents, com la translocació $t(11;19)(q23,p13)$ (Zhang et al., 2000; Hilgenfeld et al., 2001; Brown et al., 2002). No obstant, s'ha constatat que

aquestes tècniques no són prou sensibles per les translocacions subtelomèriques críptiques, com la t(5;11)(q35;p15.5) (Brown et al., 2002).

1.3.1.4 Hibridació genòmica comparada

a) Principis del mètode

La hibridació genòmica comparada (CGH) és considerada com un mètode de citogenètica molecular capaç de detectar i mapar canvis en el nombre de seqüències d'ADN amb un únic experiment, sense necessitat de tenir cèl.lules en divisió, ni d'informació prèvia de regions específiques d'interès (Kallioniemi et al., 1992).

L'anàlisi de guanys i pèrdues de material genòmic d'un tumor, es genera per la comparació de l'ADN de cèl.lules normals i tumorals. Com es representa a la figura 6, els dos ADN marcats respectivament amb fluoresceïna isotiocianat (FITC) i TexasRed[®], es cohibriden sobre metafases normals, en presència d'ADN Cot-1 sense marcar per bloquejar les seqüències repetitives. Regions cromosòmiques amb guanys o pèrdues, com duplicacions, delecions i amplificacions, es detecten per variacions en la relació d'intensitat de fluorescència dels dos fluorocroms, al llarg de cada cromosoma.

El gran avantatge de la tècnica de CGH han estat obtenir informació d'alteracions cromosòmiques processant material biològic sense necessitat d'estimular-lo a la divisió, podent utilitzar així indiferentment ADN genòmic extret de mostra fresca, congelada o fixada. Alhora, la quantitat d'ADN necessària per un experiment de CGH és mínima (~1 µg). A més, si l'ADN extret és amplificat per PCR es pot arribar a treballar partint de poques cèl.lules (Kuukasjarvi et al., 1997). El fet que la proporció d'intensitat de fluorescència entre els dos ADN cohibridats sigui calculada al llarg de l'eix dels cromosomes, permet detectar guanys i pèrdues de material genòmic i mapar la seva localització exacta. Per l'assignació de bandes s'utilitzen els punts d'intersecció entre el perfil de CGH i les línies de representació dels llindars de detecció. La regió afectada delimitada pels punts d'intersecció es

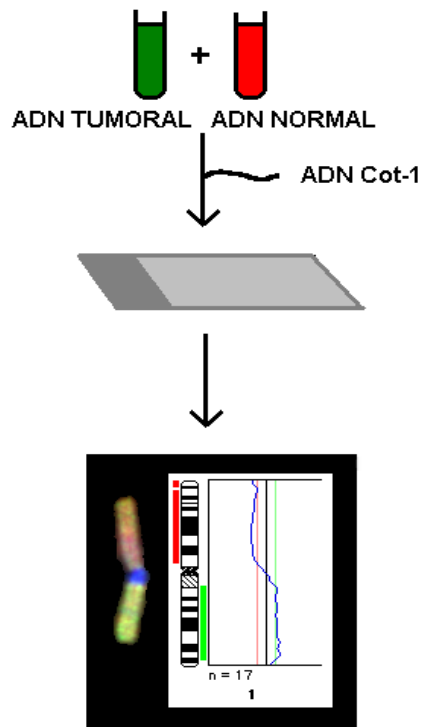


Figura 6. Esquema de la tècnica d'hibridació genòmica comparada.

representa sobre un idiograma cromosòmic de 400 o 550 bandes, visualitzant-se amb una barra de color (Fig. 6). Tot i que està descrita una bona correlació en l'assignació de bandes entre l'ACC i la CGH, la falta de precisió pot ser deguda a la variació en el grau de condensació cromosòmica en certes regions, o a la pròpia utilització dels idiogrames per la localització de les bandes cromosòmiques afectades (du Manoir et al., 1995).

Per altra banda, una limitació que presenta la tècnica de CGH és la no detecció d'alteracions cromosòmiques equilibrades, com les translocacions i inversions, ja que no causen alteracions en el nombre de còpies d'ADN. Una altra limitació associada a la tècnica, és que aquesta no detectarà alteracions que es trobin presents en una proporció baixa de cèl.lules de la mostra. El percentatge mínim de cèl.lules portadores necessari per identificar l'alteració depèn dels límits dels llindars de detecció que s'estableixin. Així, per una

població cel.lular teòrica amb la totalitat de representació de l'anomalia, i donat que el perfil és el quocient de fluorescència dels dos ADN, el valor teòric de normalitat és 1, per una trisomia 1,5 i per una monosomia 0,5. A la pràctica, les poblacions neoplàsiques mostren diferents proporcions de cèl.lules normals respecte les tumorals. En aquest sentit, s'estableix que per una població diploide on el 50 % de cèl.lules presenten l'anomalia els llindars de detecció per guanys i pèrdues són 1,25 i 0,75, respectivament (du Manoir et al., 1995). Per aquest motiu, subclones cel.lulars portadores d'alteracions generades per evolució clonal no es detectarien per aquest mètode.

La sensibilitat de detecció de la CGH disminueix en funció de la presència de cèl.lules normals i segons el nombre de còpies i grandària de la regió cromosòmica afectada. Basats en experiments de simulació, un guany del 50 % com es una trisomia es podria detectar si la llargada de la regió afectada fos >2 Mb. Com que el límit de detecció d'una seqüència amplificada es determina pel número de còpies i la grandària de la regió afectada, una seqüència amplificada de 250 kb necessitaria d'un guany del 400 %. D'altra banda, la resolució a la qual s'arribaria per una pèrdua en les dues còpies d'una seqüència seria de 1-2 Mb (Joos et al., 1993; Piper et al., 1995).

Tanmateix, el límit de detecció per guanys i pèrdues basats en experiments de CGH s'estima que es troba al voltant de les 10 Mb (Kallionemi et al, 1994b; Bentz et al., 1998), tot i que delecions de 3 Mb s'han detectat per CGH utilitzant intervals de referència estàndards (Kirchhoff et al., 1999).

La sensibilitat de la tècnica de CGH, limitada pel fet que el mètode es basi en una hibridació sobre cèl.lules en metafase, es pot incrementar emprant ADN clonat i dispers en diferents microgotetes sobre un suport de vidre, tècnica anomenada matrix-CGH o CGH-array (Solinas-Toldo et al., 1997; Clark et al., 2003). La CGH array s'ha utilitzat per estudiar regions específiques del genoma amb l'objectiu de dur a terme una localització

posicional i localitzar seqüències amb canvis en el nombre de còpies on identificar gens candidats a oncogens o gens supressors de tumors (Pinkel et al., 1998; Albertson et al., 2000). Alhora, s'ha descrit un CGH array que permet l'anàlisi de pràcticament la totalitat del genoma, el qual deixa pas a nous i interessants projectes per ser aplicats en el diagnòstic clínic en un futur immediat (Pollack et al., 1999).

b) Aplicació

La CGH ha estat una tècnica important per l'anàlisi tant dels tumors sòlids com dels limfomes. Fins a l'aplicació de la CGH, l'estudi dels reordenaments cromosòmics d'aquestes neoplàsies era un procés lent i difícil a causa dels inconvenients d'obtenir cèl.lules en metafase, la qual cosa limitava l'aplicació de la citogenètica convencional. Ràpidament es va consolidar com una tècnica important en el diagnòstic clínic complementària a les tècniques convencionals. La gran quantitat d'informació aportada per aquest mètode queda reflexat en les revisions realitzades per Knuutila et al., 1998; 1999, i a la base de dades de CGH on s'analitzen les publicacions fins l'any 2002 (CGH data, http://www.helsinki.fi/cm/cgh_data.html). D'altra banda, el mètode ofereix un gran nombre d'aplicacions en recerca bàsica del càncer (Forozan et al., 1997; Kearney, 2001), com la caracterització de punts freqüents de reordenaments cromosòmics desequilibrats (Gray et al., 1994; Larramendy et al., 1998c; Nomdedeu et al., 2002), definir nous gens implicats en alteracions en el número de còpies (Visakorpi et al., 1995; Hemminki et al., 1997), anàlisi de la progressió i evolució clonal (Heselmeyer et al., 1996; Armengol et al., 2001), així com subclassificació (Tirkkonen et al., 1998) i avaluació del pronòstic (Hing et al., 2001).

L'aplicació de la CGH en l'estudi de la LMA ha estat menys extensa i pel moment es disposa de menys casuística. És de destacar que la LMA és una patologia on les alteracions cromosòmiques recurrents són majoritàriament equilibrades, i depenent de les sèries, el 45 % dels pacients tenen cariotip normal. Si s'analitzen els resultats dels treballs publicats fins al moment, la CGH s'aprecia com una tècnica indicada per ser utilitzada

complementàriament als estudis citogenètics convencionals (Bentz et al., 1995; Wilkens et al., 1998; Huhta et al., 1999; Castuma et al., 2000; Alvarez et al., 2001; Kim et al., 2001). En aquest sentit, la CGH serà útil en casos amb cariotips complexos (Nacheva et al., 1995; Lindvall et al., 2001; Verdorfer et al., 2001) o davant de cromosomes marcadors (Mohamed et al., 1993; Crossen et al., 1999). No obstant, la falta d'estudis amb sèries de pacients més extenses deixa un important buit sobre la possible implicació de les regions cromosòmiques amb alteracions en el nombre de còpies de seqüències d'ADN pel desenvolupament de la LMA.

1.3.1.5 Tècniques de genètica molecular

a) Principis dels mètodes

Les tècniques de Southern-blotting, PCR i l'anàlisi de mutacions, s'utilitzen per detectar alteracions en l'estructura molecular de seqüències d'ADN específiques.

En el mètode de Southern-blot (Southern, 1974), l'ADN es digereix utilitzant enzims de restricció i els fragments resultants es separen mitjançant un gel d'electroforesis. El patró de bandes generat es traspasa (*blotting*) a un filtre per ser hibridat amb una sonda d'ADN específica seguint el mateix principi de la FISH. Després de la hibridació, es comparen les bandes que han hibridat en la mostra test respecte a les de la mostra de referència. Emprant aquest mètode es poden detectar per un canvi concret en el patró de bandes reordenaments en la seqüència d'ADN, com per exemple, en el gen de fusió d'una translocació cromosòmica. En comparació a altres tècniques com la PCR, les limitacions del Southern-blot són que requereix una important quantitat de material, un percentatge de població neoplàsica majoritari a la mostra i que l'obtenció dels resultats és més lenta. D'altra banda, el Southern-blot s'utilitzarà preferentment per la detecció de reordenaments cromosòmics on un gen concret tingui diversos gens de fusió possibles. Un exemple és la detecció dels reordenaments de la regió cromosòmica 11q23.

L'avantatge principal de la tècnica de PCR es que permet amplificar petites quantitats d'una seqüència d'àcid nucleic específica en més d'un microgram d'ADN. El mètode es basa en una reacció de síntesi *de novo* de cadenes complementàries d'ADN mitjançant la utilització d'un enzim polimerasa. Quan la doble cadena d'ADN és accessible, s'uneix a cada cadena un fragment curt de seqüència complementària (*primer*) a partir del qual l'enzim podrà començar a sintetitzar. El producte de la reacció és la duplicació de la cadena d'ADN des d'on limiten els *primers*, mentre que la repetició continuada d'aquest cicle per variació de la temperatura de reacció, genera l'amplificació de la seqüència concreta d'ADN. Al 1988 va ser quan per primera vegada es va utilitzar la polimerasa estable en calor procedent del *Thermus aquaticus* la qual va permetre no haver d'afegir de nou l'enzim en cada cicle (Saiki et al., 1988). El procés de traspassar la reacció a tres banys a diferents temperatures per tal de donar-se la desnaturalització, hibridació i extensió, es va automatitzar amb l'aparició dels termocicladors. Aquests consisteixen en recipients metàl·lics on s'introdueixen els tubs de microcentrífuga que contenen la reacció. Inicialment els cicles eren de 2 a 8 min, fins a arribar a PCR ràpides amb cicles inferiors a 1 min. Simultàniament es va desenvolupar un sistema basat en la utilització de tubs capil·lars de vidre. Aquests augmenten la superfície de reacció, i permeten el control de la temperatura per aire (Wittwer et al., 1989). La disminució del temps de cicle i la millora en el control de la temperatura augmenten l'especificitat de la PCR (Wittwer i Garling, 1991). Al basar-se en una amplificació, el major problema del mètode de PCR és la contaminació. A més, la PCR no és quantitativa, fet que condiciona la interpretació per exemple en estudis de malaltia residual mínima. Aquestes limitacions s'anul·len al utilitzar la tècnica de PCR quantitativa a temps real, on la reacció es desenvolupa dins un sistema tancat i on la quantificació del producte s'analitza de manera continuada al llarg de la reacció.

Per a la identificació de mutacions en una seqüència determinada es poden utilitzar tècniques de detecció a l'atzar, o tècniques més dirigides en el

cas que la mutació sigui coneguda. Dins el primer grup trobem l'anàlisi de RFLP, la qual detecta canvis de nucleòtids que afecten a una diana de restricció. L'electroforesi en gel és també un sistema per identificar canvis d'un sol nucleòtid. El sistema es basa en crear condicions especials de desnaturalització o de gradient les quals afecten a l'estructura secundària de l'ADN. Exemples d'aquest sistema són la tècnica de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) i de SSCP (*Single Strand Conformation Polymorphism*). Dins el segon grup s'inclouen tècniques com la PCR-SSO (*Sequence Specific Oligonucleotide*), la qual detecta canvis de nucleòtid entre una sonda marcada al.llel específica i el producte de PCR immobilitzat en una membrana sota condicions d'hibridació astringents. L'ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*) és un mètode que detecta polimorfismes de cadena si l'extrem 3' del *primer* abraça la variació. Finalment destacar la tècnica OLA (*Oligonucleotide Ligation Assay*), en la qual s'utilitzen dues sondes lliures que s'hibriden sobre el producte de PCR desnaturalitzat, de tal manera que si hi ha complementarietat un enzim lligasa unirà les dues sondes, mentre que si hi ha una variació de seqüència a 3', l'enzim no actuarà.

El pas definitiu en la identificació de mutacions és la seqüenciació. La seqüenciació ens permet conèixer l'origen de la variació en el gen que s'ha identificat com a mutat al aplicar les tècniques esmentades anteriorment.

b) Aplicació

Les tècniques de Southern-blot i de PCR s'apliquen per la detecció d'alteracions cromosòmiques d'importància diagnòstica. El fet que s'hagin d'utilitzar sondes o *primers* específics fa que aquestes tècniques s'utilitzin majoritàriament per la detecció dels reordenaments més estudiats i específics de LMA. El Southern-blot és una tècnica útil per a la detecció de translocacions de certes regions cromosòmiques que presenten diferents punts alternatius d'unió (*partner*). Per exemple, aquesta tècnica es continua aplicant en el diagnòstic de la LMA per la detecció del reordenament de la regió 11q23, ja que s'han descrit més de 40 *partners* diferents del gen *MLL*.

Com que per PCR no es poden combinar simultàniament l'amplificació d'aquest nombre tant elevat de seqüències serà més indicat la visualització del patró de bandes de gen reordenat aplicant el mètode de Southern-blot. D'altra banda, en el diagnòstic de la LMA la PCR s'utilitza per estudiar els gens de fusió d'un reordenament cromosòmic observat prèviament per citogenètica convencional. Malgrat tot, a causa de la introducció constant de nous avenços de la pròpia PCR i les seves modificacions, aquestes tècniques van quedant progressivament més en desús (veure 1.3.2). Destacar però, que serà encara preferible utilitzar la PCR qualitativa enlloc de la quantitativa quan les característiques de l'alteració genètica impliqui dissenyar uns *primers* per una seqüència relativament llarga. Aquest fet es deu a que la PCR quantitativa és només adequada per obtenir productes de PCR inferiors a les 300 kb.

1.3.2 Mètodes d'estudi d'expressió

1.3.2.1 Transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa a temps real

a) Principi del mètode

L'àcid ribonucleic (ARN) cel·lular s'analitza per PCR, un cop transcrit inversament (RT) a ADN complementari (cADN) (McCulloch et al., 1995). Convencionalment l'anàlisi del producte de PCR és un pas posterior a l'amplificació, el qual es realitza en un gel d'electroforesis i on s'avalua la grandària de banda i la puresa. L'estratègia d'analitzar el producte de PCR durant l'amplificació, anomenada PCR a temps real, redueix el temps d'assaig i risc de contaminació al donar-se en un sistema tancat. Aquest seguiment es realitza per fluorescència, i es combina la utilització de tubs de vidre capil·lars. Els capil·lars fan la funció de cubetes per l'anàlisi de fluorescència i a la vegada permeten ràpids cicles de PCR. Des del punt de vista tècnic, existeixen tres estratègies principals d'anàlisi de la fluorescència

que es diferencien en el mètode per detectar el producte de PCR: els que utilitzen sondes TaqMan, els basats en la hibridació de dues sondes de seqüència específica, i els que utilitzen un compost intercalant que s'uneix directament a la doble cadena d'ADN (Meuer et al., 2001). Encara que inicialment es va utilitzar el bromur d'etidi com a molècula intercalant de doble cadena (Higuchi et al., 1992), aquest ha estat substituït per altres molècules fluorescents, com el SYBR Green I, el qual presenta major sensibilitat i un espectre d'emissió més convenient (Wittwer et al., 1997).

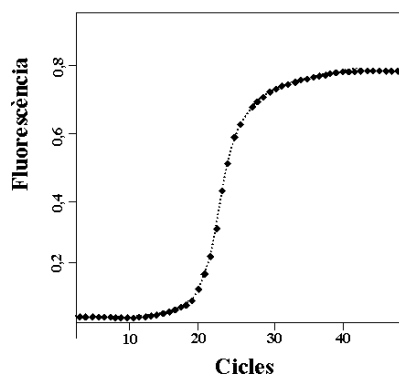


Figura 7. Corba d'amplificació de la reacció en cadena de la polimerasa al representar el nombre de cicles respecte la intensitat de fluorescència. La corba té tres fases, la inicial, l'exponencial i la plana.

El seguiment de la fluorescència a cada cicle permet la quantificació del nombre inicial de còpies presents a la mostra [per revisió veure (Meuer et al., 2001; Gloffke, 2003)]. Si es representa els cicles de PCR respecte fluorescència s'obté una corba amb tres fases, inicial, exponencial i plana (Fig. 7). Per l'anàlisi quantitativa de les dades només s'utilitzen els valors de la fase exponencial, anomenada fase logarítmica-lineal, ja que es pot representar de manera lineal després de ser transformada logarítmicament. Existeixen dos mètodes quantitius diferents, el mètode dels punts coincidents (*Fit Points Method*), i el mètode de la segona derivativa màxima (*Second Derivative Maximum Method*), els quals tots utilitzen les dades d'aquesta fase ja que és la única que permet assumir que la reacció de PCR

per totes les mostres es dona sota condicions comparables. Ambdós mètodes utilitzen una recta estàndard de referència, on els punts són quantificacions conegudes. Per construir la recta de referència es necessita fixar un valor llindar de fluorescència on el senyal sigui major que el soroll de fons (*background*) (Fig. 8). Els dos mètodes quantitius esmentats anteriorment difereixen en el procés de determinació del llindar de fluorescència.

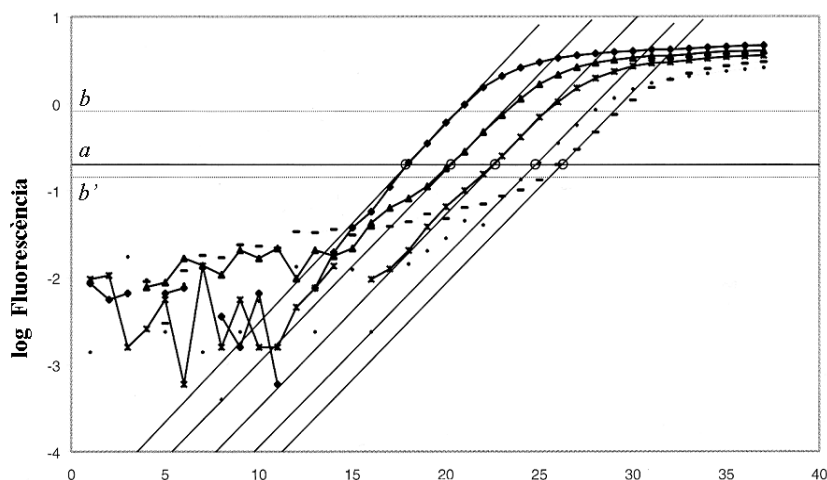


Figura 8. Per formar la recta de referència en aquest cas s'utilitzen cinc corbes d'amplificació on es coneix la concentració inicial de cada una d'elles. S'ha de fixar el valor llindar de fluorescència (*a*), de tal manera que sigui major al senyal de soroll de fons. Diversos valors de llindar (entre *b* i *b'*) són acceptables (Meuer et al., 2001).

Per comparar valors de fluorescència de diferents mostres i d'estàndards s'utilitzen els punts d'encreuament (*crossing points*). Els punts d'encreuament representen el número de cicles on el nivell de fluorescència de totes les mostres és el mateix. Aquest punt d'encreuament depèn de la quantitat inicial de la seqüència a la mostra: més quantitat de seqüència, més quantitat per començar la reacció i menys cicles per arribar al valor específic de fluorescència. Aquest principi és la base de l'anàlisi quantitatiu. Per calcular la concentració d'una seqüència en una mostra, es representa la recta estàndard en nombre de cicles (o punts d'encreuament) respecte al logaritme de la concentració de la seqüència en cada estàndard (Fig. 9, detall). Aquesta representació dona una recta amb equació

$$n = (-1/\log E) \cdot \log N_0 + (\log N_n/\log E)$$

on N_n és la concentració en el punt de encreuament n , N_0 és la concentració inicial, i E és l'eficiència de la reacció. A partir de la regressió lineal s'extrapola el valor de punt de encreuament de qualsevol mostra (n) obtenint així el seu valor de concentració inicial (N_0). Cal destacar, que el valor llindar escollit influeix en l'error d'extrapolació a la recta estàndard de referència (Fig. 9).

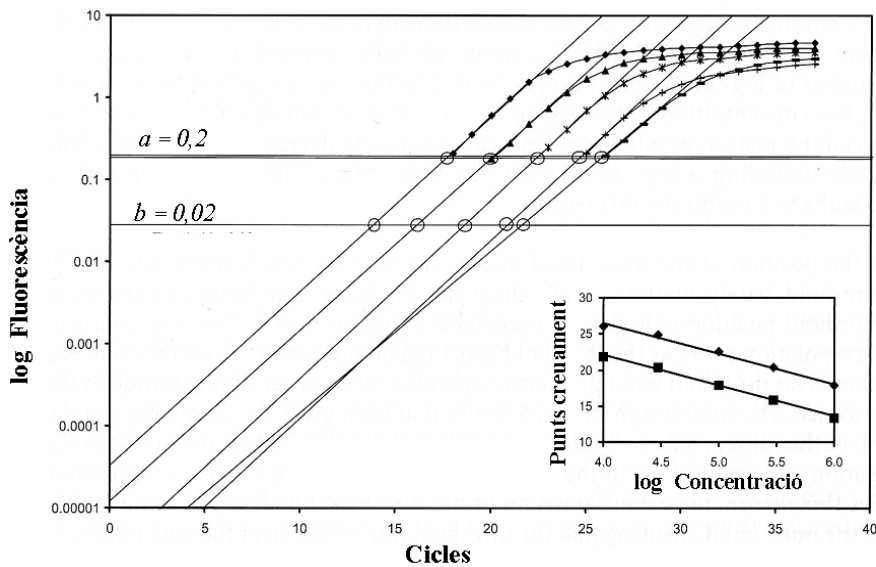


Figura 9. Es poden escollir diversos valors de fluorescència per fixar el llindar. Utilitzant a o b , obtenim dues rectes estàndards amb la mateixa eficiència de reacció (o pendent). No obstant, al disminuir el valor llindar, separant-lo dels valors de fluorescència i acostant-lo als valors de soroll de fons (veure valor de llindar de fluorescència b respecte a), s'augmenta l'error al extrapolar les dades a la recta estàndard (o es disminueix el punt de tall a l'eix Y) (Meuer et al., 2001).

La corba de fusió (*melting curve*) es produeix al acabar la PCR quan es mesura la fluorescència de les mostres al augmentar la temperatura. Segons les propietats de l'ADN, al augmentar la temperatura la fluorescència disminueix, ja que al separar-se les dobles cadenes les molècules de SYBR Green I queden lliures. L'objectiu de l'anàlisi de la corba de fusió és determinar la temperatura de fusió característica d'una molècula d'ADN

determinada. Petites variacions en la seqüència d'ADN, donen temperatures de fusió diferents. Aquest anàlisi aporta informació complementària a la PCR que és útil per la identificació de producte, de productes no desitjats (com dímers de *primers*) i per predir mutacions.

b) Aplicació

Per estudis d'expressió, la RT-PCR quantitativa (QRT-PCR) a temps real representa la tècnica quantitativa disponible més sensible per determinar canvis de concentracions d'ARN missatger (mARN) per exemple, en resposta a agents químics, enfront diferents tipus de teixits cel·lulars, entre moltes d'altres aplicacions. Tanmateix, ofereix la possibilitat de quantificar nivells d'expressió d'una manera ràpida i reproducible. Aquestes característiques fan de la QRT-PCR a temps real la tècnica eficaç per l'extensió de l'anàlisi d'expressió obtingut a partir dels estudis per ADN array. Els treballs publicats on es comparen les dues tecnologies assenyalen en general una bona correlació de resultats (Rajeevan et al., 2001; Virtaneva et al., 2001; Niini et al., 2002). No obstant, en casos concrets és possible observar una certa fluctuació a causa principalment de la major sensibilitat de la QRT-PCR. Aquesta discordança de resultats s'accentuaria en casos que presentessin nivells baixos d'expressió.

En estudis diagnòstics, la RT-PCR qualitativa i quantitativa, també s'utilitzen per estudiar la presència d'una translocació cromosòmica específica quan no es pot realitzar a nivell d'ADN, a causa per exemple, d'una elevada variància en els punts de trencament de la translocació entre pacients, que poden ser de 10 kb o més. Aquest fet suposaria haver de dissenyar PCR específiques per cada cas per tal d'assegurar la sensibilitat de detecció de la translocació. En moltes neoplàsies, especialment en les hematològiques, el gen de fusió es transcriu com a mARN, el qual es pot amplificar per RT-PCR. Actualment s'ha desenvolupat una RT-PCR anomenada múltiple-RT-PCR, la qual permet la detecció simultània de 29 translocacions diferents realitzant vuit reaccions de PCR, amb la mateixa

sensibilitat que una RT-PCR simple (Pallisgaard et al, 1998). Aquest tipus d'anàlisi suposa poder dissenyar múltiple-RT-PCR específiques de tumor, incloent en cada cas els primers per la detecció dels reordenaments cromosòmics amb importància pel seu diagnòstic.

1.3.2.2 *ADN arrays*

a) Principis del mètode i tipus d'arrays

La seqüenciació del genoma humà recentment completada (Human Genome Project, <http://www.genome.gov>) va estimar en el moment de la seva publicació en 31.000 el nombre de gens codificants per proteïnes i va permetre caracteritzar les seqüències de 22.000 a 26.000 d'aquests (Baltimore, 2001; Venter et al., 2001). L'interès de la seqüència del genoma en el camp de la biomedicina ha estat l'oportunitat de dissenyar noves tècniques per l'estudi de la funció de nous gens i fer possible la identificació del seu paper en el desenvolupament de malalties. Una de les tècniques pioneres és l'ADN array, la qual permet estudiar l'expressió simultània de centenars a milers de gens en un sol experiment (Schena et al., 1995). El principi del mètode és l'estudi de l'expressió de gens per un canvi en la quantitat del mARN a la cèl.lula, basant-se en la propietat que posseeix una doble cadena d'ADN d'hibridar amb una de complementària. L'ADN array està format per diferents cADN d'aproximadament 200 a 400 parells de bases (pb) amplificats per PCR i immobilitzats sistemàticament sobre un suport sòlid, com vidre o filtres de niló. L'amplificació es realitza en regions dels cADN fora de la regió poli-A, d'elements repetitius, o de seqüències conservades, evitant així hibridacions no específiques. La sonda serà ARN extret a partir de la mostra d'interès, podent-se utilitzar alternativament tant ARN total (Schena et al., 1995), com poli-A⁺ mARN (Lashkari et al., 1997) o fraccions polisomals de poli-A⁺ mARN (Diehn et al., 2000). Per assegurar transcriure l'ARN extret en cADN òptims per la hibridació (500 pb), és important haver comprovat la qualitat de l'ARN.

Quan l'array és un filtre de niló, l'array s'hibrida junt amb la mostra de cADN marcada radioactivament amb P^{32} o P^{33} (Giege et al., 1998), i que representa la barreja de tots els mARN que s'expressen en el moment que s'ha realitzat l'extracció de la mostra. Només els cADN marcats complementaris a les seqüències de l'array s'hibridaran. La quantitat relativa dels gens es determina al mesurar la intensitat del marcatge a l'array. El valor de la intensitat de cada gen en un experiment es compara a continuació amb els valors obtinguts pels mateixos gens en altres experiments, obtenint la relació (*ratio*) d'expressió gènica entre condicions experimentals diferents (Fig. 10, dreta). Quan l'array és en suport de vidre, aquest es cohibrida simultàniament amb cADN test o tumoral, marcat amb fluorocrom vermell, i amb cADN de referència o normal, marcat amb fluorocrom verd (Shalon et al., 1996). Els fluorocroms més utilitzats, tant per raons històriques com per la seva estabilitat i separació d'espectres, són els Cy3™ i Cy5™ (DeRisi et al., 1997). Altres combinacions possibles són fluoresceïna i lissamina (Shena et al., 1995), o Cy3™ i rodamina (DeRisi et al., 1996). Seguint el mateix principi que la tècnica de CGH, els dos cADN marcats s'hibriden competitiuament sobre les seqüències presents a l'array. Per aquest sistema, les diferències d'expressió entre la mostra de referència i la test es detecten per la relació (*ratio*) de fluorescència entre verd i vermell mesurada per cada gen (Fig. 10, centre).

L'avantatge principal dels ADN arrays en vidre respecte els de filtre és que permeten incorporar més quantitat de gens per superfície (Alizadeh et al., 2001), fet que els fa anomenar també microarrays. Al treballar amb fluorescència disminueix el temps de realització de l'assaig en comparació al temps d'exposició que requereix el marcatge radioactiu, i disminueix el risc que comporta l'experimentació amb radioactivitat (Cox, 2001). No obstant, hibridacions amb marcatge radioactiu donen un nivell de soroll de fons inferior, que permet detectar nivells d'expressió d'entre 10 a 20 còpies de mARN per cèl.lula, o un nivell d'abundància del 0,0025 %. A més, la quantitat d'ARN total necessari per realitzar l'assaig en cADN array en filtre

és menor (2 µg per mostra i hibridació) en comparació als de vidre (que en requereixen uns 50 µg).

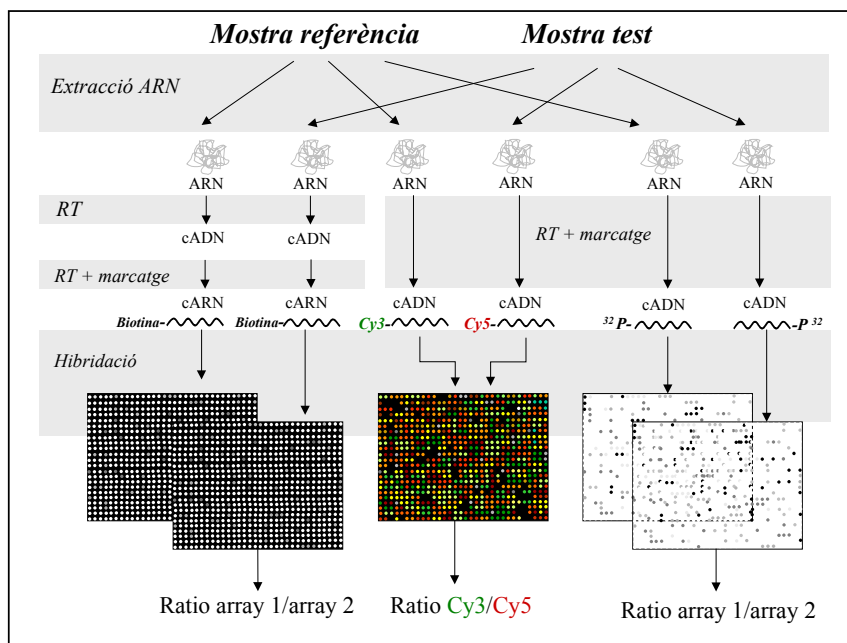


Figura 10. Esquema de la tècnica ADN array segons les diferents variants: dreta, cADN en filtre; centre, cADN en vidre; esquerra, oligonucleòtid array en vidre. RT, transcripció inversa

Alternativament els arrays en vidre poden estar formats per oligonucleòtids enlloc de cADN. Aquests arrays, també anomenats ADN xips, contenen seqüències curtes d'aproximadament 20 pb que han estat sintèticament sintetitzades sobre la superfície del propi array (Lipshutz et al, 1999). L'avantatge principal d'aquest sistema és que permet augmentar significativament la densitat dels gens a estudiar. Com que els oligonucleòtids són seqüències curtes que podrien ser complementàries a més d'un gen, l'especificitat gènica s'aconsegueix incloent diversos oligonucleòtids per gen, reduint així les hibridacions creuades (Wu, 2001). En el protocol experimental, els cADN de la mostra de referència i de la test es transcriuen a cARN, procés que amplifica la població inicial de mRNA present a la mostra. A continuació s'hibriden en arrays diferents, i l'anàlisi

es realitza en base al marcatge d'un sol fluorocrom (Fig. 10, esquerra). Un dels desavantatges de l'oligonucleòtid array en relació als altres és el cost que suposa, a causa del seu sistema de producció (Deyholos i Galbraith, 2001). A més, la utilització d'oligonucleòtids implica conèixer la seqüència de tots els gens que s'inclouen a l'array, cosa que no passa quan s'utilitzen cADN. D'altra banda, aquest sistema ofereix una major especificitat ja que es redueix la possibilitat d'hibridacions creuades (Ramaswamy i Golub, 2002). Una avantatge més en comparació als cADN arrays en vidre és que es necessita menor quantitat d'ARN total per realitzar l'assaig (uns 10 µg per mostra i hibridació).

Comercialment existeix una gran varietat d'array que poden incloure gens relacionats amb càncer, gens específics de teixits o gens associats tant a funcions cel·lulars com a vies de senyalització concretes, entre d'altres opcions. Alternativament existeix la possibilitat de construir un array a mida, o incloure la totalitat de les seqüències conegudes per tal d'analitzar el genoma sencer.

L'anàlisi simultani de l'expressió gènica d'un elevat nombre de gens és l'avantatge principal de la tècnica d'ADN array en relació a altres tècniques d'estudi d'expressió existents, com la RT-PCR, l'ARN blot (Alwine et al., 1977), o fins i tot l'anàlisi serial d'expressió gènica (SAGE) (Velculescu et al., 1995). No obstant, en relació per exemple a la QRT-PCR, l'ADN array és una tècnica amb menor sensibilitat i precisió en la quantificació de l'expressió. Els resultats de l'ADN array es consideren semiquantitatius, pel fet que la mateixa concentració d'ARN pot donar senyals d'hibridació diferents, que implica donar una aproximació de la intensitat amb un rang de 2 a 5 ordres de variació. És possible però precisar l'estimació de la quantitat d'ARN comparant el valor d'intensitat obtingut amb el valor d'un gen que es coneix prèviament la concentració. Aquests controls positius són gens *housekeeping* que estan inclosos a l'array. No obstant, per tal d'obtenir una valoració quantitativa es calcuen les intensitats dels cADN utilitzant un programa informàtic específic segons la imatge obtinguda en l'escàner. Una

limitació inherent al mètode, és que l'anàlisi de l'expressió per ADN array no detecta variacions de *splicing* ni modificacions posttranscripcionals, les quals afecten també a l'expressió dels gens.

b) Anàlisi de les dades

L'expressió de cada gen en l'ADN array normalment s'analitza per duplicat, comparant l'expressió del gen a la mostra d'interès respecte l'expressió a la mostra de referència (Fig. 9). Les intensitats de senyal dels gens a cada mostra s'han de normalitzar, escalar i estandarditzar per tal d'eliminar possibles variacions d'intensitat que no són degudes a canvis en l'expressió o presència d'ARN a la mostra. Aquestes variacions poden ser provocades per diferències en la quantitat de cADN donades per variacions d'eficiència en la reacció al preparar la sonda, o per variacions d'eficiència durant el marcatge, hibridació o rentats posthibridació. Una estratègia àmpliament utilitzada és la normalització per gens *housekeeping* (deRisi et al., 1996), els quals són gens que produeixen mARN necessari pel metabolisme basal de la cèl.lula. Contràriament als gens que s'analitzen a l'array, els quals estan sota control transcripcional, els nivells dels gens *housekeeping* es manté constant en diferents teixits, cèl.lules, estats de desenvolupament o patologies (Adams et al., 1993). La normalització de les dades es realitza dividint la intensitat relativa de cada gen per la intensitat del gen *housekeeping*, tant a la mostra test com a la mostra de referència. Un mètode alternatiu per la normalització de les dades és el basat en la mitjana de la intensitat de tots els cADN en l'array, o d'un grup de cADN que representen el mateix gen, on s'assumeix que la quantitat de cADN test que hibrida és la mateixa que en la mostra de referència, i per tant la intensitat total hauria de ser semblant (Tefferi et al., 2002). En canvi, el sistema de normalització en els oligonucleòtids arrays és completament diferent, ja que cada seqüència en l'array va acompanyada d'una seqüència germana que difereix en una base nucleòtica, i la diferència d'intensitat entre aquestes s'utilitzarà per ajustar els valors d'intensitat d'hibridació (Lipshutz et al., 1999). Després de la normalització, s'obté la relació (*ratio*) d'expressió de

cada gen dividint el valor normalitzat del gen a la mostra test per el mateix valor a la mostra de referència. A continuació, el valor resultant es transforma logàritmicament per tal que l'expressió gènica s'aproximi a una distribució normal. Aquesta transformació és important per poder realitzar l'anàlisi estadística de les dades mitjançant tests paramètrics.

L'objectiu de la majoria dels experiments d'ADN array és correlacionar canvis en l'expressió gènica sota condicions diferents. En aquest cas, s'analitza l'expressió d'un elevat nombre de gens diferents en llargues sèries de mostres, per la qual s'obté una gran quantitat d'informació. Pel tractament d'aquesta informació és imprescindible la utilització de programes informàtics específics i de mètodes estadístics potents, dissenyats des del camp de la bioinformàtica.

El mètode més senzill per l'anàlisi de l'expressió a partir de la informació obtinguda en l'array és la identificació de gens sobre- o sotaexpressats en resposta a les condicions experimentals. El principi del mètode es basa en que els gens que es troben molt regulats en resposta a un estímul concret poden tenir una funció important en aquella funció cel·lular. Això permet correlacionar gens amb funcions cel·lulars concretes. No obstant, una limitació del mètode és que requereix que s'estableixi *a priori* els límits de significació pels valors de relació (*ratio*) d'expressió (Deyholos i Galbraith, 2001). L'elecció dels límits influeix directament en el resultat. Per una banda, valors elevats poden ignorar gens rellevants, mentre que valors baixos incrementarien l'aparició de falsos positius. No obstant, tot i que es poden utilitzar criteris estadístics (ex. tests *T* o *F*) o biològics, a la pràctica, canvis en el nivell d'expressió superiors a 2 ordres es consideren significatius (DeRisi et al., 1996). Aplicant els límits de significació s'obté la llista dels gens d'interès.

Un mètode addicional per l'anàlisi de l'expressió obtinguda per cADN array és l'agrupació (*clustering*) dels gens d'interès segons perfils d'expressió propers, on s'assumeix que la coexpressió de diferents gens implica la participació en una funció biològica semblant. Segons el mateix

principi, l'agrupació de diverses mostres amb perfils d'expressió gènica propers permet la identificació de diferents categories de mostres. S'han desenvolupat diversos algorismes estadístics per l'anàlisi de patrons de coexpressió segons l'agrupació de gens o de mostres [per revisió veure (Dopazo et al., 2001; Tefferi et al., 2002)] (Fig. 11a). Bàsicament les anàlisis poden ser dirigides o no dirigides, segons si estan o no basades en informació prèvia. Les anàlisis dirigides permeten assignar gens a classes funcionals o malalties dins de categories predefinides, podent definir així, diagnòstics, pronòstics o tractaments associats. Les anàlisis no dirigides s'utilitzen per la identificació de noves agrupacions, i poden ser jeràrquiques o no jeràrquiques segons si s'especifica o no la relació entre els diferents tipus d'agrupacions. L'anàlisi per agrupacions no jeràrquiques requereix que es predeterminin el nombre d'agrupacions i els elements d'aquestes, com en l'anàlisi d'agrupacions per κ -mitjana (Tavazoie et al., 1999), l'anàlisi per mapes autoorganitzadors (SOM) (Tamayo et al., 1999), o en l'anàlisi de component principal (Hilsenbeck et al., 1999). D'altra banda, en l'anàlisi d'agrupacions no dirigides i jeràrquiques, s'especifica la relació entre les agrupacions mitjançant la representació d'un dendograma. Segons el sistema que s'utilitzi per establir la relació, l'anàlisi d'agrupacions no dirigides i jeràrquiques s'anomena aglomerativa o divisiva. En les aglomeratives, les agrupacions es comencen des d'un element establint les relacions fins a obtenir grups majors, mentre que en les divisives, inicialment tenim el grup d'elements i aquest es va dividint fins a obtenir les diferents agrupacions.

El mètode més utilitzat és l'anàlisi no dirigida, jeràrquica i aglomerativa (Eisen et al., 1998). En una gràfica (Fig. 11b), els gens es localitzen a l'eix de les Y i les mostres a l'eix de les X . Els diferents elements de cada eix estan organitzats segons semblança, per exemple, des de gens sobreexpressats fins a gens sotaexpressats en l'eix Y , i mostres amb perfils d'expressió gènica semblant relacionades per dendogrames a l'eix X . La gràfica és un esquema tabular on cada columna representa una mostra, i on cada fila representa un gen. El valor de relació (*ratio*) d'expressió d'un gen en una

mostra s'indica per la intensitat de color de cada requadre, segons una escala que va des de vermell brillant (màxim valor de sobreexpressió), passant per negre (mitjana d'expressió), fins a verd brillant (màxim valor de sotaexpressió). En el dendograma, les branques uneixen mostres properes, i la llargada de les branques indica al grau de semblança. Així, branques curtes relacionen mostres molt properes, mentre que branques llargues indicaran un grau inferior de semblança entre les mostres.

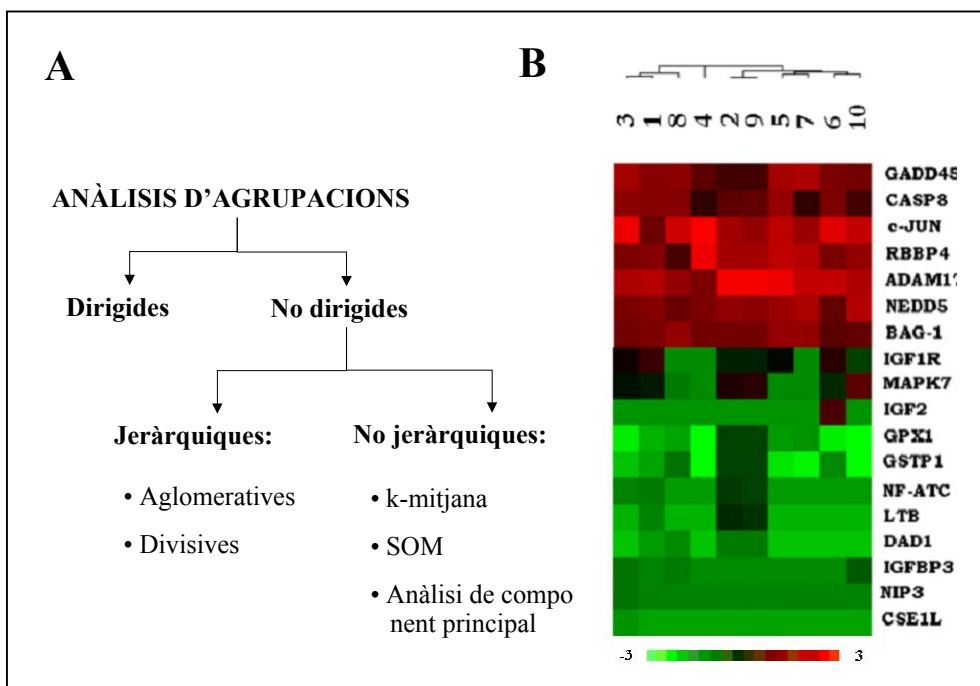


Figura 11. a) Tipus d'anàlisi d'agrupacions; b) Gràfica d'anàlisi no dirigida jeràrquica i aglomerativa

c) Aplicació

La tècnica d'ADN array permet, amb un únic experiment d'hibridació, l'estudi de l'expressió d'un gran nombre de gens d'interès pel desenvolupament i progressió tumoral. Les aplicacions del mètode en recerca bàsica del càncer són diverses [per revisió veure (Marx, 2000)]. La comparació de l'expressió gènica cel.lular en diferents condicions experimentals permet la caracterització de nous gens (Fuller et al., 1999;

Hughes et al., 2000), correlacionar gens amb funcions cel·lulars concretes (Tamayo et al., 1999), o la identificació d'elements reguladors de patrons d'expressió concretes (Voehringer et al., 2000).

L'anàlisi d'ADN array s'utilitza també per la detecció de gens o perfils d'expressió associats a l'alteració d'una via de senyalització cel·lular concreta. Per exemple, s'han identificat nous gens regulats a través de la via de senyalització de *P53*, els quals s'ha vist que presenten una funció important en induir que la cèl·lula es mantingui en cicle cel·lular (Zhao et al., 2000).

Les aplicacions s'extenen en la investigació del tractament del càncer. En aquest camp, la identificació d'alteracions en l'expressió gènica en un determinat teixit tumoral facilita la identificació de gens codificants de proteïnes potencials a ser dianes terapèutiques (Wang et al., 2003). Tanmateix, és possible estudiar l'efecte del tractament a nivell transcripcional, fet que condiona la detecció tant de gens marcadors amb sensibilitat terapèutica, com de gens associats a resistència al tractament (Zembutsu et al., 2002). En aquest sentit, la informació aportada per la tècnica d'ADN array potencialment podria ajudar al disseny de nous tractaments (Bumol i Watanabe, 2001), els quals passarien a ser més individualitzats, augmentant així la seva eficiència terapèutica.

Tanmateix, la caracterització de perfils d'expressió s'utilitza per realitzar classificació tumoral. Així, l'aplicació de la tècnica d'ADN array permet discriminar clarament subtipus de càncers diferents (Golub et al., 1999), essent possible la identificació de nous subtipus tumorals (Alizadeh et al., 2000), facilitant així un coneixement més precís de la malaltia. Concretament, en el primer estudi on es demostrava l'aplicació de l'ADN array en la classificació tumoral, va ser possible diferenciar els patrons d'expressió de pacients de LMA respecte els de LLA (Golub et al., 1999). En treballs posteriors s'ha aplicat per caracteritzar perfils d'expressió de pacients amb síndrome mielodisplàsic (SMD) respecte els de LMA

(Miyazato et al., 2001), i més recentment per la diferenciació de pacients pediàtrics amb LMA i LLA (Moos et al., 2002).

La correlació de perfils d'expressió s'ha utilitzat també per estudiar les diferències a nivell transcripcional entre subgrups tumorals coneguts. En aquest sentit, en LMA s'han trobat resultats interessants al comparar pacients que presentaven al diagnòstic cariotips normals i els que eren portadors de trisomia 8 (Virtaneva et al., 2001). De manera semblant, la correlació dels perfils d'expressió de diversos pacients de leucèmia aguda amb reordenament del gen *MLL* suggereix la consideració d'aquests dins un subtipus leucèmic diferent a la resta de leucèmies agudes (Armstrong et al., 2002). Tanmateix, a partir de la informació obtinguda per ADN array ha estat possible segregar subgrups de pacients amb diferents alteracions cromosòmiques específiques de LMA (Schoch et al., 2002b). En aquest sentit, altres treballs han ampliat l'estudi de les diferències en el perfil d'expressió donades per la presència d'una alteració específica. Així, per tal d'investigar el paper de l'alteració cromosòmica concreta en el desenvolupament de la leucèmia, es comparen els resultats d'ADN array entre línies cel.lulars que expressen o no l'alteració, obtenint informació dels programes transcripcionals que s'activen (Johansen et al., 2001; Mizuki et al., 2003; Shimada et al., 2002).

1.4 Objectius

- Detectar, mitjançant les tècniques de múltiple-FISH de 24 colors i la FISH dual, alteracions genètiques no identificades prèviament per anàlisi citogenètica convencional en els subgrups de pacients de LMA amb:
 - $inv(16)(p13q22)$ o $t(16;16)(p13;q22)$
 - Cariotip normal
 - Duplicació parcial en tàndem del gen *MLL*.
- Aplicar la tècnica de CGH per la detecció de regions amb guanys i pèrdues de material genètic en la LMA:
 - Identificar alteracions genètiques no identificades prèviament per anàlisi citogenètica convencional
 - En el subgrup de pacients amb cariotip anòmal, es compararan dels resultats obtinguts mitjançant CGH i citogenètica convencional, i es complementarà l'estudi mitjançant FISH o múltiple-FISH
- Estudiar perfils d'expressió, aplicant la tècnica de cADN array, de gens relacionats amb el mecanisme d'apoptosi en pacients de LMA:
 - Relacionar els perfils genètics d'expressió amb disfunció de les vies de senyalització de l'apoptosi.
 - Comprovar els nivells d'expressió gènica obtinguts mitjançant les tècniques de cADN array i QRT-PCR a temps real.
- Anàlisi d'expressió, mitjançant la tècnica de QRT-PCR a temps real, dels gens *HOXA9*, *DEK*, *CBL* i *CSF1R* relacionats amb la LMA:
 - Relacionar els nivells d'expressió genètica amb diferents paràmetres biològics, com edat, immunofenotip, citogenètica, subtipus morfològic o percentatge de blastes a medul·la òssia.
 - Investigar la possible implicació de l'expressió dels gens estudiats amb el pronòstic dels pacients.

2 Material i Mètodes

2.1 Pacients

Les mostres de MO i SP estudiades corresponen a 210 pacients afectes de LMA *de novo* en el moment del diagnòstic. Les dades clínic-biològiques i els mètodes utilitzats es resumeixen a la Taula 3.

Taula 3. Dades dels pacients inclosos i mètodes utilitzats en cada estudi

<i>Estudi</i>	<i>Mètodes</i>	<i># casos</i>	<i>Edat Mitjana (anys)</i>	<i>Sexe (H/D)</i>	<i>Subtipus FAB</i>
I	ACC FISH Southern-blot RT-PCR	2	42, 58	1/1	M1, M4
II	ACC FISH	40	17-75 (41)	23/17	M2 (5 %), M4 (95 %)
III	ACC FISH M-FISH	40	17-60 (43)	21/19	M1 (25 %), M2 (22,5 %), M4 (10 %), M5 (40 %), M6 (2,5 %)
IV	ACC CGH FISH M-FISH	128	17-60 (42)	69/59	M0 (4,7 %), M1 (21,1 %), M2 (19,5 %), M4 (21,9 %), M5 (29,7 %), M6 (0,8 %), LMA-inc (2,4 %)
V	ADN array QRT-PCR	15	1-60 (43)	6/9	M1 (13,3 %), M2 (26,7 %), M4 (13,3 %), M5 (46,7 %)
VI	QRT-PCR Anàlisi estadística	41	21-72 (50)	18/23	M0 (2,4 %), M1 (12,2 %), M2 (39 %), M3 (4,9 %), M4 (19,5 %), M5 (22 %)

H, home; D, dona; ACC, anàlisi citogenètica convencional; FISH, hibridació *in situ* fluorescent; M-FISH, múltiple-FISH; CGH, hibridació genòmica comparada; QRT-PCR, transcripció inversa-reacció en cadena de la polimerasa quantitativa; inc, inclassificable segons subtipus FAB; I a VI, estudis presentats en la memòria

Les LMA es van diagnosticar seguint la classificació morfològica del grup cooperatiu FAB utilitzant el criteri de >20 % de blastes de la classificació WHO. Algunes de les mostres es van incloure en més d'un

estudi. La majoria de pacients es van incloure al protocol de tractament LAM-99 del grup cooperatiu CETLAM, format per diferents Hospitals de l'Estat, excepte un cas inclòs en l'Estudi I el qual va ser diagnosticat a la Unitat de Trasplantament de Medul·la Òssia i Hematologia de la Universitat de Perugia a Itàlia, i 27 pacients corresponents a l'Estudi VI que van ser diagnosticats al Departament de Medicina de l'Hospital Central Universitari de Hèlsinki a Finlàndia.

En l'Estudi I es van analitzar retrospectivament mitjançant FISH dues mostres de MO de pacients adults que presentaven al diagnòstic DPT del gen *MLL*. El primer pacient era un home de 58 anys que va ser com una LMA-M4, i el segon cas corresponia a una dona de 48 anys amb una LMA-M1.

En l'estudi II es van analitzar retrospectivament mitjançant FISH 40 mostres de MO de pacients adults que presentaven un cariotip amb $inv(16)(p13q22)$ o $t(16;16)(p13;q22)$. Les mostres provenien de 23 homes i 17 dones. L'edat mitja dels pacients en el moment del diagnòstic era de 41 anys, amb un rang de 15 a 75. La majoria de LMA van ser classificades com a M4 (95 %), mentre que la resta corresponien al subtipus M2 (5 %).

En l'estudi III es van analitzar retrospectivament mitjançant M-FISH i FISH 40 mostres de MO de pacients adults que presentaven un cariotip normal. L'edat dels pacients inclosos era de 17 a 60 anys (mitjana de 43). Les mostres incloses provenien de 21 homes i 19 dones diagnosticats com a subtipus M1 (25 %), M2 (22,5 %), M4 (10 %), M5 (40 %) i M6 (2,5 %).

En l'estudi IV es van analitzar mitjançant CGH 128 pacients adults diagnosticats des del 16/09/1998 fins el 12/08/02, l'edat mitjana dels quals era de 42 anys en un rang de 17 a 60. La distribució per sexe era de 69 homes respecte 59 dones. Es van classificar en M0 (4,7 %), M1 (21,1 %), M2 (19,5 %), M4 (21,9 %), M5 (29,7 %), M6 (0,8 %), i la resta es van considerar inclassificables (2,4 %). Les mostres estudiades per CGH corresponien a MO (93 %), SP (7 %) i pell (0,8 %).

En l'estudi V, 10 mostres es van estudiar per cADN array i 15 per QRT-PCR a temps real. Els pacients, 6 homes i 9 dones, van ser diagnosticats com

a M1 (13,3 %), M2 (26,7 %), M4 (13,3 %) i M5 (46,7 %). L'edat mitjana de la sèrie era de 43 anys, en un rang de 1 a 60.

En l'estudi VI es van analitzar un total de 41 pacients adults de LMA per QRT-PCR a temps real. L'edat mitjana dels pacients era de 50 anys, entre un rang de 21 a 72. Es van classificar en M0 (2,4 %), M1 (12,2 %), M2 (39 %), M3 (4,9 %), M4 (19,5 %) i M5 (22 %). La sèrie estava formada per un total de 18 homes i 23 dones.

2.2 Mètodes d'estudi genòmic

El processament aplicat a les mostres per tal de realitzar els estudis genòmics queda il·lustrat a la Figura 12.

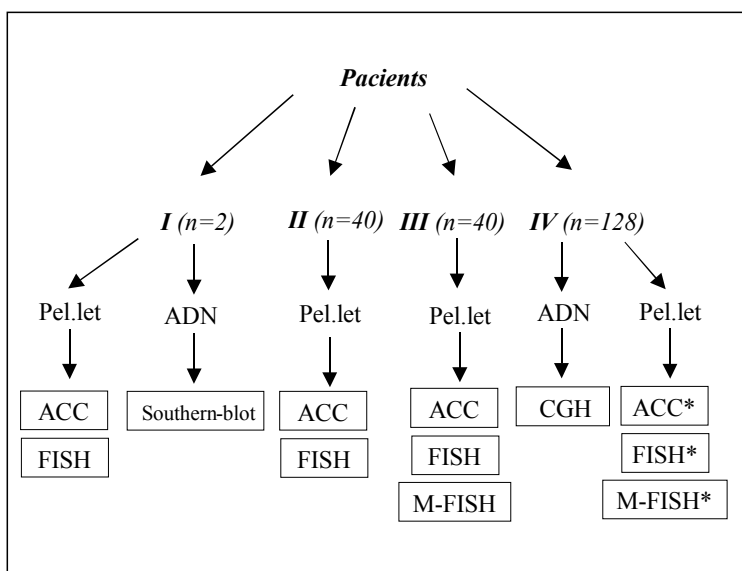


Figura 12. Diagrama on es mostra el tractament de les mostres i els mètodes d'estudi genòmic. *, tècnica no realitzada a totes les mostres

2.2.1 Anàlisi citogenètica convencional (I a IV)

Per l'ACC es va realitzar un cultiu de 24 h sense estimulants, identificació cromosòmica per bandes-G i cariotipatge segons *The International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN 1995).

2.2.2 *Hibridació in situ fluorescent (I a IV)*

Les preparacions amb material cel.lular estès es van deixar a temperatura ambient (TA) durant 24 h pel seu envelliment. En un microscopi de contrast de fases es va comprovar la qualitat de les extensions, i segons el cas, es va realitzar tractament enzimàtic previ a la hibridació (veure protocol M-FISH). Aquest pretractament és essencial per dur a terme la FISH amb sondes no comercials. En casos especials, on interessava treballar sobre les mateixes preparacions utilitzades per l'ACC, les extensions van ser destenyides amb solució de Carnoy (metanol/àcid acètic, 3:1) durant 5 min a TA (Zhu et al., 1993).

a) Emprant sondes comercials

Es van emprar sondes comercials CEP-16, WCP-9, -11, -16p, -18 i 21 (Appligene Oncor-Qbiogene, Illkirch, France), les quals estaven marcades amb nucleòtids deoxiuridina 5' trifosfat (dUTP) conjugats amb fluorocroms d'espectre verd (FITC) o vermell (TexasRed[®]). El protocol seguit va ser el recomanat per la casa comercial:

Les preparacions en desnaturalitzen durant 2 min en 70 % formamida/2x SSC a 72°C, i es deshidraten en la sèrie d'etanols freds al 70 %, 80 % i 95 %. Simultàniament es prepara la sonda, preescalfant-la a 37°C durant 5 min. En el cas de la sondes WCP-16p i WCP-18, el protocol segueix amb la desnaturalització de la sonda a 72°C durant 10 min, temps que és de 5 min per les sondes WCP-11, -21 i CEP-16. A continuació, les sondes WCP es deixen incubant 1 h a 37°C. Seguidament s'apliquen 10 µl de sonda per una àrea de 24x24 mm, i es deixa hibridant en una cambra humida a 37°C durant 12-18 h. Passat aquest temps es procedeix als rentats posthibridació, 5 min en 0,5x SSC a 72°C i de 2 min en 1x PBS a TA, i contratació amb 10 µl de DAPI (0,02 µg/ml en Antifade; Appligene Oncor-Qbiogene) per cubre de 24x60 mm.

Així mateix, es van emprar sondes comercials de LSI-MLL, -CBFB, -D13S25, WCP-11 i TEL-5q, -10q, -11p, -16q (Vysis Inc., Downers Grove,

IL, USA), marcades amb dUTP conjugats amb fluorocroms d'espectre verd (FITC), vermell (TexasRed[®]) o taronja (SpectrumOrange[™]). El protocol seguit en cada cas va ser el recomanat per la casa comercial:

Les preparacions es desnaturalitzen durant 5 min en 70 % formamida/2x SSC a 72°C, i es deshidraten en la sèrie d'etanols freds al 70 %, 85 % i 100 %. Simultàniament, es desnaturalitza a 72°C durant 5 min 1 µl de sonda preparada amb 2 µl d'aigua desionitzada i 7 µl de tampó d'hibridació (Vysis Inc.). Després d'aplicar els 10 µl per una àrea de 24x24 mm, es deixa hibridant en una cambra humida a 37°C durant 12-18 h. El dia següent es segueix amb els rentats posthibridació, que consisteixen en 0,4x SSC/0,3 % NP-40 a 72°C durant 2 min, i en 2x SCC/0,1 % NP-40 a TA durant 1 min, i amb la contratació aplicant 10 µl de DAPI II (Vysis Inc.) per cubre de 24x60 mm.

Els estudis de FISH seqüencials sobre la mateixa preparació es van dur a terme seguint un protocol descrit amb anterioritat en el qual, la senyal fluorescent de l'anterior hibridació s'anul·la al tractar les extensions amb 97 % etanol/3 % èter durant 5 min a TA (Dierlamm et al., 1996). En les cohibridacions amb diferents sondes es va mantenir la quantitat d'aquestes i es va ajustar la proporció d'aigua a la barreja de desnaturalització (sondes Vysis Inc.), o es va reduir la quantitat de les sondes a cohibridar (sondes Appligene Oncor-Qbiogene).

b) Emprant sondes no comercials

Es van emprar sondes no comercials com PAC 980J15 (cortesia de M. Rocchi, Universitat de Bari, Itàlia) complementària a una seqüència del locus del gen *PLFZ*, PAC 891P24 (M. Rocchi) localitzada al gen *ATM*, PAC 770G7 (cortesia de J. Flint, Universitat d'Oxford, UK) localitzada a la regió subtelomèrica 11q, i la sonda L 1.84 (cortesia de M. Stul, Universitat de Leuven, Bèlgica) localitzada a la regió centromèrica del cromosoma 18. El protocol seguit ha estat el descrit amb anterioritat (Dierlamm et al., 1996).

c) Anàlisi i interpretació de les imatges

Les preparacions híbrides es van analitzar en un microscopi de fluorescència (DMRB; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, Germany) a través d'una càmera monocroma d'alta sensibilitat *charge-coupled device* (CCD) (Photometrics SenSys; Roper Scientific Inc., Tucson, USA) i d'una roda de filtres (Croma Technology Corp, Brattleboro, VT, USA) específica pels fluorocroms. En els estudis de FISH interfàsica es van analitzar un mínim de 200 nuclis en cada cas, i en els estudis de FISH en metafase es van analitzar entre 5 i 20 metafases per cas. El tractament de les imatges es va realitzar emprant el programa informàtic Iplab (Vysis Inc.) (Fig.12).

2.2.3 *Hibridació in situ fluorescent múltiple (III i IV)*

La M-FISH es va dur a terme utilitzant les sondes que actualment hi ha disponibles comercialment, formades per una mescla de sondes de pintat cromosòmic marcades combinatòriament amb cinc fluorocroms diferents per tal de pintar simultàniament els 24 cromosomes d'un color específic. La sonda 24Xyte (MetaSystems GmbH, Altlußheim, Germany) ve marcada amb FITC, TexasRed[®], dietilamino-coumarin (DEAC), SpectrumOrange[™] i biotina, la qual requereix de passos de detecció utilitzant streptavidin-Cy[™]5 (Amersham Pharmacia Biotech Limited, Inc., Buckinghamshire, England). La sonda SpectraVysion (Vysis Inc.) ve marcada directament amb els fluorocroms SpectrumFRed[™], SpectrumAqua[™], SpectrumGreen[™], SpectrumGold[™] i SpectrumRed[™] (Fig. 12).

a) Emprant la sonda 24Xyte

Es va seguir el protocol recomanat per la casa comercial introduint certes modificacions durant el procés de desnaturalització, la qual es va realitzar segons condicions prèviament publicades (Cremer et al., 1988).

Les extensions es van deixar durant 3 dies a TA per tal d'obtenir l'envelliment recomanat. Previ a la hibridació, i per tal de fer més accessible la sonda a l'ADN cromosòmic, es va realitzar un pretractament de les preparacions basat en una digestió enzimàtica, el qual elimina les proteïnes

de la membrana cel·lular, seguit d'una fixació amb formaldehid. Així, les extensions es submergeixen en una solució de pepsina a 37°C durant 10 min, composta per 0,3 mg de pepsina (P6887; Sigma-Aldrich Inc.) en 100 ml de HCl 0,001 N. Després d'un rentat de 5 min amb 1x PBS a TA, les extensions es deixen durant 10 min en una solució al 1 % formaldehid/1x PBS/50 mM Mg₂Cl a TA. Després d'un segon rentat amb 1x PBS, es deshidraten les preparacions en una sèrie d'etanols al 70 %, 80 % i 100 % a TA. Un cop assecades, es procedeix immediatament a la desnaturalització en 70 % formamida/2x SSC durant 2 min a 65°C, i a la deshidratació en la sèrie d'etanols freds al 70 %, 80 % i 100 %.

Per una àrea d'hibridació seleccionada de 24x40 mm, es desnaturalitzen 8 µl de la sonda a 75°C durant 5 min i es deixa durant 30 min a 37°C fins a la hibridació. Després d'aplicar la sonda, les preparacions es deixen hibridant en una cambra humida a 37°C durant 72 h. Passat aquest temps es procedeix als rentats posthibridació, on primerament les extensions s'introdueixen en 1xSSC a 75°C durant 5 min seguit d'un segon rentat de 3 min amb 4x SSC/0,05 % Tween[®]20 (Calbiochem) a TA.

Les preparacions un cop hibridades s'incuben amb els reactius de detecció necessaris utilitzant el *kit* B-tect (MetaSystems GmbH). Primer s'apliquen 25 µl de *blocking reagent* sobre l'àrea d'hibridació amb un cubre de 24x60 mm, i es deixen incubar en una cambra sense humitat a 37°C durant 15 min. Després de realitzar un rentat de 3 min amb 4x SSC/0,05 % Tween[™]20 (Calbiochem) a TA, s'apliquen 25 µl de *blocking reagent* i 0,5 µl del reactiu de detecció I, seguint el mateix procediment que en el pas anterior i allargant la incubació a 30 min. Passat aquest temps es renten dues vegades, i se segueix amb idèntic protocol pels reactius de detecció II i III. Després d'un rentat de les preparacions de 3 min en 1x PBS a TA, es realitza la contratinció aplicant 20 µl de DAPI/antifade (MetaSystems GmbH) sota un cubre de 24x60 mm.

Les metafases hibridades es van visualitzar en un microscopi de fluorescència (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan) connectat a un equip de

captura format per una càmera monocroma d'alta sensibilitat CCD i una roda de filtres (Croma Technology Corp) adequada pels fluorocroms FITC, TexasRed[®], DEAC, SpectrumOrange[™], Cy[™]5 i DAPI. L'anàlisi i interpretació de 5 a 20 metafases híbrides per cas es va dur a terme amb el suport del programa informàtic ISIS (MetaSystems GmbH). El disseny de marcatge de la sonda 24XCyte es troba representat a la Taula 4.

Taula 4. Esquema del disseny de marcatge de la sonda 24XCyte

#	DEAC Ex 426 nm Em 480 nm	FITC Ex 502 nm Em 503 nm	S.Orange [™] Ex 559 nm Em 588 nm	TexasRed [®] Ex 595 nm Em 615 nm	Cy [™] 5 Ex 694 nm Em 670 nm
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

S., Spectrum

b) Emprant la sonda SpectraVysion

Respecte al procediment anterior, el pretractament de les preparacions inclou un pas de digestió amb ARNasa. Així, primerament s'apliquen 20 µl de la solució de treball de ARNasa A lliure d'ADNasa [10 µl de la solució

estoc (10 mg/ml en 2x SSC) en 990 µl de 2x SSC] (Roche Diagnostics), es col·loca un cubreobjectes de 22x22 mm per una àrea seleccionada i es deixa incubant en una cambra humida a 37°C durant 30 min. Després de dos rentats de 5 min en 2x SSC a TA, introduïm les extensions durant 5 min en la solució de pepsina a 37°C preparada amb 3,5 mg de pepsina (P6887; Sigma-Aldrich, Inc.) en 70 ml HCl 0,01 N. Després de dos rentats de 5 min en 1x PBS a TA, s'introdueixen les preparacions 2 min en solució de formaldehid (69,3 ml d'aigua desionitzada, 3,5 ml de MgCl₂ 1 M, 7 ml de 1x PBS i 1,89 ml de formaldehid 37 %) a TA. A continuació, es realitzen dos rentats de 5 min en 1x PBS a TA seguits de la deshidratació en la sèrie d'etanols al 70 %, 85 % i 100 %.

Un cop es tenen les preparacions assecades, aquestes es desnaturalitzen en 70% formamida/2x SSC durant 2 min a 72°C, i es deshidraten en la sèrie d'etanols freds al 70 %, 85 % i 100 %, alhora que la desnaturalització de la sonda es realitza en un bany a 72°C durant 2 min. Posteriorment a l'aplicació de la sonda, les extensions es deixen hibridant durant 12-18 h en una cambra humida a 37°C. El dia següent es segueix amb els rentats posthibridació, que consisteixen en 0,4x SSC/0,3 % NP-40 a 72°C durant 2 min, i en 2x SSC/0,1 % NP-40 a TA durant 1 min, i amb la contratació aplicant 10 µl de DAPI III (Vysis Inc.).

Les metafases hibridades es van capturar utilitzant un microscopi de fluorescència (DMRB; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) a través d'una càmera monocroma d'alta sensibilitat CCD (Photometrics SenSys; Roper Scientific Inc.) i d'una roda de filtres (Croma Technology Corp) específica pels fluorocroms SpectrumFRed™, SpectrumAqua™, SpectrumGreen™, SpectrumGold™, SpectrumRed™. El disseny utilitzat en el marcatge de la sonda SpectraVysion és representat a la Taula 5.

L'anàlisi i interpretació de 5 a 20 metafases hibridades per cas es va dur a terme amb el suport del programa informàtic Quips SpectraVysion (Vysis Inc.).

Taula 5. Esquema del disseny de marcatge de la sonda SpectraVysion

#	S.FRed™ Ex 655 nm Em 675 nm	S.Aqua™ Ex 433 nm Em 480 nm	S.Green™ Ex 497 nm Em 524 nm	S.Gold™ Ex 530 nm Em 555 nm	S.Red™ Ex 592 nm Em 612 nm
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					
22					
X					
Y					

S., Spectrum

c) Anàlisi i interpretació de les imatges

Es van analitzar metafases híbrides, ben esteses, amb el mínim de cromosomes doblegats, junts o encreuats, sense soroll citoplasmàtic, amb el mínim soroll de fons i uniformitat de fluorescència al voltant dels cromosomes, amb un patró d'hibridació uniforme, no granulós i amb intensitat de fluorescència equivalent entre els cinc fluorocroms.

Automàticament el programa d'anàlisi de M-FISH tracta les imatges de les metafases híbrides per tal de superar passos crítics com l'alineament acurat dels sis plans capturats, delimitar el perfil de cromàtide, quantificar el valor d'intensitat de fluorescència de cada fluorocrom i assignar un valor espectral a cada cromosoma. Després d'haver cariotipat les metafases amb

l'ajuda de la contraincinció DAPI i de la imatge d'hibridació en 24 colors, s'obté el cariotip M-FISH. Els reordenaments intercromosòmics es visualitzen per un canvi en el patró de fluorescència al llarg d'un cromosoma. Diverses opcions del programa informàtic, com la visualització del resultat de quantificar la intensitat de fluorescència de cada pla al llarg de l'eix dels cromosomes o la imatge en colors artificials del cariotip (basada en el valor espectral de cada cromosoma), ajuden a la interpretació.

En la interpretació es va tenir en compte que reordenaments intracromosòmics com les inversions (Speicher et al., 1996), i petites delecions i duplicacions (Law and Jalal, 2000) no es poden detectar per aquest mètode, i que les regions cromosòmiques d'heterocromatina o braços p de cromosomes acrocèntrics no es poden assignar per M-FISH.

2.2.4 *Extracció d'ADN genòmic (I i IV)*

Per l'obtenció d'ADN genòmic de les mostres biològiques (Fig. 12) es va seguir un procediment estàndard d'extracció (Miller et al., 1988), realitzant un rentat de la mostra, la lísi de cèl.lules eritrocitàries i leucocitàries, una digestió amb proteinasa K, i la posterior extracció de l'ADN per deshidratació amb etanol i precipitació amb solució de NaCl saturada.

2.2.5 *Hibridació genòmica comparada (IV)*

a) Marcatge de l'ADN genòmic

L'ADN genòmic tumoral/test (Fig. 12) es va marcar amb el fluorocrom FITC d'espectre verd mitjançant la reacció de *nick translation* i seguint el protocol d'utilització per el CGH Nick Translation Kit (Vysis Inc.). La barreja de reacció de 50 µl de volum total, preparada en un tub de microcentífuga i que conté 1 µg d'ADN de tamany >20 kb, 2,5 µl de 0,2 mM dUTP-FITC, 5 µl de 0,1 mM dTTP, 10 µl de 0,1 mM dNTP (dATP:dCTP:dGTP), 5 µl de 10x tampó (500 mM Tris-Cl ph 7,2; 100 mM MgSO₄; 1 mM DDT) i 5 µl d'enzim (ADN polimerasa I, ADNasa I en 50 %

glicerol; 50 mM Tris-Cl ph 7,2; 10 mM MgSO₄; 0,1 mM DDT; 0,5 mg/ml nucleasa lliure de albúmina sèrica bovina), s'incuba durant 3-4 h a 15°C. Per aturar la reacció, es traspasa a un bany a 70°C durant 10 min i posteriorment es deixa refredar en gel. En cada cas es va comprovar la mida dels fragments de l'ADN tumoral marcat en un gel al 1 % d'agarosa després d'electroforesis. Els *smears* d'ADN òptims es consideren de 300 a 3.000 pb. Cada reacció, on es genera la quantitat d'ADN tumoral marcat necessari per a poder realitzar quatre experiments de CGH, es va guardar a -20°C.

b) Hibridació

En cada experiment de CGH, i seguint el protocol recomanat per la casa comercial (Vysis Inc.), es barregen 200 ng d'ADN tumoral/test marcat amb FITC, 100 ng d'ADN normal/referència marcat amb TexasRed[®] (Vysis Inc.) i 10 µg d'ADN Cot-1 sense marcar (Vysis Inc.) amb 0,1 v/v de 5 mM acetat sòdic i 2,5 v/v etanol absolut. Per tal de precipitar els ADN, la barreja s'incuba en gel durant 15 min i es centrifuga a 1.200 rpm (Eppendorf 5415; Eppendorf AG, Hamburg, Germany) durant 30 min a 4°C. Posteriorment, es decanta el sobrenadant i es deixa assecar el botó d'ADN a 37°C durant 20 min. Una vegada s'ha afegit 3 µl d'aigua desionitzada i 7 µl de tampó d'hibridació (Vysis Inc.) es desnatura la sonda a 73°C durant 5 min. Les preparacions amb metafases normals (Vysis Inc.) es desnatura amb 70 % formamida/2x SSC a 73°C durant 5 min, seguit de la deshidratació en una sèrie d'etanols freds al 70 %, 85 % i 100 %. Després de l'aplicació de la sonda, les extensions es deixen hibridar en una cambra humida a 37°C durant 72 h. Els rentats posthibridació són de 2 min en 0,4x SSC/0,3 % NP-40 a 73°C, i d'1 min en 2x SSC/0,1 % NP-40 a TA. Després de la contraincubació amb DAPI II (Vysis Inc.), les preparacions hibridades es van capturar amb un microscopi de fluorescència (DMRB; Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) a través d'una càmera monocroma d'alta CCD (Photometrics SenSys; Roper Scientific Inc.) i d'una roda de filtres (Croma Technology Corp) específica per cada fluorocrom, amb el suport del programa de captura SmartCapture (Vysis Inc.). Els tres plans capturats per separat i

corresponents a l'emissió de FITC, TexasRed[®] i DAPI són integrats donant una mateixa imatge d'hibridació.

c) Anàlisi i interpretació de les imatges

Es van analitzar metafases ben esteses, amb el mínim de cromosomes doblegats, junts o encreuats, sense soroll citoplasmàtic, amb el mínim soroll de fons i uniformitat de fluorescència al voltant dels cromosomes, amb un patró d'hibridació uniforme, no granulós i amb una adequada intensitat de fluorescència al llarg dels cromosomes, amb condensació cromosòmica semblant a tota la metafase i entre 400-500 bandes, i amb intensitat de fluorescència equivalent entre els fluorocroms. A través del programa d'anàlisi específic de CGH (Vysis Inc.) es cariotipen les metafases utilitzant la contraindicació DAPI. El programa obté el perfil de fluorescència verd/vermell al llarg de cada cromosoma realitzant una sèrie d'operacions automàtiques. Entre aquestes s'inclouen, la normalització de la intensitat de fluorescència i la correcció del soroll de fons, la determinació dels perfils de fluorescència per integració dels valors *pixel* normalitzats al llarg de les línies perpendiculars a l'eix del cromosoma i finalment, l'obtenció de la proporció (*ratio*) de fluorescència dividint el perfil d'intensitats de fluorescència entre verd/vermell.

En la interpretació dels resultats es considera la mitjana dels perfils de cada cromosoma d'un mínim de 10 metafases, utilitzant 1,2-0,8 com a valors de tall fix o llindar de guanys i pèrdues, respectivament. Els resultats es van comprovar amb l'interval de confiança del 95 %. Els anteriors valors de llindar es van escollir valorant la realització prèvia de controls negatius i positius (no mostrats).

Per la interpretació es va tenir en compte que regions genòmiques d'heterocromatina, com les localitzades a les bandes cromosòmiques 1q12, 9q12, 16q11, 13p, 14p, 15p, 21p 22p, i Yq12, no es poden incloure a l'anàlisi al estar bloquejades per la hibridació de l'ADN Cot-1. Alhora, variacions en el perfil a les regions telomèriques, on les intensitats de fluorescència poden apropar-se als nivells de soroll de fons, van ser

prudently analitzades. Es va tenir en compte que artefactes de marcatge poden conduir a falsos perfils en les regions cromosòmiques riques en citosina i guanina com a 1p32-pter, 19 i 22. En casos concrets, per descartar falsos positius en aquests punts es va dur a terme el mateix experiment de CGH amb marcatge invers, on l'ADN passa a ser marcat amb TexasRed® mentre que l'ADN de referència és amb FITC (Larramendy et al., 1998a).

2.2.6 *Southern-blot (I)*

L'ADN genòmic (Fig. 12) es digereix amb les endonucleases de restricció Bam HI i Bgl II, i els fragments resultants es separen per electroforesis en un gel d'agarosa al 0,8 %. A continuació es realitza una desnaturalització i es transfereix a una membrana de nitrocel.lulosa. Després d'una prehibridació, la membrana es deixa hibridant tota la nit amb la sonda B859 marcada amb ³²P. El dia següent, es realitzen els rentats i s'exposa la membrana durant 48 h a -70°C utilitzant Intensifying Screen. Les condicions de prehibridació, hibridació i rentats van ser les descrites amb anterioritat (Cimino et al., 1997). En cada experiment s'inclou un control positiu (mostra d'ADN amb reordenament del gen *MLL*) i un control negatiu (mostra d'ADN de placenta).

La sonda B859 correspon a un fragment de cADN derivat dels exons 8-14 del gen *MLL* que permet analitzar la regió de trencament (Gu et al., 1992) (Fig. 14). Els casos negatius s'identifiquen per la presència d'una banda germinal. En els casos positius s'observa la banda G junt amb fragments de diferent grandària que formen la banda reordenada.

2.3 *Mètodes d'estudi d'expressió gènica*

El processament aplicat a les mostres per tal de realitzar els estudis d'expressió gènica queda il.lustrat a la Figura 13.

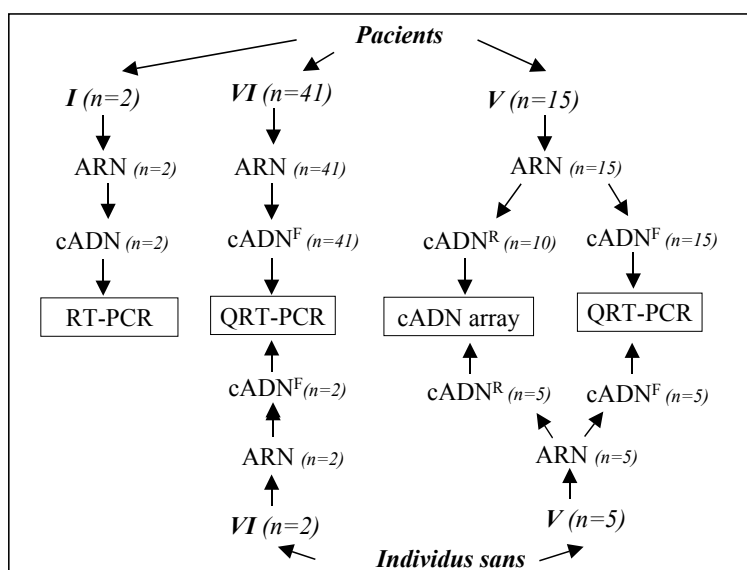


Figura 13. Diagrama on es mostra el tractament de les mostres i els mètodes d'estudi d'expressió. ^F, marcat fluorescent; ^R, marcat radioactiu

2.3.1 Extracció de l'ARN total (I, V i VI)

L'extracció de l'ARN total de les cel·lules mononuclears (Fig. 13), les quals van ser aïllades de MO utilitzant la solució de Lymphoprep™ (Progen Biotechnik GmbH, Heidelberg, Germany), es va dur a terme emprant el reactiu Trizol® Reagent (Gibco BRL) i seguint el protocol recomanat per la casa comercial. Per evitar la presència de restes d'ADN a la mostra, que interferiria en els estudis quantitius d'expressió, es va realitzar en tots els casos un tractament del ARN total amb DNasa I lliure de RNasa segons el protocol descrit en The Atlas cDNA Expression Array's User Manual (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA). La qualitat i la integritat de l'ARN total es va comprovar en un gel d'agarosa al 1 % després d'electroforesis.

2.3.2 *Mostra de referència (V i VI)*

En l'Estudi VI es va extreure l'ARN de dues mostres de MO procedents de donadors sans (Fig. 13). La quantificació dels cADN es va utilitzar com a valors d'expressió gènica de referència per l'anàlisi de les mostres dels pacients. En l'Estudi V es va extreure l'ARN de cinc mostres procedents de donadors sans (Fig. 13). Una aliquota formada per la barreja d'1 µg d'ARN procedent de cada una de les cinc mostres es va utilitzar per la síntesi i marcatge de la sonda de referència en el cADN array.

2.3.3 *Transcriptasa inversa-reacció en cadena de la polimerasa (I)*

Per detectar la duplicació del gen *MLL* es va aplicar la tècnica de RT-PCR amb primers complementaris a l'exó 3 (antisentit)/exó 8 (sentit) del gen *MLL* com en el cas 1, o complementaris a l'exó 4 (antisentit)/exó 8 (sentit) com en el cas 2 (Fig. 14), segons la nomenclatura exònica proposada per Nilson et al. El protocol seguit ha estat publicat amb anterioritat (Schnittger et al., 2000). Breument, 1 µg d'ARN total en un volum de reacció de 24 µl es va transcriure en revers a cADN emprant reactius comercials de síntesi i seguint el protocol recomanat per la casa comercial (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). A continuació, 3 µl del producte de síntesi de cADN s'amplifiquen amb els primers anteriorment esmentats mitjançant una PCR de 35 cicles (PCR System 9700; Applied Biosystem). El producte d'amplificació, de 258 pb en el cas 1 i de 270 pb en el cas 2, es visualitza per electroforesis en gel d'agarosa al 2 % (Fig. 14).

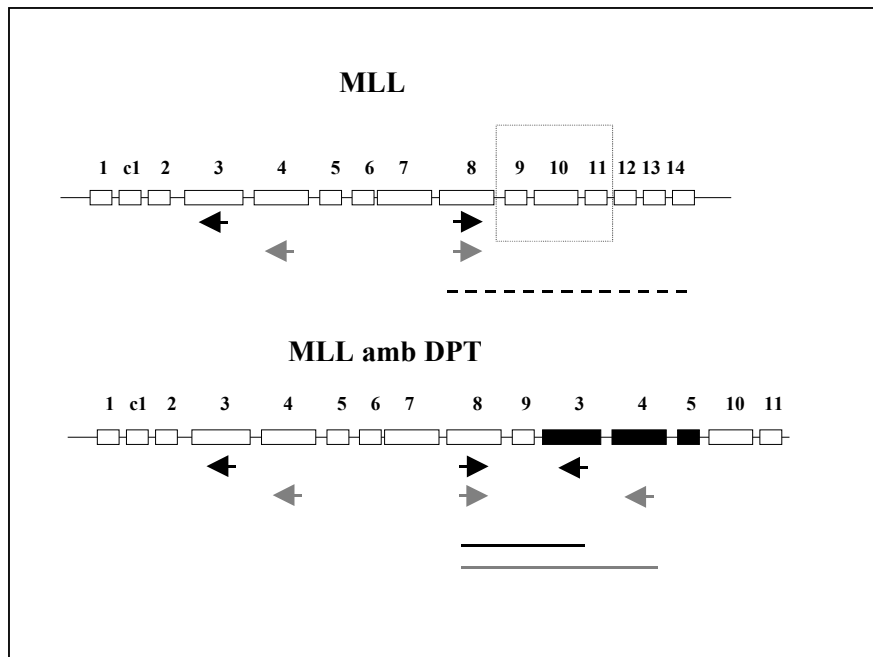


Figura 14. Esquema de la regió 5' del gen *MLL* que conté la regió típica de trencament en els reordenaments 11q23 (de l'exó 9 a 11). La línia discontinua representa la seqüència específica de la sonda B859 utilitzada en el Southern-blot. Els primers utilitzats en la RT-PCR en el cas 1 i 2 s'indiquen amb fletxes negres i grises, respectivament. S'identifica producte d'amplificació en el cas de duplicació parcial en tàndem (DPT), que serà de 258 pb en el cas 1, i de 270 pb en el cas 2. Numenclatura exònica utilitzada segons Nilson et al. (Nilson et al., 1996).

2.3.4 *cADN array (V)*

La tècnica de *cADN array* es va dur a terme segons el protocol descrit en The AtlasTM Human Apoptosis Array (Clontech Laboratories Inc.). Cada filtre de niló conté fragments de *cADN* de 217 gens per duplicat, que inclou nou gens humans *housekeeping* utilitzats com a controls positius i per la normalització dels resultats, tres gens no humans com a controls negatius, i 205 gens amb funció relacionada amb el cicle cel·lular i l'apoptosi (Fig. 15). La llista dels gens esmentats és accessible a la pàgina web <http://www.clontech.com>. A partir de l'ARN de cada pacient es sintetitza una sonda de *cADN* i es marca radioactivament, la qual s'hibrida sobre el filtre de niló (Fig. 13).

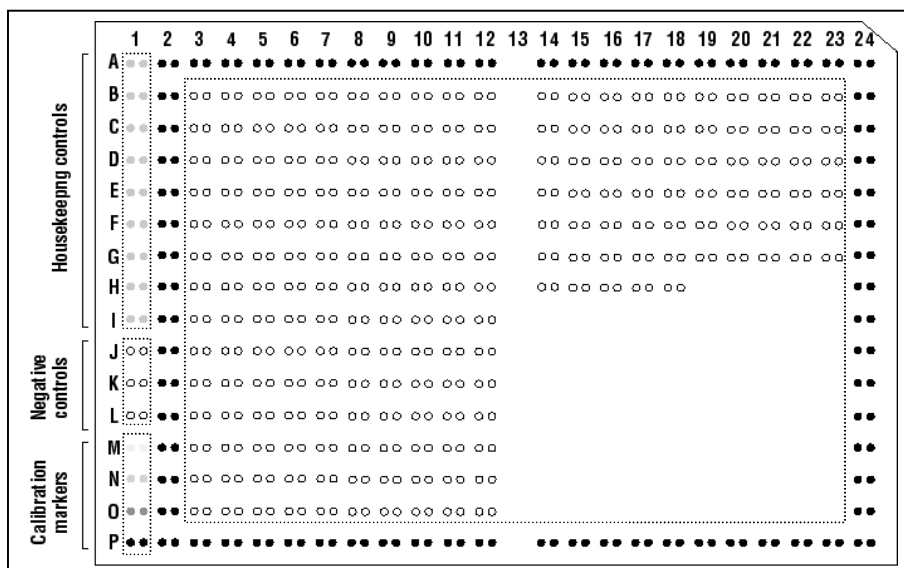


Figura 15. Esquema de The Atlas™ Human Apoptosis Array (Clontech Laboratories Inc.), on s'observa l'orientació i distribució dels diferents cADN sobre el filtre de niló.

a) Obtenció del cADN i marcatge radioactiu

Seguint el protocol descrit en The Atlas cDNA Expression Array's User Manual (Clontech Laboratories Inc.), 3 µg d'ARN total es transcriuen en revers en cADN marcat amb ³²P. Per cada reacció es prepara la MasterMix en un tub de microcentífuga de 0,5 ml a TA barrejant 2 µl de 5x tampó de reacció (250 mM Tris-HCl, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂; Clontech Laboratories Inc.), 1 µl de 10x dNTP Mix (5 mM de dCTP, 5 mM de dGTP, 5 mM de dTTP; Clontech Laboratories Inc.), 0.5 µl de 100 mM ditiotretitol (Clontech Laboratories Inc.) i 3,5 µl de α-³²dATP (3.000 Ci/mmol, 10 µCi/µl) (Amersham Pharmacia Biotech). En un segon tub es barregen 3 µg d'ARN i 1,5 µl de CDS Primer Mix (Clontech Laboratories Inc.) i s'incuba durant 2 min a 70°C i 2 min a 50°C. Simultàniament, s'afegeix 1 µl de Superscript™II Rnase H-Reverse Transcriptase (Gibco BRL) per reacció al tub de MasterMix a TA. Passades les incubacions, s'afegeixen 8 µl de MasterMix amb l'enzim al tub que conté l'ARN, i es deixa incubant 25 min més a 50°C fins que s'atura la reacció amb la incorporació d'1 µl de 10x

Termination Mix (0,1 M EDTA, 1 mg/ml glicogen; Clontech Laboratories Inc.).

Després d'obtenir els cDNAs marcats, s'utilitza una columna cromatogràfica per tal d'eliminar nucleòtids-³²P no incorporats, i de petits fragments (< 0,1 kb) de cADN. Cada reacció es dilueix en un volum total de 200 µl amb tampó NT2 (Clontech Laboratories Inc.), es traspassa a la columna per ser centrifugat a 14.000 rpm (Eppendorf MiniSpin Personal Micro Centrifuge; Eppendorf AG) durant 1 min, i es descarta el tub col.lector. Aquest mateix pas es repeteix tres vegades afegint a la columna cada cop 400 µl de tampó NT3 (Clontech Laboratories Inc.), i a la última centrifugació es comprova que la radioactivitat de les mostres sigui de l'ordre de 20 a 50 contatges per segon (cps). En aquest moment és possible parar l'experiment posant els cADN marcats en gel o guardant-los a -20°C.

b) Hibridació

Per preparar la solució de prehibridació, s'incuba 0,5 mg d'ADN d'esperma de salmó (D7656; Sigma-Aldrich, Inc.) a 100°C durant 5 min. A continuació ho barregem amb 5 ml de la solució ExpressHyb™ (Clontech Laboratories Inc.) que es trobava a 68°C, i ho deixem a 68°C fins a la seva utilització. El filtre s'introdueix dins una ampolla d'hibridació procurant no deixar que es formin bombolles d'aire. Seguidament s'hi afegeixen 5 ml de la solució ExpressHyb™ (Clontech Laboratories Inc.), i es deixa prehibridant en agitació contínua en 5-7 rpm (Shake'n'Stack Hybridization Oven; Hybaid, Ashford, UK) durant 30 min a 68°C. Durant aquesta incubació es prepara la sonda per a la hibridació. A la sonda obtinguda després de la purificació (~ 200 µl) se li afegeixen en un primer pas 22 µl de 10x solució de desnaturalització (1 M NaOH, 10 mM EDTA) i s'incuba a 68°C durant 2 min, en un segon pas s'addicionen 5 µl de ADN Cot-1 (1 mg/ml) més 225 µl de 2x solució de neutralització (1 M NaH₂PO₄, ph 7) i es continua incubant a 68°C durant 10 min. Finalment la sonda s'introdueix directament a l'ampolla

que conté el filtre i la solució de prehibridació. Filtre i sonda es deixen hibridar en agitació de 12-18 h a 68°C.

c) Rentats posthibridació, exposició i adquisició de les imatges

El dia següent es decanta la solució d'hibridació i es procedeix als rentats posthibridació. Els primers quatre rentats es realitzen amb 200 ml de 2x SSC/1 % SDS a 68°C durant 30 min cada un, seguits d'un rentat de 30 min a 68°C amb 200 ml de 0,1x SSC/0,5 % SDS, i d'un rentat de 5 min amb 2x SSC a TA. A continuació els filtres s'emboliquen amb plàstic transparent mantenint-los humitejats, i s'exposen de 2 a 4 dies en la placa d'imatge (BAS-MP 2040S; Fuji, Kanagawa, Japan). Al escanejar la placa d'imatge a través d'un escàner Phosphorimager (Bio-Imaging Analyser, BAS-2500; Fuji) s'obtenien imatges de 16 bits d'alta resolució dels filtres hibridats amb format *tiff*.

d) Anàlisi i interpretació

Les intensitats dels cADN es van calcular utilitzant The Atlas Image Analysis Software 2.0 (Clontech Laboratories Inc.). El soroll de fons local en cada punt de la imatge hibridada es va suprimir emprant les eines específiques del programa informàtic. Per minimitzar els possibles efectes de les diferències en la quantitat d'ARN i l'eficiència en la hibridació entre mostres, els valors d'intensitat es van normalitzar eliminant la mitjana de les diferències d'intensitat en un array a cada valor de diferència d'intensitat, estandarditzant així la mitjana de la diferència d'intensitats a zero en tots els arrays. A continuació, per obtenir la relació (*ratio*) del valor d'expressió d'un gen, els valors normalitzats de les intensitats de cada punt en cada array corresponents a les mostres dels pacients es va comparar amb el respectiu valor a l'array de la mostra de referència (procedent de 5 individus sans), i el valor de proporció resultant es va transformar en escala \log_2 . Del total de gens, es van escollir per l'anàlisi aquells on la proporció d'expressió s'observava significativament alterada (entre un rang de -1.32 a $+1.32$) en tres pacients com a mínim.

L'anàlisi d'agrupacions va ser de tipus no dirigida, jeràrquica i aglomerativa (*Hierarchical Clustering*). L'anàlisi es va aplicar segons pacients i gens utilitzant el Cluster Program (Michael Eisen, <http://rana.lbl.gov/>) basat en una correlació sense certesa com a mètrica de semblança. Els resultats es van visualitzar a través del TreeView Program (Michael Eisen, <http://rana.lbl.gov/>).

2.3.5 Transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa a temps real (V i VI)

En l'Estudi VI es va quantificar l'expressió de gens suggestius a tenir un paper important en el desenvolupament de la LMA, escollits en funció d'estudis anteriors d'ADN array (Golub et al., 1999; Larramendy et al., 2002). Concretament es va realitzar l'estudi del transcrit pel receptor extracel·lular de tipus tirosin-quinasa CSF1R (també anomenat protooncogen *FMS*), del protooncogen *CBL*, del transcrit per la proteïna protooncogènica de desordre sanguini DEK i pel factor de transcripció HOXA9 (Taula 6). En l'Estudi V es va quantificar l'expressió de gens apoptòtics, *MYC*, *DAPK1*, *BAX* i *MCL1*, per tal de validar els resultats obtinguts mitjançant la tècnica de cADN array (Taula 6). L'anàlisi d'expressió del gen *housekeeping* β -actina (*ACTB*) es va realitzar per normalitzar els valors d'expressió obtinguts mitjançant QRT-PCR.

Taula 6. Característiques dels gens estudiats

<i>Símbol</i>	<i>Gen</i>	<i>Gene Bank #</i>	<i>Localització</i>	<i>Estudi</i>
<i>MYC</i>	MYC protooncogen		8q24.12-q24.13	V
<i>DAPK1</i>	Death-associated protein kinase 1	X76104	9q34.1	V
<i>BAX</i>	Bcl2-associated X protein	L22473	9q13.3-q13.4	V
<i>MCL1</i>	Myeloid cell leukemia 1	L08246	1q21	V
<i>CSF1R</i>	Macrophage colony stimulating 1 receptor (FMS protooncogen)	X64229	5q33.2-33.3	VI
<i>CBL</i>	CBL protooncogen	X57110	11q23.3	VI
<i>DEK</i>	DEK protooncogen	X64229	6p23	VI
<i>HOXA9</i>	Homeo box A9	U82759	7p15-p14.2	VI
<i>ACTB</i>	Actin-beta	X00351	7p22-p12	V i VI

a) Disseny dels primers

Els primers oligonucleòtids van ser dissenyats i sintetitzats per TIB MolBiol (Berlin, Germany). Les corresponents seqüències van ser testades en l'algoritme BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) per descartar amplificacions inespecífiques en el producte de PCR (Taula 7).

Taula 7. Primers utilitzats en la transcriptasa inversa quantitativa-reacció en cadena de la polimerasa a temps real

<i>Gen</i>		<i>Seqüència 5' - 3'</i>	<i>Llargada (pb)</i>	<i>CG (%)</i>	<i>Tm (°C)</i>	<i>Grandària de producte (pb)</i>
<i>DEK</i>	F	GTGGGTCAGTTCAGTGGC	18	61,1	61,9	291
	R	AGGACATTTGGTTCGCTTAG	20	45	60,7	
<i>CSF1R</i>	F	CACCAAGCTCGCAATCCCTC	20	60	63,7	169
	R	CTCTACCACCCGGAAGAACA	20	55,5	63,9	
<i>CBL</i>	F	ATGTCCCAAAGCCACCTG	18	55,6	63,6	217
	R	GCAGGACCACTACCTTGCT	19	57,9	61,9	
<i>HOXA9</i>	F	AAAAATCTACCTGTTCTGAC	21	38,1	56,3	236
	R	CTATCTTCCACAATCACAATGGG	23	43,5	64,1	
<i>MYC</i>	F	GGCAAAAGGTCAGAGTCTGG	20	55	63,7	209
	R	GTGCATTTTCGGTTGTTGC	19	47,4	64,1	
<i>DAPK1</i>	F	CAGTGTGTTGCTCTAGGAAG	21	47,6	57,2	196
	R	GGGACTGCCACAAATGATGAG	21	52,4	58,2	
<i>BAX</i>	F	TGCTTCAGGGTTTCATCCAG	20	50	56,9	169
	R	GGCGGCAATCATCCTCTG	18	61,1	57,3	
<i>MCL1</i>	F	GATGATCCATGTTTTAGCGAC	22	45,5	56,4	205
	R	CTCCACAAACCCATCCCAG	19	57,9	57,7	
<i>ACTB</i>	F	AGCCTCGCCTTTGCCGA	17	64,7	68,5	174
	R	CTGGTGCTGGGGCG	15	80	64,1	

F, sentit; R, antisentit; pb, parells de bases; Tm, temperatura de fusió

b) Transcriptasa inversa-reacció en cadena de la polimerasa quantitativa

Per cada mostra (Fig. 13), 0,5 µg d'ARN total es va transcriure en revers en cADN emprant The 1st Strand cDNA synthesis kit per QRT-PCR (Roche Diagnostics) i seguint el protocol recomanat per la casa comercial.

La QRT-PCR es va dur a terme utilitzant els reactius de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I i els aparells LightCycler Instrument (Roche Diagnostics). La barreja de reacció consisteix en 1-2 mM de

MgCl₂, 0,3-1 µM de cada primer (sentit i antisentit), 1 µl de LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I mix (Taq DNA polymerase, dNTP, MgCl₂ i SYBR Green I dye) i 1 µl de cADN diluït al 1/10, en un volum total de 10 µl. Quatre dilucions del gen de la beta-globulina (DNA Control kit; Roche Diagnostics), entre 0,015 i 15 ng/µl, es van utilitzar per obtenir la corba estàndard en cada experiment. Les condicions pels cicles d'amplificació es van optimitzar segons les característiques dels primers utilitzats i la seqüència a amplificar, seguint les recomanacions de la casa comercial (Taula 8). Com a controls de qualitat es van incloure controls negatius (barreja de reacció sense cADN) en cada assaig i cada cas va ser processat per duplicat.

Taula 8. Protocol de QRT-PCR a temps real

<i>Programa</i>	<i>Segment</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Durada (seg)</i>	<i>TTT (°C/seg)</i>	<i>Cicles</i>
Desnaturalització	1	95	450	20	1
Amplificació	1	95	15	20	55
	2	*	5	20	
	3	72	Llargada producte (pb)/25	20	
Corba de fusió	1	95	0	20	1
	2	65	15	20	
	3	98	0	0,1	
Refredament	1	40	30	20	1

TTT, taxa transició temperatura; pb, parells de bases; *, depèn de cada primer

c) Anàlisi i interpretació

Els productes d'amplificació de PCR es van verificar utilitzant l'anàlisi de la corba de fusió (*melting curve*), i el valor d'expressió de cada gen es va calcular emprant el mètode de la segona derivativa màxima amb el suport del programa informàtic LightCycler Software Version 3.5 (Roche). A continuació, es va calcular la mitjana dels valors d'expressió dels gens en els dos assaigs. El valor mitjà de cada gen, tant en les mostres corresponents als pacients com a la referència, es va normalitzar segons el valor mitjà del gen *ACTB*. La relació (*ratio*) d'expressió dels gens en cada pacient, es va

calcular dividint el valor normalitzat del gen pel valor del mateix gen en la mostra de referència.

Els valors relatius d'expressió dels gens superiors a un nivell de 3 van ser considerats indicatius de sobreexpressió, i inferiors de 0,3 a ésser indicatius de sotaexpressió.

2.4 Anàlisi estadística (VI)

Per l'anàlisi estadística de les dades en l'Estudi VI (Fig. 13) es va emprar el programa informàtic SPSS per Windows (Versió 10,0). Diversos paràmetres clínics i biològics, com edat, cariotip, classificació FAB, immonofenotip i percentatge de blastes a MO, es van comparar amb els valors d'expressió gènica mitjançant el test estadístic no paramètric *U* de Mann-Whitney. Alhora, diferents curves de supervivència es van comparar amb el mètode de Kaplan-Meier per analitzar el valor pronòstic associat a l'expressió dels gens *HOXA9*, *DEK*, *CBL* i *CSF1R*. El valor de significació es va establir a 0,05.