

CITOGENÉTICA EN HEMATOLOGÍA

J. M. Hernández Rivas, F. Prósper Cardoso

Introducción. Técnicas de análisis genético y epigenético. Aplicaciones de la citogenética molecular. Conclusiones

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de estudiar el núcleo celular ha ofrecido, desde ya hace muchos años, un conocimiento fundamental de los cambios genéticos responsables de los procesos que suceden durante la transformación maligna de las células. Además de su aplicación en las hemopatías malignas, el estudio cromosómico es indispensable en otras enfermedades hematológicas como la anemia de Fanconi y en el seguimiento del injerto en los pacientes trasplantados siempre que el receptor y el donante sean de distinto sexo. A las técnicas de citogenética convencional se ha añadido la metodología de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del inglés *fluorescent in situ hybridization*), que permite la visualización dentro del núcleo (en interfase o en metafase) de las sondas marcadas con fluorocromos y que reconocen secuencias génicas específicas. La incorporación de nuevos fluorocromos ha permitido, además, que las posibilidades de hibridación se multipliquen y sea posible marcar cada cromosoma en un color, lo que se denomina *cariotipo en colores* o SKY (del

inglés *spectral karyotyping*). A lo largo del presente siglo, a estas tecnologías se ha incorporado la posibilidad de analizar, en un solo experimento, la expresión de la mayoría de los genes o de sus polimorfismos mediante la aplicación de los biochips. Y durante esta década se han realizado numerosos estudios de secuenciación del genoma humano y se dispone de muchos datos de la secuenciación de exomas completos de casi todas las neoplasias. Junto a ello se han desarrollado tecnologías que permiten analizar de forma global el epigenoma celular, es decir, los mecanismos que condicionan modificaciones de la expresión de genes sin cambios en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN), y que incluye la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas. Por tanto, el estudio del genoma, del epigenoma y del transcriptoma celular es un campo en continua evolución que permite avanzar de manera notable en el conocimiento de las alteraciones que condicionan la transformación de una célula normal en una célula tumoral.

La aplicación de estas metodologías al estudio de las hemopatías malignas

ha ayudado en su clasificación, y en muchas ocasiones la presencia de estas aberraciones citogenéticas ha contribuido a establecer el pronóstico de la enfermedad e incluso indicar tratamientos específicos. Por todo ello, muchas decisiones terapéuticas están basadas en estos hallazgos genéticos. Por esta razón, el estudio de las alteraciones genéticas se incluye como esencial en las clasificaciones de la Organización Mundial de la Salud (2008 y 2016).

TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO Y EPIGENÉTICO

Citogenética convencional

A pesar de que las técnicas de citogenética convencional cuentan con más de medio siglo de existencia, siguen proporcionando una valiosa información clínica, por lo que son uno de los pilares en los que se sustenta el diagnóstico de las hemopatías. En la actualidad, el análisis de los cromosomas es obligado en el estudio de la sangre y de la médula ósea (MO) en las hemopatías malignas. En algunas ocasiones se dispone de sondas de FISH específicas que complementan los hallazgos obtenidos por citogenética. En otras, el diagnóstico se basa exclusivamente en el cariotipo de los pacientes, como en el caso de la determinación de roturas cromosómicas, hallazgo característico de los pacientes con anemia de Fanconi. La muestra que se cultiva en los estudios citogenéticos puede proceder de cualquier tejido: sangre, MO, líquido amniótico, ganglio, bazo, masas o derrames tumorales. Es imprescindible que la muestra no esté contaminada en el momento de su cultivo y que el transporte hasta el laboratorio de citogenética sea lo más rápido posible. Las condiciones de cultivo varían en relación con el tipo de tejido que se pretende analizar y con el diagnóstico de

sospecha de la enfermedad. Una vez cultivada, se procede a la recolección de los cromosomas y, posteriormente, estos se tiñen adoptando el patrón característico de bandeo cromosómico.

Tanto la definición de clonalidad como la nomenclatura citogenética son revisadas periódicamente por un comité internacional de expertos, el *International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN). La nomenclatura del ISCN es el idioma que permite la comprensión de las alteraciones citogenéticas. Estas se ordenan de manera numérica, comenzando por el primer cromosoma afectado en una alteración. En el caso de las alteraciones numéricas, el cromosoma afectado va precedido de un signo que indica su ganancia o su pérdida (por ejemplo, +8 en el caso de un cromosoma 8 adicional, o -5 en el caso de pérdida del cromosoma 5). Las alteraciones estructurales son más difíciles de anotar, pero siguen los mismos principios. Así, la presencia de una $t(9;22)(q34;q11)$ significa que hay un intercambio recíproco de material entre los cromosomas 9 y 22, y más en concreto entre la banda q34 del cromosoma 9 y la banda q11 del cromosoma 22.

Para que un hallazgo citogenético sea considerado clonal y, por tanto, patológico, es preciso que al menos dos mitosis tengan una ganancia del mismo cromosoma o presenten la misma alteración estructural. En el caso de las pérdidas, denominadas *monosomías*, es necesario que tres metafases o más presenten la pérdida del mismo cromosoma.

Los principales tipos de alteraciones citogenéticas, tanto numéricas como estructurales, y su significado se recogen en la **tabla 1**. Cuando hay varias alteraciones citogenéticas, el cariotipo se denomina *complejo*, si bien el número de cromosomas necesarios para que un cariotipo se considere complejo difiere en-

Tabla I. Principales tipos de alteraciones citogenéticas

Abreviatura	Significado	Concepto	Ejemplo
+	Trisomía	Ganancia de un cromosoma	+8
-	Monosomía	Pérdida de un cromosoma	-7
t	Traslocación	Intercambio recíproco de material genético entre dos o más cromosomas	t(9;22)
der	Cromosoma derivado	Intercambio no recíproco de material genético entre dos o más cromosomas	der(9)t(9;22)
del	Delección	Pérdida de material genético dentro de un brazo de un cromosoma	del(5)
inv	Inversión	Intercambio recíproco de material genético dentro del mismo cromosoma	inv(16)
i	Isocromosoma	Pérdida completa de un brazo de un cromosoma acompañada de la duplicación del otro brazo	i(17)(q10)

tre los grupos de investigadores (más de tres o más de cinco). La presencia de un cariotipo complejo se asocia a mal pronóstico, pues supone la existencia de un daño cromosómico muy importante en el tumor analizado.

Hibridación fluorescente *in situ*

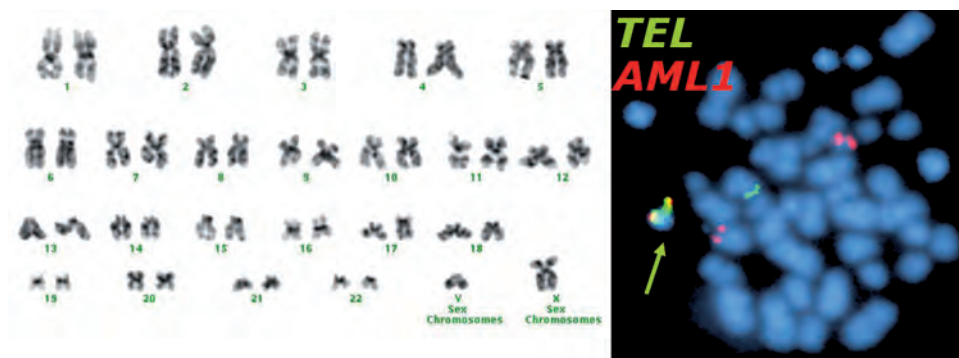
La FISH se basa en el uso de sondas marcadas con un fluorocromo que reconocen secuencias específicas del ADN genómico. Estas sondas pueden ser específicas de centrómeros o de una región genómica (generalmente de un gen). Tras la hibridación con núcleos en interfase o en metafase, es posible observar la presencia de ganancias, pérdidas o fusiones entre genes. Esta metodología se usa para confirmar el diagnóstico de las hemopatías que tienen una alteración característica, como la t(9;22) en la leucemia mieloide crónica (LMC) (fusión *BCR/ABL*) o la t(15;17) en la leucemia aguda promielocítica (fusión *PML/*

RARA). Como hemos referido en los capítulos previos, su uso ha contribuido a un mejor seguimiento de la enfermedad en los pacientes con alteraciones específicas, numéricas o estructurales en el momento del diagnóstico.

A diferencia de la citogenética convencional, la mayoría de las técnicas de FISH no precisan de células tumorales en división, por lo que son de gran ayuda en el estudio de muestras en las que no se han obtenido metafases. Además puede aplicarse directamente sobre células extendidas de sangre periférica o MO, imprevistas de tejido en fresco o congelado y tejido seccionado y parafinado.

Sondas para la hibridación fluorescente *in situ*

Se dispone de un gran número de sondas para el estudio de las alteraciones genéticas frecuentes en las neoplasias. Las sondas usadas en la FISH se pueden clasificar en:



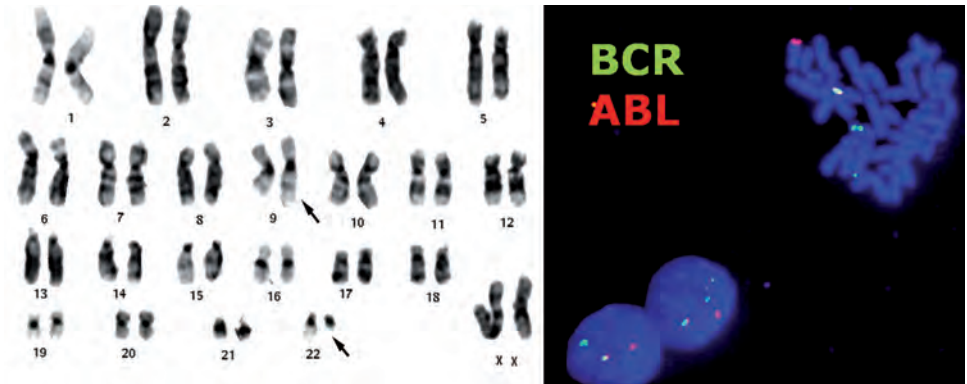
► **Figura 1.** Paciente con leucemia aguda linfoblástica B. Citogenética e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). $t(12;21)(p13;q22)$ *TEL-AML1*, *ETV6-CBFA2*. Esta traslocación no se observa mediante citogenética convencional.

- **Sondas centroméricas.** Son específicas de cada centrómero, por lo que sirven para diferenciar los cromosomas entre sí. Los centrómeros contienen secuencias repetitivas de ADN, específicas de cada uno de ellos (con la excepción, en los humanos, de los centrómeros de los cromosomas 13 y 21, que contienen muchas homología). Por ello, son el tipo de sondas indicado para estudiar las alteraciones numéricas, como las trisomías y las monosomías.
- **Sondas que hibridan simultáneamente con múltiples secuencias del cromosoma.** Se denominan *sondas de pintado cromosómico*. Solo pueden utilizarse en metafase y sirven para detectar alteraciones estructurales (traslocaciones, cromosomas marcadores, derivados, etc.) difíciles de identificar con la citogenética convencional, como la $t(12;21)$ en la leucemia aguda linfoblástica B (LAL-B) del niño (**fig. 1**).
- **Sondas que hibridan con una única secuencia de ADN.** Estas sondas permiten sobre todo detectar reordenamientos estructurales de

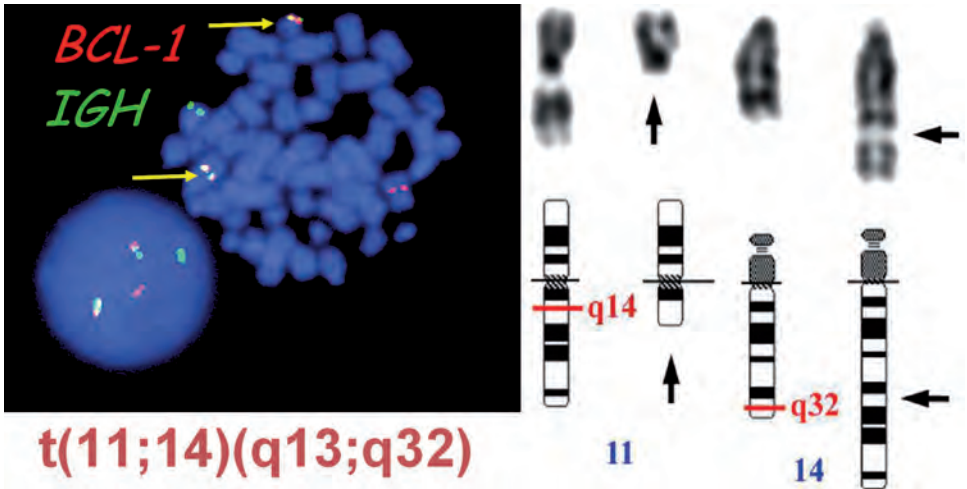
genes o de regiones cromosómicas concretas. Para poder utilizarlas es necesario conocer *a priori* la región candidata a estudio en cada enfermedad. Son de mucha utilidad en el estudio de las fusiones génicas, de las pérdidas de un fragmento cromosómico y de las amplificaciones génicas. Sus principales aplicaciones se describen en la **tabla II** y en las **figuras 2 y 3**.

Otras técnicas de hibridación fluorescente *in situ*

Además de la FISH de uno o dos colores, las más utilizadas en la clínica, hay otras modalidades de FISH usadas con menos frecuencia en la práctica clínica, como: 1) la hibridación genómica comparada (HGC), donde se produce la hibridación de ADN tumoral y normal frente a cromosomas normales, y 2) la hibridación *in situ* multicolor, que combina varios fluorocromos para visualizar distintas regiones cromosómicas. Se usa para determinar qué cromosomas están implicados en el caso de los cariotipos complejos o cuando los cromosomas afectados no están bien definidos.



► **Figura 2.** Paciente con leucemia mieloide crónica. Citogenética e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). $t(9;22)(q34;q11)$. Fusión BCR/ABL .



► **Figura 3.** Paciente con linfoma de células del manto. Citogenética e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). $t(11;14)(q13;q32)$.

Biochips

Un biochip o *microarray* permite el análisis de grandes cantidades de genes o de secuencias genéticas en un solo experimento. Los biochips son colecciones ordenadas de secuencias genéticas fijados a un soporte sólido. En general, estas secuencias son oligonucleótidos, aunque sobre estos pueden fijarse otras estructuras como cADN, BAC (cromosomas arti-

ficiales de bacterias), etc. Tras el marcaje del ADN o del ácido ribonucleico (ARN) de la muestra que se quiere analizar y su posterior hibridación al biochip, es posible analizar, en un solo experimento, la mayoría de las secuencias génicas o de los ARN de un conjunto de células. Los biochips se han aplicado al estudio de las leucemias y de los linfomas, demostrando que el perfil de expresión génica (ARN) de cada tipo molecular de LAL o LAM es distinto. Su

Tabla II. Alteraciones citogenéticas con intercambio de material genético más características de las hemopatías malignas

Traslocación	Genes fusionados	Enfermedad
t(9;22)(q34;q11)	<i>BCR/ABL</i>	LMC, LAL-B
t(8;21)(q21;q22)	<i>RUNX1/RUNX1T1</i>	LAM
inv(16)(p13q22)	<i>BFB/MYH11</i>	LAM M4 Eo
t(15;17)(q22;q12)	<i>PML/RARA</i>	Leucemia promielocítica
t(9;11)(p22;q23) ²	<i>MLLT3/MLL</i>	LAM
t(6;9)(p23;q34)	<i>DEK/NUP214</i>	LAM
inv(3)(q21q26)	<i>RPN1/EVI1</i>	LAM
t(1;22)(p13;q13)	<i>RBM15/MKL1</i>	LAM megacarioblástica
t(5;12)(q31;p13)	<i>PDGFR-beta/ETV</i>	LMMC Eo
t(4;11)(q21;q23) ²	<i>AF4/MLL</i>	LAL
t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6/RUNX1³</i>	LAL-B
t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3/PBX1⁴</i>	LAL-B
t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGH</i>	LCM, MM
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH/CCND2</i>	Linfoma folicular
t(11;18)(q21;q21)	<i>API2/MALT1</i>	Linfoma MALT extranodal
t(8;14)(q24;q32)	<i>C-MYC/IGH</i>	Linfoma de Burkitt
t(4;14)(p16;q32)	<i>FGFR3/MMSET/IGH</i>	MM
t(14;16)(q23;q23)	<i>IGH/CMAF</i>	MM

1. También llamados *AML1/ETO*. 2. El gen *MLL* puede reordenarse con muchos otros genes.

3. También denominado *TEL/AML1*. 4. También denominado *E2A/PBX1*.

LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAM: leucemia aguda mieloblástica; LCM: linfoma de células del manto; LMC: leucemia mieloide crónica; LMMC Eo: leucemia mielomonocítica crónica con eosinofilia; MALT: tejido linfoide asociado a mucosas; MM: mieloma múltiple.

aplicación al estudio de los linfomas difusos de células grandes ha definido nuevos tipos (BCG y ABC), que presentan pronósticos diferenciados (véase capítulo 18). Los estudios de ADN mediante biochips han definido nuevas regiones cromosómicas alteradas en las hemopatías malignas y representan una herramienta complementaria a la citogenética molecular.

Secuenciación masiva (*next generation sequencing*, NGS)

El creciente desarrollo de todas las metodologías de estudio del ADN debido a la secuenciación completa del genoma

humano junto con los avances en el campo de la química, robótica e informática, ha permitido que la secuenciación completa del genoma tumoral sea una realidad. La secuenciación del primer genoma humano supuso el esfuerzo coordinado de muchos laboratorios de investigación y la inversión de cientos de millones de euros durante varios años. Sin embargo, en la actualidad, es posible secuenciar un exoma humano completo en muchos laboratorios con un coste inferior a 3.000 euros y en varias horas. Esta situación ha permitido la secuenciación del exoma de más de 10.000 tumores y definir la presencia de nuevas mutaciones en

estas enfermedades. Es previsible que, con el tiempo, el diagnóstico genético en cáncer se base en las técnicas de NGS. Estas metodologías permiten secuenciar ADN, ARN y micro-ARN (miARN) y analizar las regiones promotoras de los genes mediante la técnica de CHIP-seq. Sin embargo, a nivel clínico la NGS se aplica mediante el uso de paneles específicos de genes, alterados con más frecuencia en las distintas enfermedades.

Metilación del ADN

Uno de los sistemas que las células utilizan para regular la expresión de genes es la adición de un grupo metilo en la posición 5' de una citosina. Estas modificaciones se producen en regiones específicas del genoma donde una citosina (C) está precedida por una guanina (G). Las regiones enriquecidas en CG se denominan CpG. Tradicionalmente se pensaba que la metilación se producía casi de forma exclusiva en regiones reguladoras del genoma, fundamentalmente en regiones promotoras, y que esta modificación se asociaba a un silenciamiento génico, pero aunque este concepto sigue siendo parcialmente vigente, hoy sabemos que la metilación afecta por igual a regiones intergénicas y regiones *enhancers*, entre otras, y que su efecto biológico puede variar. Hoy se conocen tanto las enzimas responsables de introducir los grupos metilo (ADN-metiltransferasas) como las que participan en su eliminación (como las demetilinas de la familia de TET o IdH). De hecho, sabemos que las alteraciones a nivel de dichos genes, ya sean mutaciones o deleciones, contribuyen a alterar los perfiles de metilación y participan en la patogénesis de los tumores hematológicos. En este sentido, se ha demostrado que las alteraciones epigenéticas pueden tener un valor pronóstico en tumores hematológicos y también ser dianas terapéuticas.

Modificaciones de histonas

En el núcleo de la célula, el ADN se dispone alrededor de una serie de bloques de proteínas denominadas *histonas* formando los nucleosomas. Las colas aminoterminales de las histonas pueden ser modificadas mediante distintas reacciones, metilación, acetilación, sumoilación, etc., lo que conlleva que adquieran una conformación abierta permitiendo la transcripción génica (eucromatina) o, por el contrario, compactándose (heterocromatina), en cuyo caso se silencia la expresión. Debido a que múltiples residuos de aminoácidos pueden modificarse y que hay distintas posibles modificaciones, la interpretación que la célula hace del código de histonas es enormemente compleja. De igual manera que se han descrito alteraciones en los genes que regulan la metilación del ADN, también se han descrito mutaciones y alteraciones en genes implicados en las modificaciones de histonas. Las alteraciones de la histona-lisina *N*-metiltransferasa HRX (MLL) en pacientes con leucemias agudas, las mutaciones en la histona-lisina metiltransferasa EZH2 (EZH2) en pacientes con linfomas, las histonas deacetilasas (HDAC) o las desmetilasas de lisinas, desempeñan un papel en la patogenia de la enfermedad y son potenciales dianas terapéuticas contra las que se están desarrollando numerosas moléculas.

APLICACIONES DE LA CITOGENÉTICA MOLECULAR

Estudios en la sangre periférica

La citogenética es aún la técnica de elección en el estudio de las cromosomopatías. En Hematología es importante el estudio de los linfocitos normales de la sangre periférica en las siguientes situaciones:

- *Seguimiento del injerto tras el trasplante de progenitores de donante de distinto sexo.* Aunque los estudios de microsatélites son muy útiles en la monitorización del injerto en el trasplante de progenitores hematopoyéticos, los estudios de citogenética molecular permiten efectuar el seguimiento del injerto de manera cuantitativa cuando hay disparidad de sexo entre donante y el receptor.
- *Anemia de Fanconi.* Esta anemia congénita se produce por un defecto en los genes de reparación del ADN. En consecuencia, los estudios citogenéticos ponen de manifiesto la presencia de roturas en las cromátides. Dado que hay varios genes implicados en esta enfermedad, el cribado mediante el estudio citogenético es indispensable como primer paso en el diagnóstico de la anemia de Fanconi.

Estudios en la médula ósea

La mayoría de los análisis cromosómicos de las hemopatías malignas se llevan a cabo en la MO. El estudio citogenético es indispensable en cualquier leucemia (aguda o crónica) y en los síndromes mielodisplásicos (SMD). También es recomendable en los síndromes mieloproliferativos (SMP), aunque en aquellos que presenten la mutación de los genes *JAK2*, *CALR* o *MPL* no sería indispensable. En algunas enfermedades, como en los SMD y en la LMC, la citogenética es la base del diagnóstico, mientras que en las leucemias agudas su principal aplicación es con fines pronósticos. En las **tablas II y III** se muestran las alteraciones citogenéticas observadas con más frecuencia en las hemopatías malignas, en relación con traslocaciones y con ganancias o pérdidas de material genético, respectivamente. Por su gran interés práctico, en las **tablas IV y V** se exponen por separado las alteraciones

Tabla III. Alteraciones citogenéticas con ganancia o pérdida de material genético observadas con más frecuencia en las hemopatías malignas

Alteración	Genes implicados	Enfermedad
+8	¿?	LAM, SMD, SMP
-7	¿?	LAM, SMD, SMP
5q-	<i>RPS14/CTNNA1</i>	SMD, LAM
7q-	¿?	SMD, LAM, SMP, LEZM
20q-	¿?	SMD, SMP
13q-	¿?	LLC, MM
11q-	<i>ATM</i>	LLC
17p-	<i>p53</i>	LLC, MM
+12	¿?	LLC, LNH
6q-	¿?	SLP, LNH
+3	¿?	Linfomas marginales
i(17)(q10)	<i>p53</i>	LMC en crisis blástica

LAM: leucemia aguda mieloblástica; LEZM: linfoma esplénico de la zona marginal; LLC: leucemia linfática crónica; LMC: leucemia mieloide crónica; LNH: linfomas no Hodgkin; MM: mieloma múltiple; SLP: síndromes linfoproliferativos; SMD: síndromes mielodisplásicos; SMP: síndromes mieloproliferativos.

citogenéticas que definen el diagnóstico y el pronóstico de estas enfermedades, que pasamos a discutir con detalle.

Leucemias agudas mieloblásticas

Junto con la edad, los hallazgos citogenéticos son el factor pronóstico más importante en las LAM. La presencia de una t(15;17), t(8;21) o de una inv(16), es decir, de una leucemia aguda promielocítica o de una leucemia de los genes *core binding factor*, se asocia a un pronóstico favorable (fig. 4). Por el contrario, la presencia de un cariotipo complejo, de reordenamientos del cromosoma 3, de alteraciones del cromosoma 5, del cariotipo hipodiploide (menos de 46 cromosomas) y las pérdidas del cromosoma 7 condicionan un pronóstico muy desfavorable. El resto de las alteraciones, tales como la presencia de una trisomía 8, los reordenamientos del gen *MLL* o un cariotipo normal, suelen asociarse a pronóstico intermedio (tabla V).

Además, los estudios de secuenciación del ADN han permitido definir la presencia de mutaciones en los genes *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA*, *RUNX1*, *IDH1/2*, *EZHA2*, *DNMT3A* y *TP53*. En algunos casos las mutaciones de estos genes se asocian con buen pronóstico (*NPM1* y *CEBPA*), mientras que en otros casos (*FLT3*, *TP53*, *RUNX1*, *IDH1/2*) condicionan un pronóstico peor. Es necesario estudiar la presencia de mutaciones de al menos *NPM1*, *CEBPA* y *FLT3* en las LAM que tienen cariotipo normal. En la tabla VI se describen las mutaciones más frecuentes en las hemopatías malignas más prevalentes.

Leucemias agudas linfoblásticas

Al igual que en las LAM, la edad y la presencia de alteraciones citogenéticas son los determinantes del pronóstico en las LAL-B. Así, el hallazgo de un cariotipo hiperdiploide (con más de 50 cromosomas) o la presencia de una t(12;21) se

Tabla IV. Alteraciones citogenéticas que definen el diagnóstico de las enfermedades hematológicas

Citogenética	Genes implicados	Enfermedad
t(9;22)(q34;q11)	<i>M-BCR/ABL</i>	LMC
t(9;22)(q34;q11)	<i>mBCR/ABL</i>	LAL-B Ph positiva
t(15;17)(q22;q12)	<i>PML/RARA</i>	Leucemia promielocítica
inv(16)(p13q22)	<i>CBFB/MYH11</i>	LAM M4 Eo
del(5)(q13q31)	<i>RPS14/CTNNA1</i>	SMD 5q-/síndrome 5q-
t(5;12)(q31;p13)	<i>PDGFR-beta/ETV6</i>	LMMC Eo
t(11;14)(q13;q32)	<i>CCND1/IGH</i>	LCM
t(14;18)(q32;q21)	<i>IGH/CCND2</i>	Linfoma folicular
t(11;18)(q21;q21)	<i>API2/MALT1</i>	Linfoma MALT extranodal
t(8;14)(q24;q32)	<i>C-MYC/IGH</i>	Linfoma de Burkitt
t(8;13)(p11;q12)	<i>ZNF198/FGFR1</i>	EMP con reordenamiento de <i>FGFR1</i>
Normal	<i>PDGFR-alfa/FIP1L1</i>	Leucemia eosinofílica crónica

EMP: enfermedad mieloproliferativa; LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAM M4 Eo: leucemia aguda mieloblástica M4 con eosinofilia; LCM: linfoma de células del manto; LMC: leucemia mieloide crónica; LMMC Eo: leucemia mielomonocítica crónica con eosinofilia; MALT: tejido linfoide asociado a mucosas; SMD: síndrome mielodisplásico.

Tabla V. Alteraciones citogenéticas que definen el pronóstico en las hemopatías malignas

Citogenética	Enfermedad	Pronóstico
t(9;22)(q34;q11)	LMC	Bueno
t(9;22)(q34;q11)	LAL-B Ph positiva	Malo
t(15;17)(q22;q12)	Leucemia promielocítica	Bueno
inv(16)(p13q22)	LAM M4 Eo	Bueno
t(8;21)(q21;q22)	LAM	Bueno
Alteración/del 5	LAM	Malo
-7/7q	LAM	Malo
Alteración 3	LAM	Malo
Cariotipo complejo	LAM	Malo
t(4;11)(q21;q23)	LAL	Malo
Hipodiploide	LAL	Malo
Hiperdiploide	LAL	Bueno
t(12;21)(p13;q22)	LAL-B	Bueno
t(1;19)(q23;p13)	LAL-B	Intermedio
t(8;14)(q24;q32)	LAL-B	Bueno
del(5)(q13q31)	SMD 5q/síndrome 5q	Bueno
del(20)(q12)	SMD	Bueno
-Y	SMD	Bueno
-7/7q-	SMD	Malo
Cariotipo complejo	SMD	Malo

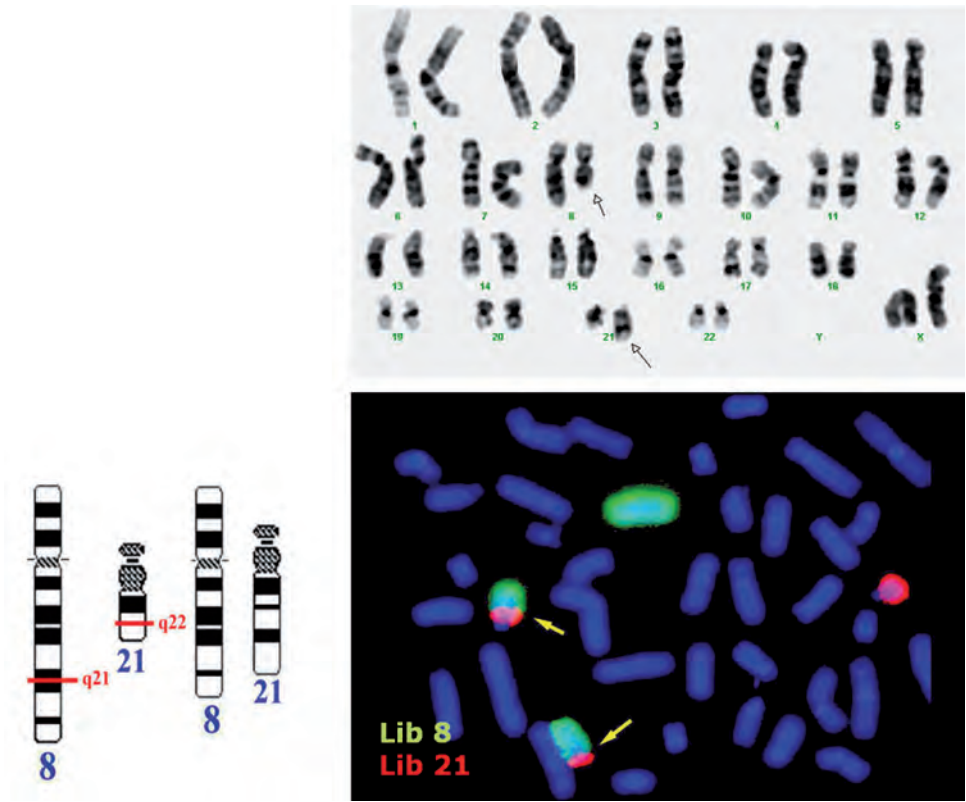
LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAM: leucemia aguda mieloblástica; LAM M4 Eo: leucemia aguda mieloblástica M4 con eosinofilia; LMC: leucemia mieloide crónica; SMD: síndromes mielodisplásicos.

asocian a buen pronóstico (**fig. 1**), mientras que la t(9;22), los reordenamientos del gen *MLL* y la existencia de un cariotipo hipodiploide se asocian a peor pronóstico. Sin embargo, el uso de los inhibidores tirosinasa en las LAL con t(9;22) y fusión *BCR/ABL* ha mejorado su pronóstico. En las LAL-T no ha sido posible definir qué alteraciones a nivel de ADN condicionan el pronóstico, pero la expresión de los genes de la familia *HOX* puede influir en este.

Síndromes mieloproliferativos

El diagnóstico de LMC se basa en la presencia de la t(9;22), el cromosoma Filadelfia (Ph), aunque en el 10% de los

casos esta alteración solo es visible por técnicas de FISH o reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (**fig. 2**). En la crisis blástica de la LMC es frecuente observar otras alteraciones añadidas, como la presencia de un doble cromosoma Ph, +8, +19, -Y o un isocromosoma del 17q. Las alteraciones citogenéticas son infrecuentes en el resto de los SMP, por lo que no es preciso realizar esta metodología en los casos con mutación del gen *JAK2*, de *CALR* o de *MPL*. Casi el 100% de los enfermos con policitemia vera tienen mutación de *JAK2*, mientras que la mayoría de los enfermos con trombocitemia esencial presentan mutación en alguno de estos tres genes. Los enfermos con mielofibro-



► **Figura 4.** Citogenética e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). Leucemia aguda mieloblástica con t(8;21)(q21;q22) AML1/ETO.

sis también suelen presentar mutaciones en *JAK2* o en *CALR*. En las mielofibrosis son frecuentes las mutaciones en otros genes, como *ASXL1*, *EZH2* y *SRSF2*, que además se asocian con peor pronóstico. Es importante realizar estudios de citogenética y de FISH en las LMC-Ph negativas, sobre todo porque algunas de ellas tienen reordenamientos de los genes *PDGFR-alfa* o *PDGFR-beta*, y estos pacientes responden bien a los inhibidores de la tirosinasa (véase capítulo 12).

Síndromes mielodisplásicos

Este grupo de enfermedades son, en ocasiones, difíciles de diagnosticar, y la

presencia de alteraciones citogenéticas define la clonalidad del proceso. Por consiguiente, el estudio mediante citogenética molecular es una pieza indispensable en su diagnóstico. La alteración más frecuente es la pérdida de un fragmento en el brazo largo del cromosoma 5 (5q-), la +8 y las alteraciones del cromosoma 7 (7q y -7). En los SMD la citogenética no es solo una herramienta diagnóstica, sino que además constituye un factor pronóstico de primer orden y tiene un peso importante en todos los sistemas de estratificación pronóstica de estos síndromes (véase capítulo 15). Los pacientes con 5q como alteración aislada, 20q o -Y tienen buen pronóstico (fig. 5).

Tabla VI. Genes mutados con más frecuencia en las hemopatías malignas

	Hemopatía maligna					
	LAM	LAL-B	LAL-T	LLC	MF	SMD
Genes mutados	<i>FLT3</i>	<i>NRAS</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>SF3B1</i>	<i>JAK-2</i>	<i>SF3B1*</i>
	<i>NPM1*</i>	<i>KRAS</i>	<i>FBXW7</i>	<i>ATM</i>	<i>CALR*</i>	<i>TET2</i>
	<i>DNMT3A</i>	<i>PAX5</i>	<i>WT1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>ASXL1</i>	<i>ASXL1</i>
	<i>IDH2</i>	<i>JAK1</i>	<i>JAK1</i>	<i>TP53</i>	<i>TET2</i>	<i>SRSF2</i>
	<i>IDH1</i>	<i>JAK2</i>	<i>BCL11B</i>	<i>POT1</i>	<i>SRSF2</i>	<i>DNMT3A</i>
	<i>TET2</i>	<i>FLT3</i>	<i>PTPN2</i>	<i>CHD2</i>	<i>EZH2</i>	<i>RUNX1</i>
	<i>RUNX1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>IL7R</i>	<i>XPO1</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>U2AF1</i>
	<i>TP53</i>	<i>TP53</i>	<i>PHF6</i>	<i>RPS15</i>	<i>MPL</i>	<i>TP53</i>
	<i>NRAS</i>	<i>ETV6</i>	<i>CNOT3</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CBL</i>	<i>EZH2</i>
	<i>CEBPA</i>	<i>IKZF1</i>	<i>RPL5/RPL10</i>	<i>MYD88*</i>	<i>SF3B1</i>	<i>STAG2</i>

Algunas hemopatías se asocian con mutaciones en genes específicos, como el linfoma de Burkitt, que presenta una elevada incidencia de mutaciones en los genes *TCF3* o *ID3*. La policitemia vera presenta mutaciones de *JAK2*. La trombocitemia esencial presenta mutaciones de *JAK2*, *CALR* o *MPL*. Otras neoplasias mieloproliferativas también presentan mutaciones concretas, como la leucemia neutrofílica crónica, que tiene mutaciones en *CSF3R*, y la leucemia mieloide crónica atípica, con mutaciones en *CSF3R* o en *SETBP1*.

* La presencia de mutaciones en estos genes se asocia con buen pronóstico relativo y supervivencia más prolongada en estas enfermedades. *MYD88* se identifica en la mayoría de los linfomas linfoplasmacíticos/macroglobulinemia de Waldenström.

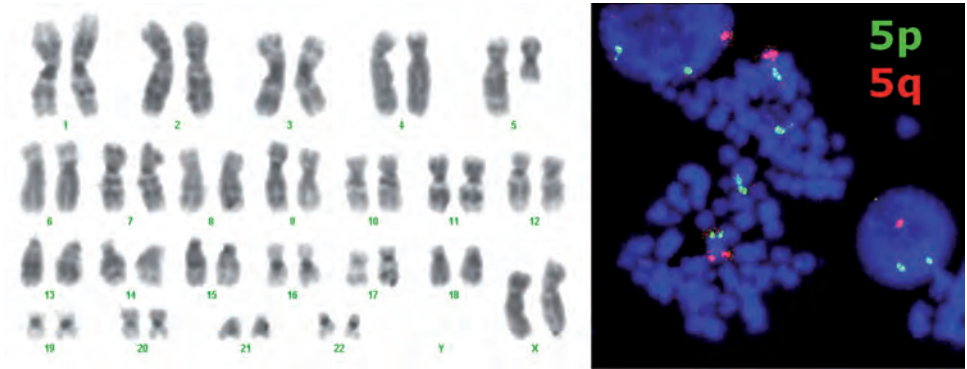
LAL: leucemia aguda linfoblástica; LAM: leucemia aguda mieloblástica; LLC: leucemia linfática crónica; MF: mielofibrosis; SMD: síndromes mielodisplásicos.

Por el contrario, aquellos con cariotipos complejos, alteraciones del cromosoma 7 o isocromosoma 17q presentan un pronóstico desfavorable. El resto de las alteraciones citogenéticas se consideran de pronóstico intermedio.

Leucemia linfática crónica y síndromes linfoproliferativos

En la LLC es difícil obtener metafases analizables y es preferible estudiar estos

casos por FISH. El estudio genético no tiene valor en el diagnóstico, pero es un importante factor pronóstico (véase *capítulo 16*). Las alteraciones más frecuentes son la pérdida de un fragmento del brazo largo del cromosoma 13 (13q-) y la trisomía del 12. Las LLC con pérdida en 13q o sin alteraciones genéticas tienen un pronóstico favorable, mientras que los casos con pérdida de 17p (gen *TP53*) o de 11q (gen *ATM*) tienen un pronóstico adverso. Los casos con trisomía del



► **Figura 5.** Paciente con síndrome mielodisplásico. Citogenética e hibridación fluorescente *in situ* (FISH). del(5)(q13q31).

cromosoma 12 presentan un pronóstico intermedio o adverso. El resto de los síndromes linfoproliferativos no presentan alteraciones citogenéticas recurrentes.

Mieloma múltiple

Al igual que ocurre en las LLC, en el MM no son frecuentes los casos con alteraciones citogenéticas y es preferible analizar estos pacientes mediante FISH. La alteración más frecuente es la pérdida de 13q, seguida de los reordenamientos del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IGH), localizado en 14q32. La presencia de una t(11;14) o la ausencia de alteraciones citogenéticas se asocia a buen pronóstico, mientras que la t(4;14), la t(14;16) y la pérdida de 13q, especialmente cuando se relaciona con estas alteraciones, así como la pérdida de 17p, condicionan un pronóstico adverso (véase capítulo 19).

Linfomas no Hodgkin

El estudio citogenético de los pacientes con linfoma no Hodgkin (LNH) se suele realizar en el ganglio o en el bazo, aunque cuando hay infiltración de la MO o de la sangre periférica es posible reali-

zarlo en estos tejidos. En la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los LNH-B, la mayoría de estas neoplasias tienen una alteración citogenética característica, que casi siempre es una traslocación (véase capítulo 18). Los linfomas foliculares se caracterizan por presentar la t(14;18), los linfomas de las células del manto presentan la t(11;14) y en los linfomas difusos de células grandes (LDCG) es frecuente observar reordenamientos del gen *BCL6*, situado en 3q27, y más raramente la t(14;18). Los LDCG con reordenamientos de *BCL6* presentan una mayor respuesta al tratamiento, mientras que los casos con t(14;18) tienen peor pronóstico. Los linfomas de Burkitt tienen reordenamiento del gen *C-MYC*, situado en 8q24 y que puede reordenarse con IGH, t(8;14), o con los genes de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (kappa o lambda), t(2;8) y t(8;22), respectivamente (**tabla IV**). En los linfomas de células marginales extranodales de bajo grado se observa la t(11;18), y esta alteración es la única que es exclusiva de un tipo de los linfomas. Suele condicionar la ausencia de respuesta al tratamiento antibiótico erradicador del *Helicobacter pylori*. La alteración citogenética más frecuente de

los linfomas esplénicos de la zona marginal es la pérdida del brazo largo del cromosoma 7. Otro tipo de LNH como el anaplásico con expresión de *Ki-1* se asocia a la presencia de una t(2;5).

En los LNH-T puede haber alteraciones de los cromosomas 1, 7, 11 y 14, pero la presencia de alteraciones citogénéticas no es específica de ninguno de los tipos definidos en la clasificación de la OMS, y estas alteraciones no conllevan cambios en el pronóstico de estos pacientes. La rara enfermedad conocida como *neoplasia de la célula madre*, en la que se combinan un LNH-T y un SMP, suele presentar una t(8;13). Por último, cabe reseñar que en la enfermedad de Hodgkin no es preciso hacer estudios citogenéticos porque no presenta alteraciones características.

Algunas hemopatías se asocian con mutaciones en genes específicos, como el linfoma de Burkitt, que presenta una elevada incidencia de mutaciones en los genes *TCF3* o *ID3*. La policitemia vera presenta mutaciones de *JAK2*. La trombocitemia esencial presenta mutaciones de *JAK2*, *CALR* o *MPL*. Otras neoplasias mieloproliferativas también presentan mutaciones concretas, como la leucemia neutrofílica crónica, que tiene mutacio-

nes en *CSF3R*, y la leucemia mieloide crónica LMCa, con mutaciones en *CSF3R* o en *SETBP1*.

CONCLUSIONES

Las técnicas de análisis cromosómico, complementadas con los estudios moleculares, son fundamentales en el correcto estudio de las cromosomopatías y del cáncer. La FISH es un complemento ideal de los clásicos estudios de citogenética convencional y, en conjunto, se denominan *citogenética molecular* porque sirven para analizar los genes dentro del núcleo, bien en interfase o en metafase. Estos estudios son indispensables en el momento del diagnóstico y condicionan el pronóstico de las hemopatías malignas, por lo que ayudan a definir el tratamiento que debe usarse en estas enfermedades. Por ello, en la actualidad se aplican de manera sistemática en el estudio de los pacientes con hemopatías malignas (**tablas II a VI**). En un futuro próximo estas técnicas se complementarán con los estudios de secuenciación masiva, que están comenzando a aplicarse en la clínica, con lo que será posible conocer, en un solo experimento, el genoma y el transcriptoma de la célula tumoral.

EL INMUNOFENOTIPO EN HEMATOLOGÍA

M. B. Vidriales Vicente, N. Villamor Casas

Introducción. Métodos para la obtención del fenotipo celular. Aplicaciones en hematología

INTRODUCCIÓN

El sistema hematopoyético se origina a partir de una célula precursora hematopoyética pluripotente de la que derivan todas las líneas hematológicas maduras que se encuentran en la sangre, la médula ósea y los tejidos. La diferenciación y maduración celular van acompañadas de cambios morfológicos, fenotípicos y genéticos altamente regulados que nos permiten identificar los diversos tipos celulares y sus estadios de diferenciación.

El estudio del fenotipo celular tiene una amplia difusión en diversos ámbitos de la hematología ya que se conocen los antígenos específicos o altamente asociados a cada una de las líneas hematopoyéticas normales, los cambios asociados a su maduración y las alteraciones fenotípicas de las células patológicas. La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) integra características clínicas, morfológicas, fenotípicas, genéticas y moleculares, y, por tanto, el fenotipo es una parte fundamental en el diagnóstico de las enfermedades hematológicas malignas. En la

tabla I se describen las aplicaciones del análisis fenotípico en hematología y en la **tabla II** se listan los antígenos más importantes en el estudio de enfermedades hematológicas.

El análisis del fenotipo se basa en el empleo de anticuerpos que reconocen moléculas presentes en las células mediante una reacción antígeno-anticuerpo. En la práctica clínica se emplean dos tipos de técnicas: la inmunohistoquímica (IHQ) y la citometría de flujo (CF). La IHQ precisa que la muestra se haya fijado e incluido en parafina, por lo que se puede emplear en muestras de archivo, pero no se puede aplicar hasta 48 horas después de la obtención de la misma. El estudio inmunofenotípico mediante CF es mucho más rápido en la obtención del resultados, lo que hace que sea una herramienta que permite orientar la patología que padece el paciente en pocas horas. Además, la CF multiparamétrica es capaz de identificar células patológicas presentes en muy baja frecuencia, lo que ha permitido su empleo para el análisis de la enfermedad residual y el estudio de poblaciones minoritarias.