

Alteraciones cromosómicas secundarias en pacientes con leucemia mieloide crónica, en un hospital de referencia del noreste de México

Martha I. Dávila-Rodríguez,* Ricardo M. Cerda-Flores,*,** Carlos H. Leal-Garza,* Rosa M. Arana-Trejo,***,**** Enrique Báez-de la Fuente,***** Elva I. Cortés-Gutiérrez*

Recepción versión modificada: 14 de enero de 2004

aceptación: 16 de abril de 2004

Resumen

Introducción: la caracterización del perfil citogenético que presenta una determinada fase de la leucemia mieloide crónica (LMC), está ofreciendo nuevas direcciones para la investigación de la etiología a nivel molecular. En México no existen datos de la descripción cromosómica de esta enfermedad, por lo que el objetivo del presente estudio fue determinar las alteraciones cromosómicas de 56 pacientes con LMC.

Diseño: estudio transversal (diagnóstico y estadio).

Material y métodos: las muestras de médula ósea de 56 pacientes con LMC en diferentes etapas, fueron sometidas a estudios citogenéticos mediante técnicas de bandeo G e hibridación in situ fluorescente (FISH), con sonda específica para cromosoma Filadelfia (Ph).

Resultados: 19% (6/31) de los pacientes en etapa crónica mostró alteraciones cromosómicas secundarias, en contraste con 60% (15/25) observado en aquellos pacientes en etapa acelerada. Las alteraciones cromosómicas secundarias más frecuentes fueron: las trisomías 8 y 19, cromosoma Ph extra e isocromosoma de brazos largos del cromosoma 17.

Conclusión: este es el primer trabajo que determina alteraciones cromosómicas secundarias en pacientes mestizos mexicanos con LMC, cuyas frecuencias están de acuerdo con lo reportado para otras poblaciones a nivel mundial.

Palabras clave: Leucemia mieloide crónica, citogenética, México.

Summary

Introduction: Our aim was to characterize the cytogenetic profile that displays a certain phase of chronic myelogenous leukemia (CML), offering new directions for investigation of the etiology to the molecular level. In Mexico, data does not exist in this regard; thus, the objective of the present study was to determine cytogenetic alterations in 56 Mestizo Mexican patients with LMC.

Design: Cross-sectional study (diagnosis and stage) was carried out.

Materials and Methods: samples of bone marrow of 56 patients with CML in different phases were analyzed using G banding and fluorescence in situ hybridization (FISH) with DNA probes for Philadelphia chromosome (Ph).

Results: 19% of patients in chronic stage showed secondary chromosomal alterations in contrast with an observed 60% in patients in accelerated stage. Most frequent alterations included trisomy 8 and 19, extra Ph chromosome, and isochromosome of the 17.

Conclusions: We believe this to be the first work that determines secondary chromosomal alterations in Mexican racially mixed patients with LMC. These are in agreement with those reported for other populations at the worldwide level.

Key words: Chronic myeloid leukemia, cytogenetic, Mexico.

*División de Genética, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Monterrey, México.

**Facultad de Enfermería, Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México.

***Servicio de Genética, Hospital General de México, O. D.

****Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal.

*****Departamento de Hematología, Hospital de Especialidades No. 25, IMSS. Monterrey, México.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dra. Martha I. Dávila-Rodríguez. División de Genética, CIBIN, IMSS. 2 de Abril y San Luis Potosí, colonia Independencia, 64720 Monterrey, Nuevo León, Tel. y Fax (81) 81904035. E-mail. marthadavila40@hotmail.com

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia que afecta principalmente a la población adulta, su incidencia a nivel mundial es de uno a dos casos por cada 100 mil individuos.¹ En México, la tasa de mortalidad por esta enfermedad es de tres por cada 100 mil habitantes.² Se caracteriza por presentar leucocitosis y esplenomegalia. Esta neoplasia presenta diferentes fases:

- **Fase crónica:** es el inicio de la enfermedad y mediante técnicas citogenéticas convencionales aproximadamente 90% de los casos presenta el cromosoma Filadelfia (Ph), el cual es el resultado de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, originándose diferentes rearrreglos moleculares como consecuencia de los diversos rompimientos en ambos cromosomas, de los cuales en 98% de los casos dan origen al gen quimérico M-bcr/abl.¹ Mediante citogenética convencional, 10% de los casos no presentan el cromosoma Ph, sin embargo mediante técnicas moleculares aproximadamente 50% de ellos lo presentan.³
- **Fase acelerada:** con el progreso de la enfermedad el paciente puede o no pasar a una fase de aceleración mieloproliferativa, antes de pasar a una fase de crisis blástica.
- **Crisis blástica:** en esta fase de la enfermedad, 60 a 80% de los casos presentan otras alteraciones cromosómicas no al azar, extras al cromosoma Ph también llamadas alteraciones secundarias.⁴ Dichas alteraciones cromosómicas se han clasificado en ruta mayor y ruta menor de acuerdo a su frecuencia.⁵ En base a todos los casos reportados en la literatura mundial (más de 1600), se sugiere que las alteraciones cromosómicas de la ruta mayor incluyan aquellas cuya frecuencia sea mayor o igual a 5%, las cuales son: +8, +Ph, i(17q), +19, -Y, +21 y -7.^{6,7} Dado lo anterior, el paciente con LMC puede presentar o estar precedido por un perfil citogenético asociado con una determinada fase de la enfermedad, lo cual ha dado paso a una investigación intensa a nivel molecular.⁸ En datos recientes se ha encontrado que la presencia de dichas alteraciones secundarias varían significativamente de acuerdo al tratamiento recibido durante la etapa crónica.⁷

En México son pocos los estudios citogenéticos que han sido realizados en pacientes con LMC, los cuales se han enfocado en determinar sólo la presencia del cromosoma Ph.^{9,10} Por tal motivo el objetivo del presente estudio transversal (diagnóstico y estadio) fue determinar las alteraciones cromosómicas secundarias en 56 pacientes con LMC de un hospital de referencia del noreste de México.

Material y métodos

Población estudiada

Se llevó a cabo un estudio transversal en 56 pacientes de ambos sexos con un promedio de edad de 45 años (rango de 17 a 77), cuyo diagnóstico clínico y hematológico fue LMC (31 en fase crónica y 25 en fase acelerada). El muestreo se realizó en el Departamento de Hematología, del Hospital 25, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), de Enero de 1996 a Enero de 1999.

El protocolo de investigación fue aprobado por el comité académico de bioética y bioseguridad del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN), IMSS. Los pacientes participantes firmaron una carta de consentimiento informado para llevar a cabo el análisis cromosómico de sus muestras (5mL de médula ósea heparinizada). Dicho análisis se realizó en el laboratorio de Citogenética Molecular del CIBIN, IMSS.

Todos los pacientes fueron sometidos a quimioterapia convencional (Busulfan) e Interferón alfa, según su número de células sanguíneas. Dicho tratamiento lo recibieron desde su diagnóstico y durante la etapa crónica, una vez que la enfermedad progresó a la fase acelerada recibieron sólo Busulfan.

Cuadro I. Alteraciones cromosómicas secundarias observadas en seis pacientes con LMC en fase crónica

Edad	Alteración Cromosómica
32	mar
54	del(20p11)
56	+18, del(19q12)
62	del(12p12)
49	del(17q23)
20	del(15q23)

Citogenética clásica

Para la obtención de metafases se cultivaron células de médula ósea en medio de cultivo (Gibco™ Invitrogen Corporation, Bone Marrow Medium) durante 24 horas. Su posterior proceso y tinción con bandeado G, fue de acuerdo a los métodos convencionales.¹¹ Se analizaron 50 metafases por individuo en un microscopio de luz convencional a objetivo 100X. El análisis de los cariotipos se realizó siguiendo el criterio del Sistema Internacional para la Nomenclatura de Citogenética Humana.¹² Para considerar una línea celular anormal, se tomaron los criterios estándares establecidos.¹³ Cabe mencionar que se toma-

ron microfotografías de todas las alteraciones cromosómicas encontradas (película Kodak Technical Pan).

Hibridación *in situ* fluorescente (FISH)¹¹

Se realizó la hibridación molecular utilizando sonda específica para la t(9;22) [LSI BCR/ABL ES Dual Color Translocation Probe, VYSIS], de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se analizaron 500 núcleos por individuo.¹⁴ Considerándose un paciente positivo cuando al menos un núcleo o metafase presentara una señal amarilla (translocación 5'BCR/3'ABL), una señal roja (gen ABL nativo), una señal verde (gen BCR nativo) y una pequeña señal roja (marcaje extra que corresponde al gen ASS) [VYSIS]. Dicho criterio se confirmó en las condiciones de nuestro laboratorio al analizar 1500 células de tres individuos control y no encontrándose ninguna célula con señal amarilla.

Cuadro II. Alteraciones cromosómicas secundarias observadas en 15 pacientes con LMC en fase acelerada

Edad	Alteración(es) cromosómica(s)	TC
35	del(3p25), +8, +Ph	12
35	i(17q10)	57
37	+8, -22,+Ph	159
40	-21, i(17q10), +19	47
24	+4, del(5q22), +8, +8, +9, +Ph, del(12p12), +19, +mar	105
49	+8, i(17q10)	120
54	+8, i(17q10)	36
60	t(1p32;17p?)	34
77	-10, del(11q21), -18, +19	26
42	+8,+7,+19,+20,+Ph, +mar, +mar	42
39	+19	22
26	del(6q21), +Ph, del(17p12), +8, + mar	12
34	-8, idic(9q11), del(17q23), -20	26
49	-15, del(17p12)	10
74	Inv(1p31→p34), 19p++	26

Resultados

El estudio citogenético de los pacientes con LMC mediante el complemento de las técnicas de bandeo G y FISH, reveló que todos los pacientes fueron positivos para el cromosoma Ph. Uno de los pacientes en fase crónica fue negativo con bandeo G y positivo en todos sus núcleos con FISH.

El análisis cromosómico de las alteraciones secundarias reveló que 19% (6/31) de los pacientes en etapa crónica presentaron alteraciones secundarias: deleciones en los

cromosomas 12, 20, 19, 17 y 15, un marcador cromosómico (material cromosómico de origen desconocido) y una trisomía del cromosoma 18 (Cuadro I).

Por otro lado 60% (15/25) de los pacientes en fase acelerada, presentaron alteraciones secundarias. Los cromosomas involucrados con mayor frecuencia fueron el 17 y 8 (en ocho casos cada uno), el 19 (en seis casos) y el Ph extra (en ocho casos), (cuadro II). Cabe mencionar que la duración de la etapa crónica en promedio fue de 49 meses (margen 10-159).

En el cuadro III se muestra el patrón cromosómico de los 17 pacientes con LMC en fase acelerada. De acuerdo al número de cromosomas, lo más frecuente fue la presencia de 46 cromosomas (20%), seguido por aquellos casos con 47-50 cromosomas (16%) y de 41-45 cromosomas (12%), se encontró únicamente un caso (4%) con un número modal de 81 cromosomas. Con respecto a la combinación de alteraciones cromosómicas específicas, también llamado patrón de la evolución citogenética, lo más frecuente fue: (a) +8,+19,+Ph [8%], (b)+8,i(17q)[8%], y (c)+8,+Ph [8%]. Se observó un caso [4%] con la combinación de i(17q),+19 (Cuadro III).

Cuadro III. Patrón de alteraciones cromosómicas secundarias en 17 de los 25 pacientes con LMC en fase acelerada

*Patrón cromosómico	n (%)
+8,+19,+Ph	2 (8.0)
+8,i(17q)	2 (8.0)
+8,+Ph	2 (8.0)
i(17q),+19	1 (4.0)
≥ 81 cromosomas**	1 (4.0)
47-50 cromosomas**	4 (16.0)
46 cromosomas**	5 (20.0)
41-45 cromosomas**	3 (12.0)

*Combinación de alteraciones cromosómicas en la evolución de la enfermedad.

**Casos con al menos una subclona con este número de cromosomas. Tres casos presentaron subclonas de diferentes números modales.

Discusión

Nuestros resultados muestran que 100% de los pacientes presentaron la translocación de los cromosomas 9 y 22 para la formación del cromosoma Ph, estos resultados son similares a otros estudios donde se encuentra del 90 al 95%. En dichos estudios se ha encontrado que de 2 a 10% de los casos presentan la intervención de tres o cuatro cromosomas al formarse dicho cromosoma Ph,³ lo cual no se encontró en el presente estudio al utilizar citogenética clásica y molecular.

Las alteraciones secundarias que se presentaron en la fase crónica (19%), no han sido reportadas como alteraciones frecuentes, lo que está de acuerdo con estudios previos.^{6,7}

Por otro lado, las alteraciones cromosómicas secundarias que se presentaron en 68% de los pacientes en la fase acelerada se incluyen en la ruta mayor y sus patrones cromosómicos más frecuentes están de acuerdo con lo reportado en un estudio previo con 1674 pacientes.⁷ Cabe destacar que en nuestro estudio se presentó un caso con i(17q),+19, cuya combinación está considerada como poco frecuente de acuerdo a datos previos.⁷ Dado lo anterior, se ha logrado inferir el orden de la aparición de los cambios basado en dichas combinaciones cromosómicas, por ejemplo se sugiere que el i(17q) es seguido por el +8 dentro de los cambios tempranos de la enfermedad, mientras que la alteración que aparece más tardía es +19,⁴ además se ha reportado que hay ventajas selectivas para la aparición de una determinada alteración secundaria, dependiendo de la alteración ya existente, debido a que algunas combinaciones son asociadas positivamente, mientras que otras se asocian negativamente.¹⁵

Al comparar las alteraciones cromosómicas estructurales encontradas en el presente estudio con las registradas como aberraciones recurrentes específicamente en LMC,⁶ nuestros hallazgos muestran que la mayoría coinciden con la región cromosómica involucrada. Se encontraron dos excepciones, la inversión 1p y el isocromosoma 9q. En la primera se ha descrito un factor de transcripción para la diferenciación de células hematopoyéticas en leucemia linfoblástica aguda (LLA), además de rompimientos frecuentes en diferentes tipos de cáncer.^{16,17} Para la segunda excepción, en cerca de 10% de pacientes con LLA, se han registrado diversas alteraciones en brazos cortos del cromosoma 9 entre ellas un isocromosoma de brazos largos, perdiéndose por lo menos dos genes que se cree son supresores de tumor.^{16,18}

De acuerdo a reportes previos, las regiones cromosómicas alteradas que se registraron en ambas fases de la enfermedad, presentaron puntos de rompimiento frecuentes para neoplasias hematológicas, sitios frágiles y genes alterados (genes supresores de tumor y protooncogenes) que probablemente están implicados en su etiología.¹⁹

Conclusiones

Este es el primer trabajo que describe y determina las alteraciones cromosómicas secundarias encontradas en pacientes mestizos mexicanos con LMC, las cuales son similares a las encontradas en otras poblaciones a nivel mundial.

Para futuros estudios se espera analizar las alteraciones cromosómicas de acuerdo a los diferentes tratamientos y definir los eventos moleculares involucrados en la formación de las alteraciones cromosómicas secundarias.

Referencias

1. **Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM.** The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 1999b;341:164-72.
2. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA. Epidemiología. México: SSA;1997.
3. **Aurich J, Duchayne E, Hugues-Rigal F, Bauduer F, Navarro M, Perel Y, Pris J, Caballón MR, Dastugue N.** Clinical, morphological, cytogenetic and molecular aspects of a series of Ph-negative chronic myeloid leukemia. *Hematol Cell Ther* 1998;40:149-158.
4. **Heim S, Mitelman F.** Cancer cytogenetics. 2a ed. New York: Wiley-Liss;1995. pp. 23-28.
5. **Mitelman F, Levan G, Nilsson PG, Brandt L.** Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976;18:24-30.
6. **Mitelman F, Johansson B, Mertens F.** Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2002). <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>
7. **Johansson B, Fioretos T, Mitelman F.** Cytogenetic and molecular genetic evolution of Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia. En: Bain BJ, editor. *Chronic myeloproliferative disorders*. Basel, Switzerland: Karger;2003. pp. 44-61. Article based on a article first published in *Acta Haematologica* 2002;107:76-94.
8. **Shet AS, Jahagirdar BN, Verfaillie CM.** Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 2002;16:1402-1411.
9. **Lisker R, Pérez Chávez F, Casa L, Córdova M S, Mutchinik O.** Leucemia granulocítica crónica. Correlación entre datos clínicos, citogenéticos y de laboratorio. *Rev Invest Clin (Mex)* 1980;187-192.
10. **Salles Manuel MT, Sobrevilla Calvo P, Guarnier Lans J, Acosta Barrera MA, Reynoso E.** Hallazgos citogenéticos en leucemia mielocítica crónica y su correlación pronóstico en pacientes del Instituto Nacional de Cancerología de México. *Gac Med Mex* 1994;1:1-6.
11. **Verma RS, Babu A.** Human chromosomes, principles and techniques. 2a. ed. New York: Pergamon Press;1989. pp. 72-127, 280-287.
12. **ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.** Mitelman F, editor. Basel, Switzerland: Karger;1995.
13. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982 (1984). *Cancer Genet Cytogenet* 1984;33:254.
14. **Wang YL, Bagg A, Pear W, Nowell PC, Hess JL.** Chronic myelogenous leukemia: laboratory diagnosis and monitoring. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:97-111.
15. **Hashimoto T, Ohtaki M, Kamada N, Yamato H, Munaka M.** Application of log-linear model in inference on karyotypic evolution in chronic myelocytic leukemia. *Environ Health Perspect* 1990;87:135-141.
16. Human gene mapping 11. London Conference (1991). Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping. *Cytogenet Cell Genet* 1991;58:1-984.
17. **Huret JL.** t(1;7)(p32;q34),t(1;14)(p32;q11),p32 rearrangements. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* January 1998. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/>
18. **Heerema NA.** 9p Rearrangements in ALL. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* August 1999. <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/>
19. **Mitelman F.** Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutat Res* 2000;462:247-253.