
3 Resultats

3.1 Revisió de les diferents tècniques de citogenètica i biologia molecular utilitzades en el diagnòstic de la leucèmia mieloide aguda (0)

Aventin A, Casas S. Leucemia mieloide aguda: Caracterizació genètica. *Haematologica* 2001;86(Sup l 1):219-26.

En aquest estudi de revisió es descriu la importància clínica de les alteracions genètiques pel diagnòstic, pronòstic i tractament de la LMA. Tanmateix, es revisen les principals tècniques de citogenètica i biologia molecular per la detecció d'anomalies genètiques associades a la LMA.

Bàsicament el diagnòstic genètic de la LMA es dur a terme mitjançant ACC junt amb la RT-PCR pels gens de fusió relacionats amb valor pronòstic. L'ACC permet un anàlisi global dels possibles reordenaments cromosòmics però, al treballar en metafases, la seva limitació es troba en la resolució, la qual pot ser inferior en casos on s'obtenen cromosomes de mala qualitat, i en la necessitat d'obtenir cèl.lules en divisió. Al basar-se en una amplificació d'ADN, la RT-PCR ofereix una elevada sensibilitat de detecció, però la principal limitació del mètode és el fet que només és possible analitzar la seqüència específica entre els *primers* utilitzats. Així doncs, en els últims anys han aparegut diferents tècniques per complementar les limitacions diagnòstiques, tant de l'ACC com de la RT-PCR. En el primer grup s'inclouen la M-FISH i la CGH, mentre que la múltiple-PCR i la PCR circular serien variants de la RT-PCR.

granulocítica (MPO). Sin embargo, hoy se conoce que ambos tipos de mieloblasto, con relativa frecuencia, muestran también rasgos fenotípicos diferenciales debido a la existencia de aberraciones fenotípicas en el mieloblasto patológico, presumiblemente relacionadas con las anomalías genéticas presentes en él.

Bibliografía

1. Tavani M, Cortes F, Charbord P, Labastie C, Peault B. Emergence of the hematopoietic system in the human embryo and foetus. *Haematologica* 1999; 84: 1-3.
2. Woessner S, Florensa L. La citología óptica en el diagnóstico hematológico (4.ª ed). Madrid: Acción Médica, 2000.
3. Macedo A, Orfao A, Ciudad J, San Miguel JF. Caracterización fenotípica de la diferenciación mielode normal. *Sangre (Barc)* 1994; 39: 277-282.
4. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton D, Gralnick HR et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British cooperative group. *Ann Intern Med* 1985; 103: 629-639.
5. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller Hermelink HK, Vardiman J et al. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-3849.
6. Loken MR, Wells DA. Normal antigen expression in hematopoiesis: basis for interpreting leukemia phenotypes. En: Stewart CC, Nicholson JKA, eds. *Immunophenotyping*. Nueva York: Wiley Liss & Sons, 2000; 133-160.
7. Orfao A, Schmitz G, Brando B, Ruiz-Arguelles A, Basso G, Braylan R et al. Clinically useful information provided by the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies: current status and future directions. *Clin Chem* 1999; 45: 1708-1717.
8. Rothe G, Schmitz G, Adorf D, Barlage S, Gramatzki M, Hanenberg H et al. Consensus protocol for the flow cytometric immunophenotyping of hematological malignancies. *Leukemia* 1996; 10: 877-895.
9. Terstappen LW, Safford M, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. III. Neutrophil maturation. *Leukemia* 1990; 4: 657-663.
10. Terstappen LW, Loken MR. Myeloid cell differentiation in normal bone marrow and acute myeloid leukemia assessed by multi-dimensional flow cytometry. *Anal Cell Pathol* 1990; 2: 229-240.
11. Knapp W, Strobl H, Majdic O. Flow cytometric analysis of cell surface and intracellular antigens in leukemia diagnosis. *Cytometry* 1994; 18: 187-192.
12. Ackerman GA. Ultrastructure and cytochemistry of the developing neutrophil. *Lab Invest* 1968; 19: 290-294.
13. Menendez P, Prosper F, Bueno C, Arbona C, San Miguel JF, Garcia-Conde J et al. Sequential analysis of CD34+ and CD34- cell subsets in peripheral blood and leukapheresis products from breast cancer patients mobilised with SCF plus G-CSF and cyclophosphamide. *Leukemia* 2001; 15: 430-439.
14. Menendez P, Cañizo MC, Orfao A. Immunophenotypic characteristics of PB-mobilised CD34+ hematopoietic progenitor cells. *J Biol Regul Homeost Agents* 2001; 15: 53-61.
15. Stelzer G, Goodpasture L. Use of multiparameter flow cytometry and immunophenotyping for the diagnosis and classification of acute myeloid leukemia. En: Stewart CC, Nicholson JKA, eds. *Immunophenotyping*. Nueva York: Wiley Liss & Sons, 2000: 215-238.
16. San Miguel JF, Ojeda E, Gonzalez M, Orfao A, Cañizo MC, Sanchez I et al. Prognostic value of immunologic markers in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1989; 3: 108-111.
17. Vidrales MB, Orfao A, López-Berges MC, González M, López-Macedo A, García MA et al. Light scatter characteristics of blast cells in acute myeloid leukaemia: association with morphology and immunophenotype. *J Clin Pathol* 1995; 48: 456-462.
18. San Miguel JF, Gonzalez M, Cañizo MC, Anta JP, Zola H, Lopez-Borrasca A. Surface marker analysis in acute myeloid leukaemia and correlation with FAB classification. *Br J Haematol* 1986; 64: 547-560.
19. Bene MC, Bernier M, Casasnovas RO, Castoldi G, Doekharan D, Van der Holt B et al. Acute myeloid leukaemia M0: haematological, immunophenotypic and cytogenetic characteristics and their prognostic significance. An analysis in 241 patients. *Br J Haematol* 2001; 113: 737-745.
20. Casasnovas RO, Campos L, Mugneret F, Charrin C, Bene MC, Garand R et al. Immunophenotypic patterns and cytogenetic anomalies in acute non-lymphoblastic leukemia subtypes: a prospective study of 432 patients. *Leukemia* 1998; 12: 34-43.
21. San Miguel JF, Vidrales MB, López-Berges MC, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C et al. Early immunophenotypic evaluation of minimal residual disease (MRD) in AML identifies different patient risk-groups and may contribute to post-induction treatment stratification. *Blood* 2001. En prensa.

LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA: CARACTERIZACIÓN GENÉTICA

A. AVENTÍN Y S. CASAS

Departamento de Hematología, Hospital Sant Pau. Barcelona.

Introducción

La leucemia mieloide aguda de novo (LMA) es una hemopatía maligna caracterizada por una gran heterogeneidad clínico-biológica. Fue durante las décadas de los 70 y 80 cuando se describieron las primeras asociaciones entre determinadas anomalías cromosómicas y rasgos clínico-citológicos configurándose los llamados "síndromes de leucemia aguda no linfoblástica" y cuyos ejemplos más destacables son: LMA (M2) con t(8;21)(q22;q22), leucemia aguda mielomonocítica (M4) con eosinofilia e inv(16)/t(16;16)(p13;q22), leucemia aguda promielocítica (M3) con t(15;17)(q22;q21), y LMA con anomalías del cromosoma 11q23. Aunque sin duda alguna, el bandedo cromosómico fue esencial en la identificación de las alteraciones citogenéticas, la introducción del cultivo a corto término y el método de sincronización celular o bandedo da alta resolución contribuyeron a mejorar los resultados y aplicabilidad del estudio citogenético en la práctica clínica. En 1988 se propuso la clasificación MIC, para la LMA, la cual combinaba el perfil inmunofenotípico y citogenético con el morfo-citoquímico clásico definido por los criterios del grupo cooperativo FAB; con ella se ponía de manifiesto el interés y la necesidad de utilizar un abordamiento multidisciplinario para el diagnóstico y manejo de las LMA. Con el estudio molecular de las regiones cromosómicas implicadas en las alteraciones citogenéticas se identificaron los genes, muchos de ellos factores de transcripción, que como consecuencia de la relocalización producían un gen quimérico o gen de fusión, cuyo producto de transcripción podía ser fácilmente detectado e incorporado al estudio inicial del diagnóstico. La combinación de la citogenética clásica con las técnicas de biología molecular y de hibridación *in situ* fluorescente, ha sido fundamental no sólo a nivel diagnóstico sino también para el conocimiento de los mecanismos de leucemogénesis. En el presente trabajo, se comenta como esta información contribuye en la práctica clínica al cuidado de los enfermos con LMA, y como la aplicación de nuevas metodologías configuran actualmente el diagnóstico genético multidisciplinario.

Importancia clínica de los hallazgos citogenéticos-moleculares en la leucemia mieloide aguda

Diagnóstico

El análisis citogenético convencional o metafásico (ACC) ha permitido la identificación de una

Tabla 1. Alteraciones genéticas balanceadas en LMA

Alteración cromosómica	Genes involucrados
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO
t(6;9)(p23;q34)	DEK-NUP214
inv(3)/t(3;3)(q21;q26)	Riboforina-EV11
t(3;5)(q25;q34)	MLF1-NPM1
t(15;17)(q22;q21)	PML-RAR α
t(11;17)(q23;q21)	PLZF-RAR α
t(11;17)(q13;q21)	NuMA-RAR α
t(5;17)(q35;q21)	NPM-RAR α
inv(16)/t(16;16)(p13;q22)	CBFB-MYH11
t(v;11q23)	v-MLL
t(6;11)(q27;q23)	MLL-AF6
t(9;11)(p22;q23)	MLL-AF9
t(11;19)(p13;q23)	MLL-ELL,MLL-ENL
t(8;16)(p11;p13)	MOZ-CBP
inv(8)(p11q13)	MOZ-TIF2
t(8;22)(p11;p13)	MOZ-p3000
t(12;15)(p13;q25)	TEL-TRKC
t(3;21)(q26;q22)	AML1-EV11
t(v;11)(v;p15)	v-NUP98
t(7;11)(p13;p15)	HOXA9-NUP98
t(1;11)(q23;p15)	NUP98-PMX1

v: cromosoma partner variable.

gran variedad de anomalías cromosómicas clonales, tanto numéricas como estructurales, en las LMA. Algunas de ellas se asocian de manera característica o específica a determinados rasgos clínico-citológicos. Si se utilizan los criterios morfo-citoquímicos del grupo cooperativo FAB -que distingue ocho subtipos de LMA- se observa que anomalías citogenéticas como la t(8;21)(q22;q22), t(6;9)(p23;q34), t(15;17)(q22;q21), inv(16)/t(16;16)(p13;q22), t(z;11q23) se asocian a los subtipos M2, M2 con basofilia, M3, M4 con eosinofilia y M5-FAB, respectivamente, sin ello significar que todas las LMA clasificadas, por ejemplo, como M2 o M5 presentarán la t(8;21) o la t(v;11q23) (1). En la tabla 1 puede observarse, junto a las alteraciones citogenéticas más clásicas, otras de más reciente descripción. Aberraciones cromosómicas como la inv(3)/t(3;3)(q26;q21) asociada a disme-gacariopoyesis y plaquetas normales o elevadas, monosomía 5, monosomía 7, del(5q), del(7q) y tri-

Tabla 2. Alteraciones genéticas no balanceadas en LMA

Monosomías-Trisomías	Deleciones	Alteraciones con pérdida y ganancia simultánea de material
-5	+4	del(5)(qv)
-7	+8	del(7)(qv)
-20	+11	del(12)(pv)
-21	+13	del(13)(q12q14)
-22	+14	del(20)(q12q13)
-X, Y	+21	i(X)(q13)

v: puntos de rotura variable.

somía 8, se han observado en todos los subtipos FAB sin mostrar una particular asociación¹. Una gran mayoría de alteraciones típicas de la LMA son reordenamientos equilibrados o balanceados y muchas de las citadas alteraciones están perfectamente caracterizadas a nivel molecular, se conoce su equivalente molecular o gen de fusión (tabla 1) y pueden ser detectados mediante la técnica de la transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de manera rutinaria. Algunas anomalías cromosómicas numéricas o no balanceadas se citan en la tabla 2 y en el momento actual su detección se realiza por ACC.

Aunque muchas de las alteraciones citogenéticas descritas en la LMA pueden considerarse características de linaje, el diagnóstico de primera línea de LMA vs leucemia linfoblástica aguda se basa en la morfología e inmunofenotipo celular. Sin embargo, en algunos casos la información genética es necesaria obtenerla prácticamente al mismo tiempo. Así, el paradigma lo constituye la leucemia promielocítica aguda (LPA). Aunque el perfil morfológico e inmunofenotípico es muy característico para la mayoría de LAP, se han descrito algunos casos de LAP críptica con t(15;17)(q22;q21)/PML-RARA⁺, que no sólo no presentarían las típicas células con "astillas" sino que el perfil inmunofenotípico mostraría positividad para los antígenos de clase II y de diferenciación precoz como el CD34 y TdT². Asimismo, la existencia de: a) LMA con fenotipo HLA-DR-, mielóide/"natural killer", morfológicamente subtipo M2-FAB, presencia de células hipergranulares y blastos de aspecto reniforme o lobulado, sin t(15;17)(q22;q21)/PML-RARA⁻; y b) variantes citogenéticas, es decir, t(11;17)(q23;q21)/PLZF-RARA⁺ y t(5;17)(q34;q21)/NPM-RARA⁺, con rasgos morfológicos aunque no idénticos a los de la LAP definida por la FAB pero con una gran semejanza³, hace que el acierto diagnóstico se complique extraordinariamente.

En los actuales protocolos de tratamiento de las LMA la cifra de blastos para la inclusión es del 30%. Sin embargo, se han descrito casos con alteraciones cromosómicas con gran repercusión clínica como son la t(8;21)(q22;q22)/AML1-ETO e inv(16)(p13q22)/CBFB-MYH11, que presentaban cifras inferiores al 30%. Tal como ha sido señalado, estos enfermos deben incluirse en los mismos regímenes terapéuticos y su conocimiento es, por tanto, esencial en el momento del diagnóstico⁴. En el mismo sentido, destacar que en los esquemas actuales de tratamiento se realiza profilaxis del SNC únicamente en las LMA con componente monocítico, es decir, M4 y M5 FAB; en aquellos casos con una LMA compatible con M2 FAB cuyos blastos presenten una positividad focal en la tinción de las esterasas inespecíficas, debemos descartar la presencia de la t(8;21)(q22;q22) antes de clasificarlos como M4 o M5 FAB, ya que este patrón citoquímico ha sido descrito en este tipo de leucemia⁵.

Pronóstico

Junto al valor diagnóstico señalado, la identificación de cambios cariotípicos ha demostrado ser un elemento importante en la subclasificación de las LMA-FAB en grupos más homogéneos aunque más importante aún, ha sido la demostración por diferentes investigadores, de que el cariotipo posee un valor pronóstico independiente. Así, es capaz de predecir la tasa de remisión, duración de la misma y supervivencia libre de enfermedad; los hallazgos citogenéticos-moleculares en el momento del diagnóstico permiten, pues, la estadificación de los enfermos con LMA en tres subgrupos de pronóstico favorable, intermedio y desfavorable. Resultados recientemente publicados muestran que el grupo de pronóstico favorable –que incluye a los enfermos con t(8;21)/AML1-ETO e inv(16),t(16;16)/CBFB-MYH11– presenta una tasa de remisión alta y una supervivencia a los 5 años de más del 50%, recibiendo únicamente quimioterapia a dosis alta de citarabina como tratamiento posremisión, frente al 32 y el 15% en los enfermos con cariotipo normal o con otras alteraciones citogenéticas, respectivamente⁶. Por lo que se refiere a las alteraciones genéticas incluidas en el grupo de pronóstico intermedio y desfavorable, cabe mencionar que algunas de ellas como por ejemplo la trisomía 8, fluctúan entre ambos dependiendo de las series. En nuestro centro, se sigue el protocolo de estudio y tratamiento diseñado por el grupo cooperativo CETLAM, el cual tiene en cuenta en la estratificación del tratamiento posremisión la clasificación genética (tabla 3), exceptuando en la LAP en la que la información genética es ya esencial para la elección del tratamiento de inducción y se considera una forma de LMA con personalidad propia. En el grupo favorable con t(8;21) (q22;q22), se han descrito determinados signos como la presencia de masa extramedular, expresión positiva de CD56, o cifra alta de leucocitos, este último también para la inv(16)/t(16;16) (p13q22) que influirían negativamente en el pronóstico¹. Dentro del grupo desfavorable, es interesante destacar la importancia de identificar el cromosoma *partner*, de entre los muchos que se asocian a la translocación t(11q23) y que involucran al gen *MLL*, ya que los enfermos con t(9;11)(p22;q23) presentan un pronóstico menos desfavorable que el resto¹, no obstante en otra serie no se ha confirmado⁷. Dentro de este mismo grupo señalar los resultados desalentadores con los tratamientos actuales, especialmente para los enfermos con inv(3)/t(3;3), cariotipo complejo o con alteraciones de los cromosomas 5 y 7, manteniéndose en estas dos últimas el mal pronóstico incluso con trasplante de progenitores hemopoyéticos⁸. Sin embargo, en otra serie posterior se observa que si la anomalía del cromosoma 7, se encuentra sola y en forma de deleción del(7q), tiene un pronóstico similar al asignado al cariotipo normal⁷. Por tanto, es importante también

Tabla 3. Alteraciones genéticas y tratamiento posremisión en la LMA (excepto LAP) según protocolo CETLAM/LMA-99

Pronóstico	Alteración genética	Tratamiento posremisión
Favorable	t(8;21)/AML1-ETO (única o acompañada) inv(16)-t(16;16)/CBFB-MYH11 (única o acompañada)	QT (citarabina a dosis altas)
Intermedio	Cariotipo normal (con o sin dupl MLL o FLT3)	Auto-TPH
Desfavorable	Cariotipo complejo inv(3)/t(3;3) -5, 5q-, -7, 7q- Trisomía 8 t(v;11q23) t(8;16) t(6;9) No mitosis Miscelánea	Alo-TPH (si donante)

dupl: duplicación; QT: quimioterapia; TPH: trasplante progenitores hematopoyéticos.

perfeccionar la caracterización de los subgrupos citogenéticos.

En lo que se refiere al grupo de pronóstico intermedio con cariotipo normal, destacar la descripción de un nuevo reordenamiento del gen *MLL*, en forma de duplicación parcial o fusión del mismo involucrando habitualmente los exones 2-8; de los 94 pacientes estudiados, un 11% presentaban esta alteración molecular y en ellos la duración de la remisión era significativamente más corta que en los pacientes sin duplicación del gen *MLL*⁹. Estos resultados han sido, recientemente, confirmados por otros investigadores¹⁰. En el mismo sentido, señalar la descripción de la duplicación de *FLT3*, tirosincinasa compuesta de cuatro dominios estructurales; la microduplicación del dominio yuxtamembrana de *FLT3* se encuentra alrededor del 20% de LMA, en muchos casos corresponden a cariotipo normal y, como la duplicación del gen *MLL*, se asocia a mal pronóstico¹¹. Estos hallazgos indicarían que el grupo de cariotipo normal es heterogéneo desde el punto de vista molecular y es necesario combinar otras metodologías para profundizar en su estudio. Finalmente, comentar que las anomalías cromosómicas añadidas a la t(8;21), t(15;17) e inv(16)/t(16;16) no influyen en el pronóstico favorable asignado, aunque en una serie¹, los enfermos con una del(9q) asociada a t(8;21) presentaron un supervivencia menor.

“Viejas” y nuevas metodologías en el diagnóstico citogenético-molecular de la leucemia mieloide aguda

El diagnóstico genético de la LMA, se realiza mediante el ACC y la técnica de RT-PCR. Ambos méto-

dos tienen ventajas e inconvenientes, por lo que deberían ser utilizados de manera complementaria y no alternativa. Las grandes limitaciones del ACC continúan siendo la no obtención de metafases en un pequeño número de casos o la mala calidad morfológica de los cromosomas, produciéndose falsos negativos para determinados cariotipos. Contrariamente al ACC, que detecta todos los cambios cromosómicos en un solo estudio, la RT-PCR descarta una sola alteración genética en cada análisis, únicamente puede utilizarse para aquellas alteraciones que ya se conozca el gen de fusión y en ocasiones, debido a su gran sensibilidad, puede producir falsos positivos aún en condiciones de máximo control. Con la introducción de la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), se ha incrementado la precisión diagnóstica del ACC tanto para anomalías cromosómicas sutiles, por ejemplo la inv(16)/t(16;16) y "masked" inv(16), como para anomalías citogenéticas complejas o cromosomas marcadores, indescifrables únicamente con el ACC¹². Además, utilizando sondas de secuencia específica, es capaz de identificar alteraciones genéticas submicroscópicas o reordenamientos crípticos que se hallan en el límite de resolución del ACC, dilucidando discrepancias entre ACC y RT-PCR¹³. En relación a ello, en diferentes series se describe una diferencia entre la frecuencia de detección de transcritos AML1-ETO y CBFβ-MYH11 por RT-PCR y la de la t(8;21)(122;q22) e inv(16)/t(16;16)(p13q22) por ACC, de $\approx 4\%$ ^{14,15}. En nuestra experiencia la diferencia observada entre ambas metodologías es menor, tanto en el protocolo anterior del CETLAM/LMA-94 como en el que actualmente se está realizando, CETLAM/LMA-99. Resultados recientes publicados en una serie de 412 casos de LMA, señalan también una incidencia menor de reordenamientos crípticos¹⁶ que la sugerida con anterioridad en otras series^{14,15}. Otros investigadores, han observado que aquellos enfermos que presentaba una positividad para el transcrito AML1-ETO pero no se detectaba la t(8;21)(q22;q22) en el ACC, alcanzaban la remisión completa un 40 frente al 90% para los casos con positividad en ambas metodologías¹⁷.

RT-PCR múltiple

Como ya se ha indicado, ninguno de los dos métodos mencionados, es decir, RT-PCR y FISH, analiza todo el genoma en un solo experimento y únicamente confirman la presencia o ausencia de la alteración genética que queremos determinar. Recientemente se han desarrollado un tipo de RT-PCR llamada "multiplex" RT-PCR, que permite en un solo análisis detectar simultáneamente hasta 29 translocaciones, incluyendo múltiples cebadores. Se ha aplicado a una serie de 164 casos de leucemia aguda y en un 33% de LMA y un 47% de LLA se han detectado aberraciones cromosómicas submicroscópicas o translocaciones "masked" no evidenciadas en el ACC; su gran poten-

cial como técnica de cribaje, la hacen muy interesante en el estudio inicial de leucemias agudas complementando al ACC¹⁸.

RACE y "Panhandle" PCR

Estas son PCR de nueva generación, que presentan también un gran interés para estudiar genes como el MLL o NUP98, que recombinan potencialmente con un gran número de cromosomas y por tanto, con gran variedad de puntos de rotura. Requieren un ARN o ADN de buena calidad y un cebador específico del gen conocido. Por un procedimiento de circulación, digestión y clonaje se puede conocer la secuencia problema¹⁹.

Hibridación *in situ* múltiple

Esta técnica de hibridación *in situ* de múltiples colores incluye tanto el cariotipo espectral (SKY) como la Multiplex FISH (M-FISH)²⁰. Ambos consiguen -mediante la combinación de cinco fluorocromos distintos- una única combinación de color y la visualización simultánea de los 24 cromosomas pintados de diferentes colores, obteniéndose un cariotipo molecular. Al igual que el ACC, esta técnica requiere de células en división y explora todo el genoma de una sola vez, sin conocimiento previo de la alteración citogenética. Sin embargo, no identifica reordenamientos intracromosómicos, como son las inversiones, sino que fundamentalmente detectaría las alteraciones citogenéticas que podrían pasar desapercibidas con el bandeado-G convencional, además de poder resolver inequívocamente cariotipos complejos, identificando alteraciones citogenéticas con gran repercusión clínica que quedarían enmascaradas por la complejidad del cariotipo²⁰. En nuestro laboratorio estamos implementado la M-FISH y aunque todavía no se dispone de un gran número de casos, nos ha permitido descifrar con una sola hibridación casos con gran complejidad (fig. 1).

Hibridación genómica comparada

La hibridación genómica comparada (CGH), detecta y localiza regiones cromosómicas que contienen pérdidas o ganancias de secuencias de ADN sin necesidad de células en división. Esta técnica se basa en comparar el ADN tumoral con el ADN de una muestra control normal o ADN de referencia, los cuales al cohibridarlos con una metafase normal se produce una relación de intensidad de fluorescencia a lo largo de todo el cromosoma; las regiones con ganancias o pérdidas de ADN producen una desviación en el perfil de fluorescencia a la derecha y a la izquierda, respectivamente. Con este método es posible detectar cambios genómicos cuando el tamaño de la región afectada excede a 5 Mb; también es importante la representación del tejido tumoral que debe exceder al 50% y no detecta alteraciones genéticas balanceadas. La CGH se ha aplicado fundamentalmente a tumores sólidos y linfomas. En nues-

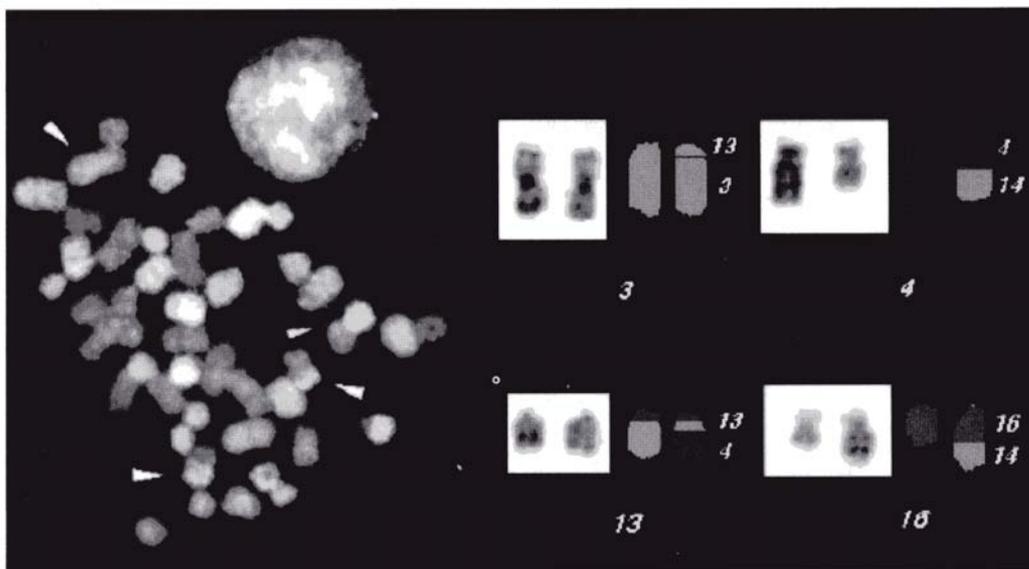


Figura 1. M-FISH de una metafase correspondiente a un caso de LMA con cariotipo complejo. A la derecha cariotipo parcial con bandeos G y patrón con diferentes colores correspondiendo a los intercambios de material cromosómico.

tro laboratorio la estamos aplicando como técnica complementaria al ACC en el estudio de las LMA²¹. De los resultados obtenidos hasta el momento, destacar que nos ha permitido corregir anomalías que afectan, por ejemplo, a cromosomas metacéntricos como el 19 o 16 con pérdida de todo un brazo y que técnicas como la M-FISH o FISH con sondas de pintado cromosómico no resolverían (fig. 2); identificación de material extra, irreconocible por su patrón de bandas o de cromosomas marcadores. Además, se ha identificado en 3/7 casos con metafases insuficientes para el ACC, un cariotipo anómalo siendo uno de ellos muy complejo con múltiples ganancias, pérdidas y amplificación del cromosoma 13q (fig. 3).

Es de esperar que con la combinación de estas metodologías se consiga un diagnóstico genético y una clasificación pronóstica más precisa, que permita un tratamiento más individualizado de las LMA.

Nuevas lesiones moleculares: mutaciones puntuales en leucemia mieloide aguda

AML-1

La pérdida de función de AML1 por mecanismos diferentes a las translocaciones cromosómicas es un hallazgo reciente; se describió en una serie de familias con trombocitopenia hereditaria y predisposición a LMA²². Estudios de ligamiento determinaron la presencia de asociación en el cromosoma 21 y posteriormente se evidenciaron mutaciones en el dominio RUNT de esta proteína. En la actualidad se han descrito mutaciones de AML1 en pacientes con

LMA-M0 de la clasificación FAB con trisomía adquirida del cromosoma 21²³.

CEBPA

CEBPA es una proteína con actividad de factor de transcripción que es esencial en la diferenciación normal de la serie granulocítica. Se han identificado 10/137 casos con LMA con mutaciones en heterocigosis de CEBPA. La proteína anormal interfiere con la función fisiológica de CEBPA²⁴; la mayoría de los casos corresponden al subtipo LMA-M2 de la clasificación FAB. No se han establecido aún correlaciones pronósticas.

C-kit

Pertenece al grupo de las tirosincinasa de tipo III y se ha encontrado mutado en una serie de 21 pacientes con inv(16)(p13q22); en 7 casos se detectaron microdeleciones de c-kit²⁵. Estos hallazgos, si son confirmados por otros grupos, pueden servir para estratificar esta entidad, incluida dentro del grupo de buen pronóstico en los esquemas terapéuticos actuales.

Conclusión

El diagnóstico genético, mediante la combinación de técnicas de citogenética y molecular convencionales, es fundamental para establecer una clasificación genotípica de las LMA y elegir el tratamiento más adecuado en cada caso. La incorporación de nuevas metodologías en la práctica diaria para perfeccionar los grupos pronósticos actuales y la colaboración entre los diferentes grupos de trabajo para

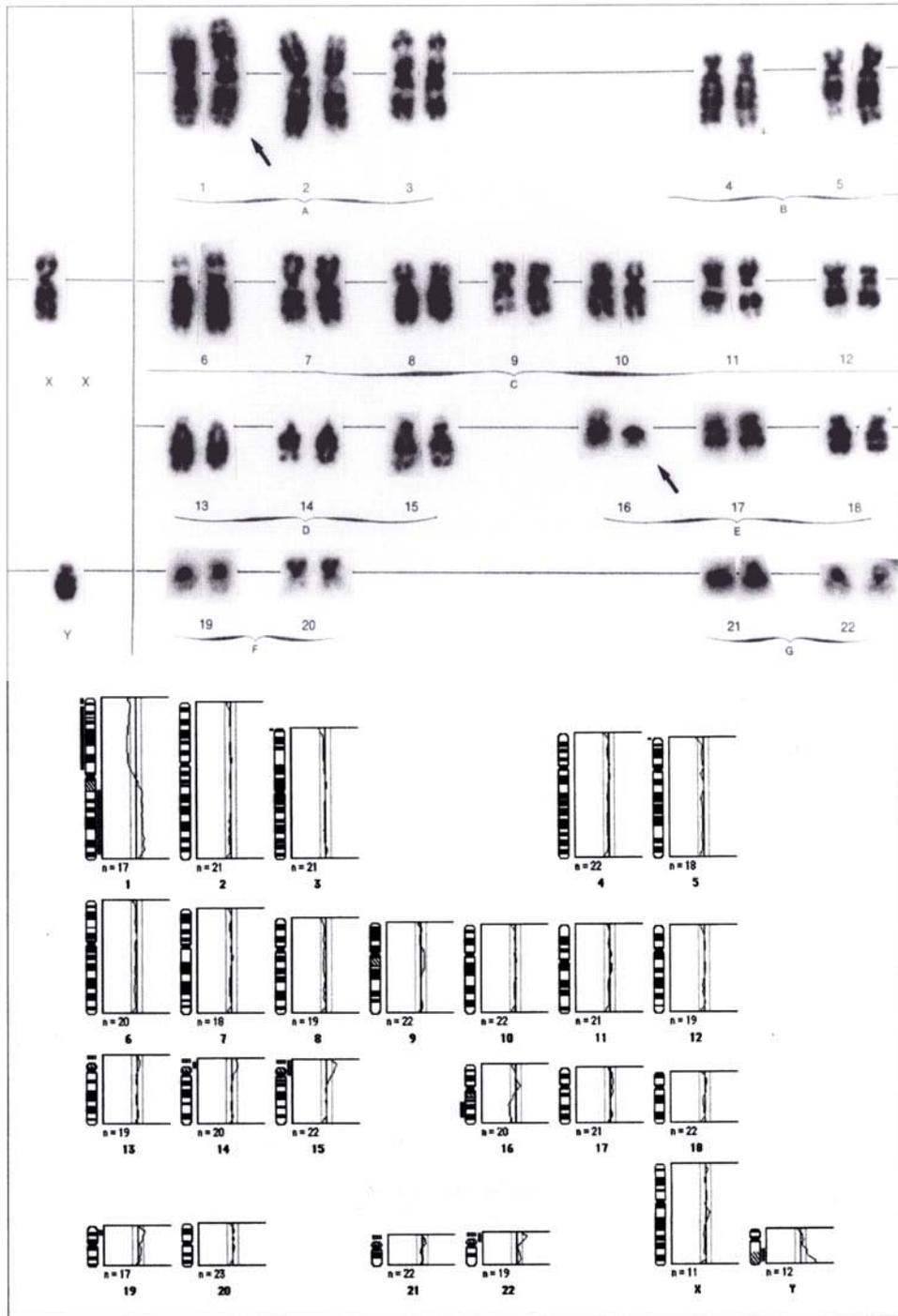


Figura 2. Arriba: cariotipo completo con bandeado G. Se señala el isocromosoma 1q y la del(16p). Abajo: CGH del mismo enfermo en el que se observa las desviaciones en el perfil indicando pérdidas y ganancias de material cromosómico. Nótese que para el cromosoma 16, el perfil indica pérdida del brazo largo del(16q).



Figura 3. Metafase hibridada con CGH, de un enfermo con metafases insuficientes al ACC. Obsérvese pérdidas, ganancias en múltiples cromosomas y amplificación en el cromosoma 13q.

mejorar la asistencia de los enfermos, debería continuar siendo uno de nuestros principales objetivos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado, en parte, por la beca FIS 00/0352 y XT 00026 de la Generalitat de Catalunya. S.C. está financiada por una beca predoctoral (00285) de la Generalitat de Catalunya. Los autores agradecen a los componentes del grupo cooperativo CETLAM su colaboración en el protocolo de estudio y tratamiento de la LMA-99.

Bibliografía

1. Mrózek K, Bloomfield CD. Chromosome aberrations in de novo acute myeloid leukemia in adults: clinical implications. *Rev Clin Exp Hematol* 1998; 5: 44-67.
2. Aventin A, Mateu R, Martino R et al. A case of cryptic acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 1998; 12: 1490-1491.
3. Sainy D, Liso V, Cantù-Rajoldi A et al. A new morphologic classification system for acute promyelocytic leukemia distinguishes cases with underlying PLF/RARA gene rearrangements. *Blood* 2000; 96: 1287-1296.
4. Aventin A, Moltó E. Inversion inv(16)(p13q22) in a patient with myelodysplastic syndrome. Fourth symposium on myelodysplastic syndromes. Barcelona, april 1997.
5. Swirsky DM, Li YS, Matthews JG et al. 8;21 translocation in acute granulocytic leukaemia: cytological, cytochemical and clinical features. *Br J Haematol* 1984; 56: 199-213.
6. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res* 1998; 58: 4173-4179.
7. Grimwade D, Walker H, Oliver F et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: Analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. *Blood* 1998; 92: 2322-2333.
8. Gale RP, Horowitz MM, Weiner RS et al. Impact of cytogenetic abnormalities on outcome of bone marrow transplants in acute myelogenous leukemia in first remission. *Bone Marrow Transpl* 1995; 16: 203-208.
9. Caligiuri MA, Strou MP, Lawrence D et al. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 1998; 58: 55-59.
10. Schnittger S, Kinkelin U, Schoch C et al. Screening for MLL tandem duplication in 387 unselected patients with AML identify a prognostically unfavorable subset of AML. *Leukemia* 2000; 14: 796-804.
11. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y et al. Prognostic implications of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-3080.
12. Espadaler M, Aventin A, Martín-Henao GA et al. Identificación de cromosomas marcadores y translocaciones cromosómicas complejas, mediante hibridación *in situ* no radiactiva, en hemopatías malignas. *Sangre* 1994; 39: 383-387.
13. Aventin A, La Starza R, Nomdedéu J et al. Typical CBFβ/MYH11 due to insertion of the 3'-MYH11 gene into 16q22 in a case of acute monocytic leukemia with normal chromosomes 16 and trisomies 8 and 22. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 123: 137-139.
14. Langabeer SE, Walker H, Gale RE et al. Frequency of CBFβ/MYH11 fusion transcripts in patients entered into the U.K. MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 96: 736-739.
15. Langabeer SE, Walker H, Rogers JR et al. Incidence of AML/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 99: 925-928.
16. Rowe D, Cottenill SJ, Ross FM et al. Cytogenetically cryptic AML1-ETO and CBFβ-MYH11 gene rearrangements: incidencia in 412 cases of acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2000; 111: 1051-1056.
17. Sarriera JE, Albitar M, Estrov Z et al. Comparison of outcome in acute myelogenous leukemia patients with translocation (8;21) found by standart cytogenetic analysis and patients with AML/ETO fusion transcript found by PCR testing. *Leukemia* 2001; 15: 57-61.
18. Pallisgaard N, Hokland P, Riisshoj DC et al. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for simultaneous screening of 29 translocation and chromosomal aberrations in acute leukemia. *Blood* 1998; 92: 574-588.
19. Felix CA, Jones DH. Pandhandle PCR: a technical advances to amplify MLL genomic translocations breakpoints. *Leukemia* 1998; 12: 976-981.
20. Schröck E, Padilla-Nash H. Spectral karyotyping and multicolor fluorescence *in situ* hybridization reveal new tumor-specific chromosomal aberrations. *Semin Hematol* 2000; 37: 334-347.
21. Aventin A, Casas S, Vallespi T et al. Hibridación Genómica Comparada en el estudio de la leucemia mieloide aguda: Resultados preliminares.

- inares de los pacientes incluidos en el protocolo LMA-99. Haematologica 2000; 85 (Supl 3): 30.
22. Song WJ, Sullivan MG, Legare RD et al. Haploinsufficiency of CBFA2 causes thrombocytopenia with propensity to develop acute myelogenous leukaemia. Nat Genet 1999; 23: 166-176.
23. Preudhomme C, Warot-Loze D, Roumier C et al. High incidence of biallelic point mutations in the Runt domain of the AML1/PEBP2 α B gene in M0 acute myeloid leukemia and in myeloid malignancies with acquired trisomy 21. Blood 2000; 96: 2862-2869.
24. Pabst T, Mueller BU, Zhang P et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein- α (C/EBP α), in acute myeloid leukemia. Nature Genet 2001; 27: 263-270.
25. Gari M, Goodeve A, Wilson G et al. C-kit proto-oncogene exon 8 in-frame deletion plus insertion mutations in acute myeloid leukemia. Br J Haematol 1999; 105: 894-900.

CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS MIELOBLÁSTICAS AGUDAS

S. WOESSNER Y T. VALLESPÍ*

*Escuela de Hematología Soledad Woessner-IMAS. Laboratorio de Citología Hematológica. Departamento de Patología. Hospital del Mar. *Servicio de Hematología. Unidad de Citología-Citogenética. Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.*

Introducción

Desde 1976 se han utilizado los criterios del grupo FAB¹ para clasificar las leucemias mieloides agudas (LMA). Estos criterios se basan exclusivamente

Tabla 1. Clasificación WHO (World Health Organization) o de la OMS para las leucemias mieloides agudas

- I. LMA con alteraciones citogenéticas características
 - LMA con t(8;21)(q22;q22) o AML1(CBF α)/ETO
 - Leucemia promielocítica aguda (LMA con t(15;17)(q22;q11-12)* y variantes, o PML/RAR α)
 - LMA con eosinófilos atípicos en médula ósea con inv(16)(p13q22) o t(16;16)(p13;q11)** o CBF β /MYH11
 - LMA con anomalías en 11q23
 - II. LMA con displasia multilineal
 - Con síndrome mielodisplásico previo
 - Sin fase previa de mielodisplasia
 - III. LMA secundaria a tratamientos previos
 - Agentes alquilantes
 - Inhibidores de la topoisomerasa II
 - Otros
 - IV. LMA sin características de los grupos anteriores
 - LMA escasamente diferenciada
 - LMA sin maduración
 - LMA con maduración
 - Leucemia mielomonocítica aguda
 - Leucemia monocítica aguda
 - Leucemia eritroide aguda
 - Leucemia megacariocítica aguda
 - Leucemia basofílica aguda
 - Panmielosis aguda con mielofibrosis
- Leucemias agudas bifenotípicas

*Gen RAR α ubicado en 17q11-q21; **Probable error tipográfico. Debería ser (p13;q22).

en características morfológicas y citoquímicas de las células hemopoyéticas. A pesar de que la clasificación MIC² (morfología, inmunofenotipo, citogenética) potenció un diagnóstico que integraba técnicas que reflejaban la complejidad de la célula maligna, la clasificación FAB siguió siendo la más ampliamente aceptada. Sin embargo, poco a poco, se fueron separando entidades citogenéticas que, o bien determinaban un tratamiento especial (ácido transretinoico en la leucemia con t(15;17), o bien definían grupos de riesgo diferente (t[8;21], inv[16], anomalías en 11q23) que permitían adecuar el tratamiento al riesgo de la leucemia. La aparición de técnicas (PCR, FISH), que permiten detectar el equivalente molecular de las entidades citogenéticas descritas, e incluso descubrir reordenamientos crípticos, ha permitido correlacionar los hallazgos biológicos con la respuesta al tratamiento. Más recientemente, un grupo de expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) plantea una clasificación para las LMA³ más acorde con el diagnóstico integrado de las leucemias y que la mayoría de hematólogos estaban ya utilizando.

La clasificación WHO (World Health Organization) o de la OMS para las LMA separa cuatro grupos³:

- I. LMA con alteraciones citogenéticas características.
- II. LMA con displasia multilineal.
- III. LMA secundaria a tratamientos previos.
- IV. LMA sin características de los grupos anteriores.

El primer grupo (tabla 1) recoge las anomalías citogenéticas específicas, en su mayoría translocaciones recíprocas, que originan genes de fusión que codifican proteínas quiméricas con capacidad oncogénica. Incluyen cuatro tipos de translocaciones con relevancia clínica e implicaciones terapéuticas. Está ampliamente demostrado que pacientes con LMA y presencia del gen de fusión PML/RAR α se benefician del uso del ácido transretinoico⁴. Los pacientes con AML1(CBF α)/ETO o presencia de CBF β /MYH11 tienen mejor pronóstico que el resto de LMA. Finalmente, los pacientes con reordenamientos del gen MLL (situado en 11q23) tienen un pronóstico grave por lo que, si es posible, pueden beneficiarse de un trasplante alogénico⁵.

En este primer grupo, cabe señalar que, a pesar de que las características morfológicas o la citogenética convencional pueden orientar el diagnóstico, es necesario corroborar la presencia del reordenamiento genético, que produce o es producido por la translocación, mediante técnicas moleculares. Los genes de fusión son los que condicionan el tipo de tratamiento y son indispensables para el seguimiento de enfermedad residual⁶.

En el grupo II se clasifican las LMA con mielodisplasia en más de una línea celular (multilineal). Este nuevo grupo recoge las LMA con displasia multilineal con fase previa de mielodisplasia o sin ella.

3.2 Anàlisi d'anomalies cromosòmiques mitjançant hibridació in situ fluorescent i múltiple-FISH (I, II, III)

3.2.1 Duplicació parcial en tàndem del gen *MLL* (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(1):8-12.

Es van analitzar per FISH dos casos de LMA que presentaven un cariotip de 46,XY,add(16)(p13) i 46,XX,add(18)(p11.2), respectivament. La hibridació amb les sondes WCP-11 i WCP-16 en el cas 1, i amb WCP-11 i WCP-18 en el cas 2, va confirmar la presència de material del cromosoma 11 al cromosoma 16 i 18, respectivament. Les sondes LSI-*MLL*, PAC 980J15, PAC 891P24 i PAC 770G7 es van utilitzar per estudiar la trisomia parcial del cromosoma 11. En el cas 1, es van observar tres senyals de cada una de les sondes LSI-*MLL*, PAC 980J15 i PAC 770G7 localitzades als cromosomes 11 normals i en el cromosoma der(16), i dues corresponents a PAC 891P24 localitzades als cromosomes 11 normals (Fig. 1A i C). Així, la trisomia parcial del cromosoma 11 en el cas 1 s'inicia per sota de PAC 891P24 (gen *ATM*). En el cas 2, es van identificar tres senyals de cada una de les sondes LSI-*MLL*, PAC 980J15, PAC 891P24 i PAC 770G7 localitzades en els cromosomes 11 normals i en el cromosoma der(18) (Fig. 1B i D). Així, la trisomia parcial del cromosoma 11 en el cas 2 s'inicia per sobre de PAC 891P24 (gen *ATM*). Per tant, la trisomia parcial del cromosoma 11 diagnosticada en ambdós casos era a causa de la translocació desequilibrada der(16)t(11;16)(q23;p13) i der(18)t(11;18)(q22;p11.2), respectivament. En tots dos casos l'anàlisi molecular per Southern-blot va detectar reordenament del gen *MLL*, amb un patró de bandes suggestiu a presentar també duplicació interna (Fig. 2). La DPT del gen *MLL* es va confirmar posteriorment mitjançant RT-PCR (Fig. 2).