

II. Citogenética y biología molecular en linfomas no-Hodgkin

Andrés A. Gutiérrez, Francisco Martínez, Alma D. Chávez

Introducción

Los Linfomas no-Hodgkin (LNH) representan la sexta causa de consulta y la sexta de ingresos hospitalarios en el Instituto Nacional de Cancerología de la Secretaría de Salud. El problema que enfrentamos al atender a estos enfermos es que el diagnóstico es cada vez más complejo y costoso (Figura 1). Sin embargo, es necesario realizar la caracterización morfológica de los LNH junto con la inmunofenotipificación y el análisis genético, para clasificarlos adecuadamente.¹ Es cierto que la utilidad clínica de las diversas clasificaciones de LNH con las que se cuenta a la fecha están lejos de ser perfectas, pero al menos la clasificación REAC (por las siglas en inglés de "Revised European-American Classification") ha permitido identificar algunas categorías de valor pronóstico clínico. Éstas incluyen cuatro grupos principales: 1) entidades indolentes; 2) moderadamente agresivas; 3) agresivas y 4) altamente agresivas. (Para mayor discusión al respecto, ver el trabajo del Dr. Morales Polanco en este mismo número).

de lactato deshidrogenasa (LDH), el número de metástasis a ganglios y órganos, la carga tumoral y el estadio de la enfermedad. De estos factores pronósticos, aquéllos que han obtenido significancia estadística en estudios multivariados han sido agrupados en escalas como la del Índice Pronóstico Internacional (IPI)^{2,3} y la del MD Anderson. Sin embargo, la heterogeneidad celular de los LNH ha sido un factor limitante para que estos factores clínicos sean suficientes para definir un pronóstico certero. Por ello es que se han buscado otro tipo de marcadores, como los moleculares, con los objetivos de: 1) definir el tratamiento más adecuado al paciente; 2) predecir el curso clínico con dicho tratamiento y 3) diagnosticar la recaída a nivel de enfermedad mínima residual para ofrecer terapia de rescate antes de que se presente la recaída clínica. Algunos de los factores pronósticos a nivel patológico, celular y molecular se muestran en el cuadro I y han sido revisados, por Panayiotidis,⁴ Diebold⁵ Howard⁶ y Gascoyne.⁷



Figura 1. Algoritmo diagnóstico de linfomas y leucemias.

Por otra parte se han identificado factores pronósticos de utilidad clínica en LNH como son la edad, la presencia de síntomas B, el estado físico, el nivel

de comportamiento clínico agresivo pero pueden ser curados aproximadamente 40 al 55% de los estadios avanzados. El tratamiento es muy debatido y puede consistir en quimioterapia sola o asociada a trasplante autólogo de médula ósea o al de células progenitoras periféricas. Desgraciada-

Cuadro I. Factores pronósticos en LNH

Patológicos	Proyecto de Clasificación de LNH ⁸
Celulares	Índices de proliferación celular Ki-67, contenido de DNA en fase S, etc. Moléculas de Adhesión CD44, ICAM-1, HGF Metaloproteasas - TIMPs Factores Angiogénicos (VEGF) Citocinas IL6, TNF, survivina
Moleculares	Translocaciones, deleciones y mutaciones

mente, hoy en día, no contamos con marcadores pronósticos que nos permitan identificar eficientemente a qué pacientes les irá bien con tan sólo la quimioterapia y en quienes mejorará el pronóstico con la terapia combinada con trasplante. Si tomamos en cuenta que este grupo de LNH es el más frecuente en nuestra población, resulta obvia la utilidad que tendría el implementar un programa nacional de marcadores moleculares en la toma de decisiones clínicas de éstos y otros tipos de pacientes y en leucemias.

Citogenética y análisis molecular de los LNH

Como parte de la evaluación rutinaria de los pacientes con LNH se recolectan muestras de sangre, médula ósea o tejido. Luego, estas mismas muestras pueden ser utilizadas para: 1) realizar el estudio de citogenética y/o hibridación *in situ* por fluorescencia, FISH; 2) extraer los ácidos nucleicos; 3) extraer las proteínas; 4) hacer cortes histopatológicos y fijar los tejidos en laminillas; o 5) analizar el inmunofenotipo y el índice de proliferación por citometría de flujo (Figura 2). La tendencia actual es que todas estas técnicas se combinen para obtener mejores diagnóstico, pronóstico y seguimiento del paciente.

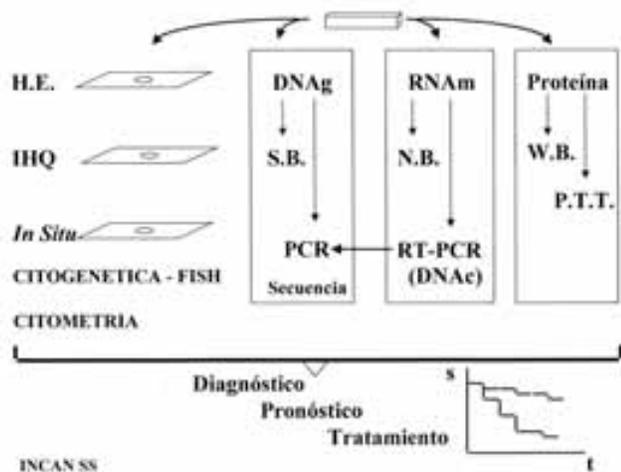


Figura 2. Técnicas utilizadas para el análisis de linfomas y leucemias.

Técnicas utilizadas

La citogenética ha jugado, por muchos años, un papel muy importante en la detección de translocaciones de valor diagnóstico y pronóstico en

Cuadro II. Translocaciones en linfomas indolentes o moderadamente agresivos

	Rearreglo	%	Gen	Actividad
Folicular	t(14;18)	80	Bcl-2/IgH	Anti-apoptosis
Linfoplasma-citoide/inm	t(9;14)	50	PAX5/IgH	Promueve ciclo c. (fact. transcripción)
MALT	t(11;18)	18-33	API2-MLT	Anti-apoptosis
	Trisomía 3	78		
Linfocítico pequeño	t(14;19)		Bcl-3	Fact. Transcripción
	Trisomía 12			Inhibidor NFK β
Manto	t(11;14)	87	Bcl-1/JH	Ciclina D

Cuadro III. Translocaciones en linfomas difusos agresivos

	Rearreglo	%	Gen	Actividad
Difuso	t(14;18)	12-40	Bcl-2/IgH	Anti-apoptosis
Anaplásico	t(2;5)	33-64	NPM/ALK	Linfomagénesis

hemato-oncología. Las translocaciones descritas en LNH son numerosas pero las de mayor importancia se señalan en los cuadros II y III.

Dichas translocaciones están constituidas por DNA genómico (DNAg) y codifican transcritos de RNA que, a su vez, se traducen en proteínas con acción biológica. Según lo mostrado en la figura 3, las translocaciones, o rearrreglos genéticos, fusionan un cromosoma A con un cromosoma B. De esa fusión pueden resultar uno de dos transcritos principales: 1) uno de los genes es sobre expresado, o 2) la proteína de fusión completa es sobre expresada.

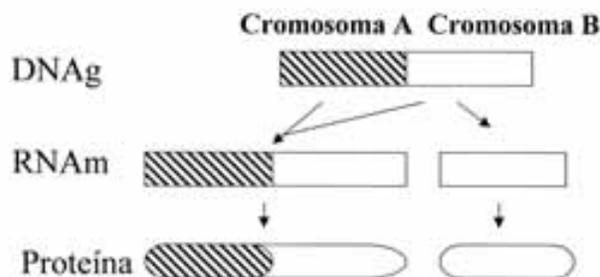


Figura 3. Rearreglos genéticos y sus productos en linfomas. Las translocaciones de dos cromosomas (A y B, en este caso) generan la fusión de dos genes distintos. De este rearrreglo genético (DNAg) pueden producirse dos tipos de transcritos (RNAm): 1) uno que codifique una proteína de fusión completa o 2) uno que sólo sea el producto de la traducción de uno de los genes involucrados en la translocación.

En el caso muy particular de linfomas, las proteínas resultantes suelen ser moléculas que inhiben la muerte celular (i.e. apoptosis) o que promueven la progresión del ciclo celular (p.ej. ciclina D, factores de transcripción, cinasas, etc.) en las clonas que las contienen. Sin embargo, existen numerosas variables de las que dependen la vida media de los transcritos y la de sus proteínas, por ejemplo, la velocidad de transcripción, la estabilidad del transcrito (RNAm), la cantidad de proteína que se traduce y el grado de su destrucción, etc.

Hoy en día existen numerosas técnicas para analizar todo tipo de translocaciones y sus productos. En general, las translocaciones pueden ser identificadas en cariotipos o usando sondas marcadas con elementos fluorescentes. A esta última técnica se la ha denominado hibridación *in situ* por fluorescencia (FISH). Dichas sondas son pedazos de DNA que complementan la secuencia de DNAG de la translocación y que, por medio de su capacidad fluorescente, permiten la rápida identificación del rearrreglo en los cariotipos directamente. Otra de las técnicas usadas puede ser la amplificación de la secuencia genética de la translocación por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta técnica, por su alta sensibilidad, permite la detección de una célula que contenga la translocación entre un millón de células que no la contengan. Esto lo logra gracias a su capacidad de amplificar una molécula de DNA en un factor de 1×10^8 copias. De ahí que las técnicas basadas en PCR puedan identificar células con rearrreglos genéticos con mayor eficiencia que la citogenética o el FISH, aunque sólo sea una prueba diagnóstica complementaria a estas últimas.

Por otra parte, si se extrae el DNA genómico (DNAG) de las células problema, éste puede ser usado para identificar la translocación por medio de un Southern Blot. Por el contrario, si lo que se desea es identificar el transcrito de RNAm que surge de estas translocaciones, éste puede demostrarse usando sondas específicas por la técnica de Northern Blot (NB.). Otra alternativa para evaluar la presencia de los transcritos de las translocaciones puede realizarse por la técnica de reverso transcripción (RT-PCR) y la subsecuente amplificación del DNA complementario (DNAC) por PCR. Para ello se aísla primero el RNAm total de la célula del linfoma y se transforma en DNAC por RT-PCR (Figura 2.). Este DNAC es más estable y no se degrada tan rápida y

fácilmente como el RNAm, por lo que permite su fácil manipulación. Ya con el DNAC obtenido se procede a amplificar el rearrreglo genético (si lo existe) por medio de PCR para identificarse rápidamente. Este procedimiento tiene la ventaja de que la RT-PCR con la subsecuente amplificación por PCR, son más sensibles que la citogenética para detectar estos transcritos. Por ello sus resultados pueden utilizarse como factor pronóstico o para el diagnóstico de enfermedad mínima residual (EMR) después del tratamiento de linfomas y de leucemias. Este concepto de EMR implica la existencia de actividad tumoral a nivel molecular y la usan varios autores para complementar su evaluación de respuestas clínica, hematológica y citogenética después del tratamiento.

En cuanto a las proteínas, éstas pueden ser extraídas de los tejidos problemas y ser evaluadas por medio de anticuerpos específicos en contra de los epítopes de la proteína por medio de la técnica de Western Blot (W.B.). Sin embargo, clínicamente es más fácil evaluar la presencia y el nivel de expresión de las proteínas resultantes de translocaciones por medio de la inmunohistoquímica (IHQ) en laminillas embebidas en parafina o en preparaciones en fresco.

Finalmente, la citometría de flujo se ha utilizado para practicar el inmunofenotipo de las clonas malignas en LNH y para evaluar la ploidía (i.e. contenido del ADN) y la fracción de células en fase de síntesis (Fase S).

Translocaciones como factores pronósticos

Muchas translocaciones han sido descritas que pudieran tener utilidad diagnóstica o pronóstica en los LNH (Cuadros II y III). Estas translocaciones involucran genes como Bcl-1, Bcl-2, Bcl-3, Bcl-6, AP12, PAX-5 y NPM/ALK. Como ya se ha comentado anteriormente, la detección de estas translocaciones puede hacerse a tres niveles: (1) el rearrreglo genético por citogenética, FISH, SB o PCR; (2) el transcrito de RNA por medio de RT-PCR y NB; o el de (3) la proteína utilizando IHQ y WB. Pero debido a que la sensibilidad y especificidad de estas pruebas varían importantemente de institución a institución, se recomienda estandarizar cada una de las pruebas para cada caso y en cada centro y emplearlas de manera complementaria a los otros métodos diagnósticos.

La translocación t(14;18) (q32;q21)

Esta translocación se puede identificar citogenética y molecularmente (p.ej. FISH, SB, PCR) en un 70 a 90% de los pacientes con LNH folicular y en aproximadamente una tercera parte de los linfomas difusos. En un estudio realizado en la Secretaría de Salud se obtuvieron resultados similares en 51 pacientes consecutivos con LNH. Cuatro de 6 pacientes (66.6%) del grupo de bajo grado y 14 de 33 (43.75%) de linfomas de grado intermedio (IWF) presentaron el rearrreglo genético por PCR.⁹

El estudio molecular de esta translocación ha permitido caracterizar los sitios de ruptura involucrados en los cromosomas 14 y 18. Todos los sitios de ruptura en el cromosoma 14 ocurren cerca del segmento del gen de la cadena pesada de la inmunoglobulina (IgH), lo que refleja que esta translocación ocurre como un error durante la reacción de unión de la IgH D-J. Por el contrario, en el cromosoma 18, la ruptura ocurre en dos sitios que están dentro o que flanquean la secuencia, del gen anti-apoptótico Bcl-2. A estos dos sitios se les ha denominado Sitios de Ruptura Mayor (MBR, por sus siglas en inglés) y Menor (mcr). Lo más importante es que, en cualquiera de los dos casos, la región codificadora del gen Bcl-2 no se altera por la translocación y este rearrreglo conduce a la sobreexpresión de Bcl-2 en estas células.

Por mucho tiempo se consideró que la sola presencia del rearrreglo genético conducía a la sobreexpresión de Bcl-2 y que ésta, por su mecanismo anti-apoptótico, aumentaba la supervivencia de estas células en linfomas foliculares. No obstante, ahora se sabe que la sola sobreexpresión de Bcl-2 es insuficiente para producir la linfomagénesis. Aún más, la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 observada en los LNH difusos por IHQ o WB, ocurre frecuentemente en ausencia de la translocación citogenética o del rearrreglo genético (p.ej. por SB o PCR). En estos casos se ha propuesto que la sobreexpresión del Bcl-2 ocurre por mecanismos distintos a la translocación. Por el otro lado, es posible que los pacientes con LNH difusos que presentan la translocación pudieran haber sido linfomas indolentes de inicio y que progresaron posteriormente y que no son linfomas de *novo* necesariamente.

Desde el punto de vista clínico, la identificación citogenética o molecular (p.ej. PCR, SB, FISH) de t(14;18) en linfomas foliculares ha demostrado tener valor pronóstico en supervivencia global, libre de enfermedad y repuesta a tratamiento. Además, debido a la mayor sensibilidad de las técnicas moleculares sobre la citogenética, la presencia de rearrreglo por PCR en pacientes con aparente remisión clínica e incluso citogenética, ha sido utilizada para el rastreo de enfermedad mínima residual postratamiento en LNH foliculares. Por el contrario, la presencia o ausencia del rearrreglo genético en LNH difusos no parece tener valor pronóstico de significancia estadística. Como ya lo hemos comentado, la translocación detectable molecularmente es poco frecuente en estos casos y no requiere estar presente para que exista sobreexpresión de Bcl-2. De ahí que no es de extrañarse que estos LNH difusos suelen tener sobreexpresión de la proteína Bcl-2 (p.ej. en WB e IHQ) sin que existan rearrreglos a nivel citogenético o molecular. Por esta misma razón es por la cual la detección de Bcl-2 por IHQ parece ser de valor pronóstico para los períodos libres de enfermedad y de supervivencia total en LNH difusos y no así la presencia de rearrreglos.⁷

La translocación t(11;14) (q13;q32)

Casi todos los linfomas de células del manto (LCM) parecen contener este rearrreglo. Esta translocación genera la sobreexpresión del gen de la ciclina D1 localizado en el cromosoma 11. Ya que esta ciclina es de vital importancia para el inicio del ciclo celular de múltiples células, es por lo que se ha propuesto como un factor necesario, pero no único, de la linfomagénesis de estos pacientes.

Independientemente de su papel fisiopatogénico, la detección molecular de este rearrreglo por FISH, SB o PCR, ayuda a confirmar el diagnóstico morfológico y citogenético de estos casos. Esto es debido a que la mayoría de las pruebas que están en uso tiene una sensibilidad pobre. Por ejemplo, ésta es de 50-75% para citogenética, 14-99% para FISH y 50 a 60% en PCR.¹⁰ La importancia de establecer un diagnóstico certero en LCM radica en que son linfomas altamente refractarios a tratamiento y que requieren de terapias específicas. Por ello cada institución debe escoger y estandarizar

las técnicas que elijan para el diagnóstico de LCM porque debe evitarse emitir un diagnóstico ambiguo en estos casos.

La translocación t(2;5)(p23;q35)

Este tipo de translocación se encuentra hasta en 30% de linfomas anaplásicos de células grandes (LACG) y en casos aislados de: 1) linfomas difusos de células B; 2) enfermedad de Hodgkin; 3) papulosis linfomatoide y 4) linfoma primario de piel. Este rearrreglo produce la fusión del gen de la proteína nucleolar o nucleofosmina (NPM), en el cromosoma 5, con el del gen de la cinasa de linfoma anaplásico (ALK) del cromosoma 2. Ya que la proteína resultante de este rearrreglo (NPM/ALK) posee actividad cinasa, ésta se ha involucrado en el proceso de linfomagénesis. Sin embargo, algunos LACG también pueden presentar actividad ALK sin que contengan el rearrreglo t(2;5). Este fenómeno se ha explicado en base a la posible activación del ALK por otras translocaciones.¹¹

El rearrreglo en t(2;5) puede ser detectado por citogenética convencional, FISH o PCR mientras que la proteína de fusión, p80, se puede identificar con anticuerpos monoclonales. Desde el punto de vista clínico, la expresión aberrante de ALK se correlaciona con el fenotipo maligno. En LACG la presencia del rearrreglo genético es característica de un subgrupo de niños y adultos jóvenes con LNH de morfología variable, fenotipo T o indeterminado, positividad a CD30+ y compromiso ganglionar y extraganglionar.¹² En un estudio retrospectivo se demostró inicialmente que la presencia del rearrreglo genético t(2;5) se asociaba a un mejor pronóstico a 5 años. Este hallazgo se ha podido comprobar en otro estudio más reciente en que la proteína p80 se encontró positiva en 64 % de los pacientes con LACG. En general, aquellos pacientes que eran p80+ fueron más jóvenes y presentaron mayor supervivencia global que los p80.¹³

La translocación t(11;18)

Los linfomas de bajo grado que surgen del tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT) son una entidad clínica reconocida de buen pronóstico. Los hallazgos citogenético y moleculares más impor-

tantes son la presencia de trisomía del cromosoma 3 en 78% de los casos y de la translocación t(11;18) en 18 a 50% de los mismos.¹⁴

Al parecer la translocación t(11;18) genera la proteína de fusión AP12-MLT que está involucrada en la oncogénesis del tejido linfoide. En este rearrreglo el gen API2, que codifica para un inhibidor de apoptosis (conocido también como c-IAP₂, HIAP1 y MIHC), se fusiona con el gen MLT del cromosoma 18. Este último contiene varios dominios similares a los de Ig.¹⁵ Desafortunadamente, la trascendencia clínica de la identificación de este rearrreglo está en estudio.

Translocación p13;q32)

Esta translocación se ha identificado citogenéticamente en 40 a 50% de los casos de linfomas linfoplasmacitoides/inmunocitomas. El hallazgo de un fenotipo linfoplasmacitoide se asocia a un curso indolente inicial que progresa en el tiempo hacia linfomas agresivos de células grandes.

El rearrreglo genético t(9;14) lleva a la expresión del gen PAX-5 del cromosoma 9. Este gen, en condiciones normales, se expresa en todos los procesos de diferenciación de células B excepto en la diferenciación terminal. Por esta razón se piensa que, al expresarse de manera aberrante en el tejido linfoide, la célula no pueda salir del ciclo celular y conduzca a su proliferación ilimitada. La utilidad clínica de la detección molecular de este rearrreglo está en estudio.

Otras alteraciones

Se ha visto la sobre expresión del gen de Bcl-6 generada por varias translocaciones se encuentra en 40% de los linfomas difusos. La expresión persistente de este gen conduce a la linfomagénesis debido al bloqueo de la diferenciación de células B dentro del centro germinal. Sin embargo, su utilidad como marcador pronóstico no ha sido establecida.⁶

Finalmente la translocación clásica t(14;19) (q32;q13) es un evento muy raro en linfomas de células pequeñas y suele ir acompañado de otras alteraciones. Su detección requiere de estudios con gran sensibilidad. Por ello, es recomendable que en

estos casos, además del estudio citogenético, se realice algún estudio molecular. Desafortunadamente el valor pronóstico de este rearrreglo ha demostrado ser pobre en los estudios realizados a la fecha.

Conclusiones

El diagnóstico actual de linfomas no Hodgkin es muy complejo y requiere de la evaluación clínica, citogenética, por citometría de flujo y de pruebas moleculares. Desafortunadamente la mayoría de los análisis moleculares en este tipo de enfermos se encuentra en fase de investigación y su valor pronóstico no está determinado. Además, las técnicas moleculares empleadas son costosas y requieren de personal y equipo especializados. De aquí que sería recomendable que cada institución evalúe la implementación de ciertas pruebas, según sus necesidades, y que estandarice sus metodologías.

No obstante, consideramos que la detección de ciertos marcadores moleculares podrían ser de utilidad clínica diagnóstica, pronóstica y de recaída (p.ej. en enfermedad mínima residual) en LNH frecuentes en nuestro medio como lo son los agresivos difusos (clasificación REAL).

Referencias

1. **Harris N, Jaffe E, Stein Banks P, Chan J, Cleary M, et al.** A revised European-American classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994;84:1361-1392.
2. **Moore DF Jr, Cabanillas F.** Overview of prognostic factors in Non-Hodgkin's lymphoma. *Oncol* 1998;12(10 Suppl 8):17-24.
3. **Shipp M, Harrington DP, Anderson J, Armitage J, Bonnadona G, Brittinger G, et al.** A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma: The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. *N Engl J Med.* 1993;329:987-994.
4. **Panayiotidis P, Kotsi P.** Genetics of small lymphocyte disorders. *Semin Hematol* 1999;36:171-177.
5. **Diebold J, Weisenburger D, MacLennan KA, Muller Hermelink HK, Nathwani BN, Harris NL, Anderson JR, Roy P, Armitage JO.** Reproducibility and prognostic value of histopathological classifications of malignant lymphomas. Prolegomena for the 1st. international classification proposed by WHO. Group of the Non-Hodgkin's Malignant Lymphoma Classification Project. *Bull Acad Natl Med* 1998;182:1537-1548.
6. **Howard OM, Shipp MA.** The cellular and molecular heterogeneity of the aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* 1998;10:385-391.
7. **Gascoyne RD.** Pathologic prognostic factors in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clinics North Amer* 1997;11:847-862.
8. **Armitage J.** For The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project: a clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997;89:3909-3918.
9. **Martínez F, Rivas Vera S, Gutiérrez F, Mas-Oliva J, Gutiérrez A.** Identification of the t(14;18) translocation in non-Hodgkin's lymphomas of the diffuse type. In preparation.
10. **JYL, Gaillard F, Moreau A, Harouseau JL, Laboisie C, Milpied N, Bataille R, Avet Loiseau H.** Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence *in situ* hybridization. *Am J Pathol* 1999;154:1449-1452.
11. **Kinney MC, Kadin ME.** The pathologic and clinical spectrum of anaplastic large cell lymphoma and correlation with ALK gene dysregulation. *Am J Clin Pathol* 1999;111(1) (Suppl 1):556-67.
12. **Kadin ME, Morris SW.** The t(2;5) in human lymphomas. *Leuk Lymph* 1998;29:249-56.
13. **Nakamura S, Shiota M, Nakagawa A, Yatabe, Y, Kojima M, Motoori T, et al.** Anaplastic large cell lymphoma: A distinct molecular pathologic entity, *Am J Surg Pathol* 1997;21:1420-1432.
14. **Auer IA, Gascoyne RD, Connors JM, Cotter FE, Greiner TC, Sanger WG, Horsman DE.** t(11;18)(q21;q21) is the most common translocation in MALT lymphomas. *Ann. Oncol* 1997;8:979-85.
15. **Dierlamm J, Baens M, Wlodarska I, Stefanova Ouzounova M, Hernandez JM, Hossfeld DK, De Wolf-Peeters C, Hagemeijer A, Van den Berghe H, Marynen P.** The apoptosis inhibitor gene AP12 and a novel 18q gene, MLT, are recurrently rearranged in the t(11;18)(q21;q21) associated with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *Blood* 1999;93:3601-9.