

Anomalías cromosómicas estructurales nuevas en leucemia linfocítica crónica. Su valor pronóstico

Travella Ana¹, Bezares Raimundo², Rodríguez Andrea³, Slavutsky Irma¹

¹Laboratorio de Genética, Instituto de Medicina Experimental, CONICET - Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires.

²Servicio de Hematología, Hospital Gral. De Agudos "Dr. Teodoro Álvarez", Buenos Aires.

³Servicio de Hemato-Oncología, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Correspondencia: Irma Slavutsky, MD, PhD
Laboratorio de Genética

Instituto de Medicina Experimental, CONICET - Academia Nacional de Medicina
Pacheco de Melo 3081 - 1425 - Buenos Aires, Argentina

TE: (5411) 4805-8803 ext. 241 - Fax: (5411) 4803-9475

e-mail: islavutsky@hematologia.anm.edu.ar

"Premio XX Congreso Argentino de Hematología"

Fecha de recepción: 01/10/2011

Fecha de aprobación: 15/10/2011



ARTÍCULO
ORIGINAL

HEMATOLOGÍA, Vol. 16 N° 1: 8-19
Enero-Abril, 2012

RESUMEN

El análisis citogenético permite la detección de anomalías estructurales (AE) que pasan desapercibidas con la técnica de FISH (fluorescence in situ hybridization). En este trabajo se analizaron 34 pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) portadores de anomalías estructurales (AE) clonales y un grupo control de 78 pacientes sin alteraciones. Se realizó estudio cromosómico por bandeado G complementado con FISH, y análisis molecular del estado mutacional de *IGVH* y de la expresión de los genes *LPL* y *ADAM-29*. Se detectaron 16 casos (47%) con AE nuevas. El cromosoma 8 fue el más implicado con 7 alteraciones, seguido por los pares 13 (6), 12 (5) y 15 (4). Se observó una similar distribución de AE entre los pacientes con *IGVH* mutado y no mutado. Los casos con AE mostraron una tendencia a mayor expresión de *LPL* y menor de *ADAM-29*. Se encontraron diferencias significativas en el recuento de blancos ($p=0,019$), plaquetas ($p=0,002$), LDH ($p=0,029$) y supervivencia libre de tratamiento (13 meses) en los pacientes con AE nuevas respecto de controles (69 meses) ($p=0,087$). Los resultados obtenidos confirman el pronóstico adverso de las AE en pacientes con LLC reforzando la importancia del análisis citogenético en esta patología.

Palabras claves: leucemia linfocítica crónica, citogenética, FISH

INTRODUCCIÓN

La leucemia linfocítica crónica (LLC) constituye la neoplasia a células B maduras más frecuente en Occidente representando el 30% de las leucemias del

adulto. Se caracteriza por presentar un curso clínico altamente variable con un amplio rango de supervivencia, entre unos pocos meses y más de una década a partir del diagnóstico. Alrededor de un tercio de los pacientes muestran escasa sintomatología y una supervivencia similar a la de la población general, otro tercio presenta una etapa indolente seguida de progresión y muerte por causas ligadas a la patología, y el tercio restante debuta con enfermedad agresiva requiriendo tratamiento inmediato¹. Si bien los sistemas de estadificación establecidos por Rai y col.² y Binet y col.³ poseen importancia pronóstica y son útiles para el manejo terapéutico, no son suficientes para definir con certeza formas estables o progresivas de la enfermedad, sobre todo en estadios tempranos de la misma⁴. En las últimas décadas, numerosos marcadores pronóstico entre los que se incluyen el análisis del estado mutacional de los genes de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (*IGVH*), la expresión de ZAP-70 (ζ -chain-associated protein kinase) y CD38, y las anomalías genéticas, están siendo utilizados para identificar pacientes con diferente evolución clínica y respuesta al tratamiento⁵⁻⁹. Más recientemente, el empleo de las técnicas de microarrays permitió establecer un perfil de expresión génica característico de LLC haciendo factible la identificación de numerosos genes con potencial valor pronóstico y/o terapéutico^{10, 11}.

Entre ellos cabe resaltar *LPL* (lipoprotein lipase) (8p22)¹² asociado a progresión de la enfermedad, y *ADAM-29* (disintegrin and metallopeptidase domain 29) (4q34.2)¹³ relacionado a buena evolución clínica. El análisis por PCR en tiempo real indica que su sobreexpresión es específica de las células de LLC^{12,13}, desconociéndose aún su función en ellas.

Si bien los estudios cromosómicos en LLC resultan dificultosos debido al bajo índice mitótico *in vitro* de las células leucémicas, aún utilizando estimulación mitogénica, el empleo de las técnicas de citogenética convencional ha permitido encontrar alteraciones clonales en el 40-50% de los casos¹⁴⁻¹⁶. En contraste, el análisis de anomalías genómicas mediante FISH (fluorescence in situ hybridization), ha hecho factible la detección de rearrreglos genómicos en más del 80% de los pacientes permitiendo el establecimiento de grupos de riesgo citogenético⁷, entre los que se destacan las deleciones de 13q14, 11q22 (lugar donde se ubica el gen ATM) y 17p13 (que involucra el gen TP53), y la trisomía 12. La deleción monoalélica de 13q14.3 (13q14x1) es la anomalía más frecuente, encontrándose en aproximadamente el 50% de los casos, y se asocia a buen pronóstico cuando se detecta como única alteración. Las deleciones de 11q22 y 17p13 se relacionan a una sobrevida media mucho más corta, mientras que la trisomía 12 y la deleción bialélica de 13q14.3 (13q14x2) se asocian a pronóstico intermedio¹⁷⁻¹⁹.

Simultáneamente, sabemos que en la LLC, a diferencia de otras neoplasias a células B, la presencia de translocaciones recurrentes es de muy baja frecuencia^{7,16}. En los últimos años, diferentes autores han relacionado las alteraciones cromosómicas complejas y las translocaciones con una evolución clínica desfavorable, sugiriendo la importancia del análisis citogenético en la comprensión de la biología y el comportamiento clínico de esta patología²⁰⁻²³. En este contexto, nuestro estudio se encuentra focalizado en la descripción de rearrreglos estructurales nuevos en LLC, tendiente a identificar los cromosomas más involucrados, su frecuencia e impacto clínico. Los resultados obtenidos fueron correlacionados con los parámetros clínicos, el estado mutacional de *IGVH* y los perfiles de expresión génica de *LPL* y *ADAM-29*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población estudiada

En el período 2007 a 2011, realizamos el estudio citogenético y el análisis por FISH de un total de 145 pacientes con diagnóstico de LLC. Entre éstos se seleccionaron para nuestro análisis 34 pacientes (23,4%)

(25 varones; edad media: 61,5 años; rango: 39-82 años; estadios clínicos Rai: 0: 17%, I-II: 50%, III-IV: 33%) que presentaron alteraciones estructurales (AE) clonales. El diagnóstico de LLC se efectuó teniendo en cuenta los criterios establecidos por la WHO (World Health Organization)²⁴. Los estadios clínicos fueron definidos acorde a la clasificación de Rai (2). Para la comparación de parámetros clínicos, se analizó un grupo control de 78 pacientes con LLC de buen pronóstico (con cariotipo normal y sin alteraciones genómicas o con del(13)(q14) por FISH como única anomalía) (42 varones; edad media: 66 años; rango: 40-89 años). En la Tabla I se resumen las características clínicas de los pacientes estudiados. Las muestras fueron obtenidas por el médico hematólogo con la conformidad y el consentimiento informado de los pacientes. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética institucional.

Estudios citogenéticos

El análisis cromosómico se realizó mediante cultivo de linfocitos de sangre periférica (SP) en medio F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino y estimulado con los mitógenos Pokeweed y Lipopolisacárido, durante 96 hs a 37 °C. Los preparados se analizaron empleando la técnica de bandejo G con tripsina al 1% y coloración con Wright, con posterior observación al microscopio. Las anomalías cromosómicas fueron descritas acorde a lo establecido en el ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature)²⁵.

Hibridación in situ por fluorescencia (FISH)

El análisis citomolecular se efectuó en el mismo material empleado para el estudio citogenético utilizando el kit LSI p53/ATM/13q14/13q34/CEP12 (Vysis-Abbott), acorde al protocolo establecido por el proveedor. Las muestras se analizaron al microscopio de fluorescencia empleando los filtros apropiados, efectuándose el análisis de al menos 200 núcleos interfásicos para cada sonda. Los puntos de corte empleados para cada sonda (media de controles normales + 3 desvíos estándar), determinados a partir de 10 individuos sanos, fueron: 3,02%, 10,2%, 7,7% and 5,1% para trisomía 12 y monosomias de D13S319 (13q14), ATM y p53, respectivamente. Para el estudio de pacientes con cariotipo complejo se emplearon sondas de pintado cromosómico total (WCP) (CAMBIO) y el panel de M-FISH Spectra Vysion WCP probe (Vysis-Abbott). En cada caso, se analizaron un mínimo de 10 metafases informativas. La adquisición de imágenes se realizó empleando el software Cytovision 3.9 (Applied Imaging Corporation, California, USA).

TABLA I.- Características clínicas de los pacientes con anomalías estructurales nuevas y recurrentes y del grupo de riesgo favorable

	Grupo riesgo favorable	Grupo AEN (AEN vs C)	P	Grupo AR	P (AR vs C)
N° de pacientes (n)	78	16		16	
Sexo F/M	36/42	3/13	0,053	6/12	0,431
Edad media (años; rango)	66 (40-89)	62,2 (39-82)	0,166	63,6 (48-78)	0,385
Distribución estadios (%)					
Rai 0	33,3	20	0,643	64,3	0,058
Rai I-II	45	60	0,583	21,4	0,181
Rai III-IV	21,7	20	0,79	14,3	0,774
Media recuento leucocitos (x10 ⁹ /L) (rango)	30 (8,3-400)	77 (8,9-354)	0,019	58 (12,9-354)	0,028
Media porcentaje linfocitos (rango)	76 (40-99)	75,6 (60-97)	0,901	74,8 (54-97)	0,755
Media recuento plaquetas (x10 ⁹ /L) (rango)	169 (15-440)	234 (152-400)	0,002	207 (47-378)	0,052
Media Hb (g/dL) (rango)	12,9 (6,8-16)	12,5 (8,2-15,8)	0,431	13,4 (9,6-15,8)	0,206
Media LDH (UI/L) (rango)	349,2 (149-626)	407,4 (310-526)	0,029	325,6 (159-492)	0,469
Media β2M (mg/ml) (rango)	2,9 (1,1-6)	3,3 (2,1-5,9)	0,235	2,5 (1,2-3,2)	0,038
Media SLT (meses)	69	13	0,0087	No alcanza la media de sobrevida	-
Media SV (meses)	144	64	0,0121	69	0,87

F: femenino; M: masculino; AEN: alteraciones estructurales nuevas; AR: alteraciones recurrentes; C: controles; LDH: lactato dehidrogenasa; β2M: β2 microglobulina; Hb: hemoglobina; SLT: sobrevida libre de tratamiento; SV: sobrevida.

Extracción de ARN y obtención del ADNc

Se realizó extracción de ARN total a partir de células mononucleares de SP, obtenidas por separación con Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare) de pacientes y controles, utilizando el método de trizol/cloroformo, seguido de una purificación con isopropanol. La síntesis de ADNc se efectuó por RT-PCR, a partir de 3 µg de ARN, usando *random-primers*. El ADNc fue guardado a -20 °C hasta su utilización.

Cuantificación de la expresión génica por PCR en tiempo real (QRT-PCR)

Se efectuó el análisis de los niveles de expresión de los genes *ADAM-29* y *LPL* mediante QRT-PCR con metodología SybrGreen a partir de los ADNc previamente obtenidos, empleándose el kit y el software de Lightcycler (Roche). Se utilizaron los *primers* y ciclados previamente descriptos para estos genes^{26,27}. Como control interno para normalizar la expresión de los mismos se utilizó el gen de expresión constitutiva

GAPDH (gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) utilizando los *primers* descriptos por Hu y col²⁸. Se estandarizaron las condiciones de QRT-PCR para cada gen, arribándose a un único ciclado para ambos: 95 °C 10min, seguido de 50 ciclos de 95 °C 15s, 62 °C 10s y 72 °C 15s. Como control negativo de la reacción, se utilizó agua en lugar de ADNc. El número total de copias de ARNm presentes se cuantificó analizando las respectivas curvas de *melting* mediante el software Lightcycler (Roche). Se realizaron las curvas estándar para cada gen empleando diluciones seriadas (1/2, 1/4, 1/8, 1/16 y 1/32) de ADNc de un control normal para el gen *GAPDH*, y de dos pacientes con LLC (no incluidos en el estudio) que expresaban altos niveles de *LPL* y *ADAM-29*, respectivamente.

Estado mutacional de *IGVH*

Las secuencias del gen *IGVH* fueron determinadas acorde a lo previamente descripto²⁹. Sucintamente, se trabajó a partir de ADNc, efectuándose amplificación

mediante 6 reacciones de PCR por cada muestra con *primers* sentido específicos de cada familia (VH₁-VH₆) y un único *primer* consenso antisentido J_H. Cuando la amplificación de estos fragmentos no resultó satisfactoria, se procedió a la amplificación con *primers* sentido para las secuencias de la región líder (LH₁-LH₆) y un único *primer* antisentido C_H³⁰. En ambos casos, se empleó el siguiente ciclado: desnaturalización inicial a 93 °C 3min, seguido de 33 ciclos a 94 °C 30s, 62 °C 30s y 72 °C 30s, extensión a 72 °C 7min y enfriamiento a 4 °C 10min. Se realizó electroforesis en gel de agarosa al 2% con Bromuro de Etidio y visualización bajo luz UV, seguido de purificación empleando GFX PCR DNA and gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences). Los productos purificados fueron secuenciados en un secuenciador automático, empleándose las bases de datos IMGT (<http://imgt.cines.fr/>) e IgBlast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>), para la identificación de los segmentos clonales y el porcentaje de homología con la línea germinal. Se consideraron como no mutadas (NM) las secuencias con una homología $\geq 98\%$ respecto de la línea germinal.

Análisis estadístico

Se empleó el test de Mann-Whitney para la comparación de los resultados entre pacientes y controles, y entre los diferentes subgrupos. Para el análisis de las características clínicas de los pacientes se utilizó el test t' de Student (para las variables cuantitativas) y la prueba de χ^2 o el test exacto de Fisher (para las variables categóricas). Las curvas de sobrevida (SV) fueron efectuadas con el método de Kaplan-Meier y comparadas con el test de log-rank. Para todas las evaluaciones se consideró un $p < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

De los 34 pacientes con anomalías estructurales, 16 presentaron alteraciones estructurales nuevas (AEN) en su cariotipo y los restantes mostraron anomalías recurrentes en LLC. Las características citogenéticas y de FISH de ambos grupos se muestran en las Tablas II y III. El análisis de los casos con AEN permitió detectar un total de 32 anomalías no descritas previamente en la literatura³¹: 24 traslocaciones (16 desbalanceadas y 8 balanceadas), 5 deleciones, 1 duplicación, 1 isocromosoma y 1 cromosoma pseudo dicéntrico (Tabla IV). A excepción del caso 11 que presentó en un segundo estudio exclusivamente metafases patológicas, todos los pacientes mostraron células citogenéticamente normales y anormales. La mayoría de los casos (87,5%)

presentaron cariotipos complejos con tres o más anomalías, observándose cariotipos simples sólo en los pacientes 8 y 13.

El cromosoma 8 fue el más frecuentemente implicado en AEN, con un total de 7 alteraciones, seguido de los cromosomas 13 (6 alteraciones), 12 (5) y 15 (4). Todas las AEN del cromosoma 8 halladas en nuestra serie fueron translocaciones (4 desbalanceadas), que involucraron diferentes cromosomas dadores: 1p, 8q, 12p, 12q, 13q y 14q (Figura 1). Estas translocaciones desbalanceadas determinaron fundamentalmente pérdidas en el brazo corto, siendo 8p21-pter la región más involucrada (Figura 2a). Un único paciente (caso 2) mostró ganancia de parte del brazo largo en la región 8q22-qter. El cromosoma 13 mostró cinco translocaciones (2 desbalanceadas) y el psu dic(13;3)(q34;p21), presentando también pérdidas de material genético como desbalance más frecuente (Figura 2a).

Por el contrario, las AEN del cromosoma 12 (cinco translocaciones; 3 desbalanceadas), determinaron mayormente ganancias de parte del brazo largo, siendo la región más implicada 12q13-qter (Figura 2a). Con respecto al cromosoma 15, se encontraron 4 translocaciones desbalanceadas, tres de las cuales fueron halladas en el mismo paciente (caso 11): der(15)t(Y;15)(q11;p11), der(17)t(15;17)(q15;q25) y der(19)t(15;19)(q15;q13), que determinaron tanto pérdidas como ganancias de material genético.

Es interesante remarcar que se observaron tres AEN que involucraban a los cromosomas sexua-

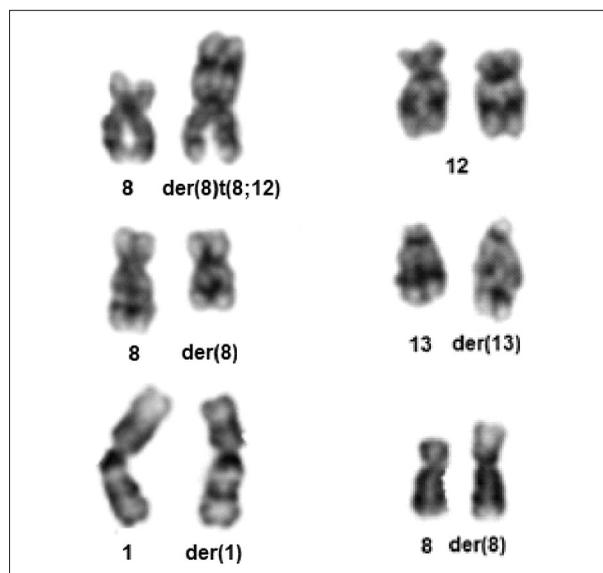


Fig. 1.— Cariotipos parciales de los casos 6, 10 y 14 mostrando las translocaciones: der(8)t(8;12)(p21;q13), t(8;13)(q22;q22) y t(1;8)(p34;p21).

TABLA II.- Análisis citogenético y FISH en pacientes con LLC portadores de anomalías estructurales nuevas

Caso	Edad/ sexo	Cariotipo combinado bandeó G y FISH	del13q14	FISH (%)		del17p13
				+12	del11q22	
1	62/M	45~47,Y,der(X)t(X;5)(q22;q13),del(1)(q23;q25),t(2)(q10),del(3)(p13),+del(3)(q21),del(6)(q25),+i(6)(p10), del(7)(q22),t(8;12)(q13;p13)+10,del(11)(q23),+der(12)t(12;15)(p13;q11),-16,-17,-18,+22,+r[cp11]/46,XY[2]	0,5	71	0	58
2	79/F	46~47,XX,der(8)t(8;8)(p21;q22),-12, t(14;18)(q32;q21),der(22)t(22;?) (q11;?),+r[cp12]/46,XX[6]	1,1	35,4	0,7	2,1
3	55/M	45~46, XY,+6,t(11;13)(p15;q22),add(17)(q25)[cp9]/46,XY[1]	ND	ND	ND	ND
4	66/M	46,XXY[9]/46,XX,der(14)t(10;14)(q11;p11),+del(14)(q24),+r[cp5]/76~122,XXYY,+del(3)(p11),del(6)(q21),-11,+der(14)t(10;14)(q11;p11),+del(14)(q24),-16,+20,+21,+22,+r[cp4]	ND	ND	ND	ND
5	58/M	47,XY,del(13)(q12q14),+12 [3]/44,XY,del(1)(q22q32),del(5)(q13q31),-21,-22[2]/46,XY[18]	21,5	24,4	0,5	0,8
6	72/F	46,XX,dup(X)(q22q26),del(7)(q32),der(8)t(8;12)(p21;q13)[17]/46,XX[2]	2,3	1,6	4,8	2,3
7	71/M	46,XXY,der(4)t(4;5)(q35;q13),+del(9)(q13q22),der(14)t(10;14)(q22;q32)[6]/46,XY[9]	ND	ND	ND	ND
8	63/M	45~47,XY,+del(9)(q11),del(10)(q22)[cp4]/46,XY[12]	ND	ND	ND	ND
9	61/M	46,XY,del(6)(q25),t(7;7)(q22;p22)[4]/46,XY,+21,-22[3]/46,XY,t(12;13)(q24;q14)[2]/46,XY[12]	x1:79,6 /x2: 4,9	0	0	1,3
10	39/M	46,XY,t(2;14)(q31;q32),t(2;20)(p13;p13),t(8;13)(q22;q22),del(11)(q21)[8]/46,XY[20]	0	0	5,6	0,9
11	72/M	43~44,X,-Y,del(7)(q22q32),der(8)t(8;13)(p11.2;q11),der(15)t(Y;15)(q11;p11),del(17)(p11),der(17)t(15;17)(q15;q25),del(18)(q11q21),der(19)t(15;19)(q15;q13)[cp11]/46,XY[8]	5,3	0	0	44,3
73/M		44,XY,-2,del(6)(q21),del(7)(q22q32),der(8)t(8;13)(p11.2;q11),add(12)(p13),psu dic(13;3)(q34;p21),del(17)(p11),der(17)t(15;17)(q15;q25),del(18)(q11q21),der(19)t(15;19)(q15;q13)[cp6]/44,X,-Y,del(4)(p12),del(6)(q21),del(7)(q22q32),der(8)t(8;13)(p11.2;q11),add(12)(p13),psu dic(13;3)(q34;p21),der(15)t(Y;15)(q11;p11),der(17)t(15;17)(q15;q25),del(18)(q11q21)[cp4]	12,7	0	0	72
12	52/M	51,XY,der(1)t(1;4)(q32;q21),+12,+18,+19,+22,+mar[15]/46,XY[10]	x1:44 /x2:22	56,4	0	0
13	53/M	46,XY,del(9)(q11)[5]/46,XY[27]	2,8	0,5	0	0
14	82/M	41~44,XY,t(1;8)(p34;p21),del(6)(q13q21),-8,add(13)(p11),-13,-16,-19,-22[cp8]/46,XY[22]	ND	ND	ND	ND
15	61/F	81~83,XXX,-1,-2,-3,del(6)(q15),-8,-9,-10,der(12)t(12;13)(q24;q22),der(14)t(8;14)(q22;q32),-14,-16,del(17)(p11)x2,der(19)t(4;19)(q21;q13),-20 [cp8]/46,XX [2]	98,6	0	4	97
16	40/M	46,XY,del(6)(q13q21),del(7)(q22q34),-8,add(9)(q34),del(9)(q22),der(11)t(11;11)(q21;q23),-17,+r,+dm[cp14]/46,XY[3]	1,8	1,3	67,6	76,3

F: Femenino; M: Masculino; Negrita: porcentaje del clon anormal, x1: detección monoalélica de 13q14; x2: detección bialélica de 13q14

les, dos alteraciones del cromosoma X: $\text{der}(X)t(X;5)(q22;q13)$ y $\text{dup}(X)(q22q26)$, y una del cromosoma Y: $\text{der}(15)t(Y;15)(q11;p11)$ (ya mencionada), eventos muy raros en esta patología. En nuestra serie se detectó también una AEN recurrente: $\text{del}(9)(q11)$ (casos 8 y 13), siendo en este último paciente la única alteración en el cariotipo. El resto de las AEN y su distribución se encuentran detallados en la Figura 3.

Los puntos de ruptura más frecuentemente implicados fueron $8p21$, $8q22$ y $13q22$ (3 rupturas cada uno), seguidos de $1q32$, $4q21$, $5q13$, $9q11$, $12p13$, $12q24$, $15q15$ y $19q13$ (2 rupturas cada uno) (Figura 2b).

Asimismo, se encontraron tres rearrreglos observados una única vez en la literatura³¹ los cuales se transforman en recurrentes a partir de nuestros datos: $\text{del}(1)(q23q25)$, $\text{del}(3)(p11)$ y $\text{del}(10)(q22)$ (ca-

sos 1, 4 y 8, respectivamente). El análisis por FISH confirmó los resultados observados en el estudio cromosómico, excepto en los casos 9 y 12 que mostraron delección mono y bialélica de $13q14$ (Tabla II) no detectadas por citogenética convencional.

En cuanto a las anomalías estructurales recurrentes, las mismas correspondieron mayormente a delecciones de $6q$ (61%), $14q$ (21%) y $11q$ (10,5%) (Tabla III), observándose en estos casos un mayor aporte de la técnica de FISH que permitió detectar rearrreglos genómicos no observados por citogenética convencional en el 54% de los pacientes.

El análisis del estado mutacional de *IGVH* se realizó en 20 pacientes: 8 correspondían al grupo con anomalías estructurales y 12 al grupo control. La evaluación del total de casos mostró: 45% de pacientes NM y 55% mutados (M). El análisis de

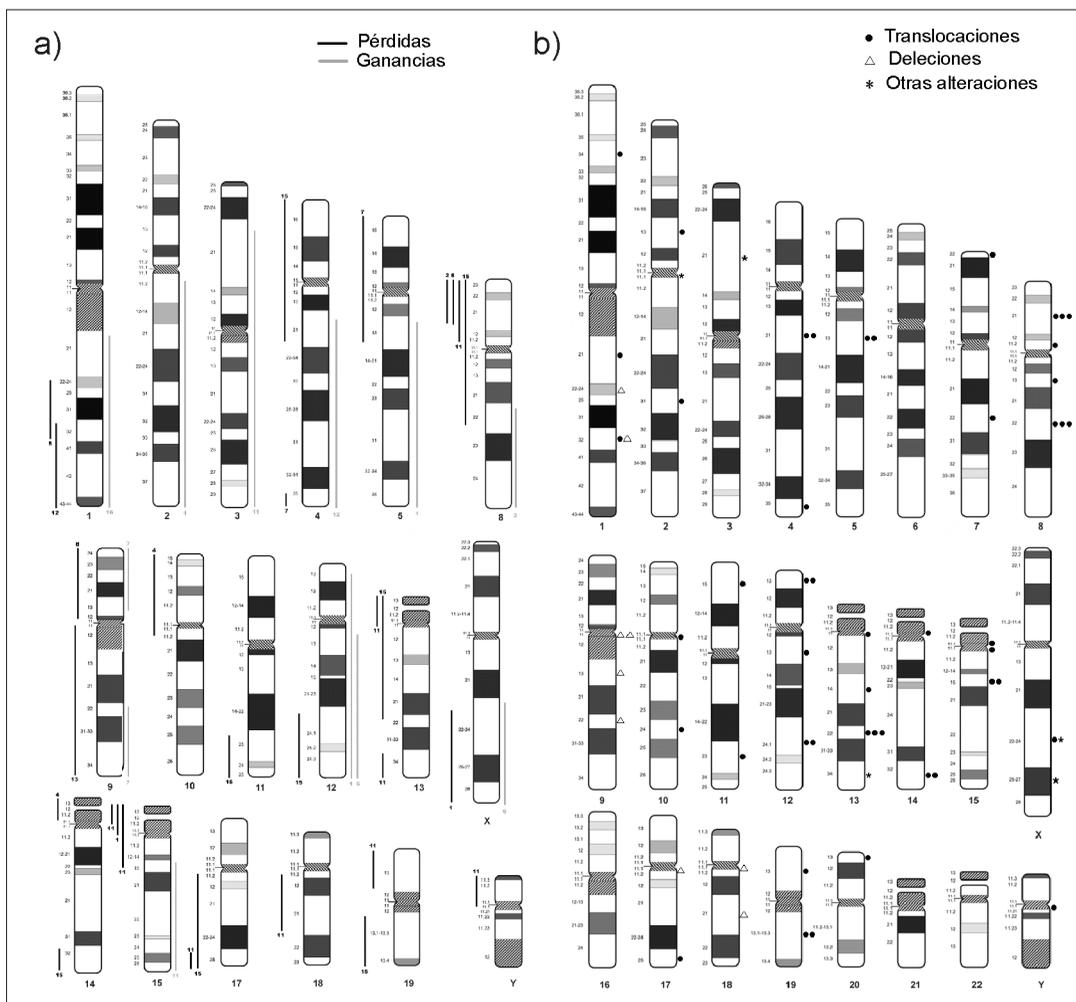


Fig. 2.- a) Diagrama mostrando las ganancias (gris) y pérdidas (negro) de material genético observadas en los pacientes con anomalías estructurales nuevas; b) Diagrama mostrando la ubicación de los puntos de ruptura de los pacientes con anomalías estructurales nuevas.

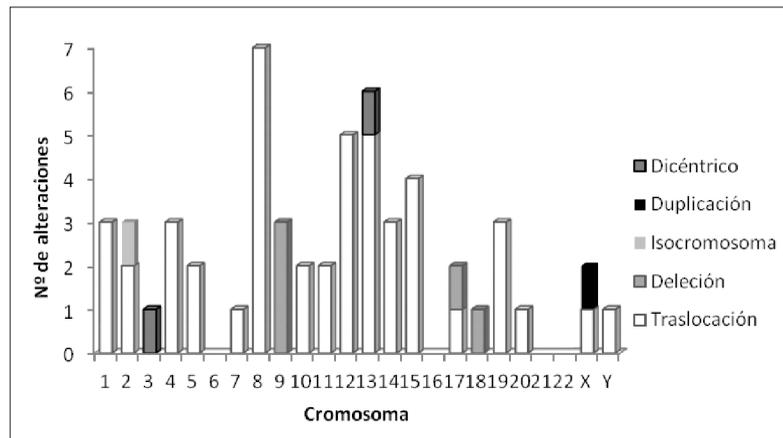


Fig. 3.- Histograma mostrando la distribución y tipo de anomalías estructurales nuevas por cromosoma.

TABLA III.- Análisis citogenético y FISH en pacientes con LLC portadores de anomalías estructurales recurrentes

Caso sexo	Edad/ sexo	Cariotipo combinado bandeó G y FISH	FISH (%)			
			del13q14	+12	del11q22	del17p13
17	63/F	46, XX,del(6)(q25) [4]/46,XX [9]	ND	ND	ND	ND
18	67/M	46, XY,del(6)(q25) [5]/46,XY[10]	ND	ND	ND	ND
19	71/M	46,XY,del(6)(q25) [8]/46,XY[4]	ND	ND	ND	ND
20	62/M	46,XY,del(14)(q24) [5]/46,XY [14]	2,3	0,8	1,7	2,1
21	73/M	46, XY,del(13)(q14;q22) [5]/46, XY [9]	28,7	0,5	0,5	0,4
22	59/M	46,XY,del(6)(q25),+10,+18,-19 [cp9]/46,XY[10]	1,4	0,5	10,2	0
23	58/M	46,XY,del(14)(q22) [3]/46,XY [32]	0	2,9	3,8	0,6
24	70/M	46,XY,del(14)(q24) [4]/46,XY [8]	0,1	2,1	2,1	2,9
25	78/F	46,XX,del(6)(q23q25),i(17)(q10) [3]/46,XX[16]	x1:27/x2:26	3,4	0,9	1,8
26	64/F	46,XX,del(8)(p11) [14]/46,XX [5]	x1: 71/x2: 8,4	0	13,6	1,3
27	48/M	46,XY,del(6)(q15q21),del(14)(q22) [cp4]/46,XY[10]	0	0,5	0	9
28	59/M	46,XY,del(13)(q12q14) [6]/46,XY [14]	62	0	1	1,6
29	63/F	46,XX,del(6)(q25)[1]/46,XX[14]	5,9	0	0,5	6,3
	65/F	46,XX,del(6)(q25) [2]/46,XX [14]	0	0	0	3,8
30	63/M	46,XY,del(6)(q21q23) [4]/46,XY [20]	49	0	0	0
31	67/F	46,XX,del(6)(q15) [5]/46,XX [6]	ND	ND	ND	ND
32	61/M	46,XY,del(11)(q21) [7]/46,XY [10]	16,4	0	32,2	0
33	52/F	47,XX,del(6)(q25),del(11)(q21) [6]/46,XX [14]	ND	ND	ND	ND
34	67/M	44~45,XY,add(3)(q25),del(6)(q12),add(7)(q?)-9, -11, add(12)(p?),add(17)(p?)[cp4]/46,XY [26]	ND	ND	ND	ND

F: Femenino; M: Masculino; Negrita: porcentaje del clon anormal, x1: delección monoalélica de 13q14; x2: delección bialélica de 13q14

los genes *IGHV* presentó un mayor uso de la familia VH3 (45% de los casos), seguido por VH4 (30%), VH1 (20%) y VH7 (5%); un caso mostró VH3-21. El uso de VH3 presentó un mayor porcentaje de pacientes con LLC-M (67%). Asimismo, se observó una similar distribución de AE entre los pacientes con IGVH M y NM (50% cada uno).

Por otra parte, se evaluó la expresión de los genes *LPL* y *ADAM-29* mediante QRT-PCR, en células mononucleares de SP de 11 pacientes con anomalías

estructurales y 17 del grupo control. Si bien las diferencias no fueron significativas, el gen *ADAM-29*, relacionado a buena evolución clínica, presentó niveles menores de transcripto en el grupo de AE respecto de controles. Por su parte, el gen *LPL*, asociado a mal pronóstico, mostró mayor expresión en los pacientes con anomalías estructurales respecto del grupo control al igual que el cociente *LPL/ADAM-29* (247,4 vs. 7,56, respectivamente) (Figura 4), considerado de mayor valor predictivo.

Tabla IV.- Anomalías estructurales nuevas

Translocaciones	Deleciones	Otras alteraciones
t(1;8)(p34;p21)	del(1)(q22q32)	i(2)(q10)
der(1)t(1;4)(q32;q21)	del(9)(q11) [2]	psu dic(13;3)(q34;p21)
t(2;14)(q31;q32)	del(9)(q13q22)	dup(X)(q22q26)
t(2;20)(p13;p13)	del(17)(q11)	
der(4)t(4;5)(q35;q13)	del(18)(q11q21)	
t(7;7)(q22;p22)		
der(8)t(8;8)(p21;q22)		
der(8)t(8;12)(p21;q13)		
der(8)t(8;13)(p11.2;q11)		
t(8;12)(q13;p13)		
t(8;13)(q22;q22)		
t(11;13)(p15;q22)		
der(11)t(1;11)(q21;q23)		
t(12;13)(q24;q14)		
der(12)t(12;13)(q24;q22)		
der(12)t(12;15)(p13;q11)		
der(14)t(10;14)(q11;p11)		
der(14)t(8;14)(q22;q32)		
der(15)t(Y;15)(q11;p11)		
der(17)t(15;17)(q15;q25)		
der(19)t(4;19)(q21;q13)		
der(19)t(10;19)(q24;p13)		
der(19)t(15;19)(q15;q13)		
der(X)t(X;5)(q22;q13)		

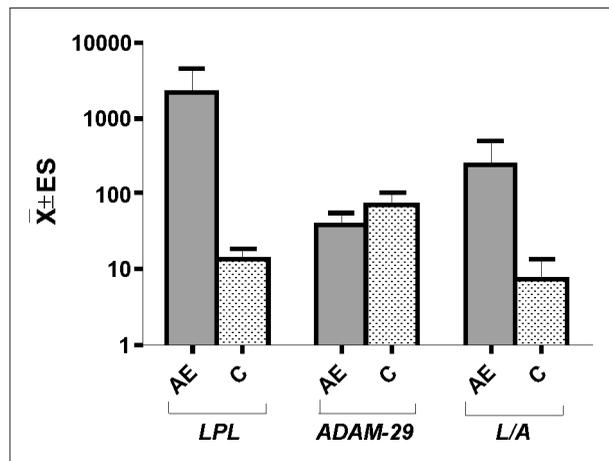


Fig. 4.- Niveles de expresión de los genes LPL, ADAM-29 y relación LPL/ADAM-29 en pacientes con anomalías estructurales y en el grupo control. AE: anomalías estructurales; C: controles.

Asimismo, se efectuó la comparación de los parámetros clínicos detallados en la Tabla I, observándose diferencias significativas entre los pacientes con AEN y AE recurrentes respecto del grupo control en el recuento de blancos ($p=0,019$ y $p=0,028$, respectivamente). El grupo con AEN mostró diferencias respecto de los pacientes de buen pronóstico

en el recuento de plaquetas ($p=0,002$) y los niveles de LDH ($p=0,029$), en tanto que los casos con AE recurrentes presentaron diferencias significativas en los niveles de β_2 Microglobulina comparado con los controles ($p=0,038$). El análisis de sobrevida libre de tratamiento (SLT) para el total de pacientes con AE mostró diferencias significativas en comparación con el grupo control (29 y 69 meses, respectivamente; $p=0,036$) (Figura 5a). De la misma manera, el grupo de pacientes con AEN presentó diferencias significativas tanto en la SLT (13 meses) como en la SV global (64 meses) con respecto al grupo de buen pronóstico (SLT: 69 meses, $p=0,0087$; SV global: 144 meses, $p=0,0121$) (Figura 5a y b).

DISCUSIÓN

Los estudios citogenéticos en neoplasias linfoides han demostrado ser una herramienta importante en la caracterización biológica de estas entidades. Esta técnica resulta de interés ya que permite el análisis del complemento cromosómico completo haciendo factible la detección de anomalías no visibles por FISH, así como la identificación de cromosomas o regiones cromosómicas que involucran genes de importancia para el desarrollo y/o progresión de la patología. En LLC, las dificultades del crecimiento *in vitro* de las células leucémicas ha retrasado la

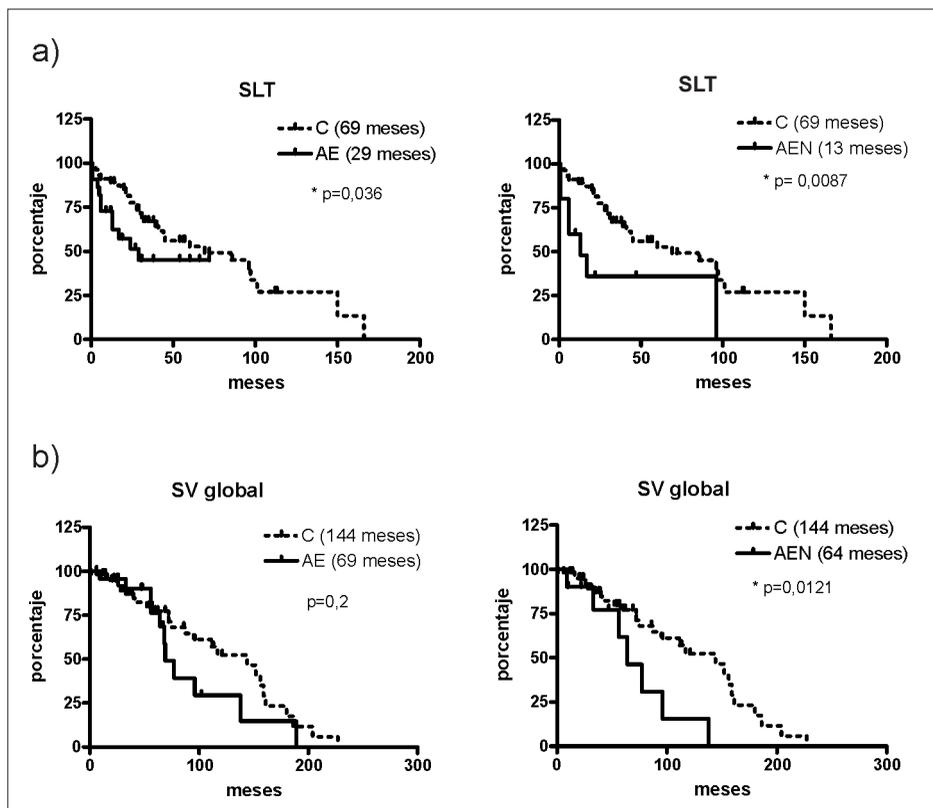


Fig. 5.- a) Curvas de supervivencia libre de tratamiento en el total de pacientes con anomalías estructurales (AE) y en el grupo con anomalías estructurales nuevas (AEN) respecto del grupo control (C); b) Curvas de supervivencia global en el total de pacientes con AE y en el grupo con AEN respecto de los controles.

caracterización de nuevos marcadores citogenéticos y determinado la escasa información existente al respecto. En este trabajo, identificamos numerosas AE no descritas previamente en la literatura, y evaluamos su correlación con las características clínicas de los pacientes, el estado mutacional de *IGVH* y los perfiles de expresión génica.

En nuestra serie, el cromosoma 8 resultó el más frecuentemente involucrado en AEN. Estas alteraciones determinaron fundamentalmente pérdidas de parte de su brazo corto, siendo la región 8p21-pter la más afectada. La recurrencia de desbalances en 8p ha sido escasamente observada en la literatura. Estudios de CGH (comparative genomic hybridization) han mostrado pérdida de 8p en el 5-7% de los casos con LLC^{32,33} con un incremento en los pacientes con síndrome de Richter (44%)³². Haferlach y col.¹⁹ encontraron pérdida de 8p sólo en pacientes con cariotipos complejos y delección de la región 8p11-pter en casos portadores de alteraciones que involucran los loci de las inmunoglobulinas. Por su parte, Grubor y col.³⁴ detectaron, mediante el uso de la técnica

ROMA (representational oligonucleotide microarray analysis) una nueva región de delección de 3,6 Mb en 8p21.2-p12, que incluye al gen *TRIM35*, en tanto que Grunnarsson y col.³⁵ observaron mediante array de SNP (single nucleotide polymorphism) delección de 8p11.2-p23.3 en el 1,6% de los casos analizados. Simultáneamente, Forconi y col.³⁶ encontraron que tanto la SLT como la SV global eran significativamente más cortas en los pacientes con pérdida de 8p, sugiriendo la importancia clínica de esta alteración.

La delección 13q14 es la anomalía más común en LLC, encontrándose asociada a buen pronóstico cuando se la observa como única alteración⁷. No obstante, los rearrreglos estructurales de este cromosoma son mucho menos frecuentes, siendo importante su detección ya que cambia significativamente el pronóstico de la enfermedad³⁷. En nuestra serie encontramos cinco AEN de este cromosoma, la mayoría como parte de cariotipos complejos, entre las cuales es de destacar la presencia del *psu dic(13;3)(q34;p21)*, alteración de escasa observación en LLC³¹, y usualmente asociada a inestabilidad genética.

Finalmente resulta de interés la detección de AEN de los cromosomas 12, 15 y de los pares sexuales, todos raramente involucrados en rearrreglos en LLC³¹. En el cromosoma 12, las AEN determinaron ganancia recurrente de parte de su brazo largo abarcando la región 12q13-qter que incluye la banda 12q22, lugar donde se ubica el gen *CLL1* (chronic lymphocytic leukemia up-regulated gene 1), sobreexpresado exclusivamente en células de LLC³⁸. Resultados previos de nuestro grupo³⁹ muestran la asociación de anomalías de este cromosoma con mala evolución clínica, en tanto que otros autores²³ refieren ganancia de 12q en el 5% de los casos con alteraciones cromosómicas. Con respecto al cromosoma 15, datos de la literatura muestran translocaciones que lo involucran en el 3,2% de los casos²². En cuanto a los cromosomas sexuales, en nuestra serie detectamos tres AEN de estos cromosomas: der(X)t(X;5)(q22;q13), dup(X)(q22q26) y der¹⁵t(Y;15)(q11;p11). Dado que nos encontramos con una patología cuya edad media está entre los 65 y 70 años de acuerdo a los diferentes estudios, la pérdida de los cromosomas X e Y es un evento de frecuente aparición, no así las alteraciones estructurales de los mismos, y mucho menos aún las del cromosoma Y³¹.

Si bien el estado mutacional de *IGVH* pudo ser evaluado en un número reducido de pacientes, se observó una distribución similar de casos con AE entre los pacientes M y NM. En este aspecto, los datos de la literatura presentan resultados contradictorios. Algunos autores, como en nuestro caso, no encuentran asociación entre el cariotipo y el estado mutacional de *IGVH*²³, en tanto que otros detectan correlación de *IGVH* NM con un mayor número de aberraciones, la presencia de translocaciones no balanceadas y cariotipos complejos^{16,22}. Cabe aclarar que los pacientes con anomalías estructurales de los que se dispuso material para efectuar el análisis de *IGVH* no presentaban cariotipos de alta complejidad, situación que podría explicar los resultados observados.

En referencia a los perfiles de expresión génica, si bien no se detectaron diferencias significativas posiblemente debido al limitado número de pacientes analizados, nuestros datos muestran por primera vez una mayor expresión de *LPL* y menor de *ADAM-29* en los casos con anomalías estructurales respecto de controles. La literatura sólo refiere correlación con los grupos de riesgo de FISH, observando mayor expresión de *LPL* en los pacientes con delección de 17p y 11q^{12,40}, y alta expresión de *ADAM-29* en el grupo con delección 13q14²⁶.

El análisis del seguimiento clínico mostró una SV global y SLT significativamente más corta en los pacientes con AE, particularmente aquellos con AEN respecto de los casos sin alteraciones. De esta manera, nuestros datos confirman observaciones previas de la literatura^{22,23,41}, sustentando el importante valor pronóstico de las anomalías estructurales en LLC, cuya presencia representa un importante parámetro a tener en cuenta en la evaluación de la evolución clínica de los pacientes.

Concluyendo, el presente estudio permitió definir 32 anomalías no descritas previamente en la literatura, una de ellas recurrente en nuestra serie y detectar tres rearrreglos observados una única vez en la literatura que pasan a ser recurrentes a partir de nuestros resultados. Finalmente, nuestros datos confirman el impacto de las anomalías estructurales en la SV de los pacientes, particularmente en aquellos con cariotipos complejos, y muestran por primera vez una asociación entre los perfiles de expresión génica de *LPL* y *ADAM-29* y las características citogenéticas. De esta manera, el presente estudio refuerza la importancia del análisis citogenético en la comprensión del comportamiento biológico de la LLC.

ABSTRACT

Cytogenetic analysis allows the detection of structural abnormalities (SA) that cannot be observed by FISH (fluorescence in situ hybridization). Thirty four patients with diagnosis of chronic lymphocytic leukemia (CLL) and clonal SA were evaluated. Results were correlated with clinical characteristics, IGHV mutational status, and LPL and ADAM29 expression profiles. To compare clinical parameters, a control group of 78 CLL patients with normal karyotype and FISH analysis were also analyzed. RT-PCR and DNA sequencing for IGHV, and real-time PCR for gene expression were performed. Sixteen CLL patients showed new SA; chromosome 8 was the most frequently involved (7 translocations), followed by pairs 13 (6), 12 (5) and 15 (4). A similar distribution of SA in patients with IGHV mutated and unmutated was observed. Although no significant differences were found, lower ADAM29 and higher LPL expression in patients with SA compared to controls were observed. Patients with new SA showed significant differences in white blood count ($p=0.019$), platelet count ($p=0.002$), lactate dehydrogenase levels ($p=0.029$), treatment free survival (13 months) and overall survival (64 months) than the control group (69 and 144 months; $p=0.087$ and $p=0.012$, respectively), supporting the important prognostic value of chromosomal translocations in CLL.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 352: 804-15.

2. Binet JL, Lepoprier M, Dighiero G, y col. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia: prognostic significance. **Cancer** 1977; 40: 855-864.
3. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, y col. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 1975; 46: 219-234.
4. Binet JL, Caligaris-Cappio F, Catovsky D, y col. International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL). Perspectives on the use of new diagnostic tools in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 2006; 107: 859-61.
5. Damle JN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukaemia. **Blood** 1999; 94: 1840-7.
6. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukaemia. **Blood** 1999; 94: 1848-1854.
7. Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med** 2000; 343: 1910-1916.
8. Kröber A, Seiler T, Benner A, et al. VH mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 2002; 100: 1410-1416.
9. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. **N Engl J Med** 2003; 348: 1764-75.
10. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, y col. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. **J Exp Med** 2001 3; 194: 1639-47.
11. Klein U, Tu Y, Stolovitsky GA, y col. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogenous phenotype related to memory B cells. **J Exp Med** 2001; 194: 1625-38.
12. Heintzel D, Kienle D, Shehata M, y col. High expression of lipoprotein lipase in poor risk B-cell chronic lymphocytic leukemia. **Leukemia** 2005; 19: 1216-23.
13. Opezzo P, Vasconcellos Y, Settegrana C, y col. The LPL/ADAM29 expression ratio is a novel prognosis indicator in chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 2005; 106: 650-57.
14. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, y col. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. **N Engl J Med** 1990; 323: 720-4.
15. Juliusson G, Gahrton G, for the International Working Party on Chromosomes in CLL (IWCLL). Cytogenetic findings and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second IWCLL compilation of data on 662 patients. **Leuk Lymph** 1991; 5: 21-55.
16. Dewald GW, Brockman SR, Paternoster SF, y col. Chromosome anomalies detected by interphase fluorescence in situ hybridization: correlation with significant biological features of B-cell chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol** 2003; 121: 287-95.
17. Chena C, Avalos JS, Bezares RF, y col. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. **Eur J Haematol** 2008; 81: 94-9.
18. Mittal AK, Hegde GV, Aoun P, y col. Molecular basis of aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia patients with 11q deletion and trisomy 12 chromosomal abnormalities. **Int J Mol Med** 2007; 20: 461-9.
19. Haferlach C, Dicker S, Schnittger S, y col. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study of 506 cases analyzed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV_H status and immunophenotyping. **Leukemia** 2007; 21: 2442-51.
20. Koski T, Karhu R, Visakorpi T, y col. Complex chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia are associated with cellular drug and irradiation resistance. **Eur J Haematol** 2000; 65: 32-9.
21. Mayr C, Speicher MR, Kofler DM, Buhmann R, y col. Chromosomal translocations are associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia. **Blood** 2006; 107: 742-51.
22. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, y col. Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgV_H status, and CD38 expression. **Blood** 2006; 108: 3152-60.
23. Van Den Neste E, Robin V, Francart J, y col. Chromosomal translocations independently predict treatment failure, treatment-free survival and overall survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia patients treated with cladribine. **Leukemia** 2007; 21: 1715-22.
24. Müller-Hermelink HK, Monserrat E, Catovsky D, et al. Chronic Lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma. In: WHO Classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. SH Swerdlow, E Campo, NL Harris, ES Jaffe, SA Pileri, H Stein, J Thiele, JW Vardiman eds. Lyon, IARC; 2008. pp 180-182.
25. ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature: Shaffer LG, Slovak ML, Campbell LJ (eds), Karger, Basel 2009.
26. Van't Veer MB, Brooijmans AM, Langerak AW, y col. The predictive value of lipoprotein lipase for survival in chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica** 2006; 91: 56-63.
27. Maloum K, Settegrana C, Chapiro E, y col. IGHV gene mutational status and LPL/ADAM29 gene expression as clinical outcome predictors in CLL patients in remission following treatment with oral fludarabine plus cyclophosphamide. **Ann Hematol**. 2009; 88: 1215-21.
28. Hu LH, Chen FH, Li YR, Wang L Quantification of hTERT mRNA in gastric cancer. **World J Gastroenterol** 2004; 10: 3514-17.
29. Pritsch O, Troussard X, Magnac C, y col. VH gene usage by family members affected with chronic lymphocytic leukaemia. **Br J Haematol** 1999; 107: 616-24.
30. Campbell MJ, Zelenetz AD, Levy S, Levy R. Use of family specific leader region primers for PCR amplification of the human heavy chain variable region repertoire. **Mol Immunol** 1992; 29: 193-203.
31. Mitelman Database of Chromosome Aberration in Cancer. Mitelman F, Johansson B, Mertens F (eds). Available from URL: <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>, 2011.
32. Beà S, López-Guillermo A, Ribas M, et al. Genetic imbalances in progressed B-cell chronic lymphocytic leukemia and transformed large-cell lymphoma (Richter's syndrome). **Am J Pathol** 2002; 161: 957-68.
33. O'Malley DP, Giudice C, Chang AS, et al. Comparison of array comparative genomic hybridization (aCGH) to FISH and cytogenetics in prognostic evaluation of chronic lymphocytic leukemia. **Int J Lab Hematol** 2011; 33: 238-44.
34. Grubor V, Krasnitz A, Troge JE, y col. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). **Blood** 2009; 113: 1294-303.
35. Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, y col. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. **Haematologica** 2011; 96: 1161-9.

36. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al. **Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukemia with 17p deletion.** *Br J Haematol* 2008; 143: 532-6.
37. Parker H, Rose-Zerillo MJ, Parker A, y col. **13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia.** *Leukemia* 2011; 25: 489-97.
38. Buhl AM, Jurlander J, Jørgensen FS, y col. **Identification of a gene on chromosome 12q22 uniquely overexpressed in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2006; 107: 2904-2911.
39. Cerretini R, Chena C, Giere I, y col. **Structural aberrations of chromosomes 17 and 12 in chronic B-cell disorders.** *Eur J Haematol* 2003; 71: 433-8.
40. Mansouri M, Sevov M, Fahlgren E, y col. **Lipoprotein lipase is differentially expressed in prognostic subsets of chronic lymphocytic leukemia but displays invariably low catalytic activity.** *Leuk Res* 2010; 34: 301-6.
41. Ouillette P, Collins R, Shakhani S, y col. **Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia.** *Blood* 2011; 118: 3051-61.