

SEGUIMIENTO CITOGENETICO E HIBRIDIZACION *IN SITU* (FISH) EN LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL

SUSANA ACEVEDO

Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Los estudios citogenéticos son una herramienta de suma importancia a la hora del diagnóstico, pronóstico y seguimiento de las neoplasias hematológicas. La técnica de citogenética convencional o de bandeo G nos brinda una amplia información a cerca del espectro de aneuploidías y cambios estructurales presentes en las células malignas, con una sensibilidad de 1 a 5% dependiendo de la cantidad de metafases analizadas. La técnica de FISH, con una mayor sensibilidad, de 10^{-2} – 10^{-4} , trata de suplir una de las limitaciones más grandes del bandeo G como lo es la falta de células en división, mediante el empleo de sondas que permiten abordar el estudio en núcleo interfásico. De esta manera nuestros pacientes fueron monitoreados con ambas metodologías durante el curso de su enfermedad para evaluar la persistencia de enfermedad mínima residual. Mientras no contemos con posibilidad de realizar PCR cuantitativas de rutina, el FISH será el método por excelencia para cuantificar el clon patológico. Lo será también para el seguimiento de rearrreglos para los cuales no contamos aún con determinaciones moleculares. Nuestras observaciones coinciden con las de diferentes grupos de investigadores en la necesidad de evaluar series más numerosas de pacientes con distintas entidades para poder llegar a conclusiones que nos permitan predecir con anticipación y certeza la recaída .

Abstract *Cytogenetics and in situ hybridization (FISH) in minimal residual disease.* Cytogenetic studies are an important tool for diagnosis, prognosis and minimal residual disease (MRD) follow up specially in oncohematology. Conventional cytogenetics, also known as G banding technique, brings complete information for the spectrum of aneuploidies and structural changes present in malignant cells with a sensitivity of 1-5% depending on the number of metaphases analyzed. FISH technique with a higher sensitivity, 10^{-2} – 10^{-4} , attempts to make up for one of the principal limitations of G banding which is the absence of metaphases, thus employing different probes and allowing the study of interphase nucleus. Our patients were monitored with both methodologies during the course of the disease looking for MRD. FISH is the best methodology for quantifying the abnormal clone until we can apply quantitative PCR routinely. It will also be important for the follow up of rearrangements for which we do not yet have molecular determinations available. Our findings are coincident with those of other research groups in the need of evaluating higher series of patients with different pathologies in order to arrive at conclusions allowing us to predict relapse with any certainty.

Key words: *in situ* hybridization, minimal residual disease, oncohematology

Los estudios citogenéticos han adquirido con el devenir de los tiempos mayor importancia a la hora del diagnóstico, pronóstico y seguimiento de numerosas enfermedades, entre las que se encuentran las oncohematológicas. La mejora en las técnicas de cultivo permitió la obtención de preparados de mejor calidad de bandas cromosómicas lo cual contribuyó al hallazgo de cambios cromosómicos no al azar, numéricos y/ o estructurales asociados a distintos tipos de leucemia y en estrecha relación con ciertas características clínicas, factores pronóstico y respuesta a terapia¹. Esta es la razón por la cual la citogenética juega un rol crítico en la

evaluación clínica de numerosos desórdenes hematológicos, participando de sub clasificaciones, elección de terapéutica adecuada y monitoreo del efecto terapéutico. La reciente incorporación de las técnicas de citogenética molecular, FISH, ha mejorado la exactitud de los resultados de citogenética convencional y contribuido también a la observación de nuevas anomalías cromosómicas. Los pacientes pueden ser monitoreados con bandeo G, FISH y técnicas moleculares durante el curso de la enfermedad para evidenciar presencia de enfermedad mínima residual (EMR).

La mayoría de los pacientes con leucemia, presentan al momento del diagnóstico un número de células neoplásicas superior a 10^{12} células². Luego del tratamiento con quimioterapia o de un transplante, se considera que entran en remisión cuando el número de célu-

las blásticas observadas al microscopio óptico es menor a 5% en médula ósea. Sin embargo a pesar de esta remisión morfológica, algunos pacientes pueden presentar aún más de 10^{10} células leucémicas. A fin de evaluar EMR aplicamos las técnicas citogenéticas de bandeado G y FISH. Ambas son técnicas complementarias que tienen sus ventajas y desventajas. Con el propósito de aprovechar lo mejor de cada una de ellas, abordamos la detección, cuantificación y seguimiento del clon residual, asimismo intentamos determinar si los resultados obtenidos son predictivos de evolución de la enfermedad.

Seguimiento citogenético

Dentro de las ventajas del bandeado G, está la posibilidad de estudiar cada uno de los 46 cromosomas presentes en la célula considerando el patrón de bandas característico de cada cromosoma, y esto permite la visualización de rearrreglos genómicos. Si tenemos en cuenta que un altísimo porcentaje (70-80%) de pacientes con leucemia aguda tiene alteraciones cromosómicas recurrentes¹, el estudio citogenético convencional constituye una herramienta indispensable para el seguimiento del clon anómalo. Por lo general la desaparición del mismo coincide con la remisión hematológica, y la reaparición del clon aberrante, con la recaída³. Sin embargo este comportamiento no es una condición *sine qua non* ya que muchos pacientes recaen sin que se observe el cariotipo inicial. Esto sugeriría que la falta de detección del clon original no garantiza una remisión durable,

Otro item a tener en cuenta es la progresión de la enfermedad que se evalúa. Tal es el caso de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) que son tratados con interferón α , algunos de los cuales logran largas remisiones clínicas y citogenéticas parciales pero sin desaparición del clon anómalo. Aquí el estudio citogenético convencional es de suma importancia a la hora del seguimiento, ya que es capaz de detectar anomalías adicionales que son indicativas de progresión de la enfermedad.

El análisis citogenético nos brinda de esta manera una amplia información acerca del espectro de aneuploidías y cambios cromosómicos estructurales presentes en las células malignas. La sensibilidad de la técnica oscila entre el 5-10% dependiendo de la cantidad de metafases analizadas. Sin embargo la falta de células en división y la mala morfología de los cromosomas, situaciones muy frecuentes en las hemopatías malignas, son una limitación de la citogenética convencional.

En la Tabla 1 se detallan los pacientes estudiados al momento del diagnóstico y durante el seguimiento. El paciente n° 2 con diagnóstico de leucemia mieloblástica aguda (LMA), subtipo M2, sin citogenética al diagnóstico, nos fue derivado en primera recaída. En esta oportu-

dad presentaba trisomía del cromosoma 8 en el 100% de las células analizadas. En general la remisión hematológica no coincidió con la desaparición del clon anormal con excepción de los pacientes 3, 6 y 10.

Seguimiento con FISH

La aplicación de estas técnicas permite suplir falencias del análisis citogenético convencional ya que mediante el empleo de determinadas sondas es posible evaluar la presencia de reordenamientos aún en núcleos interfásicos, es decir prescindiendo de metafases. No obstante, la principal desventaja de este procedimiento es que la información que brinda está limitada sólo al reordenamiento buscado. Ultimamente se han desarrollado otras técnicas de hibridización que amplían la información a los 23 pares cromosómicos en forma conjunta, como el M-FISH (FISH multicolor) o el RX-FISH (FISH multibanda), los cuales son aún muy onerosos para la aplicación en rutina diagnóstica, no sólo por el costo de las sondas sino por la infraestructura necesaria para la interpretación de resultados.

La sensibilidad de la técnica oscila entre un 10^{-2} a 10^{-4} dependiendo del tipo y cantidad de sondas utilizadas⁴.

Tipos de sondas:

- Centroméricas o de ADN satélite: hibridizan con regiones α o β satélite u otras secuencias presentes en los centrómeros.
- Locus específico: hibridizan con secuencias únicas
- Pintado cromosómico: contiene una mezcla de secuencias genómicas de todo el cromosoma o de una determinada porción.

Acceder al estudio del núcleo interfásico es sin dudas el lado fascinante del FISH. El seguimiento de pacientes con trasplante alogeneico de distinto sexo, con sondas centroméricas para los cromosomas sexuales, nos brinda un rápido panorama acerca del porcentaje de células del donante y residuales del receptor. La utilización de sondas centroméricas nos permite también cuantificar aberraciones numéricas, inclusive aquellas presentes en clones de baja expresión o con baja capacidad proliferativa, brindándonos un idea de la dimensión real del clon. La posibilidad de utilizar más de una sonda centromérica en forma simultánea, además de aumentar la sensibilidad de la técnica constituye un excelente medio para monitorear clones hiperdiploides en leucemia linfoblástica aguda (LLA).

La aplicación de sondas específicas de secuencia o locus específico nos sirven para visualizar persistencia de células residuales con alguna anomalía característica de estirpe o de subtipo como lo son la t(9;22) en LMC,

Tabla 1: Diagnóstico y seguimiento de pacientes oncohematológicos con citogenética y FISH

Paciente Nº	Diagnóstico	Edad/sexo	Cariotipo	FISH	
				Sonda	Resultado
1	Mieloma leucemizado	70/ masc	a) 47,XY,+1 b) 46,XY	CEP* 1	5% (400 núcleos)
2	LMA M2	26/ masc	a) 47,XY,+8 b) ———	CEP*8 CEP*8 CEP*8	3% (400 núcleos) 1,2%(400 núcleos) 6,6% (400 núcleos)
3	LMA M2	26/ fem	a) 45,X,t(8;21),-X b) 46,XX	WCP*8	20 metaf.normales
4	LMA M3	24/ fem	a) 46,XX,t(15;17) b)46,XX,t(15,17)	LS PML/RARa LS PML/RARa	97% (200 núcleos) 3% (200 núcleos)
5	LMA M3	30/ masc	a) 46,XY,t(15;17) b) 46,XY,t(15;17)	LS PML/RARa	7%(200 núcleos)
6	LMA M2	9/ masc	a) 46,XY,del(7q) b) 46,XY	LS 7q32	0% (400 núcleos)
7	LMA M2	7/ masc	a) 46,XY,del(7q) b) 46,XY,del(7q)	LS 7q32	6% (400 núcleos)
8	LLA L1	7/ masc	——— b) 46,XY	LS TEL/AML1 LS TEL/AML1	36% (400 núcleos) 3% (400 núcleos)
9	LLA L1	15/ masc	a) 46,XY,t(9;22) b) 46,XY	——— LS BCR/ABL ES	3% (200 núcleos)
10	LLA L2	34/ masc	a) 46,XY,t(4;11) b) 46,XY	——— WCP*4	20 metaf. normales

a) al diagnóstico, b) seguimiento

CEP: sonda centromérica, WCP: sonda painting, LS: secuencia específica

LLA y LMA que implica el reordenamiento de los genes BCR/ABL; la t(15;17) que afecta al PML/RARa para LMA M3, la t(12;21) con compromiso del TEL/AML1 en LLA, etc. Dado que la disponibilidad de células en división así como de cromosomas de buena morfología disminuye notablemente en las muestras de pacientes postratamiento, la posibilidad de seguimiento de indicadores de mal pronóstico como las deleciones de brazo largo de cromosomas 5 y 7 o de brazo corto del cromosoma 12 con sondas de secuencia específica o bien de marcadores cromosómicos complejos con sondas de pintado cromosómico, es de vital importancia.

El análisis citomolecular de los pacientes evaluados durante el seguimiento (Tabla 1) detectó la presencia de enfermedad mínima residual en todos los pacientes estudiados excepto en los casos 3, 6 y 10 en los cuales la remisión fue completa. Además, en el paciente nº 8, un niño de 7 años con diagnóstico de LLA, inmunofenotipo B y ploidía normal entre otros parámetros clínicos, nos pareció importante discernir si se encontraba dentro del 30% estimado en la población leucémica con estas características como posible portador de esta traslocación

t(12;21) considerada de buen pronóstico. Dado que esta alteración es imposible de detectar por bandejo G, se empleó FISH con sonda *locus* específica de los genes TEL/AML1 presentes en la t(12;21) al diagnóstico y durante el seguimiento.

El paciente nº 2 se evaluó con FISH en tres oportunidades, al primer, tercer, y sexto mes de lograr su segunda remisión hematológica. En la primera oportunidad mantenía un 3% de trisomía 8 (VN hasta 2,2%), motivo por el cual recibió mayor tratamiento quimioterápico. Al reevaluarlo en la segunda oportunidad, había logrado negativizar el clon, ya que se encontraron valores inferiores a lo considerado positivo de acuerdo al punto de corte estipulado para esta sonda. Se decidió entonces criopreservar médula ósea para un eventual autotransplante, ya que no disponía de donante histoiéntico. Seis meses después recayó hallándose en esta oportunidad un 6.6% de trisomía 8 en médula ósea. Recibió nuevo tratamiento quimioterápico y autotransplante pero falleció posteriormente.

Los pacientes con t(15;17) si bien se hallan en remisión hematológica, mantienen su clon residual evaluado

por FISH y RT-PCR luego de seis meses de evolución de la enfermedad.

En cuanto al paciente nº 6, de 9 años, con diagnóstico de LMA y del(7q), a pesar de haber comenzado con un marcador de mal pronóstico, sigue en remisión hematológica y citogenética luego de tres años de evolución.

El paciente nº 10 presentó una t(4;11) en el 100% de las metafases analizadas. Logró la remisión hematológica, citogenética y molecular luego de lo cual fue transplantado con un donante histoidéntico falleciendo un año después libre de enfermedad por fallo cardio-respiratorio.

Todo lo expuesto aquí nos lleva a la conclusión que las técnicas de citogenética convencional y FISH son complementarias y conviene siempre orientarnos a que tipo de sonda utilizar, mediante el estudio citogenético previo⁵. Esto nos ayudará a optimizar nuestra estrategia tendiente a lograr el mejor resultado al momento del diagnóstico y seguimiento de la enfermedad residual. Hasta tanto no contemos en los laboratorios con la posibilidad de realizar PCR cuantitativas, el FISH seguirá siendo el método por excelencia para cuantificar el clon patológico.

co. Lo será también para el seguimiento de re-arreglos para los cuales no contamos aún con determinaciones moleculares. Nuestros datos, al igual que los de distintos grupos de estudio e investigación mundiales, reflejan la necesidad de evaluar series más grandes de pacientes con las distintas entidades para poder llegar a conclusiones que nos permitan con anticipación y certeza predecir la recaída en todos los pacientes.

Bibliografía

1. Heim y Mitelman. Cancer Cytogenetics, second edition. Philadelphia: Wiley Liss, 1995
2. Greaves M. Silence of the leukemic clone. *N Engl J Med*, 1997; 336:317-23
3. Freireich F, et al. Cytogenetics for detection of MRD in acute myeloblastic leukemia. *Leukemia* 1992; 6:500-6
4. Kasprzy A, Secker-Walker LM. Increased sensitivity of minimal residual disease detection by interphase FISH in acute lymphoblastic leukaemia with hyperdiploidy. *Leukemia* 1997; 11:429-35.
5. Espinet B, Lloveras E, Solé F. Técnicas de hibridación in situ (HIS) Fundamento y aplicaciones en neoplasias hematológicas. *Sangre* 1999; 44: 261-7.

J'ai compris que, contrairement à ce que j'avais pu croire, le cheminement de la science ne consiste pas en une suite de conquêtes inéluctables; qu'elle ne parcourt pas la voie royale de la raison humaine; qu'elle n'est pas le résultat nécessaire, le produit inévitable d'observations sans appel imposées par l'expérimentation et le raisonnement. J'ai trouvé là un monde de jeu et d'imagination, de manies et d'idées fixes. A ma surprise, ceux qui atteignaient l'inattendu et inventaient le possible, ce n'étaient pas simplement des hommes de savoir et de méthode. C'étaient surtout des esprits insolites, des amateurs de difficulté, des êtres à vision saugrenue. Chez ceux qui occupaient le devant de la scène venaient souvent se déployer d'étranges mélanges d'indifférence et de passion, de rigueur et de bizarrerie, de volonté de puissance et de naïveté. C'était le triomphe de la singularité.

Entendí que, contrariamente a lo que hubiera podido creer, el desarrollo de la investigación no consiste en una seguidilla de conquistas ineludibles; que no sigue la vía de la razón humana; que no es necesariamente el resultado, el producto inevitable de observaciones sin antecedentes impuestos por la experimentación y el razonamiento. Encontré allí un mundo de juego y de imaginación, de manías y de ideas fijas. Para mi sorpresa, los que alcanzaban lo inesperado e inventaban lo posible, no eran simplemente los hombres de sabiduría y de método. Eran especialmente espíritus insólitos, amateurs de dificultades, individuos con una visión estrafalaria. Entre los que ocupaban las primeras filas se desplegaban a menudo extrañas mezclas de indiferencia y de pasión, de rigor y de bizarría, de voluntad de poder y de ingenuidad. Era el triunfo de la singularidad.

François Jacob

La statue intérieure. Paris: Editions Odile Jacob, 1987, p 13