

Detección del complejo *BCR-ABL* mediante hibridación in situ fluorescente en pacientes leucémicos venezolanos

*Marisol L. Soto Quintana**, *Francisco J. Álvarez Nava*, *Alicia E. Rojas de Atencio*,
Karelis M. Urdaneta Gutiérrez, *Jenny Z. Cañizalez de Tarazona*
y Richard J. González Bracho

Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia.
Maracaibo, Venezuela.

Recibido: 04-03-09 Aceptado: 10-11-10

Resumen

Las leucemias son un grupo de enfermedades hematológicas malignas de origen clonal y etiología desconocida que resultan de alteraciones genéticas en una o más células de la médula ósea. Aproximadamente, el 95% de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC), 25% de los pacientes adultos con Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y 3% de los pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA) presentan el cromosoma Filadelfia (Ph). Esta es una anomalía cromosómica adquirida que consiste en la $t(9;22)(q34;q11.2)$. Molecularmente, el cromosoma Ph se caracteriza por la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* formado por la fusión de porciones de estos genes. Los objetivos de este estudio fueron determinar la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* mediante FISH en pacientes venezolanos con enfermedades leucémicas y demostrar la utilidad que tiene esta técnica en la identificación de dicho complejo molecular. Se analizaron 30 muestras de médula ósea (16 LMC, 9 LLA y 5 LMA) provenientes de pacientes referidos a la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia durante los años 2006-2008. Para analizar todas las muestras se utilizó la técnica citogenética convencional y la técnica de FISH con la sonda de ADN locus específica LSI *BCR-ABL* (ES). La técnica de FISH demostró la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* en 17 de 30 (57%) pacientes. La mayoría de estos (53%) tenían el cromosoma Ph oculto por la técnica citogenética convencional. Todos los pacientes con la $t(9;22)$ presentaron también el complejo molecular *BCR-ABL*. Adicionalmente, la técnica de FISH detectó 2 de 17 (12%) pacientes con deleción de la región 5' del gen *ABL*. Estos hallazgos confirman que la técnica de FISH usada conjuntamente con la técnica citogenética convencional es indispensable para la evaluación y seguimiento clínico adecuado de los pacientes con este tipo de trastornos.

Palabras clave: FISH, cromosoma Filadelfia, complejo *BCR-ABL*.

* Autor para la correspondencia: mlizell@hotmail.com

Detección de *BCR-ABL* complex through fluorescence in situ hybridization in Venezuelan patients with leukemia

Abstract

The leukemias are a group of hematological malignant diseases of clonal origin and unknown etiology resulting of genetic alterations on one or more cells of bone marrow. Approximately, 95% of patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML), 25% of adult patients with Acute Lymphoid Leukemia (ALL) and 3% of patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) present Philadelphia (Ph) chromosome. This is an acquired chromosomal anomaly which consists in t(9;22)(q34;q11.2). Molecularly, the Ph chromosome is characterized by presence of the *BCR-ABL* molecular complex which is formed for the fusion of portions of these genes. The objectives of this study were to determine the presence of *BCR-ABL* molecular complex through FISH in Venezuelan patients with leukemic diseases and to demonstrate the utility of this technique on the identification of such molecular complex. Thirty samples of bone marrow (16 CML, 9 ALL and 5 AML) from patients referred to the Medical Genetic Unit of Faculty of Medicine of University of Zulia during 2006-2008 were analyzed. To analyze all the samples, conventional cytogenetic technique and FISH with locus-specific DNA probe *LSI BCR/ABL ES* were used. The technique of FISH demonstrated the presence of the *BCR-ABL* molecular complex in 17 of 30 (57%) patients. The majority of these patients (53%) had a hidden Ph chromosome by conventional cytogenetic technique. All patients with t(9;22) also presented the *BCR-ABL* molecular complex. In addition, the technique of FISH detected 2 of 17 (12%) patients with a deletion of 5' region of *ABL* gene. These findings confirm that the technique of FISH used together conventional cytogenetic technique is indispensable to evaluation and appropriate clinical monitoring of patients with these disorders.

Key words: *BCR-ABL* molecular complex, FISH, Philadelphia chromosome.

Introducción

Las leucemias son un grupo de enfermedades hematológicas malignas de origen clonal y etiología desconocida que resultan de alteraciones genéticas en una o más células de la médula ósea (1). Clínicamente, las leucemias se subdividen en agudas: Leucemia Mieloide Aguda (LMA) y Leucemia Linfóide Aguda (LLA); y crónicas: Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y la Leucemia Linfóide Crónica (LLC) (2, 3).

Actualmente se conoce que las células de la médula ósea del 95% de los pacientes con LMC, 25-30% de las LLA del adulto, 5% de las LLA de la infancia y en menos del 3%

de las LMA presentan el cromosoma Filadelfia (Ph) (4, 5). Esta es una anomalía cromosómica adquirida que consiste en una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, encontrándose preferencialmente involucradas las bandas q34 y q11.2 de los cromosomas 9 y 22, respectivamente (6). Se han reportado variantes de esta anomalía. La variante simple que involucra al cromosoma 9 o 22 y a otro cromosoma diferente de éstos. La variante compleja que involucra al cromosoma 9,22 y a otros, es decir, involucra 3 o más cromosomas donde dos son siempre los cromosomas 9 y 22. También se ha descrito la variante oculta que involucra translocaciones sub-micros-

cópicas que no se evidencian con la técnica citogenética convencional (7, 8).

Desde el punto de vista molecular el cromosoma Ph se caracteriza por la presencia del complejo *BCR-ABL* formado por la ruptura y posterior fusión de porciones de los genes *ABL* (cromosoma 9q34) y *BCR* (cromosoma 22q11.2) (4). El gen *ABL* tiene por lo menos 230 kb y 11 exones. Por su parte, el *BCR* tiene una longitud de 90 kb y actualmente se conoce que tiene aproximadamente 23 exones. En este gen se han descrito 3 regiones llamadas *BCR* menor (*mBCR*), *BCR* mayor (*MBCR*) y más recientemente la llamada micro *BCR* (μ -*BCR*) (9,10).

Para el estudio del cromosoma Ph y sus variantes desde hace mucho tiempo el citogenetista ha utilizado como herramienta la técnica citogenética convencional (11). Esto con la finalidad de obtener el cariotipo, el cual tiene la gran ventaja de que permite evaluar el genoma completo. No obstante, el cariotipo obtenido mediante técnicas cultivo y bandedo cromosómico solo detecta la alteración de células en metafase. Este procedimiento es altamente preciso pero tiene las desventajas de ser muy laborioso, excluye la mayoría de las células en interfase, solo permite analizar un número limitado de células cada vez y requiere personal altamente especializado. Además, ocasionalmente estos estudios tienen la dificultad de obtener metafases adecuadas de células totalmente diferenciadas o con baja actividad mitótica. Generalmente, las metafases obtenidas son insuficientes o están ausentes y los cromosomas obtenidos con frecuencia muestran un mal patrón de bandedo cromosómico, lo que impide la detección de translocaciones crípticas, la ubicación exacta de los puntos de ruptura cromosómica y el reporte de anomalías cromosómicas clonales (12-15).

Lo anteriormente expuesto ha inducido a los investigadores a utilizar la técnica de FISH (Hibridación In Situ Fluorescente) como método alternativo (citogenética mole-

cular) para identificar más fácilmente el complejo *BCR-ABL* en pacientes leucémicos (12). En Venezuela, hasta los actuales momentos solo se han reportado dos estudios donde se ha utilizado la metodología de FISH para detectar el complejo *BCR-ABL* (16, 17). En el presente trabajo se reporta una metodología similar pero empleando la sonda de ADN locus específica LSI *BCR-ABL* extra señal (ES). Los objetivos de este trabajo fueron determinar la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* mediante FISH en pacientes venezolanos con enfermedades leucémicas y demostrar la utilidad que tiene esta técnica en la identificación de dicho complejo molecular.

Materiales y métodos

Se analizaron 30 muestras de médula ósea provenientes de pacientes leucémicos venezolanos de ambos sexos con edades comprendidas entre 5-78 años de edad (38 años \pm 19,8 DS). De estos, 16 tenían diagnóstico clínico de LMC, 5 pacientes tenían diagnóstico clínico de LMA (tipo M1-M2) y 9 de LLA. De los pacientes con LMC 11 pertenecían al sexo masculino y 5 al femenino y tenían una edad de 45 años \pm 18,4 DS (rango: entre 15-78 años). De los pacientes con LMA 3 eran del sexo masculino y 2 femenino estos tenían una edad de 47,8 años \pm 18,2 DS (rango: entre 23-67 años). En los pacientes con LLA, 6 correspondían al sexo masculino y 3 al sexo femenino con una edad de 21,1 años \pm 12,6 DS (rango: entre 5-40 años). Ninguno de estos pacientes había recibido tratamiento (eran *de novo*). Las muestras de estos sujetos fueron referidas desde los hospitales públicos y privados de la región zuliana a la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia durante los años 2006-2008, con la finalidad de realizarles el cariotipo de rutina para diagnóstico y la técnica de FISH con fines de investigación. Todos los pacientes firmaron el respectivo consentimiento informado para participar en la realización del estudio. Adicionalmente,

este trabajo fue aprobado por el comité de bioética de la Unidad de Genética Médica.

Como controles se analizaron 5 muestras de sangre periférica de individuos sanos sin enfermedad hematológica maligna aparente, con cariotipo normal (controles negativos) y 5 muestras de médula ósea provenientes de pacientes con LMC los cuales al análisis citogenético convencional presentaban el cromosoma Ph en todas sus metafases (controles positivos) con un cariotipo 46, XX o 46, XY, t(9;22)(q34;q11.2). A todas las muestras de los pacientes se les realizó cultivo cromosómico según la técnica citogenética convencional descrita por Moorhead (18). Una parte del material cromosómico obtenido se utilizó para realizar cariotipo con bandas G, los cuales fueron descritos de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 2005) (19). El resto del material se almacenó a -20°C para realizar posteriormente la técnica de FISH.

Para determinar el complejo molecular *BCR-ABL* mediante la técnica de FISH se utilizó la sonda de ADN locus específica LSI *BCR-ABL* extra señal (ES), así como el protocolo de hibridación y de interpretación de las señales fluorescentes según Vysis, Inc (20). La sonda anteriormente mencionada está diseñada para detectar la fusión de los genes *BCR-ABL* tanto en metafases como en núcleos en interfase y puede detectar rupturas en la región mayor y menor del gen *BCR* en el cromosoma 22. Esta sonda produce una señal naranja o roja adicional que está presente en los núcleos de las células que poseen la translocación. Esto reduce los problemas de interpretación que resultan de yuxtaposición al azar de los diferentes genes marcados que producen señales co-localizadas.

Se contaron al menos 300 núcleos en interfase y de acuerdo a las señales fluorescentes observadas en éstos se dividieron en cuatro categorías:

1. Núcleo normal. Se consideró un núcleo normal aquel que no tenía la t(9;22). Por lo tanto, éste exhibía dos señales de color naranja (*ABL*) y dos señales de color verdes (*BCR*) distales unas de otras.
2. Núcleo con la t(9;22) que involucraba ruptura en la región M-*BCR*. Éste mostraba una señal verde correspondiente al gen *BCR* normal, una señal naranja grande correspondiente al gen *ABL* normal, una señal naranja pequeña correspondiente al gen *ASS* (Arginino Succinato Sintetasa) en el cromosoma 9 derivado, es decir la señal extra y una señal de fusión (5'*BCR*/3'*ABL*).
3. Núcleo con la t(9;22) que involucraba ruptura en la región m-*BCR*: En éste se observaba una señal naranja, una señal verde y dos señales de fusión.
4. Núcleo con delección de la región 5' del gen *ABL*. Cuando se observaba un patrón de fusión simple producto de la reducción del patrón ES o de la delección del gen *ASS*.

Todos los núcleos evaluados cumplieron además los siguientes criterios antes de ser analizados: 1) Morfología intacta; 2) sin solapamiento de los bordes nucleares; 3) bordes nucleares intactos; 4) tamaño nuclear: mediano o grande; 5) sin hibridación cruzada. Además de los núcleos en interfase, se analizaron entre 3-5 metafases por lámina cuando se disponían de ellas.

Para determinar las tasas de falsos positivos y negativos (TFPs y TFNs) para la técnica de FISH se utilizaron los criterios establecidos por Chase y col. (21) y para validar la técnica se determinó la sensibilidad y especificidad en las muestras controles. Para estos cálculos se utilizaron las fórmulas descritas por Fernández y Díaz (22). Los datos obtenidos en la presente investigación fueron analizados a través de estadística descriptiva, expresados como promedios y

desviaciones estándar del porcentaje de núcleos con el complejo *BCR-ABL* positivo.

Resultados

La tabla 1 resume los resultados del análisis citogenético convencional (cariotipo) y molecular (FISH) en pacientes leucémicos. En los pacientes con LMC se observó que a través del análisis citogenético convencional 7 de 16 (43,75%) pacientes tenían cariotipo normal, 6 de 16 (37,5%) pacientes tenían la t(9;22) clásica, 1 de 16 (6,25%) pacientes presentó una translocación variante que involucró a los cromosomas 6, 9 y 22. Adicionalmente, 2 de 16 (12,5%) pacientes presentaron cariotipos mosaicos los cuales involucraban líneas celulares normales, con anomalías de tipo numérico y/o estructural diferentes a la t(9;22). Con relación a la formación del complejo molecular *BCR-ABL* en estos pacientes, se evidenció que la mayoría de las células analizadas presentaron dicho complejo ($86,25 \pm 33,70$). Todos los pacientes con LMC excepto dos tuvieron presente la fusión en más del 95% de núcleos en interfase analizados ($98,57 \pm 1,65\%$).

En esta tabla se evidencia que 14 de 16 (87,5%) pacientes con LMC analizados tenían la presencia de la fusión génica *BCR-ABL* detectada por FISH. Así mismo, 6 de 7 (85,7%) pacientes que eran cariotípicamente normales presentaron la fusión positiva en más del 95% de los núcleos en interfase analizados. Todos los pacientes que presentaron la t(9;22) clásica o una variante de ésta en el análisis citogenético convencional tenían también la presencia de la fusión génica *BCR-ABL* detectada mediante FISH. Con respecto a los pacientes que tenían cariotipos diferentes a los anteriormente mencionados (mosaicos) uno de los dos casos presentó el complejo molecular o fusión *BCR-ABL*.

En cuanto a los pacientes con LMA 3 de 5 pacientes presentaron cariotipos normales, 1 tenía cariotipo compuesto con líneas celulares hipodiploides más la presencia de

un cromosoma marcador y el otro caso presentó un cariotipo mosaico donde una línea celular tenía una alteración numérica más la t(9;22) y la otra línea presentó solo la t(9;22) en todas sus metafases. En este último caso se confirmó la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* en el 98% de los núcleos en interfase analizados.

En los pacientes con LLA los resultados del cariotipo permitieron demostrar que 5 de 9 pacientes (55,5%) tenían cariotipos normales. De los casos restantes, 2 mostraron cariotipos mosaicos los cuales involucraban líneas celulares normales con líneas celulares hipodiploides o con otras alteraciones de tipo numérica y/o estructurales; un caso presentó hipodiploidias en todas las metafases analizadas y en el otro paciente el cariotipo no estuvo disponible debido a la mala calidad de las metafases y el mal patrón de bandedo cromosómico. El análisis citogenético molecular (FISH) permitió detectar la presencia de la fusión *BCR-ABL* en 2 de los 9 (22,2%) pacientes analizados. Estos dos pacientes tenían el cariotipo normal en todas las metafases analizadas pero la fusión detectada por FISH en más del 96% de los núcleos en interfases analizados.

En cuanto a la detección del complejo molecular *BCR-ABL* mediante FISH en el total de pacientes leucémicos estudiados (LMC, LMA, LLA). En esta tabla se puede observar que 17 de 30 (56,7%) pacientes leucémicos analizados presentaron dicho complejo. Así mismo, se puede evidenciar que 8 de los 15 (53,3%) pacientes leucémicos con cariotipos normales presentaron la fusión de estos genes. Todos los casos con cromosoma Ph clásico o sus variantes detectados por el análisis citogenético convencional tenían presente el complejo molecular *BCR-ABL*.

Con relación al mecanismo molecular para la formación del complejo *BCR-ABL* detectado mediante FISH en pacientes leucémicos se observó que en todos los pacientes analizados que presentaron el complejo mo-

Tabla 1
Análisis citogenético convencional y molecular (FISH) en pacientes leucémicos

Caso	Tipo de leucemia	Análisis citogenético convencional Cariotipo	FISH * <i>BCR/ABL</i>
1	LMC	46, XY [25]	0
2	LMC	46,XY, t(6; 9;22) (p21.1; q34; q11.2) [14]	100
3	LMC	46, XY [26]	98
4	LMC	46, XX, t(9;22) (q34;q11.2) [12]	100
5	LMC	46, XY [15]	95
6	LMC	44,XY,-4, -5 [1] / 45, XY, -18, + t(6;18)(q27;p11) [1] / 46, XY, del(1) (q42) [1] / 46, XY [23].	98
7	LMC	46, XX, [25].	98
8	LMC	46, XY, t(9;22) (q34;q11.2) [10]	99
9	LMC	46, XX [10]	100
10	LMC	46, XX [12]	97
11	LMC	46, XY, t(9;22) (q34;q11.2) [15]	100
12	LMC	46, XY, t(9;22) (q34;q11.2) [10]	99
13	LMC	46, XY [8] / 49, XY, +7, +11,+ 21[5] / 34, XY, -1, -3, -5, -7, -9, -10, -11, -15, -17, -19, -20, -22 [2]	0
14	LMC	46, XY, t(9;22) (q34;q11.2) [20]	100
15	LMC	46, XX, t(9;22) (q34;q11.2) [10]	100
16	LMC	46, XY [15]	96
17	LMA	46,XY [16]	0
18	LMA	46, XY [13]	0
19	LMA	34 ~ 44, XY, -1, -3, -4, -5, -8, -9, -10, -12, -13, -15, -18, -21, -22, + mar [cp 8]	0
20	LMA	46, XX [16].	0
21	LMA	47, XX, +19, t(9;22) (q34;q11.2) [3] / 46, XX, t(9;22) (q34;q11.2) [17]	98
22	LLA	46, XY [9]	100
23	LLA	46, XY [25]	0
24	LLA	46, XY [18]	97
25	LLA	46, XX [7]	0
26	LLA	42, XX, -8, -15, -20, -22 [1] / 45, XX, -21[1] / 46, XX [18]	0
27	LLA	34, XY, -2, -4, -5, -6, -10, -10, -13, -14, -18, -19, -20, -21[1] / 44, XY, -5, -12, [1] / 48, XY, + 2 mar [2] / end 46, XY [2] / 46, XY [3]	0
28	LLA	46, XX [8]	0
29	LLA	39 ~ 45, XY, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -12, -19, -20, -21 [15]	0
30	LLA	No disponible	0

* Expresado en porcentaje de núcleos en interfase analizados.

lecular *BCR-ABL* la ruptura dentro del gen *BCR* involucró siempre la región *M-BCR*. En cuanto a la presencia o ausencia de la delección de la región 5' del gen *ABL* ésta se detectó en 2 de 17(11,8%) pacientes; uno de ellos tenía LMC y el otro LLA.

El análisis citogenético molecular en las muestras controles evidenció que todos los controles positivos, que eran muestras que tenían la t(9;22) clásica en todas las metafases analizadas, presentaban también el complejo molecular *BCR-ABL* en más del 98% de los núcleos en interfase analizados (98,2±1,48). A diferencia de esto, en las muestras controles negativas, cuyo cariotipo era normal, no se detectó la presencia de este complejo en casi la totalidad de las células analizadas (98,8±1,30). En estas muestras la sensibilidad obtenida fue de 98,2 % y la especificidad de 98,8% con una TFP de 1,2% y una TFN de 1,8%.

Discusión

Se ha documentado ampliamente la utilidad de la técnica de FISH en enfermedades hematológicas malignas por diferentes grupos de investigadores. Una de las principales aplicaciones de esta técnica es la identificación de eventos de fusión *BCR-ABL* en pacientes con enfermedades leucémicas tales como LMC, LMA y LLA (8, 15, 23). En el presente trabajo, en los pacientes con LMC, el análisis citogenético convencional reveló que 9 de 16 pacientes (56%) con LMC eran Ph negativos. Es decir, presentaron cariotipos normales o mosaicos sin la t(9;22). En todos estos pacientes Ph negativos, excepto dos casos, la técnica de FISH demostró la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* en más del 95% de los núcleos analizados. Estos hallazgos son similares a los reportados por otros autores quienes han publicado una serie de pacientes con LMC Ph negativos pero con el complejo *BCR-ABL* positivo demostrado a través de la técnica FISH (8, 24). En un subgrupo sustancial de estos pacientes Ph negativos las investigaciones mo-

leculares han demostrado que la presencia de la fusión génica *BCR-ABL* en el cromosoma 22, es indistinguible a nivel molecular de la fusión génica *BCR-ABL* que se encuentra en los pacientes con LMC Ph positivos (8, 25). Estos casos citogenéticamente negativos pero molecularmente positivos se conocen como cromosoma "Ph oculto" (8, 26). En este estudio se detectó que 7 de 16 pacientes (43,75%) con LMC tenían el cromosoma Ph oculto. Estos hallazgos confirman una vez más que la técnica de FISH puede ser utilizada para detectar la fusión *BCR-ABL* en pacientes con cromosomas Ph ocultos no detectados por la técnica citogenética convencional. Estos casos pueden corresponder a translocaciones complejas submicroscópicas, inserción de parte del gen *ABL* al *BCR* sin la translocación recíproca o mosaicismo a bajo nivel (24, 27).

La evidencia acumulada sugiere que la LMC debería ser definida por la presencia del cromosoma Ph y/o la evidencia molecular de la fusión *BCR-ABL*. Los hallazgos reportados también sugieren que los pacientes sin esta anomalía deberían ser incluidos dentro de otros trastornos mieloproliferativos diferentes de la LMC. Recientemente, la Organización Mundial de la Salud ha realizado una clasificación de los tumores del tejido linfóide y hematopoyético sugiriendo que los trastornos mieloproliferativos crónicos diferentes a la LMC solo pueden ser diagnosticados en ausencia del cromosoma Ph (28, 29). Se han reportado algunos pacientes con un diagnóstico histopatológico sugestivo de LMC y ausencia del cromosoma Ph o el gen *BCR* rearrreglado. Estos pacientes son clínicamente distintos de la LMC y la enfermedad puede tener un curso clínico similar a los trastornos mieloproliferativos (30, 31). Basados en esto, los dos casos con LMC presentados en esta investigación y referidos anteriormente con ausencia tanto del cromosoma Ph en el cariotipo, como del complejo molecular *BCR-ABL* a través de la técnica de FISH deberían ser reclasificados y diagnosticados como otros trastornos mie-

loproliferativos crónicos diferente de LMC o síndromes mielodisplásicos. De esta manera, la técnica citogenética molecular descartó el diagnóstico de LMC en estos pacientes.

Por otra parte, todos los pacientes con LMC que tenían en el cariotipo la t(9;22) clásica o una variante de esta (tabla 1) al ser analizados a través de la técnica citogenética molecular presentaron también el complejo molecular *BCR-ABL*. Este hecho, confirma el diagnóstico de LMC en estos pacientes. Esto es importante ya que se ha reportado que con los métodos citogenéticos convencionales, la observación de un cromosoma Ph puede ser evidencia directa de LMC, pero no es evidencia directa de la fusión *BCR-ABL*, y en estos casos es donde la aplicación de FISH es relevante (24).

Se ha observado que el porcentaje de células con la fusión *BCR-ABL* en la médula ósea de la mayoría de los pacientes con LMC no tratados está en el rango de 69-91%, usando sondas *MBCR-ABL* (7). Sin embargo, en el presente trabajo esta fusión se observó en el 99-100% de los núcleos en interfase analizado. Esta diferencia se puede deber al tipo de sonda utilizada. En este aspecto se ha señalado que el porcentaje de células con la fusión puede depender del tipo de sonda utilizada y de los diferentes métodos de detección de la señal (21). Además varias investigaciones han reportado que la nueva generación de sondas *BCR-ABL ES* tiene una mayor sensibilidad y especificidad, y ellas pueden detectar el cromosoma Ph en menos del 1% de los núcleos en interfase (23, 32, 33).

Se conoce ampliamente que el cromosoma Ph y el complejo molecular que se forma producto de este rearrreglo puede aparecer en menos del 3% de los pacientes con LMA de tipo M0, M1 y M2 (34, 35). En este trabajo el análisis citogenético convencional mostró que uno de los de los 5 pacientes con LMA analizados presentó un cariotipo mosaico que involucraba dos líneas celulares; una de ellas tenía una alteración de tipo nu-

mérica más la t(9;22) y la otra presentó solo la t(9;22). En este paciente con LMA, la técnica de FISH evidenció y confirmó la presencia de la fusión génica *BCR-ABL* en el 98% de los núcleos en interfase analizados. El patrón de hibridación observado en este caso fue igual al observado en la mayoría de los pacientes con LMC. Estos hallazgos difieren de los reportados por Dong y cols. (36) quienes no encontraron la presencia de la fusión *BCR-ABL* a través de la técnica de FISH con la sonda *BCR-ABL-ES* en 66 pacientes con LMA Ph negativos (36).

Se ha sugerido que todo paciente con LMA que porte el cromosoma Ph debe ser evaluado cuidadosamente ya que existe la posibilidad que esa leucemia pueda ser una LLA o una LMC en crisis blástica (37). Por otra parte, existe suficiente evidencia que demuestra que la presencia de esta alteración confiere a los pacientes con LMA un pronóstico desfavorable (35, 37, 38).

Con relación al resto de los pacientes con LMA analizados en este estudio tres de cinco pacientes presentaron cariotipos normales y uno presentó un cariotipo con líneas celulares hipodiploides. Ninguno de estos pacientes presentó la fusión *BCR-ABL*. Por lo tanto, en estos casos la técnica de FISH confirmó los resultados del análisis citogenético convencional. Esta confirmación es importante ya que se ha reportado que pacientes con LMA y cariotipos normales o con algunas monosomías tienen un pronóstico adverso (38).

Con respecto a los pacientes con LLA analizados en este estudio, ninguno de ellos presentó el cromosoma Ph detectable a través del cariotipo convencional. Sin embargo, la técnica de FISH reveló la presencia de la fusión *BCR-ABL* en 2 de 9 (22,2%) pacientes, ambos tenían el cariotipo normal en todas las metafases analizadas pero el complejo molecular en más del 96% de los núcleos analizados. Es decir, tenían el cromosoma Ph oculto. Estos hallazgos son similares a los reportados en la literatura donde se des-

cribe uno entre 27 pacientes con LLA el cual tenía cariotipo normal y la presencia de la fusión molecular *BCR-ABL* en el 90% de las células analizadas (39).

Adicionalmente, la técnica de FISH produjo como resultado la identificación de 2 de 17 (11,74%) pacientes leucémicos (uno con LMC y otro con LLA) con cariotipo normal que tenían delección de la región 5' del gen *ABL*. El patrón de hibridación en estos pacientes se caracterizó por una señal fluorescente de color naranja (*ABL*), una señal fluorescente verde (*BCR*) y una señal de fusión (*BCR-ABL*) con ausencia de la señal extra de color naranja. Tal patrón de hibridación ha sido descrito por otros investigadores y puede ser visto en casos de delección del gen *ABL* y *ASS* (40, 41).

Varios autores han descrito que entre el 10-27% de los pacientes de con LMC tienen grandes deleciones adyacentes al punto de ruptura del gen *ABL*. Estas deleciones ocurren corriente arriba del locus *ABL* y tienen puntos de ruptura variables que pueden extenderse hasta varias megabases. Por lo tanto, esto afecta también el locus *ASS* lo cual explicaría la pérdida de la señal extra (ES) al utilizar la sonda *BCR-ABL* ES (36, 40-42). También se ha reportado que los pacientes con LMC que tienen deleciones de la región 5' *ABL* progresan a fase blástica o acelerada más rápidamente que aquellos pacientes que no tienen las deleciones y que la sobrevida de los pacientes con la delección es más corta que en los pacientes sin la delección (36 meses Vs \geq 90 meses) (32). Por lo tanto, la delección de la región 5' del gen *ABL* es un indicador de mal pronóstico en pacientes con LMC (32, 36, 40, 43, 44). Los hallazgos encontrados en este estudio parecen apoyar esta hipótesis ya que el paciente con LMC se encontraba en crisis blástica y el paciente con LLA falleció al poco tiempo. Sin embargo, se requieren más estudios que involucren un mayor número de casos con LLA para investigar una posible correlación entre estas deleciones con el pronóstico y sobrevida en estos pacientes.

Se conoce ampliamente que la técnica de FISH juega un papel importante tanto en las investigaciones clínicas como experimentales. Sin embargo, la interpretación de los resultados se complica debido a la variabilidad existente entre las TFPs Y TFNs reportadas (5, 8, 32, 33, 45). La TFP obtenida en la presente investigación es similar a la reportada por Amare y col. (46), quienes obtuvieron una TFP de $1\% \pm 0,4\%$ y Chase y cols., quienes reportaron una TFN de 2% (5). También se han reportado hallazgos similares a los obtenidos en la presente investigación por parte de otros autores (47, 48). Sin embargo, nuestros resultados difieren de otros grupos de investigadores quienes han reportado TFPs y TFNs muy altas (4%-17%) (5, 24, 49) o muy bajas (0,08%-0,5%) (32, 33, 40, 45).

Las discrepancias obtenidas entre las TFPs y TFNs en las diferentes investigaciones pueden ser explicadas por: el tamaño del núcleo y de la señal, tipo de sonda utilizada, métodos de detección, evaluación de la señal o criterio utilizado para definir la señal de fusión, fase en la cual se encuentra el núcleo en interfase a analizar (G1, S, G2), grado de condensación de la cromatina (5). Se han propuesto otros factores que también pueden influir en la variabilidad de resultados tales como: condiciones de la hibridación, intensidad de la señal, homogeneidad de la muestra, número de núcleos analizados y diferencias entre los microscopistas (50).

En este estudio empleando la sonda *BCR-ABL* ES, la sensibilidad y especificidad analítica de la técnica de FISH fue de aproximadamente 98%. Estos hallazgos son similares a los reportados por otros autores quienes encontraron una sensibilidad superior del 99% (32, 33) e inclusive una sensibilidad y especificidad del 100% (51). Las pequeñas diferencias observadas se pueden deber al número de núcleos analizados en las diferentes investigaciones. Se ha señalado que esta alta sensibilidad se debe al gran tamaño de la sonda de Vysis en compara-

ción con las sondas usadas en estudios previos (32) y la alta especificidad se debe a que esta sonda no tiene hibridación cruzada con otros loci (51) sino que la misma solo hibrida con los genes *ABL*, *ASS* y *BCR*. Los resultados de este estudio al igual que los publicados por otros autores (32, 33, 51) confirman que esta sonda es altamente sensible y específica para la detección de la fusión génica *BCR-ABL*.

Los hallazgos encontrados en el presente estudio confirman que la técnica de FISH ofrece múltiples ventajas para la detección del complejo molecular *BCR-ABL*. Esta técnica es rápida, sencilla, confiable, sensible y específica con una baja TFPs y TFNs. Es una prueba cuantitativa ya que permite cuantificar el número de células que porta la alteración cromosómica. Además, permite el análisis de un gran número de células siendo invaluable en aquellos casos en los cuales no hay metafases o éstas no están disponibles debido a su mala calidad. También, es de gran utilidad para confirmar o descartar el diagnóstico en aquellos pacientes con LMC, los cuales al análisis citogenético convencional presentan cromosoma Ph negativo. Así mismo, es muy útil en la detección del cromosoma Ph oculto y en la identificación de un subgrupo de pacientes que portan la delección de la región 5' del gen *ABL*.

Sin embargo, a pesar de lo antes mencionado es necesario tener en cuenta el elevado costo que representa el realizar la técnica de FISH, la complejidad de la interpretación de los resultados, las dificultades en la estandarización y la necesidad de personal especializado para el uso de una técnica que en la mayoría de los casos no excluyen ni sustituyen a los estudios citogenéticos clásicos sino que los amplían y complementan (15).

En este sentido, hay que resaltar que actualmente también se está utilizando para complementar el estudio de los pacien-

tes con enfermedades leucémicas, la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (PCR-RT) mediante la cual a partir de secuencias de ARN mensajero es posible determinar los transcritos de fusión *BCR-ABL*. Esta técnica es una alternativa sensible, específica y más económica que la FISH (52, 53).

Finalmente, dado que en la actualidad existen una gran variedad de técnicas para el estudio de pacientes con enfermedades hematológicas malignas y que cada una de estas metodologías presentan sus fortalezas y debilidades es necesario usar combinaciones de estos procedimientos tomando en cuenta la exactitud, relación costo-beneficio y la situación clínica particular. Esto es indispensable para la evaluación y seguimiento clínico adecuado de los pacientes con este tipo de trastornos.

Agradecimientos

Esta investigación fue subvencionada por el CONDES-LUZ.

Referencias bibliográficas

1. MISRA R., PINSKY P., SRIVASTAVA S. *Hematology Oncology Clinics of North America* 14: 907-924. 2000.
2. PÉREZ REQUEJO J. *Hematología*. 3^{ra} edición. Editorial Disinlimed, C.A. Caracas-Venezuela. Tomo I, pp. 119. 1995.
3. MINISTERIO DE SALUD. Guía Clínica Leucemia del Adulto. Santiago: Minsal, 2007.
4. GONZÁLEZ A., ANGUITA E., MORA A., ASENJO S., LÓPEZ I., POLO M., VILLEGAS A. *Cancer Genet Cytogen* 130(1): 68-74. 2001.
5. CHASE A., GRAND F., ZHANG J., BLACKETT N., GOLDMAN J., GORDON M. *Genes Chromosomes Cancer* 18(4): 246-253. 1997.
6. ROWLEY J. *Nature* 243: 290- 293. 1973.

7. DEWALD G., JUNEAU A., SCHAD C., TEF-FERI A. *Cancer Genet Cytogen* 94(1):59-66. 1997.
8. CHEN Z., MORGAN R., BERGER C., PERARCE-BIRGE L., STONE J., SANDBERG A. *Cancer Genet Cytogen* 70(2):103-107. 1993.
9. ROMÁN J., JIMÉNEZ A., SAGLIO G., ROCCHI M., MALDONADO J., TORRES A. *Haematologica* 86: 90-98. 2001.
10. KURZROCK R., GUTTERMAN J., TALPAZ M. *N Engl J Med* 319 (15): 990-998. 1988.
11. AKEL S., KOLIALEXI A., MAVROU A., METAXOTOU C., LOUKOPOULOS D., YATAGANAS X. *Clin Lab Haematol* 24 (6): 361-367. 2002.
12. GONZÁLEZ R. *Sangre* 41(3): 185-188. 1996.
13. KEARNEY L. *Br J Haematol* 104 (4): 648-658. 1999.
14. KUCHERIA K., JOBANPUTRA V., TALWAR R., AHMAD M., DADA R., SIVAKUMARANT. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1: 225-223. 2003.
15. SÁNCHEZ M., ODERO M., SOLÉ F., GUTIÉRREZ N. *Haematologica* 86: 156-161. 2001.
16. SOTO M., ROJAS A., CHIRINO H., ALVAREZ F., PINEDA L., URDANETA K., GONZALEZ S., GONZALEZ R. *Invest Clin* 39(2):85-96. 1998.
17. URDANETA K., ROJAS A., SOTO M., NUÑEZ A., CAÑIZALEZ J., GONZALEZ R., ALVAREZ F., BRACHO A., SOLIS E. *Ciencia* 17(1) 42-49. 2009.
18. MOORHEAD P., NOWELL P., MELLMAN W., BATTIPS D., HUNGERFORD D. *Exp Cell Res* 20: 613-616. 1960.
19. SHAFFER L., TOMMERUP N. *An international systems for human cytogenetic nomenclature* (ISCN). 130 pp. 2005.
20. Vysis. Managing disease with molecular techniques. Product catalog. 1999-2000.
21. CHASE A., GRAND F., GUANG J., BLACKETT N., GOLDMAN J., GORDON M. *Genes Chromosomes Cancer*. 18 (4):246-253. 1997.
22. FERNÁNDEZ P., DÍAZ P. *Cad Aten Primaria* 10: 120-124. 2003.
23. GOZZETTI A., LE BEAU M. *Semin Hematol* 37(4): 320-333. 2000.
24. DEWALD G., SCHAD C., CHRISTENSEN E., TIEDE A., ZINSMEITER A., SPURBECK J., THIBODEAU S., JALAL S. *Cancer Genet Cytogen* 71(1):7-14. 1993.
25. COSTA D., ESPINET B., QUERALT R., CARRIÓ A., SOLÉ F., COLOMER D., CERVANTES F., HERNANDEZ J., BESSES C., CAMPO E. *Cancer Genet Cytogen* 141(2): 114-119. 2003.
26. VIRGILI A., BRAZMA D., REID AG., HOWARD-REEVES J., VALGAÑÓN M., CHANALARIS A., DE MELO VA., MARIN D., APPERLEY JF., GRACE C., NACHEVA EP. *Mol Cytogen* 18; 1(1):14. 2008.
27. VAN DER PLAS D., GROSVELD G., HAGEMEIJER A. *Cancer Genet Cytogen* 52(2):143-156. 1991.
28. JAFFE E., HARRIS N., STEIN H., VARDIMAN J. *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, Lyon. 2001.
29. OWEN R., DICKINSON H., EVANS P., O'CONNOR S., SWIRSKY D., JACK A. *Br J Haematol* 120: 716-719. 2003.
30. RAIMONDI S. *Cancer Invest* 18(2):135-147. 2000.
31. KANTARJIAN H., SHTALRID M., KURZOCK R. *Am J Med* 85(5): 639-644. 1988.
32. SINCLAIR P., GREEN A., GRACE C., NACHEVA E. *Blood* 90(4):1395-1402. 1997.
33. NAJFELD V. *Cancer Genet Cytogen* 132(2):171. 2002.

34. GONZALEZ J. *Cancer Genet Cytogen* 98(2):111-114. 1997.
35. MRÓZEK K., HEINONEN K., BLOOMFIELD C. *Best Pract Res Clin Haematol.* 14(1):19-47. 2001.
36. DONG S., YUN-SONG L., YEON-SOOK Y., YOUNG-REE K., SEOK S., YOUNG K., CHA JAS., SUNG S., HAE R., YONGSOO K., HAN I. *Gene Chromosome Canc* 37(3): 291-299. 2003.
37. GOLUB T., WEISTEIN H., GRIER H. Acute myelogenous leukemia. PIZZO AND POPLACK: *Principles and practice of pediatric oncology*, Chapter 18. 3rd., Lippincott-Raven Publishers, 1997.
38. WELTERMANN A., FONATSCH C., HAAS O., GREINIX H., KAHL S., MITTERBAUER G., JÄUER U., KAINZ B., GEISSLER K., VALENT P., SPERR W., KNÖBL P., SCHWARZINGER I., GLEIB A., LECHER K. *Leukemia* 18(2): 293-302. 2004.
39. NORDGREN A., SCHOUMANS J., SÖDERHÄLL S., NORDENSKJÖLD M., BLENOW E. *Br J Haematol* 114(4): 786-793. 2001.
40. COHEN N., ROZENFELD G., HARDAN I., BROK F., AMARIGLIO N., RECHAVI G., TRAKHTENBROT L. *Cancer Genet Cytogen* 128(2): 114-119. 2001.
41. HERENS C., TASSIN F., LEMAIRE V., BEGUIN Y., COLLARD E., LAMPERTZ S., CROISSIAU C., LECOMTE M., DE PRIJK B., LONGREE L., KOULISCHER L. *Br J Haematol* 110(1): 214-216. 2000.
42. MÜLER C., HENNING E., FRANKE C., KRAHL R., LEIBLEIN S., NIEDERWIESER D., DEININGER M. *Cancer Genet Cytogen* 136(2): 149-150. 2002.
43. Li JY., Xu W., Wu W., Zhu Y., Qiu HR., Zhang R., Zhang SJ., Qian SX. *Onkologie.* 31(11):585-589. 2008.
44. DE MELO VA., MILOJKOVIC D., MARIN D., APPERLEY JF., NACHEVA EP., REID AG. *Cancer Genet Cytogen* 182(2):111-115. 2008.
45. GRAND F., CHASE A., IQBAL S., NGUYEN D., LEWIS J., MARLEY S., DAVIDSON R., GOLMAN J., GORDON M. *Gene Chromosome Canc* 23(2):109-115. 1998.
46. AMARE P., BAISAINÉ C., SAIKIA T., NAIR R., GAWADE H., ADVANI S. *Cancer Genet Cytogen* 131(2):125-134. 2001.
47. CHEN Z., NOTOHAMIPRODJO M., LANE F., MORGAN R., STONE J., SANDBERG A. *Cancer Genet Cytogen* 98(1):1-3. 1997.
48. TKACHUK D., WESTBROOK C., ANDREEFF M., DONLON T., CLERY M., SURYANARAYAN K., HOMGE M., REDNER A., GRAY J., PINKEL D. *Science* 250:559-561. 1990.
49. MOHR B., BORNHÄUSER M., PLATZBECKER U., FREIBERG J., NAUMANN R., PRANGE G., MOHM J., KROSCHINSKY F., EHNINGER G., THIEDE C. *Cancer Genet Cytogen* 127(2):111-117. 2001.
50. COHEN N., NOVIKOV I., HARDAN I., ESA A., BROK-SIMONI F., AMARIGLIO N., RECHAVI G., BEN-BASSAT I., TRAKHTENBROT L. *Cancer Genet Cytogen* 123(2): 102-108. 2000.
51. SMOLEY S., BROCKMAN S., PATERNOSTER S., MEYER E., DEWALD G. *Cancer Genet Cytogen* 148(1):1-6. 2004.
52. JIMENEZ J., CARRILLO J., CHAVES M., JIMENEZ R., VARGAS M., CAMPOS L., GUARDIA A., VALVERDE B. *Biol trop* 56(4):1613-1618. 2008.
53. VARGAS M., PORTERO M., REYES A., FERNANDEZ C. *Cancer Genet Cytogen* 195(1):71-74. 2009.