

---

## Análisis molecular de leucemias Ph positivo y variantes

A. Guembe<sup>1</sup>, I. Ezpeleta<sup>2</sup>, J. Molina<sup>3</sup>, M.J. Paloma<sup>2</sup>, J. Gastearena<sup>4</sup>, M.R. Luquin<sup>1</sup>, A. Valiente<sup>1</sup>.

---

### INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un trastorno hematológico que se caracteriza a nivel citogenético por la presencia de un marcador cromosómico llamado cromosoma Philadelphia (Ph). Este marcador se origina como consecuencia de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 a nivel de las bandas q34 y q11 respectivamente<sup>1</sup>.

El oncogen c-abl, situado en 9q34, se transloca a una región de 5,8 Kilobases (Kb), localizada en 22q11, conocida con el nombre de "major breakpoint cluster region" (M-bcr). Esta región consta de 4 exones y se encuentra mapeada conteniendo un gran número de sitios de restricción para diferentes enzimas<sup>2</sup>. Se dispone de sondas genéticas correspondientes a esta región que permiten realizar estudios de los reordenamientos que se producen.

Aproximadamente un 5% de los casos de LMC no presentan el marcador citogenético aunque la translocación ocurre a nivel molecular, hecho que se demuestra al realizar estudios moleculares<sup>3</sup>. Algunos autores como Kurzrock y cols.<sup>4</sup> distinguen otro tipo de LMC sin marcador citogenéti-

co y sin alteración molecular en la región bcr.

Un 20% de los casos de leucemia aguda linfoblástica (LAL) del adulto y entre un 6-8% de las infantiles presentan el marcador citogenético Ph, indistinguible a nivel citogenético del que se observa en los casos de LMC. Los estudios moleculares han puesto de manifiesto que aproximadamente la mitad de los casos con LAL Ph positivo reordenan en la misma región que los casos con LMC, mientras que los restantes lo hacen en una amplia zona correspondiente al primer intrón del gen BCR<sup>5</sup>.

La distribución de los puntos de rotura en LMC y LAL Ph positivos se puede obtener usando diferentes sondas y enzimas de restricción. Esta distribución es independiente de la localización geográfica de los pacientes.

Para llevar a cabo el estudio nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Ampliación y aislamiento de las sondas génicas.

2. Selección de pacientes susceptibles de estudio en función a criterios hematológicos y citogenéticos; estos últimos

según el estudio llevado a cabo en médula ósea y/o sangre periférica.

3. Detección de reordenamientos y localización de los puntos de rotura.

4. Caracterización de las LMC Ph negativo y LAL Ph positivo según los resultados moleculares.

5. Establecer el grado de informatividad de las distintas enzimas de restricción y sondas génicas.

6. Determinar si los resultados obtenidos en pacientes de la Comunidad Foral de Navarra son similares a los obtenidos por otros grupos de trabajo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha llevado a cabo estudio citogenético y molecular en 51 muestras correspondientes a 33 pacientes distribuidos de la siguiente manera: 19 LMC; 2 LAL positivo; 1 Leucemia Aguda no Linfoblástica (LANL) tipo M1; 11 posibles LMC.

La metodología empleada ha sido la siguiente:

### 1. Estudio citogenético

- Cultivos directos, 24 y/o 48 horas sin mitógeno de las muestras de médula ósea y/o sangre periférica.

- Obtención de células en metafase añadiendo colchicina; sacrificio del cultivo y extensiones sobre portaobjetos. Posteriormente se procede al estudio al microscopio de los cromosomas mediante técnica de bandeado.

### 2. Estudio molecular

- El ADN extraído de las muestras se ha digerido con las diferentes enzimas de restricción (Bam HI, Bgl II, Eco RI y Hind III) separando los fragmentos obtenidos en geles de agarosa al 0,8% mediante electroforesis.

- Southern blot a filtros de nylon sobre los que se ha realizado la hibridación con las sondas marcadas radiactivamente (3'bcr, 5'bcr y BB1). Finalmente se procede a un lavado y exposición de los filtros a la película autorradiográfica a -70°C con posterior revelado y análisis de los resultados. Para la localización de los puntos de rotura en la región M-bcr la hemos dividido en

4 zonas (F1, F2, F3 y F4) en función de las dianas de restricción.

## RESULTADOS

De los 19 pacientes con LMC Ph positivo 17 presentan translocación estándar t(9; 22) (q34; q11) y en 2 se han observado translocaciones variantes t(3; 9; 22) y t(5; 9; 22). Se ha obtenido reordenamiento, dentro de la región M-bcr con la sonda 3'bcr y/o 5'bcr, en los 19 casos, siendo la distribución de los puntos de rotura: 8 casos en F1; 5 en F2; 4 en F3; 1 en F4 y 1 sin determinar.

El grado de informatividad en la detección del reordenamiento de las 4 enzimas usadas en combinación con la sonda 3'bcr ha sido el siguiente: Bam HI 53%; Bgl II 94%; Eco RI 89%; Hind III 24%. Las combinaciones Bam HI+Bgl II y Bgl II+Hind III han detectado el 100% de los reordenamientos, siendo los porcentajes inferiores en el resto resultando la inferior a Bam HI+Hind III con un 53%.

Los 2 casos con LAL Ph positivo han mostrado reordenamiento, uno en la región M-bcr y el otro en el primer intrón del gen BCR usando la sonda BB1.

El caso con LANL tipo M1 y Ph "like" no ha reordenado ni con las sondas de la región M-bcr no con las del primer intrón.

De los 11 casos con sospecha de LMC, 5 no tienen resultado citogenético por problemas técnicos; los otros 6 no han mostrado la presencia del cromosoma Ph. Ninguno de los 11 han reordenado con las sondas de la región M-bcr.

## DISCUSIÓN

La t(9; 22) (q34; q11), estándar, aparece en el 95% de los casos de LMC Ph positivo. El trabajo presentado por De Braekeleer<sup>6</sup> muestra una frecuencia de translocaciones variantes a la estándar en torno al 4,5%. En el presente trabajo este porcentaje es más elevado, en torno al 10%, aunque el número de casos es algo escaso para considerar este dato relevante.

Los puntos de rotura en el gen BCR ocurren en una zona relativamente pequeña de 5,8 Kb denominada M-bcr<sup>7</sup>. Esta región

consta de 4 exones correspondientes a los exones 12 al 15 del gen BCR, dependiendo si el punto de rotura incluye o no al exón 3 en el ARNm quimérico consideramos la rotura en la región 5'(F1+F2) o 3'(F3+F4) de M-bcr. Los distintos grupos de trabajo en este campo estudian la distribución de los puntos de rotura en la región M-bcr; diez son los trabajos más representativos en cuanto a número de pacientes estudiados, los valores medios obtenidos son 55% de roturas en la región 5' y 45% en 3'. Los resultados obtenidos en el presente trabajo, 70% de roturas en 5' y 25% en 3', no se ajustan a los valores medios obtenidos por otros grupos de trabajo, al igual que la serie publicada por Ogawa y cols.<sup>8</sup>. Esto puede ser debido al número pequeño, de casos estudiados o a la pequeña variación que se produce en la división de M-bcr así como las diferentes sondas utilizadas por los grupos de trabajo.

En la formación del cromosoma Ph como consecuencia de la translocación es frecuente encontrarnos con deleciones<sup>9</sup> que suelen ser más frecuentes en la región 3' de M-bcr. En algunos casos la presencia de estas deleciones hace imposible detectar los reordenamientos dentro de la región M-bcr usando únicamente la sonda 3'bcr. Esto es lo que ocurre con uno de los casos del presente estudio que sólo ha reordenado con la sonda 5'bcr y por eso no ha sido posible localizar el punto de rotura en M-bcr aunque sí detectar el reordenamiento molecular. Este hecho pone de manifiesto la necesidad de llevar a cabo los estudios con más de una sonda para evitar los falsos negativos. Un hecho similar ocurre con las enzimas de restricción, no siendo posible detectar todas las roturas empleando una sola enzima sino que es necesario utilizar al menos 2 combinadas como son los casos de Bam HI+Bgl II y Hind III+Bgl II con las cuales se ha detectado el 100% de los reordenamientos dentro de M-bcr con la sonda 3'bcr. No obstante, a pesar de usar varias enzimas y sondas en ocasiones no es posible detectar la translocación a nivel molecular porque ésta se produce fuera de la región M-bcr. Este hecho se ha visto en contadísimas ocasiones como es el caso del trabajo presentado por Saglio y cols.<sup>10</sup> donde describe dos

pacientes con la rotura situada en la porción 3' del gen BCR. Negrini y cols.<sup>11</sup> describen un nuevo caso con la rotura en el extremo 5' del gen BCR idéntico al encontrado por Saglio y cols.<sup>12</sup> en 2 pacientes. Los 5 casos corresponden al norte de Italia habiéndose sugerido alguna correlación geográfica.

Gracias al empleo del estudio molecular es posible descartar la sospecha de LMC en aquellos pacientes en los que no se puede llevar a cabo el estudio citogenético o éste no es concluyente como es el caso de 5 casos del presente trabajo. En ocasiones el cromosoma Ph no se detecta citogenéticamente porque se encuentra en un porcentaje bajo y no se observa en las células estudiadas en división; la utilización de sondas moleculares solventa en gran medida este problema. En 6 casos de nuestro trabajo se llevó a cabo el estudio molecular de la región M-bcr por ser sospechas clínicas de LMC a pesar de no tener cromosoma Ph en el estudio citogenético. Es de todos sabido la existencia de los casos de LMC Ph negativo bcr positivo cuyo comportamiento a nivel clínico y hematológico es idéntico a aquellos con cromosoma Ph puesto que la translocación existe pero no es posible detectarla a nivel citogenético. Algo similar ocurre con los casos que se sospecha de la existencia del cromosoma Ph pero su presencia no se puede confirmar o descartar con el estudio citogenético debido a la existencia de translocaciones complejas que incluyen al cromosoma 22 y pueden dar lugar al fenómeno conocido como Ph "enmascarado". También puede producirse una translocación que ocasione la presencia de un cromosoma 22q-, Ph "like", como ocurre en el caso de LANL tipo M1 de nuestro trabajo; en estos casos donde la citogenética no nos saca de dudas es necesario llevar a cabo un estudio molecular completo para descartar la presencia de la translocación, como ocurrió en nuestro caso.

Aunque a nivel citogenético el cromosoma Ph de las LAL Ph positivo es idéntico al observado en las LMC, a nivel molecular se observa como aproximadamente el 50% de los casos de LAL Ph positivo presentan el punto de rotura en la misma región que la LMC mientras que el 50% restante tienen

el reordenamiento en la zona del primer intrón del gen BCR. El ARNm híbrido y la proteína que se obtiene en estos últimos casos son diferentes a los de la LMC<sup>13</sup>. La presencia del cromosoma Ph en pacientes con LAL, especialmente en niños, es un factor de mal pronóstico debido a los problemas para alcanzar la remisión y a una menor supervivencia. Los estudios encaminados a tratar de ver si existían diferencias significativas entre pacientes con reordenamiento en una u otra zona son escasos; Kantarjian y cols.<sup>14</sup> estudian un grupo de 32 pacientes concluyendo que el resultado molecular no está asociado con diferencias significativas a nivel clínico, hematológico, citogenético y no tiene implicación en el pronóstico. Los 2 casos con LAL Ph positivo estudiados en el presente trabajo se ajustan a estos resultados ya que uno de ellos reordena en la región M-bcr y el otro en el primer intrón del gen BCR. En ocasiones no es posible detectar todas las roturas que se producen en el primer intrón debido al gran tamaño de éste lo que imposibilita su estudio completo con sondas y Southern. Para un estudio completo de esta zona se requiere utilizar otras técnicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) o una electroforesis especial que permite separar y trabajar con grandes fragmentos de ADN.

Con cualquiera de las técnicas disponibles resulta de gran interés el confirmar o descartar la presencia del cromosoma Ph debido a la repercusión que ello tiene a nivel clínico.

En el presente trabajo se han encontrado las siguientes conclusiones:

1. Todos los casos con LMC Ph positivo han mostrado reordenamiento utilizando las sondas 3'bcr y 5'bcr. El estudio molecular usando más de una sonda es una herramienta fiable para el diagnóstico de este trastorno hematológico.

2. La distribución de los puntos de rotura en la región M-bcr ha sido: 70% región 5' y 25% en la región 3'; en el 5% restante no se ha podido determinar con exactitud. Estos resultados no se ajustan totalmente a los publicados por otros autores; este hecho puede ser debido al tamaño de nuestra muestra o deberse en

realidad a diferencias geográficas de la población estudiada.

3. La informatividad de la enzima Bgl II con la sonda 3'bcr ha sido la mayor detectándose un 94% de las roturas. El 100% de los reordenamientos se ha detectado utilizando las enzimas Bam HI+Bgl II y Bgl II+Hind III.

4. Para confirmar o descartar el reordenamiento en la región M-bcr es necesario utilizar más de una sonda y más de una enzima de restricción.

5. En los casos de LAL Ph positivo el estudio molecular hay que llevarlo a cabo en la región M-bcr y en el primer intrón del gen BCR. Un 50% de los casos reordenan en una zona y el 50% restante en la otra.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ROWLEY JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identifies by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 1973; 243: 290-291.
2. HEISTERKAMP N, STAM K, GROFFEN J, DE KLEIN A, GROSVELD G. Structural organisation of the bcr gen and its role in the Ph translocations. *Nature* 1985; 315: 758-759.
3. OHYASHIKI JH, OHYASHIKI K, TOYIMA K. Analysis of DNA from cells fixed in Carnoy's solution for cytogenetic study. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 34: 159-163.
4. KURZROCK R, KANTARJIAN HM, SHTALRID M, GUTTERMAN JU, TALPAZ M. Ph chromosome-negative chronic myelogenous leukemia without bcr rearrangement: A chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 1990; 75: 445-452.
5. CHEN SJ, CHEN Z, HILLION J, GRANSZ D, LIOSEAU P, FLANDRIN G et al. Ph1 positive, bcr-negative acute leukemias: clustering of breakpoints on chromosome 22 in the 3' end of the BCR gen first intron. *Blood* 1989; 73: 1312-1315.
6. DE BRAEKELEER. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia. *Cytogenet Cell Genet* 1987; 44: 215-222.
7. BLENNERHASSETT GT, JURTH ME, ANDERSON A, BURNS JP, CHAGANTI RSK, BLICK M et al. Clinical evaluation of a DNA probe assay for the Ph translocation in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia* 1988; 2: 648-657.
8. OGAWA H, SUGIYAMA H, SOMA T, MASSAOCKA T, KISHIMOTO S. No correlation between locations of bcr breakpoints and clinical states

ANÁLISIS MOLECULAR DE LEUCEMIAS Ph POSITIVO Y VARIANTES

- in Ph-positive CML patients. *Leukemia* 1989; 3: 492-496.
9. POPENOE DW, SCHAEFER-REGO K, MEARS JG, BAUKS S, LEIBOWITZ D. Frequent and extensive deletion during the (9; 22) translocation in CML. *Blood* 1986; 68: 1123-1128.
  10. SAGLIO G, GUERVASIO A, ROSSO C, ZACCARIA A, TASSINARI A, SERRA A et al. New type of bcr/abl junction in Ph chromosome-positive CML. *Blood* 1990; 76: 1819-1824.
  11. NEGRINI M, TALLARICO A, PAZZI I, CASTAGNOLI A, CUNEO A, CASTOLDI GL. A new chromosomal breakpoint in Ph positive, bcr negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 61: 11-13.
  12. SAGLIO G, GUERVASIO A, TASSINARI C, PONRETTO A, ZACCARIA A, TESTONI P et al. Variability of the molecular defects corresponding to the presence of a Ph chromosome in human hematologic malignancies. *Blood* 1988; 72: 1203-1208.
  13. HERMANS A, HEISTERKAMP N, VON LINDEM M, VAN BAAL S, MEJER D, VAN DER PLAS D et al. Unique fusion of bcr and c-abl genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 1987; 51: 33-40.
  14. KANTARJIAN HM, TALPAZ M, DINGRA K, ESTEY E, KEATING MJ, KU S et al. Significance of the P210 versus P190 molecular abnormalities in adults with Ph chromosome-positive acute leukemia. *Blood* 1991; 78: 2411-2418.