

Citogenética humana: del microscopio al microchip

Dra. Irene Larripa

Academia Nacional de Medicina
ibl@hematologia.anm.edu.ar



CONFERENCIA

HEMATOLOGIA, Vol. 15 N° 2: 27-34
Julio-Octubre, 2011

Si analizamos la historia de la citogenética humana, podemos considerar que se inicia en el año 1956 cuando Tjio y Levan, a partir de cultivos de células embrionarias humanas, pudieron establecer que el hombre poseía 46 cromosomas en las células somáticas normales. Este hallazgo fue el punto de partida de una continua e ininterrumpida serie de descubrimientos en el área de la citogenética. En esa época los cromosomas se ordenaban teniendo en cuenta solamente el tamaño y posición del centrómero en 7 grupos: A, B, C, D, E, F y G. A continuación se enumeran los hallazgos citogenéticos más importantes vinculados con el área médica. En 1959 Lejeune publica la primer aberración cromosómica consistente con la presencia de un pequeño cromosoma supernumerario (identificado años después como +21) en niños afectados con el síndrome de Down. Ese mismo año se identificaron los primeros casos de aneuploidías de los cromosomas sexuales en los síndromes de Turner (Ford, 1959) y Klinefelter (Jacobs, 1959). Al año siguiente se identificaron otros síndromes con malformaciones congénitas y presencia de cromosomas supernumerarios en el grupo D (Patau, 1960) o en el grupo E (Edwards 1960), identificados posteriormente como trisomía 13 o 18 respectivamente. En 1960 se publica la técnica del cultivo de leucocitos de sangre periférica (Morrhead, 1960), revolucionando el modo de obtener células en división mitótica, lo cual facilitó enormemente los estudios citogenéticos. También en ese período comienzan a analizarse las roturas cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas y presencia de micronúcleos para evaluar el daño inducido al ADN por la exposición a diversos mutágenos o agentes genotóxicos, iniciándose el área de la genética toxicológica. Con estas metodologías se pudieron analizar diversas patologías genéticas de deficiencia en la reparación del ADN tales como: anemia de Fanconi (AF) y ataxia telangiectasia (Schu-

ler, 1969). Años más tarde Auerbach (1985) publica el ensayo *in vitro* de fragilidad cromosómica con diepoxibutano, utilizado para diagnóstico pre y post natal de AF.

En 1960 Nowell y Hungenford describen por primera vez la asociación entre una alteración citogenética adquirida (no constitucional) y una patología oncohematológica, identificando la presencia de un cromosoma de menor tamaño a lo esperado para el grupo G, que se observaba en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC). La tinción uniforme con Giemsa, utilizada en ese momento, impedía la identificación cromosómica, por lo cual se lo denominó cromosoma Philadelphia aludiendo a la ciudad donde se realizó el hallazgo.

Respecto a avances en los métodos de cultivos celulares en 1966, Steele & Breg reportan el cultivo de líquido amniótico haciendo posible determinar la constitución cromosómica del embrión, esta metodología sigue vigente siendo actualmente una de las técnicas más utilizadas para realizar estudios de diagnóstico prenatal.

En el año 1968 Casperson y Col descubrieron la capacidad de los colorantes fluorescentes como los derivados de la quinacrina para producir zonas pálidas y brillantes a lo largo del cromosoma metafásico. A partir de este hallazgo en el año 1970, el mismo grupo de investigación publica (Casperson, 1970) el patrón de bandeado con fluorescencia de los cromosomas humanos (bandas Q, por quinacrina), rápidamente surgieron numerosas técnicas de bandeado utilizando enzimas proteolíticas, tales como la tripsina (Seabright, 1971) o realizando pretratamiento con una solución salina a 60°C (Sumner, 1971). En ambos casos se obtenía un patrón de bandeado, luego de la tinción con Giemsa (bandas G), que era equivalente al patrón de bandas Q. Es decir las bandas claras y oscuras por bandeado G se correspondían a las páli-

das y brillantes con quinacrina respectivamente. En Francia tratando los preparados cromosómicos con buffer fosfato lograron obtener un patrón de bandas inverso al patrón de bandas G al cual denominaron bandas R (por reverso). También se implementaron técnicas que permitían detectar bandas específicas para determinadas regiones cromosómicas, tales como: la heterocromatina constitutiva centromérica (bandas C), regiones teloméricas (bandas T) y organizadoras del nucleolo (bandas NORs). Las bandas Q, G y R se asocian a un patrón de replicación del ADN, mientras que las bandas C, T y NOR a estructuras específicas de los cromosomas. Las técnicas de bandeo poseen diferente nivel de resolución dependiendo del estado de condensación cromosómica, directamente relacionado con el ciclo celular. En metafase media el número promedio de bandas es de 400 a 500, permitiendo detectar deleciones o duplicaciones de 5 – 10 Mb. Si las técnicas de bandeo se realizan en estadios de menor condensación cromosómica como metafase temprana o prometáfase, el número de bandas se incrementa a 800 – 1000 (bandeo de alta resolución) (Yunis, 1976). Esto permite identificar pequeñas deleciones cromosómicas menores a 5 Mb, no detectadas con el bandeo convencional.

A partir del gran desarrollo de los diferentes métodos de bandeo el progreso de la citogenética fue imparable en todos los campos: animal, vegetal y humano. Esto llevó a la necesidad de estandarizar la información citogenética obtenida. En 1971 se realiza la Conferencia de París donde se establece un Sistema Internacional de Nomenclatura para los cromosomas humanos en base a su patrón de bandas G. Estas normas, hoy conocidas como ISCN (*International System of Chromosome Nomenclature*) se han ido actualizando en los años sucesivos: 1975, 1978, 1981, 1985, 1991, 1995, 2005 siendo la última en el 2009.

Recién en el año 1973 Janet Rowley demuestra que el cromosoma Philadelphia es el resultado de una translocación balanceada y recíproca entre los cromosomas 9 y 22 originando la t(9;22)(q34;q11), iniciando la era de la citogenética hematológica. En los años siguientes se fueron identificando nuevas alteraciones específicas, demostrando el valor diagnóstico de las mismas. A partir de la década del 70 comienza a considerarse a los estudios citogenéticos como una herramienta de relevancia en hematología por sus implicancias diagnósticas, pronósticas y de seguimiento. A partir de la identificación de los puntos de ruptura de los marcadores cromosómicos específicos de las diferentes neoplasias se pudieron caracterizar y mapear los genes involucrados en la génesis tumoral.

Paralelamente con los avances de la citogenética, en la década del 70 surge la técnica de Southern Blot (1975). Esta nueva metodología de biología molecular

(digestión con enzimas de restricción, transferencia a membranas de nylon e hibridación con sondas marcadas con P³²) permitió detectar reordenamientos genómicos confirmando las translocaciones cromosómicas identificadas por bandeo. En 1985 el bioquímico J. Mullis publica la innovadora técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo cual produjo una verdadera revolución en la investigación biológica y médica lo que determinó que recibiera el Premio Nobel de Química en 1993. Todos los avances tecnológicos surgidos durante la década del 80 incrementaron aún más el conocimiento de los cambios genéticos de las células tumorales

A partir de la década del 80 comienza a desarrollarse la técnica de hibridación in situ no radioactiva, denominada FISH (fluorescence in situ hybridization). Esta nueva metodología utiliza sondas genómicas marcadas directa o indirectamente con fluorocromos (Langer, 1981) (Cremer, 1986). Este nuevo abordaje aumenta la sensibilidad y especificidad de detección, respecto a la marcación con timidina H³ o P³², pues permite visualizar una o mas sondas marcadas con diferentes fluorocromos simultáneamente. Además evita el uso de material radioactivo y posterior revelado autorradiográfico, simplificando el estudio. El desarrollo del FISH dió lugar al origen de la denominada citogenética molecular, esta metodología permite conseguir información citogenética aún con bajo índice mitótico, mala morfología cromosómica y en cualquier etapa del ciclo celular. Las sondas utilizadas pueden ser centroméricas (ADN repetido alfa satélite), de pintado cromosómico (mezclas de secuencias de librerías de cromosomas específicos enteros) y de secuencia única (presentes en una sola copia) (Collins, 1991). Dichas sondas permiten identificar alteraciones estructurales, numéricas, rearrreglos complejos, alteraciones submicroscópicas (crípticas), deleciones, duplicaciones, aún en núcleos interfásicos. Esta metodología ha tenido un alto impacto especialmente en patologías de baja actividad proliferativa como la LLC (García-Marco, 1997) y mieloma (Fonseca, 2007). La posibilidad de combinar las técnicas de FISH e inmunohistoquímica proveen un poderoso método para investigar el linaje celular asociado a la alteración genética clonal (Price, 1992) (Knuutila, 1997)

Cuando las técnicas de FISH se realizan sobre la fibra extendida de ADN (Fibro FISH) aumenta el poder de resolución permitiendo estudiar alteraciones intragénicas. Para ello se usa una serie de sondas marcadas alternativamente con dos colores que cubren un gen o parte de él. La identificación de la falta o duplicación de alguna de las sondas que hibridan consecutivamente permiten inferir deleción o duplicación intragénica respectivamente (Parra,

1993). Esta metodología resulta de utilidad para investigar zonas crípticas del genoma muy involucradas en neoplasias tales como 11q23. La ventaja de este método sobre el Southern blot o electroforesis de campos pulsados es su simplicidad y rapidez. Solamente unas pocas imágenes necesitan ser examinadas para obtener información sobre secuencias genómicas de hasta 250 Kb.

Con todas estas herramientas metodológicas a disposición de los grupos de investigación cada vez fue mayor la información disponible sobre estudios cromosómicos de células tumorales en la literatura internacional. En la Universidad de Lund, Suecia, Mitelman y Levan (1978) recopilaron toda la información citogenética disponible hasta ese momento, lo cual le permitió demostrar que las aberraciones cromosómicas de las neoplasias humanas tendían a concentrarse en lugares específicos del genoma. Continuando con estos estudios y aumentando la casuística analizada Heim y Mitelman (1987) muestran que las alteraciones cromosómicas se encuentran distribuidas en el genoma de un modo no aleatorio y que diferentes regiones cromosómicas están preferencialmente involucradas en las distintas neoplasias. En base a las correlaciones realizadas entre puntos de ruptura citogenéticos y ubicación de oncogenes celulares concluyeron que la activación oncogénica era la responsable de la patogénesis de numerosas neoplasias. Estos conceptos ya habían sido enfatizados por Rowley (1983), Yunis (1983), Klein (1984), Varmus (1984), sobre el origen de la oncogénesis tumoral.

Con la finalidad de recopilar en forma concisa, sistemática e uniforme todas las alteraciones citogenéticas publicadas en las neoplasias humanas, se elaboró un Catálogo de aberraciones cromosómicas en cáncer (Mitelman, 2008). El primer reclutamiento de datos permitió obtener información de 3.144 neoplasias con cariotipo anormal, lo cual fue publicado en 1983. El flujo de datos cada vez mayor determinó que se realizaran nuevas ediciones del Catálogo en 1985, 1988, 1991 y 1994. En ese momento ya el número de casos citogenéticamente alterados ascendía a 22.076 casos. Como consecuencia del incremento constante de casos incluidos a partir de 1995 el catálogo paso a formato electrónico, para poder contener la enorme cantidad de información de la base de datos. En el año 2009 ya había superado los 55.000 casos incluidos.

A principios de la década del 90 comienza el proyecto genoma humano con la finalidad de determinar la secuencia completa del ADN e identificar los aproximadamente 25.000 – 30.000 genes del genoma humano. En febrero de 2001, el International Human Genome Sequencing Consortium y el grupo

liderado por el Dr. J Venter (Venter, 2001), publicaron la secuenciación definitiva del Genoma Humano, con un 99.9% de fiabilidad, comenzando la era post-genómica, en los años siguientes se fueron realizando sucesivas secuenciaciones que condujeron finalmente al anuncio del genoma completo en abril de 2003.

Todos los conocimientos adquiridos y el desarrollo tecnológico determinaron que las sondas de FISH convencionales se empezaran a utilizar en el laboratorio de hematología de manera rutinaria para el diagnóstico, pronóstico y evaluación de la enfermedad mínima residual. En estudios de investigación se empezaron a utilizar para identificar nuevos puntos de ruptura, mapeo de genes, organización de la cromatina en interfase y análisis de expresión de RNAm específico en muestras de tejidos.

Posteriormente, surgieron nuevas tecnologías de FISH, si bien se basan en el mismo fundamento que las sondas tradicionales, aportan mayor información porque posibilitan la identificación de todos los cromosomas utilizando técnicas de Multicolor-FISH (mFISH). La técnica de mFISH se define como la hibridación simultánea de varias sondas al menos tres sondas excluyendo la contratinción. El primer experimento exitoso que permitió identificar 3 secuencias nucleotídicas simultáneamente fue en 1989 (Nederlof, 1989). Pero recién en 1996 se comenzaron a utilizar los primeros sets de sondas de diferentes colores en genética humana. La tinción diferencial de cada uno de los 24 cromosomas humanos se logró usando bibliotecas genómicas de cromosomas totales, a esta metodología se la denomina Multiplex-FISH (M-FISH) (Speicher, 1996), Spectral Karyotyping (SKY) (Schrock, 1996) o 24-color FISH (Azoteifa, 2000). Para realizar estas técnicas que permiten identificar todos los cromosomas se utilizan combinaciones de 4 a 7 fluorocromos diferentes. Las técnicas de M-FISH y SKY permiten individualizar todos los pares cromosómicos simultáneamente con un color diferente, dando una imagen multicolor la cual es interpretada por un programa de computación adecuado. Ambas metodologías logran la diferenciación cromosómica a partir de la combinación de 5 fluorocromos diferentes, la discrepancia entre ambos sistemas de detección es la captura de la información, siendo en forma separada en el M-FISH (Speicher, 1996) o en una sola exposición en el SKY (Veldman, 1997), luego la imagen es procesada por un software adecuado que determina un pseudocolor diferente para cada cromosoma, lo cual permite identificarlos inequívocamente. Estas técnicas son muy útiles para estudiar cariotipos complejos, determinando el origen de los cromosomas marcadores de difícil identificación por bandeado. Las limitaciones de estas técnicas multicolor es el requerimiento de células

en división (metafases) y falta de resolución para rearrreglos inferiores a 1-3 Mb (dependiendo de la condensación de la cromatina).

Recientemente, se ha descrito la técnica de multi-banding-FISH (RxFISH), técnica similar a las de M-FISH o SKY, que permite la generación de un patrón de bandas de distintos colores para cada cromosoma (Muller, 1997). Esta metodología se basa en las homologías genómicas que existen entre la especie humana y dos especies de gibbon del género *Hylobates* (*Hylobates concolor* y *Hylobates syndactylus*) (Muller, 1998, 2000), permitiendo la identificación de alteraciones estructurales dentro de un mismo cromosoma (inversión, inserción, delección o duplicación intracromosómica) y la localización de puntos de ruptura con mayor exactitud. Esta metodología posee baja resolución detectando entre 80 – 90 bandas por cariotipo haploide. Este método aún está en fase de desarrollo y experimentación por lo cual no existen demasiadas referencias en la literatura. Esta metodología ha sido usada para identificar translocaciones crípticas en LMC (Harrison, 2000).

La hibridación genómica comparada (CGH), es una técnica de citogenética-molecular que permite detectar exclusivamente pérdidas y ganancias genómicas, mientras que los reordenamientos balanceados no pueden ser identificados. Esta metodología no requiere células en división (indispensable en la citogenética convencional) y tampoco requiere de ningún conocimiento previo de la constitución cromosómica (necesario para realizar estudios de FISH con sondas convencionales). Dicha técnica se basa en la hibridación in situ de ADN tumoral y ADN control marcados con fluorocromos de distinto color sobre metafases normales (Kallioniemi, 1992). Después de la hibridación, las variaciones numéricas del ADN tumoral se cuantifican mediante el coeficiente de intensidad de fluorescencia entre ambos ADNs hibridados con un software específico, permitiendo detectar delecciones y/o amplificaciones con una resolución efectiva de 15 – 20Mb. Esta técnica detecta cambios cuando la proporción de células tumorales es alta (40-50%), indicando baja sensibilidad. Los hallazgos citogenéticos detectados por esta metodología deben ser validados por FISH utilizando BACs o YACs específicos de la región involucrada.

Con el objetivo de aumentar la resolución del CGH se diseñó el estudio de CGH-array incorporando el uso de microarrays o chips de ADN. Estas micromatrices o microarreglos contienen miles de genes o parte de ellos sobre un soporte sólido (vidrio, plástico o silicio). La tecnología del chip de ADN se basa en la técnica de biología molecular, llamada Southern blot. El CGH-array, también denominado cariotipo molecular o virtual, detecta variaciones

en el número de copias. En lugar de usar metafases como soporte de hibridación utiliza chips de ADN que contienen clones genómicos (BAC, P1, cosmid, oligonucleótidos o cDNA) permitiendo estudiar el genoma completo o regiones específicas (Pinkel, 1998) (Albertson, 2003) (Shinawi, 2008). Las intensidades de fluorescencia en cada punto del array es analizada por un software que genera una relación logarítmica entre el ADN control y el ADN a investigar [\log_2 (test/referencia)]. El conocimiento de cada una de ellas en el array y la ubicación de cada una de ellas en el genoma permite la reconstrucción del cariotipo molecular *in silico* (Shaffer, 2006) (Edelman, 2009). Esta tecnología aumenta considerablemente los niveles de resolución llegando a ser detectables desbalances del orden de las kilobases, los tamaños genómicos de desbalances que pueden ser analizados por CGH array solo están limitados por los tamaños de los clones sembrados en el microarray. Las matrices comerciales (Affimetrix, Illumina, etc) contienen más de un millón de marcadores polimórficos y no polimórficos con una resolución de 10-20 Kb, aproximadamente el tamaño de un gen, lo cual es más de 1000 veces la resolución del cariotipo convencional.

En los tumores es frecuente la pérdida de heterocigocidad (LOH), este fenómeno puede ocurrir por diferentes mecanismos: delección simple, recombinación mitótica, conversión génica o disomía uniparental (UPD), también llamado LOH neutral. La UPD o conversión génica se infiere cuando no hay cambios en el número de copias, a pesar de haber perdido un alelo. Para que este fenómeno ocurra el individuo recibe 2 copias de uno de sus padres y ninguna del otro progenitor debido a errores en la meiosis I o II. Esta alteración se ha observado en enfermedades genéticas como Prader-Willi y síndrome de Angelman. Mientras que en las células tumorales la recombinación mitótica es el mecanismo más probable de adquisición de UPD.

Debido a que el LOH neutral no puede ser detectado por CGH array, FISH o cariotipo convencional se han diseñado los SNP-array que permiten investigar en un solo ensayo tanto el número de copias como el tipo de LOH, obteniendo una información completa del cariotipo molecular de las células neoplásicas. Actualmente para entender mejor la biología de las células tumorales es muy importante poder discriminar entre los diferentes eventos implicados en la LOH (Bruce, 2005) (Teh, 2005). La homocigocidad adquirida de un alelo no funcional de un gen supresor puede llevar a desarrollar cáncer en los individuos portadores. En las células tumorales la LOH neutral puede ser biológicamente equivalente al segundo hit de la hipótesis de Knudson. La UPD adquirida es bastante común tanto en tumores sólidos

dos como hematológicos y constituye del 20 al 80% de las LOH detectadas en los tumores humanos.

Actualmente existen numerosas plataformas comerciales y de laboratorios de investigación para realizar el estudio cromosómico basado en CGH array, lo cual permite la realización de un cariotipo de alta resolución *in silico*. Estos productos han recibido diferentes nombres: cariotipo virtual, cariotipo digital, alelo-cariotipo molecular y cariotipo molecular (Monzon, 2008) (Lehmann, 2008) (Vermeesch, 2007). Otros nombres utilizados para los estudios de SNP-array son SOMA (SNP oligonucleótido microarray) (Kulharya, 2008) y CMA (cromosoma microarray) (Probst, 2007).

Todos estos diseños de microarrays permiten realizar estudios de genómica estructural a nivel genómico cromosómico. Mientras que para realizar estudios de genómica funcional se han diseñado los microarrays de expresión. Estos últimos como su nombre lo indica miden la expresión génica de una muestra determinada (Skena, 1995) (Lashkari, 1997). Para realizar este análisis se realiza la extracción del RNA del tejido o células en estudio y un control sano (muestra de referencia) ambos se marcan con diferentes fluorocromos, los cuales se hibridan sobre matrices de cDNA (DNA monocatenario y complementario al RNAm que contiene la secuencia codificante de un gen) u oligonucleótidos. Otras plataformas de microarray de expresión realizan la marcación del RNA de la muestra problema y control con el mismo fluorocromo pero en matrices independientes. Luego la intensidad de fluorescencia es escaneada y evaluada por un software adecuado. Esta técnica es equivalente al northern blot de biología molecular y permite el estudio del transcriptoma analizando la regulación coordinada de la expresión génica. Estos chips de expresión génica se utilizan fundamentalmente en investigación en cáncer pues permiten estudiar cambios de expresión durante el ciclo celular, lo cual puede aportar datos para identificar nuevos marcadores tumorales asociados a diagnóstico, diseñar nuevas estrategias terapéuticas contra proteínas oncogénicas o desarrollar nuevos medicamentos en cáncer (Schulze, 2001) (Mills, 2001).

Los estudios realizados mediante array de expresión en diferentes tipos de tumores muestran que los perfiles de expresión correlacionan con los fenotipos histológicos de las diferentes neoplasias. En LLA se estudió el perfil de expresión de pacientes con diferentes alteraciones citogenéticas (hiperdiploidía, t(9;22), t(1;19), t(12;21), alteraciones en 11q23, y sin marcador citogenético). Teniendo en cuenta que estos subgrupos tienen diferente comportamiento respecto a respuesta al tratamiento y sobrevida, los estudios de expresión permitieron obtener información sobre

la biología asociada a los diferentes pronósticos, facilitando la monitorización del proceso terapéutico (Yeoh, 2002) (Ferrando 2002). Es indudable que esta tecnología permitirá conocer la expresión diferencial entre individuos sanos/enfermos, mutantes/salvajes, tratados/no tratados, identificar los genes característicos de una determinada patología o estadio de una enfermedad.

En la era pre-genómica los estudios genéticos se centraban en el análisis exhaustivo de genes individuales, mientras que en la era postgenómica se prioriza la cantidad de mediciones simultáneas, lo cual permite tener una estimación de menor resolución de un proceso biológico determinado pero con una perspectiva más integradora y general.

Para ejemplificar los avances citogenéticos y moleculares en oncohematología se elegirá una patología paradigmática como la LMC, donde cada avance tecnológico permitió ahondar en la patogénesis de la enfermedad hasta llegar a los conocimientos actuales. En 1960 (Nowell, 1960) se describe la primera alteración citogenética adquirida, el cromosoma Ph', en la médula ósea de pacientes con LMC. En 1973, trece años más tarde (Rowley, 1973) demuestra que el pequeño cromosoma Ph' no era una simple deleción, sino una translocación balanceada y recíproca entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)]. El conocimiento de los puntos de ruptura posibilitó la identificación de los genes involucrados en la translocación. Recién en 1985, la identificación del reordenamiento BCR-ABL (Heisterkamp, 1985) permitió esclarecer el mecanismo molecular de la patología. El producto final de este gen quimérico es una proteína de fusión citoplasmática de 210 KD con actividad de tirosina kinasa, la cual es responsable de la etiopatogenia de la enfermedad (Shtivelman, 1985) (Cortes, 1996). Teniendo en cuenta la actividad de la P210 la industria farmacéutica comenzó a diseñar un compuesto químico que pudiera inhibir dicho blanco molecular. A fines de la década del 90, la farmacéutica Novartis identificó la molécula 2-fenilaminopiridina (STI-571, imatinib, Gleevec) (Druker, 2000), la cual fue modificada con la introducción de los grupos metil y benzamida. Los ensayos clínicos confirmaron su eficacia terapéutica por lo cual fue rápidamente aprobado por la FDA en mayo de 2001. Un porcentaje variable de casos (25-30%) pueden adquirir mutaciones en el dominio kinasa del gen ABL lo cual determina resistencia al tratamiento con inhibidores de tirosina kinasa (Jabbour, 2006) (Branford, 2003) (Bengio, 2011)

El uso de las técnicas de bandeado, FISH y CGH permitieron caracterizar al cromosoma Ph', variantes de translocación (Heim, 1985) (Huret, 1990) y desbalances genéticos en determinadas regiones cro-

mosómicas con implicancias pronósticas (Su, 1999). Estudios de investigación aplicando la metodología de CGH array en LMC identificaron regiones asociadas a pérdidas preferentemente en 1p36, 5q21, 9p21 y 9q34 y ganancias en 8q24, 9q34, 16p y 22q11. Estos desbalances genómicos por defecto o exceso se detectaron en casos con aceleración de la enfermedad respecto de la fase crónica (Brazma, 2007). Posibilitando investigar el perfil genómico de alta resolución (1Mb) en un momento determinado o estadio de la enfermedad, lo cual permite sacar conclusiones sobre los cambios genéticos involucrados en la evolución clonal de la patología.

Estudios actuales con microarray de expresión demostraron cambios en los patrones de expresión génica asociados con progresión y respuesta al tratamiento (Radich 2006). Estudios recientes con chips de expresión de alta densidad han encontrado más de 3.000 genes significativamente asociados a las diferentes fases de la enfermedad. Dado que este tipo de estudios de alta performance son de difícil aplicación en la clínica, utilizando un método probabilístico, supervisado denominado BMA (Bayesian modeling averaging) pudieron identificar un pequeño set de 6 genes (NOB1, DDX47, IGSF2, LTB4R, SCARB1, SL-C25A3) que permiten discriminar entre fase crónica y crisis blástica, así como estadios intermedios. Debido a que los resultados terapéuticos están estrechamente vinculados a la fase de la enfermedad, estas probabilidades (entre 0 y 1) se pueden utilizar para determinar una estrategia de tratamiento basada en el riesgo al momento del diagnóstico (Oehler, 2009).

Es indudable que todo el avance tecnológico ha permitido identificar numerosas alteraciones crípticas, no detectables por métodos citogenéticos convencionales. El estudio de los cambios submicroscópicos y mutaciones adquiridas durante la evolución de la enfermedad permiten conocer los cambios subyacentes responsables de la progresión y falta de respuesta a los tratamientos actuales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albertson D, Pinkel D. Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. **Human Mol Genet** 12: 145-152, 2003.
2. Auerbach A, Adler B, Chaganti R. Prenatal and postnatal diagnosis and carrier detection of Fanconi anemia by a cytogenetic method. **Pediatrics** 67: 128-35, 1981.
3. Azofeifa J, Fauth C, Kraus J, et al. An optimized probe set for the detection of small interchromosomal aberrations by use of 24-color FISH. **Am J Hum Genet** 66, 1684-1688. 2000.
4. Bengio R, Riva M, Moiragahi B, et al. Clinical outcome of chronic myeloid leukemia imatinib-resistant patients: Do BCR-ABL kinase domain mutations affect patient survival? First multicenter Argentinean study. **Leukemia & Lymphoma** 2011 (en prensa)
5. Branford S, Rudzki Z, Walsh S, et al. Detection of BCR/ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance and mutations in the ATP phosphate-binding (P-loop) are associated with a poor prognosis. **Blood** 102: 276-283, 2003.
6. Brazma D, Howard J, Melo J, et al. Genomic profile of chronic myelogenous leukemia: imbalances associated with disease or progression. **Genes chromosomes Cancer** 46: 1039-1050, 2007.
7. Bruce S, Leinenen R, Lindaren C et al. Global analysis of uniparental disomy using high density genotyping arrays. **J Med Genet** 42: 847-851, 2005.
8. Cortes J, Talpaz M, Kantarjian H. Chronic Myelogenous Leukemia A Review. **The American Journal of Medicine** 100: 555-570, 1996.
9. Caspersen T, Farber S, Foley G, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. **Exp Cell Res** 49: 219-222, 1968.
10. Caspersen T, Zech L, Johansson C. Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. **Exp Cell Res** 60: 315-319, 1970.
11. Collins C, Kuo W, Segraves R, et al. Construction and characterization of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. **Genomics**, 11, 997-1006, 1991.
12. Cremer T, Landegent J, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: detection of trisomy 18 with probe L1.84. **Human Genetics**, 74, 346-352, 1986.
13. Druker B, Lyndon N. Lessons learned from the development of an ABL tyrosine kinase inhibitor for chronic myelogenous leukemia. **J Clin Invest** 105: 3-7, 2000.
14. Dutrillaux B, Lejeune J (1971). Sur une nouvelle technique d'analyse du caryotype humain. **C R Acad Sci (Paris)** 272: 2638-2640
15. Edelmann L, Hirschhorn K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. **Ann N Y Acad Sci**. 1151: 157-66, 2009.
16. Edwards J, Harnden D, Cameron A, et al. A new trisomic syndrome. **Lancet** i: 787-790, 1960.
17. Ferrando A, Neuberg D, Staunton J, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Cancer Cell** 1: 75-87, 2002.
18. Fonseca R. Multiple myeloma and FISH (but no CHIPS). **Blood** 109: 3132-3133, 2007.
19. Ford C, Jones F, Polani P et al. A sex chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome). **Lancet** 1: 711- 713, 1959.
20. Garcia-Marco J, Price C, Catovsky D. Interphase cytogenetics in chronic lymphocytic leukemia. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 94, 52-58, 1997.
21. Harrison C, Gibbons B, Yang F et al. Multiplex Fluorescence In Situ Hybridization and Cross Species Color Banding of a Case of Chronic Myeloid Leukemia in Blastic Crisis with a Complex Philadelphia Translocation. **Cancer Genetics and Cytogenetics** 116: 105-110, 2000.
22. Heim S, Billstrom R, Kristofferson U. Variant Ph translocations in chronic myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet** 18: 215-227, 1985.
23. Heim S, Mitelman F. Nineteen of 26 cellular oncogenes precisely localized in the human genome map to one of the 83 bands involved in primary cancer-specific rearrangements. **Human Genet** 75: 70-72, 1987.
24. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J et al. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. **Nature** 315: 758-761, 1985

25. Huret JL. Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukemia. **Hum Genet** 85: 565- 568, 1990.
26. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature** 409: 860-921, 2001.
27. ISCN An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2009). Shaffer L, Slovak M, Campbel L. (eds), (S Karger, Basel 2009)
28. Jabbour E, Kantarjian H, Jones D et al. Frequency and clinical significance of BCR/ABL mutations in patients with chronic myeloid leukemia treated with Imatinib mesylate. **Leukemia** 20: 1767-1773, 2006.
29. Jacobs P, Strong J. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism. **Nature** 183: 302-303, 1959.
30. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science** 258: 818-821, 1992.
31. Klein G, Klein E. Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. **Nature** 315: 190 -195, 1985.
32. Knuutila, S. Lineage specificity in haematological neoplasms. **British Journal of Haematology**, 96, 2-11, 1997.
33. Kulharya A, Flannery D, Norris K, et al. "Fine mapping of breakpoints in two unrelated patients with rare overlapping interstitial deletions of 9q with mild dysmorphic features". **American Journal of Medical Genetics**. 146A (17): 2234-41, 2008.
34. Langer PR, Waldrop AA, Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proc Natl Acad Sci USA**. 78: 6633-6637, 1981.
35. Lashkari D, DeRisi J, McCusker J, et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis". **Proc Natl Acad Sci USA**. 94: 13057-13062, 1997.
36. Lejeune J. Le mongolisme. Premier exemple d'aberration autosomique humaine. **Ann Génét**. 1959, 11: 116-119, 1956.
37. Lejeune J, Lafourcade J, Berger R, et al. Trois cas dedeletion partielle du bras court d'un chromosome 5. **C R Acad Sci**. (Paris) 257, 3098-3102, 1963.
38. Lehmann S, Ogawa S, Raynaud S, et al. Molecular allelo-karyotyping of early-stage, untreated chronic lymphocytic leukemia". **Cancer** 112 (6): 1296-305, 2008.
39. Mills J, Roth K, et al. DNA microarrays and beyond: completing the journey from tissue to cell. **Nature Cell Biology** 2001; 3: E175-178.
40. Mitelman F, Levan G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. III. Incidence and geographic distribution of chromosomr aberrations in 856 cases. **Hereditas** 89: 207-232, 1978
41. Mitelman F, Levan G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1871 cases. **Hereditas** 95: 79-139, 1981.
42. Mitelman F. Catalog of chromosome aberrations in cancer, 2nd edn. Liss, New York, 1985.
43. Mitelman F. Clustering of breakpoints to specific chromosomal regions in human neoplasia. A survey of 5345 cases. **Hereditas** 104: 113-119, 1986.
44. Mitelman F. Catalog of chromosome aberrations in cancer (5.a ed.) New York: Wiley-Liss, 1994.
45. Mitelman F, Johansson B, Mertens F, editors (2008): Mitelman Database of chromosome aberrations in cancer. Available at <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.
46. Monzon F, Hagenkord J, Lyons-Weiler M, et al. Whole genome SNP arrays as a potential diagnostic tool for the detection of characteristic chromosomal aberrations in renal epithelial tumors. **Mod Pathol** 21 (5): 599-608. 2008.
47. Moorhead P, Nowell P, Mellman W, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res** 20: 613-616, 1960.
48. Mullis K , Faloona F, Scharf S, et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**. 51 Pt 1:263-73, 1986.
49. Müller S, Rocchi M, Ferguson-Smith M, Wienberg, J. Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence in situ hybridization. **Human Genetics**, 100, 271-278, 1997.
50. Müller S, O'Brien PC, Ferguson-Smith MA, Wienberg, J. Cross-species colour segmenting: a novel tool in human karyotype analysis. **Cytometry** 33: 445-452, 1998.
51. Müller S, Wienberg J. Advances in the development of chromosome bar codes: Integration of M-FISH and Rx-FISH technology. **Medgen**. 12, 474-477, 2000.
52. Nederlof P, Robinson D, Abuknesha R, et al. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. **Cytometry** 10, 20-27, 1989.
53. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science** 132: 1497, 1960.
54. Oehler V, Yeung K, Choi Y, et al. The derivation of diagnostic markers of chronic myeloid leucemia progresión from microarray data. **Blood** 114: 3292-3298, 2009.
55. Paris Conference (1971): Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, Vol 8, No 7 (the National Foundation, New York 1972); also in *Cytogenetics* 11: 313-362, 1972.
56. Paris Conference (1971), supplement (1975): Standardization in Human Cytogenetics. Birth Defects: Original Article Series, Vol 11, No 9 (The National Foundation, New York, 1975); also in *Cytogenet Cell Genet* 15: 201-238, 1975.
57. Parra I, Windle B. High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. **Nature Genetics**, 5, 17-21, 1993.
58. Patau K, Smith D, Therman E, et al. Multiple congenital anomaly caused by an extra autosome. **Lancet** 1: 790-793, 1960.
59. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genome hybridization to microarray. **Nat Genet** 20: 207-211, 1998.
60. Price C, Kanfer E, Colman S, et al. Simultaneous genotypic and immunophenotypic analysis of interphase cells using dual-colour fluorescence: a demonstration of lineage involvement in polycythemia vera. **Blood**. 80, 1033-1038, 1992.
61. Probst F, Roeder E, Enciso V, et al. Chromosomal microarray analysis (CMA) detects a large X chromosome deletion including FMR1, FMR2, and IDS in a female patient with mental retardation. **American journal of Medical Genetics**. 143A (12): 1358-65, 2007
62. Radich J, Dai H, Mao M, et al. Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. **PNAS** 103: 2794-2799, 2006
63. Rowley JD. Letter. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature** 243: 290-293, 1973.
64. Rowley J. Human oncogenes locations and chromosome aberrations. **Nature**. 301: 290 -291, 1983.
65. Saiki R, Scharf S, Faloona F, Mullis K, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**. 230 (4732): 1350-4, 1985.

66. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**. 270: 467-470, 1995.
67. Schröck E, du Manoir S, Veldman T, et al. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science**. 273, 494-497, 1996.
68. Schuler D, Kiss A, Fábíán F. Chromosomal peculiarities and "in vitro" examinations in Fanconi's anaemia. **Humangenetik**. 7: 314-322, 1969
69. Schulze A. Navigating gene expression using microarrays a technology review. **Nature Cell Biology**. 3: E190-195, 2001.
70. Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**. 2: 971-972, 1971.
71. Shaffer L, Bejjani B. Medical applications of array CGH and the transformation of clinical cytogenetics. **Cytogenet Genome Res**. 115 (3-4): 303-9, 2006.
72. Shinawi M, Cheung S. The array CGH and its clinical applications. **Drug Discov Today**. 13: 760-70, 2008
73. Shtivelman E, Lifshitz B, Gale P, et al. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. **Nature**. 315: 550-554, 1985.
74. Southern E. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J Mol Biol**. 98: 503-517, 1975.
75. Speicher M, Ballard S, Ward D. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. **Nature Genetics**, 12, 368-375, 1996.
76. Steele M, Breg W. Chromosome analysis of human amniotic fluid cells. **Lancet i**: 383-385, 1966.
77. Su x, Wong N, Cao Q, et al. Chromosomal aberrations during progression of CML identified by cytogenetic and molecular cytogenetics tools: implication of 1q12-21
78. Sumner A, Evans H, Buckland R. New technique for distinguishing between human chromosomes. **Nature New Biol**. 232: 31-32, 1971.
79. Teh M, Blaydon D, Chaplin T, et al. Genomewide single nucleotide polymorphism microarray mapping in basal cell carcinoma unveils uniparental disomy as a key somatic event. **Cancer Res**. 65: 8597-603, 2005
80. Tjio J, Levan A. The chromosome number of man. *Heredetas*. 42: 1- 16
81. Varmus H. The molecular genetics of cellular oncogenes. **Annu Rev Genet**. 18: 553-612, 1984.
82. Vermeesch J, Fiegler H, de Leeuw N, et al. Guidelines for molecular karyotyping in constitutional genetic diagnosis". **Eur J Hum Genet**. 15 (11): 1105-14, 2007.
83. Veldman T, Vignon C, Schröck E. et al. Hidden chromosome abnormalities in haematological malignancies detected by multicolour spectral karyotyping. **Nature Genetics**. 15, 406-410, 1997
84. Venter, JC, et al. The sequence of the human genome. **Science**. 291: 1304-1351, 2001
85. Wiegant J, Kalle W, Mullenders, L, et al High-resolution in situ hybridization using DNA halo preparations. **Human Molecular Genetics**, 1, 587-591, 1992.
86. Yeoh E, Ross M, Shurtleff S, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. **Cancer Cell**. 1: 133-143, 2002.
87. Yunis J. High resolution of human chromosomes. *Science*. 191: 1268-1270, 1976
88. Yunis J. The chromosomal basis of human neoplasia. **Science**. 321: 227-236, 1983