

Estudio citogenético en desórdenes oncohematológicos. Importancia de la relación interdisciplinaria

Norma I. Sganzzetta



ACTUALIZACIÓN EN
EL LABORATORIO
HEMATOLÓGICO

Centro Nacional de Genética Médica. A.N.L.I.S. Dr. C. Malbrán. Ministerio de Salud.
Las Heras 2670. Capital Federal. TE 4801-2326 / 4452-2924. Isabel la Católica 1311,
Hurlingham, 1686 Buenos Aires

HEMATOLOGIA, Vol. 4 N° 2: 93-95
Mayo-Agosto, 2000

Los estudios citogenéticos han identificado muy bien las anomalías cromosómicas originadas en las células somáticas hematopoyéticas desde 1960, año en que el primer marcador citogenético, el cromosoma Philadelphia (Ph), fue descubierto por Nowell y Hungerford en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC)¹.

Actualmente se encuentra muy bien documentada la asociación entre anomalías cromosómicas y cambios celulares que conducen a una proliferación neoplásica clonal; como así también la estrecha correlación entre alteración genética, fenotipo, histología y cuadro clínico. Por lo dicho estas alteraciones son ampliamente utilizadas como elemento de diagnóstico, pronóstico y tratamiento¹.

Por otro lado, a nivel molecular las alteraciones cromosómicas son de especial valor porque identifican un lugar preciso en el genoma, y esto lleva a la búsqueda de los genes responsables del origen y progreso del tumor.

Por lo explicado anteriormente los estudios citogenéticos siguen siendo el primer paso en el estudio genómico directo de los desórdenes oncohematológicos.

El propósito del estudio citogenético es obtener células en división en etapa de metafase de la mitosis para el análisis cromosómico. Se detecta así cualquier cambio visible al microscopio óptico que pudo haber ocurrido específicamente en las células neoplásicas durante su evolución clonal.

Por esto es necesario ante todo tener éxito en un cultivo celular no sólo para obtener buenas metafases en cantidad y calidad para su análisis, sino las adecuadas y representativas de la patología estudiada.

Las células neoplásicas coexisten con las células normales, y el estudio citogenético a diferencia de los estudios moleculares puede diferenciar esta heterogeneidad. Sin embargo la proporción observada de células normales a anormales está sujeta a tres efectos: 1. la muestra enviada, 2. el cultivo, y 3. el análisis citogenético.

1. Muestra

La muestra de elección es el aspirado de *médula ósea (MO)*, la misma enviada en jeringa heparinizada (heparina sódica, no otros anticoagulantes ya que inhiben el crecimiento celular) en forma estéril, debe permanecer a temperatura ambiente hasta el inicio del cultivo o bien en heladera (4 °C) nunca en freezer, por no más de 48 hs. Debe tenerse en cuenta que hay muestras que se deterioran con el tiempo de espera llevando a un resultado incorrecto dado que las células normales sobreviven mejor que las anormales, ej. en Leucemia Linfoblástica aguda (LLA) y en muestras con alto recuento de glóbulos blancos; en cambio las leucemias mieloides: Leucemia Mieloide aguda (LMA), Síndromes Mielodisplásico (SMD) y Mieloproliferativo (SMP) son menos vulnerables y no requieren una atención inmediata, pero deben evitarse demoras de más de 48 hs.

Puede remitirse *sangre periférica (SP)* si el porcentaje de células inmaduras es de por lo menos 10% del total de los glóbulos blancos; entendiéndose como células inmaduras a aquellas que se encuentran en división: mieloblastos, promielocitos, linfoblastos, prolinfocitos o linfocitos atípicos.

También se procesa SP para establecer anomalías constitucionales (ver más adelante).

En los desórdenes linfoproliferativos a células T o B se estudia SP ya que existe acumulación de células maduras de linaje linfocítico o plasmático clonales que pueden ser estimuladas para su crecimiento, sin embargo la MO puede también dar información en estos casos.

En los Linfomas se prefiere aspirado o biopsia de *nódulo linfático*, salvo aquellos pacientes que presentan una fase leucémica o enfermedad avanzada en que es adecuado el estudio de SP o MO.

En cuanto a la *cantidad de muestra*, depende de algún modo del tipo de patología pero la adecuada en la mayoría de los casos es entre 2-5 ml.

Se aconseja que no sea del final de la jeringa ya que el inicio de la punción lleva gran cantidad de eritrocitos.

Dado que las muestras de MO varían en la celularidad de un paciente a otro y en los distintos desórdenes neoplásicos, es importante el conocimiento del *recuento celular* para determinar la cantidad de muestra a cultivar, ya que puede haber escaso crecimiento por exceso o defecto en la densidad celular cultivada. La cantidad celular óptima para el cultivo de MO es de 10^6 células/ml.

El *tratamiento citotóxico* del paciente afecta el éxito de un cultivo, por esto se prefiere que las muestras sean extraídas antes del tratamiento, de lo contrario es muy alta la probabilidad que los clones no sean detectados y se obtenga un resultado normal. Por esto es crítico conocer si el paciente ha comenzado el tratamiento ya que muy raramente el clon persiste, siendo su permanencia independiente del número de células blásticas presentes.

En la *remisión* de las leucemias agudas ocurre lo mismo, los clones no persisten y por lo tanto no se justifica un estudio citogenético; si se quiere realizar un seguimiento, éste debería hacerse sólo en los casos donde el clon o clones fueron previamente identificados realizando un estudio de hibridación in situ (FISH) en busca de los mismos.

2. Cultivo

La elección de un tipo de cultivo es una cuestión de preferencia y experiencia pero en realidad está directamente relacionado a la patología que se quiere estudiar.

Se mencionarán los tipos de cultivos y en qué casos se aplican para obtener mejores resultados²:

2.a. No estimulados

2.a.1. No sincronizados

- *Directo*: incubación directa con inhibidor mitótico, colchicina o colcemid, durante una hora (LLA, LMC y LMA-M6).

- *Corto término*: 24 hs a 37 °C antes del inhibidor mitótico (LMA, LMC, SMD, SMP, Anemia, Pancito-

penia, Trombocitopenia, Linfoma y Desórdenes linfoproliferativos a células T y B).

- *Largo término*: 48 hs a 37 °C antes del inhibidor mitótico (LMA, LMC, SMD, SMP, Anemia, Pancitopenia, Trombocitopenia, Linfoma y Desórdenes linfoproliferativos a células T).

- 72-96 hs a 37 °C antes del inhibidor mitótico (Desórdenes linfoproliferativos a células B).

2.a.2. *Sincronizados*: Se realiza bloqueo en varios puntos del ciclo celular (metotrexate, MTX; fluoro-deoxiuridina, FdUr, o timidina, T) y luego se libera (timidina, T o deoxicitidina), lográndose la sincronización de la mitosis. Se obtiene así un menor índice mitótico pero cromosomas más largos y de mejor morfología. Se utiliza para todo tipo celular.

2.b. *Estimulados*: Los mitógenos se utilizan para estimular la proliferación de linfocitos cuando se conoce la enfermedad linfóide o se sospecha el tipo celular B o T. Para desórdenes de células T el mitógeno de elección es fitohemaglutinina (PHA) y para desórdenes de células B se utiliza pokeweed (PKW) o Lipopolisacárido (LPS) tanto en médula ósea como en sangre periférica.

El uso de mitógenos se realiza también en SP para demostrar anomalías heredadas o constitucionales y diferenciarlas de las alteraciones somáticas adquiridas, ej. en Síndrome de Down y en síndromes de fragilidad cromosómica, estas últimas son patologías con defectos en la reparación del ADN dañado y que están predispuestas a desarrollar neoplasias, ej. Anemia de Fanconi.

En los cultivos directos y a corto término las células que primero se dividen son los precursores eritroides, por lo tanto la presencia de sólo células normales en una incubación directa debe interpretarse teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, aunque esto no es un problema si la línea eritroide es parte del clon maligno, ej. LMC con cromosoma Philadelphia positivo.

Por todo lo dicho es muy importante el conocimiento previo del linaje celular involucrado en la patología sospechada, dado que de esta información dependerá el tipo de cultivo a realizar.

3. Análisis citogenético

El mismo se realiza con coloración estándar y técnica de bandeado G, recurriéndose a otros bandeos cuando se necesite. Se analiza así cada uno de los cromosomas determinando la presencia de cualquier anomalía numérica o estructural.

El efecto del análisis en la detección de anomalías cromosómicas en células neoplásicas depende de dos factores: a) Calidad de metafases y b) Número de metafases analizadas.

3.a. Inevitablemente y sobre todo en cultivos de LLA existe una predisposición a una morfología pobre y a un bandeó cromosómico no muy bien distinguible. Por esto es importante el estudio de una muestra representativa que incluya el análisis de metafases de todas las calidades presentes en el cultivo.

En las leucemias mieloides tanto las metafases normales como las anormales son de buena calidad, pero existen excepciones que son las células con translocaciones (8; 21) y (15; 17) en que son invariablemente pobres en cantidad y calidad. Se detectan raramente en cultivos directos y de corto término lo que lleva a resultados normales. Por esto es importante dar a conocer la sospecha de estas alteraciones para realizar el tipo de cultivo correspondiente y examinar más de un cultivo antes de excluir la anomalía en forma confiada².

3.b. Existen tablas que muestran el número de células que deben analizarse para excluir mosaicismo con diferentes límites de confianza³. El recuento adecuado es entre 15-20 células⁴.

De todas maneras hay que tener en cuenta que las anomalías cromosómicas no se detectan en todas las células malignas, en algunos casos se ha comprobado por estudio de ADN que los cambios genéticos ocurrieron pero a nivel molecular, ej. rearreglo bcr en LMC con cromosoma Philadelphia negativo^{5, 6}. Por esto la detección de un cariotipo aparentemente normal ya sea en mosaico o no, no significa necesariamente que la línea celular de la cual deriva es normal en sí misma y que no existe un clon maligno.

Podemos decir entonces como en algún otro lado, *la ausencia de evidencia no es evidencia de ausencia*. Y aunque puede ser desalentador el trabajo ya que se ajustaría al dicho... "es como la búsqueda de una aguja en un pajar", dado que aun con experiencia un 33% de muestras pueden fracasar debido a: material inadecuado, ausencia de mitosis o mitosis imposibles de analizar, una buena relación interdisciplinaria entre el médico hematólogo y el citogenetista lleva a un mejor procesamiento de la muestra y a un mejor entendimiento de las patologías oncohematológicas en las que tanto hay que investigar y entender.

BIBLIOGRAFÍA

1. Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. Chapter 1, 4-10. Wiley-Liss, 1995.
2. Rooney D.E., Czepulkowski B. H. *Human Cytogenetics. Malignancy and Acquired Abnormalities. A Practical Approach*. Volume II. Chapter 1-4. Oxford University Press, 1992.
3. Hook E.B. Exclusion of Chromosomal Mosaicism: Tables of 90%, 95% and 99% Confidence Limits and Comments on Use. *Am J Hum Genet* 1997; 29: 94-97.
4. The Association of Cytogenetic Technologist Task Force: Turid Knutsen, Helen Bixenman, Helen Lawce, Paulette Martin. *Am J of Med Genetics* 1991; 41: 566-569.
5. Fitzgerald PH, Beard MEJ, Morris CM, Heaton DC, Reeve AE. Ph-negative chronic myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1987; 66: 311-314.
6. Lazaridon A, Chase A, Melo J and col. Lack of reciprocal translocation in BCR-ABL positive Ph-negative chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8: 454-457.
7. Solé F, Espinet B, Woessner S. Recomendaciones para la realización del estudio citogenético de las neoplasias hematológicas. *Sangre* 1998; 44 (1): 73-75.