

MARZO 2020

Gen HER2 amplificado en CA de mama



FISH en un corte tumoral de cáncer de mama. Sondas CytoCell HER2 (ERBB2), 17q12, Roja; y D17Z1, 17p11.1-q11.1, Verde.

► Contenido

1. Mutaciones en el gen **NPM1** en LMA
2. Sondas FISH para Mosaicismos Críticos del X
3. Sondas FISH para Mieloma Múltiple
4. Revisión de Literatura



Autores:

- Mauricio Camargo (MSc, PhD, Univ.Minnesota)
- Paula A. Rozo (Bact., MSc., U.de A.)
- Diana C. Sarrazola (Microb., MSc., U.de A.)
- Olga Zea (Biol., Esp. Citog., U.de A.)

Imagen carátula:

- Fotomicrografía tomada en GenéticaLab por Diana Sarrazola.

1 Mutaciones en el gen NPM1 en LMA

Gen *NPM1* y proteína NPM: El gen *NPM1* contiene 12 exones y está mapeado en el extremo del brazo largo del cromosoma 5, locus 5q35. Codifica la proteína multifuncional nucleofosmina (NPM), que se desplaza entre el nucléolo, el núcleo y el citoplasma. En condiciones normales, predomina la importación nuclear; pero, como veremos más adelante, cuando *NPM1* muta, predomina la sobreexpresión en el citoplasma de las células leucémicas en la LMA, afectando gran variedad de funciones intracitoplásmicas.

Dado que NPM es una chaperona multi-dominio, tiene la propiedad de unirse a distintas proteínas incluyendo histonas, factores de transcripción, proteínas involucradas en el control de la progresión del ciclo celular y la apoptosis; también es importante en la biogénesis de ribosomas, en la regulación de la duplicación del centrosoma y en el control de la ploidía. A través de su dominio C-terminal también se une al ADN/ARN. Por tanto, funcionalmente participa en diversos procesos intracelulares, destacándose el mantenimiento de la estabilidad genómica a través del control de la segregación cromosómica y la reparación del ADN.

Mutaciones en *NPM1*: Las mutaciones somáticas en el exón 12 del gen *NPM1* son hasta el presente la anomalía genética más frecuente en adultos con leucemia mieloide aguda (LMA) *de novo*. Se encuentran en cerca del 35% de ellos, y en hasta el 60% de aquellos con cariotipo normal. En niños con LMA estas mutaciones son menos frecuentes, encontrándose en 8-10% de todos los casos pediátricos de LMA, y en alrededor del 25% de aquellos con cariotipo normal. Y notablemente el 85-90% de los pacientes con LMA con diferenciación monocítica, tienen mutaciones en *NPM1*.

Las LMA mutantes para la nucleofosmina citoplásmica (NPMc+) tienen importante significancia diagnóstica ya que en ausencia de la mutación *FLT3*-ITD (o con ratio bajo) se han descrito como LMAs de pronóstico favorable.

En la **Tabla 1** se describen los factores citogenómico más importantes que a la fecha se asocian a riesgos favorables, intermedios o adversos en la LMA.

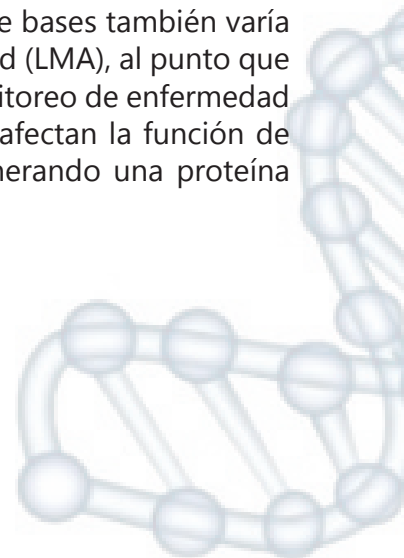
Tabla 1. Estratificación de riesgos según genética (ELN) (Döhner et al., 2017)

CATEGORÍA DEL RIESGO (1)	ANORMALIDAD GENÉTICA	Tabla 1. Tomado de las guías NCCN 2019 (Altman et al., 2019).
FAVORABLE	t(8;21)(q22;q22.1) NPM1 mutado con FLT3-ITD negativo o ratio bajo.(2) inv(16)(p13.1q22) o t(16;16) (p13.1;q22) Mutación bialélica en CEBPA	(1) El impacto pronóstico de los marcadores es dependiente de la terapia, y puede cambiar con las nuevas terapias.
INTERMEDIO	NPM1 mutado con FLT3-ITD ratio alto. NPM1 no mutado sin FLT3-ITD o ratio bajo. t(9;11)(p21.3;q23.3). (3) Anormalidades citogenéticas no-clasificadas como favorables o adversas. ⁴	(2) El concepto de ratio alélico bajo (<0.5) o alto (>0.5) se explicó en el boletín anterior en la sección de FLT3. (3) La presencia de t(9;11) (p21.3;q23.3) suele predecir y coexistir con la aparición de mutaciones de riesgo adverso.
ADVERSO	NPM1 negativo con FLT3-ITD ratio alto t(6;9) (p23;q34.1) t(v;11q23.3) t(9;22)(q34.1;q11.2) inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3) (q21.3;q26.2) -5 o del(5q); -7; 17p- Cariotipo complejo (4) o monosomal (5) RUNX1 o ASXL1 mutado (6) TP53 mutado y cariotipo complejo o mono-somal	(4) Es la presencia de 3 o más alteraciones cromosómicas, excluyendo las recurrentes según la OMS como son t(8;21), inv(16), t(16;16), t(9;11), t(v;11) (v;q23.3), t(6;9), inv(3), t(3;3). (5) Monosomía sencilla. (6) no se consideran de pronóstico adverso si concurren con marcadores de riesgo favorable.

De otro lado, aunque se han descrito cerca de 50 variantes génicas en el gen **NPM1**, ~95% de los casos consisten en la inserción de un tetranucleótido en el exón 12 entre las posiciones 956 a 959. Y cuando se examina la secuencia del inserto tetranucleotídico, la composición de bases también varía entre pacientes, pero permanece estable durante la progresión de la enfermedad (LMA), al punto que algunos autores han propuesto que dicha mutación pudiese ser útil para el monitoreo de enfermedad mínima residual. Así, aunque entre pacientes hayan variantes génicas, todas afectan la función de la NPM, ya que la inserción de 4 nucleótidos altera el marco de lectura, generando una proteína estructural y funcionalmente alterada.

Las variantes más frecuentes se describen en la siguiente tabla:

TIPO DE VARIANTE	NUCLEÓTIDOS	FRECUENCIA
VARIANTE A	TCTG	80%
VARIANTE B	CATG	10%
VARIANTE D	CCTG	5%
OTRAS	-	Raras



Metodología para la detección de la mutación común en NPM1

En **GeneticaLab** empleamos la técnica convencional de amplificar el segmento que flanquea el locus de la mutación, empleando primers (cebadores) alelo-específicos, PCR y electroforesis en agarosa. Luego de la confirmación cualitativa, los amplificados se corren en electroforesis capilar y el resultado se lee y cuantifica mediante un software, generando electroferogramas como el que aparece a continuación en la Figura 1.

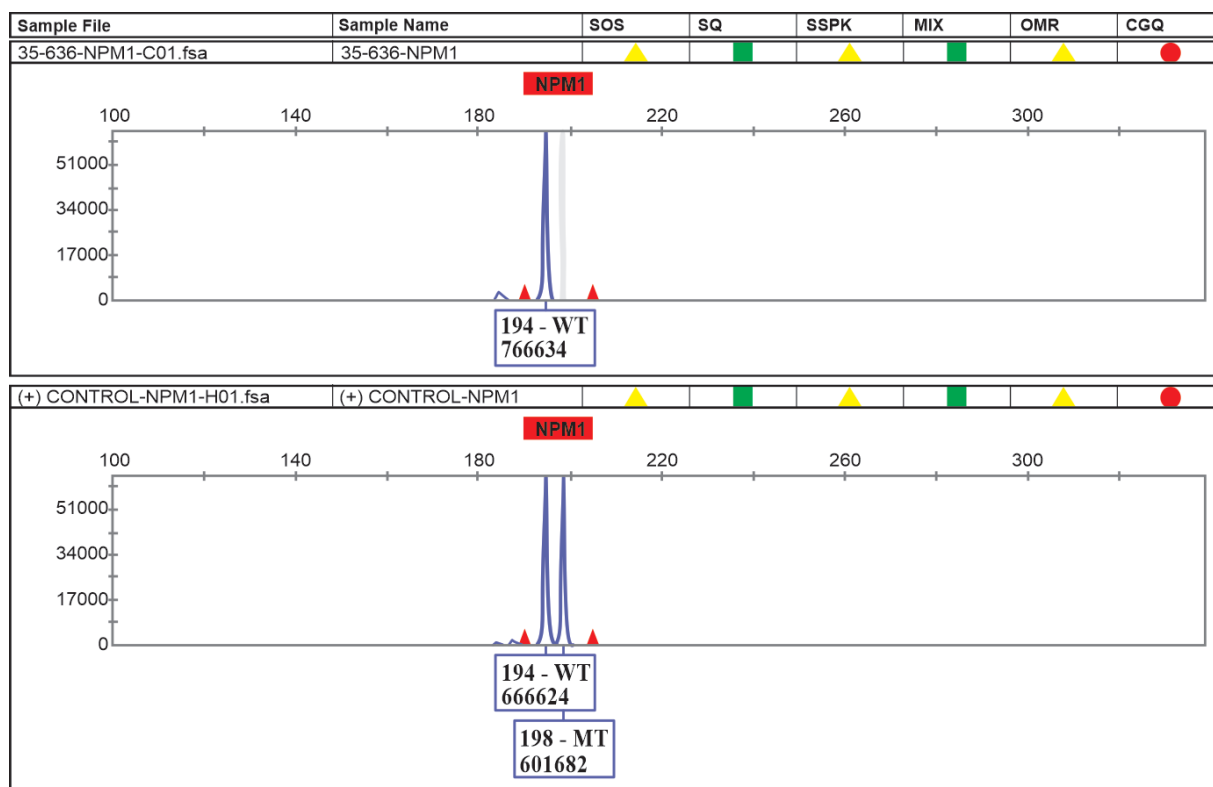


Figura 1. El cuadro superior muestra la amplificación del alelo silvestre homocigoto para *NPM1* no mutado. El cuadro inferior corresponde a un paciente atendido en **GeneticaLab**, y muestra la amplificación de dos alelos, uno no mutado (izquierda) y el mutado a la derecha (heterocigoto). Nótese que la diferencia en pares de bases es de 4 (198-194), lo cual corresponde exactamente al tamaño del tetranucleótido insertado (mutación).



► Referencias

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
- Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740-3746. doi:10.1182/blood-2005-05-2164.
- Döhner H, Estey E, Grimwade D, et al. Global Acute Myeloid Leukemia Epidemiology and Patient Flow Analysis 2016. *Blood*. 2017;129(4):424-448. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.424.
- Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): Biologic and clinical features. *Blood*. 2007;109(3):874-885. doi:10.1182/blood-2006-07-012252.
- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*. 2005;352(3):254-266. doi:10.1056/NEJMoa041974.
- Lagunas-Rangel FA, Pérez-Contreras VA, Cortés-Penagos C. FLT3, NPM1 y C/EBPa como marcadores de pronóstico en pacientes con leucemia mieloide aguda. *Rev Hematol Mex* 2015; 16:152-167.
- NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines), Acute Myeloid Leukemia, Version 3.2020 - December 23, 2019.

//

2 Sondas FISH para Mosaicismos Crípticos del X

La mala segregación de los cromosomas sexuales en niños nacidos vivos, es varias veces superior a la de cualquier otro cromosoma humano (Zijno et al., 1996). Las razones aún se desconocen, pero este concepto es fundamental para comprender la incidencia de mosaicismos clásicos o de mosaicismos crípticos del cromosoma X en casos clínicos como el de falla ovárica prematura (POF), o en niñas o infantes con talla baja de origen no-endocrino.

Tradicionalmente, el cariotipo convencional se ha empleado para determinar los diferentes tipos de mosaicismos de cromosomas sexuales. Sin embargo, dicha detección es laboriosa cuando el porcentaje de células aneuploides es bajo, ya que requiere el análisis de un número mayor de metafases. Por ejemplo, si uno evalúa (n) número de metafases, y encuentra que todas tienen el mismo cariotipo, qué grado de mosaicismo podría quedar excluido con una confiabilidad del 95%? En teoría para el caso de un mosaicismo tipo 46,XX/45,X (90:10), se requiere evaluar un mínimo de 29 células (Tabla 2). Este número aumenta a un mínimo de 149 células si dicho mosaicismo es tipo 46,XX/45,X (98:2) (Hook, 1977).

A continuación, en la Tabla 2 se transcriben valores calculados por Hook en su clásico artículo de 1977, para algunos valores teóricos de células analizadas (n).

Tabla 2. Grado o porcentaje de mosaicismos excluibles con una confiabilidad de 0.90 Y 0.95, Teniendo en cuenta un número (n) de células evaluadas que resultaron con idéntico cariotipo.

No. de células (n) a analizar	Niveles de Confiabilidad	
	0.90	0.95
10	21 %	26 %
20	11 %	14 %
30	8 %	10 %
40	6 %	8 %
50	5 %	6 %
60	4 %	5 %
70	4 %	5 %
80	3 %	4 %
90	3 %	4 %
100	3 %	3 %
120	2 %	3 %
150	2 %	2 %

La Tabla 2 muestra el grado (%) de mosaicismo que se excluiría (no se detectaría) considerando el número de células analizadas y 2 niveles de confiabilidad (0.90 y 0.95).

Por ejemplo, si se evalúan 50 células, y no se detectó mosaicismo, el mínimo porcentaje de mosaicismo que se escaparía del análisis sería del 6% a un nivel de confiabilidad del 95% (0.95).

También se observa que para el caso de **un mosaicismo críptico (ej., 3%), el número ideal de células a analizar sería cercano a n=100.**

De lo anterior se deriva que los cariotipos convencionales, en donde (n) suele ser 30 metafases, no son apropiados para detectar mosaicismos del orden del 8-10% a un nivel de confiabilidad de 0.90-0.95.

En cambio, el método molecular tipo FISH ofrece la posibilidad de una rápida y costo-efectiva valoración de mosaicismos "crípticos" con aneuploidías de cromosomas sexuales (siendo el más común el 46,XX/45,X) ya que permite evaluar cientos de células interfásicas en un tiempo breve (horas) y sin la necesidad de cultivos celulares como ocurre en el caso de linfocitos en sangre periférica o amniocitos en líquido amniótico. Esto se realiza en **GeneticaLab** empleando la sonda coctel DXZ1 y DYZ3 que hibrida a los respectivos centrómeros en los cromosomas X y Y.

Con este nuevo nivel de resolución, han surgido varios estudios que expanden el concepto del mosaicismo de bajo nivel (ej.<10%) o del mosaicismo críptico (ej.<5%) a otras áreas clínicas como la talla baja no endocrina y la falla ovárica prematura (POF) en mujeres fenotípicamente normales. Y sugieren que los estudios con sondas FISH para cromosomas sexuales, deberían considerarse en aquellos casos de POF esporádicos e inexplicados. Este punto de vista tiene implicaciones prácticas para la asesoría genética, y en especial, para los tratamientos de infertilidad femenina.

Finalmente, cabe resaltar también que la detección de bajos niveles de mosaicismo que involucren al cromosoma Y, es de crucial importancia, dada la bien conocida asociación entre la presencia de material Y eucromático, y el aumento del riesgo para el desarrollo de gonadoblastoma u otros tumores gonadales, reforzando así la sugerencia del uso de sondas coctel FISH X/Y para refinar el cariotipo, el pronóstico y la asesoría genética del paciente.

► Referencias

- Ayed W, Amouri A, Hammami W, Kilani O, Turki Z, Harzallah F, Bouayed-Abdelmoula N, Chemkhi I, Zhioua F, Slama CB. Cytogenetic abnormalities in Tunisian women with premature ovarian failure. *C R Biol.* 2014 337(12):691-4 (2014). doi: [10.1016/j.crv.2014.09.003](https://doi.org/10.1016/j.crv.2014.09.003).
- Baronchelli S, Conconi D, Panzeri E, Bentivegna A, Redaelli S, Lissoni S, Saccheri F, Villa N, Crosti F, Sala E, Martinoli E, Volontè M, Marozzi A, Dalprà L. Cytogenetics of premature ovarian failure: an investigation on 269 affected women. *J Biomed Biotechnol.* 370195 (2011). doi: [10.1155/2011/370195](https://doi.org/10.1155/2011/370195).
- Gersak K, Gersak ZM. Chromosomal Abnormalities and Menstrual Cycle Disorders. Intech, Chapter 6, 105-121 (2017).
- Gersak K, Veble A. Low-level X chromosome mosaicism in women with sporadic premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online.* 22(4):399-403 (2011). doi: [10.1016/j.rbmo.2011.01.002](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2011.01.002).
- Lakhal B, Braham R, Berguigua R, Bouali N, Zaouali M, Chaieb M, Veitia RA, Saad A, Elghezal H. Cytogenetic analyses of premature ovarian failure using karyotyping and interphase fluorescence in situ hybridization (FISH) in a group of 1000 patients. *Clin Genet.* 78(2):181-5 (2010). doi: [10.1111/j.1399-0004.2009.01359.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01359.x).
- Zijno A, Leopardi P, Marcon F, Crebelli R. Sex chromosome loss and non-disjunction in women: analysis of chromosomal segregation in binucleated lymphocytes. *Chromosoma.* 104(6):461-7 (1996).



3

Sondas FISH para Mieloma Múltiple

La citogenética del mieloma múltiple se ha enriquecido en los últimos años gracias al uso de la hibridación in situ fluorescente (FISH), y a la separación magnética específica de células plasmáticas. En un principio, la citogenética convencional (con bandejo G o R) no producía los resultados de hoy por el reducido número de células plasmáticas en médula ósea, su bajo índice mitótico y la dificultad de realizar los análisis puntuales en las células plasmáticas. Pero con la técnica FISH no se requieren células en división ni poblaciones celulares abundantes. Y con la separación inmuno-magnética con CD-138 de células plasmáticas, se garantiza la especificidad del análisis, como explicaremos más adelante.

Gracias a ello, actualmente sabemos que desde las fases iniciales del MM, como son la “**gamopatía monoclonal de significado indeterminado**” y el “**MM-latente**” (en inglés MGUS y SMM, respectivamente), aparecen anomalías cromosómicas primarias clonales, específicas de cada estadio. Y cuando la progresión de la enfermedad pasa de SMM al MM pleno, el tránsito está asociado con anomalías cromosómicas secundarias sub-clonales.

Algunas anomalías aparecen al momento de la transformación inicial de una célula plasmática normal a un clon proliferativo inicial; mientras que otras surgen posteriormente, durante el progreso latente de la enfermedad hacia el curso maligno, y luego, al estado de recaída refractaria. Sin embargo, cabe aclarar que algunas anomalías pueden implicar significados diferentes según la fase de la enfermedad. Por ejemplo, las trisomías están asociadas a un alto riesgo de transformación de SMM a MM, pero a un bajo riesgo de progresión desde MM hacia adelante.

De otro lado, recordemos que el Mieloma Múltiple (MM) es una de las neoplasia hematológicas más comunes, y consiste en varios subtipos citogenéticos. En las prácticas actuales en países desarrollados o en laboratorios de mayor complejidad, la citogenética y el FISH se aplican de rutina en muestras con diagnóstico de MM, en las cuales se han detectado varios subtipos citogenéticos, como son: trisomías o translocaciones que involucran las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgH) en el locus cromosómico 14q32.

El subgrupo con translocaciones lo conforman las translocaciones IgH más comunes: t(11;14), t(4;14), t(14;16), t(14;20) y t(6;14). De manera interesante, se ha descubierto que el pronóstico proliferativo varía con el subtipo citogenético. Por ejemplo, las anomalías t(4;14), t(14;16), t(14;20) y del17p son claros marcadores de riesgo desfavorable de progresión del mieloma (**Tablas 3 y 4**).

Tabla 3. Estratificación del riesgo de Mieloma basada en citogenética

Estratificación de riesgo	Anormalidades citogenéticas
Riesgo estándar	<ul style="list-style-type: none"> • Trisomías • t(11;14) • t(6;14)
Riesgo intermedio	<ul style="list-style-type: none"> • t(4;14) • Ganancia (1q21)
Riesgo alto	<ul style="list-style-type: none"> • Deleción (17p) • t(14;16) • t(14;20) • Deleción (1p)

Am J Hematol. 89(10):999-1009 (2014) Review

Tabla 4. Resumen en solo dos grupos de riesgo según las características citogenéticas

Riesgo Alto	Riesgo estándar
<ul style="list-style-type: none"> • FISH: t(4;14), t(14;20), deleción (17/17p), ganancia (1q) • Cariotipo no hiperdiploide • Cariotipo con deleción en 13q • Alto riesgo basado en el perfil de expresión génica 	<ul style="list-style-type: none"> • Todos los demás incluyendo FISH: t(11;14), t(6;14)

Blood Cancer Journal (2015) 5, e365; doi:10.1038/bcj.2015.92

Varios estudios también han evidenciado, a su vez, que el mencionado subgrupo de 4 marcadores desfavorables muestra una tasa de supervivencia global inferior cuando se compara con el subgrupo de pacientes con las translocaciones t(11;14), t(6;14) y trisomías (Tabla 5). Y la combinación de 3 o más alteraciones cromosómicas confiere riesgo máximo con menos de 2 años de supervivencia. Sin embargo, cabe aclarar que el pronóstico en pacientes que posean estas anomalías citogenéticas, puede variar según la terapia escogida. La Tabla 5 provee una visión concisa sobre la interpretación de los resultados citogenéticos en MM y su relevancia en la práctica clínica

Tabla 5. Guía práctica para la interpretación de anomalías citogenéticas detectadas por FISH en la práctica clínica.

Anormalidad citogenética	Escenario clínico en el que se detecta anomalía	
	SMM	MM
Trisomías	Riesgo intermedio de progresión, con una mediana de TTP de 3 años.	<ul style="list-style-type: none"> • Buen pronóstico, riesgo estándar de MM, con una mediana de OS de 7 a 10 años • Al diagnóstico la mayoría tiene mieloma con compromiso óseo. • Excelente respuesta a la terapia basada en lenalidomida.
t(11;14) (q13;q32)	Riesgo estándar de progresión, con una mediana de TTP de 5 años.	<ul style="list-style-type: none"> • Buen pronóstico, riesgo estándar de MM, con una mediana de OS de 7 a 10 años.

Anormalidad citogenética	Escenario clínico en el que se detecta anomalía	
	SMM	MM
t(6;14) (p21;q32)	Riesgo estándar de progresión, con una mediana de TTP de 5 años.	• Buen pronóstico, riesgo estándar de MM, con una mediana de OS de 7 a 10 años.
t(4;14) (p16;q32)	Riesgo alto de progresión, con una mediana de TTP de 2 años.	• Riesgo intermedio de MM, con una mediana de OS de 5 años. • Requiere terapia inicial basada en bortezomib y un ASCT temprano (si es candidato), seguido de terapia de consolidación/mantenimiento basado en bortezomib.
t(14;16) (q32;q23)	Riesgo estándar de progresión, con una mediana de TTP de 5 años.	• Alto riesgo de MM, con una mediana de OS de 3 años. • Se asocia con altos niveles de FLC y un 25% presentan falla renal aguda como MDE.
t(14;20) (q32;q11)	Riesgo estándar de progresión, con una mediana de TTP de 5 años.	• Alto riesgo de MM, con una mediana de OS de 3 años.
Ganancia(1q21)	Riesgo alto de progresión, con una mediana de TTP de 2 años.	• Riesgo intermedio de MM, con una mediana de OS de 5 años.
Delección(17p)	Riesgo alto de progresión, con una mediana de TTP de 2 años.	• Alto riesgo de MM, con una mediana de OS de 3 años.
Trisomías, mas cualquiera de las traslocaciones IgH	Riesgo estándar de progresión, con una mediana de TTP de 5 años.	• Puede mejorar el pronóstico adverso que confieren las traslocaciones IgH de alto riesgo y la delección (17p)
Monosomía 13 sola o monosomía 14 sola	Riesgo estándar de progresión, con una mediana de TTP de 5 años.	• Su efecto en el pronóstico no es claro
Cariotipo Normal	Riesgo bajo de progresión, con una mediana de TTP de 7 a 10 años.	• Buen pronóstico; probablemente es el reflejo de baja carga tumoral; con una mediana de OS >7 a 10 años.

Abreviaturas: ASCT, autotrasplante de células madre; FLC, cadena ligera libre; IgH, cadena pesada de inmunoglobulina; MDE, evento que define mieloma; MM, mieloma múltiple; OS, supervivencia global; SMM, mieloma múltiple latente; TTP, tiempo de progresión.

Traducido del *Blood Cancer Journal* (2015) 5, e365; doi:10.1038/bcj.2015.92

Anormalidades cromosómicas primarias. En términos generales, las anomalías citogenéticas primarias en pacientes con MM son trisomías y translocaciones monoclonales. Estas translocaciones primarias usualmente involucran el locus 14q32.33 de la inmunoglobulina de cadena pesada (IgH) en el cromosoma 14 (cromosoma “receptor”), y un segmento de otro “cromosoma donador”, siendo los más comunes los cromosomas 4, 6, 11, 14 y 20, resultando en las translocaciones descritas en las Tablas 3 y 4. Este evento de recombinación ocurre en la región variable del locus de IgH que contiene potenciadores génicos (enhancers), alterando la expresión génica de los genes vecinos en el “cromosoma donador” como son los genes *FGFR3* y *MMSET* en el locus *4p16*, *CCND3* en *6p21*, *CCND1* en *11q13*, *MAF* en *6q23* y *MAFB* en *20q12*.

Las particularidades clínicas y pronósticas de cada translocación a llevado a que el “*International Myeloma Working Group*” (IMWG) proponga que cada subtipo citogenético se considere como una neoplasia distintiva de células plasmáticas, y que solo se agrupan para efectos de manejo clínico (**Tabla 5**).

Anormalidades cromosómicas secundarias. Las más comunes son la monosomía 13 y la delección 13q que se detectan en 35–40% y 6–10% de pacientes, respectivamente. También son comunes la monosomía 17 o la pérdida del brazo corto 17p, asociada a la pérdida del gen TP53. Y la delección 1p-, o la amplificación/ganancia en 1q, todas detectables vía FISH. Aún se desconoce porqué la combinación 17p-, 1q+ y t(4;14), generan una tasa de progresión más rápida

En resumen, el grupo desfavorable según FISH muestra poseer las siguientes anomalías: t(4;14), t(14;16), t(14;20) y pérdida del locus que contiene el gen *p53* como son del17p o monosomía 17 (Tabla 5), especialmente en ausencia de trisomías. Y los pacientes con otras anomalías o FISH normal, se consideran de riesgo “estándar” (Tabla 4). El grupo de la Clínica Mayo y otros, también coinciden en que los subgrupos citogenéticos influyen en la presentación clínica, la progresión, el manejo

terapéutico, la respuesta a la terapia y el pronóstico. Además, una anomalía dada puede tener un significado diferente según el estadio de la enfermedad. Por ejemplo, las trisomías se asocian a un riesgo elevado de progresión del mieloma latente (SMM) a MM; pero en cambio son de riesgo reducido para la progresión del inicio del MM hasta el estadio tardío de la enfermedad.

También se ha logrado concluir que el análisis mediante FISH es de relevancia clínica fundamental en el factor pronóstico. El consenso de la IMWG recomienda que mediante FISH, se usen como mínimo las respectivas sondas para del(17p), t(4;14), y t(14;16). Y para ensayos clínicos recomiendan un panel extendido que incorpore sondas FISH para t(11;14), t(14;20), ganancia en (1q), del(1p), del(13q), y el estatus de ploidía.

Metodología de Laboratorio: Se resume en el siguiente esquema (Fig. 2)

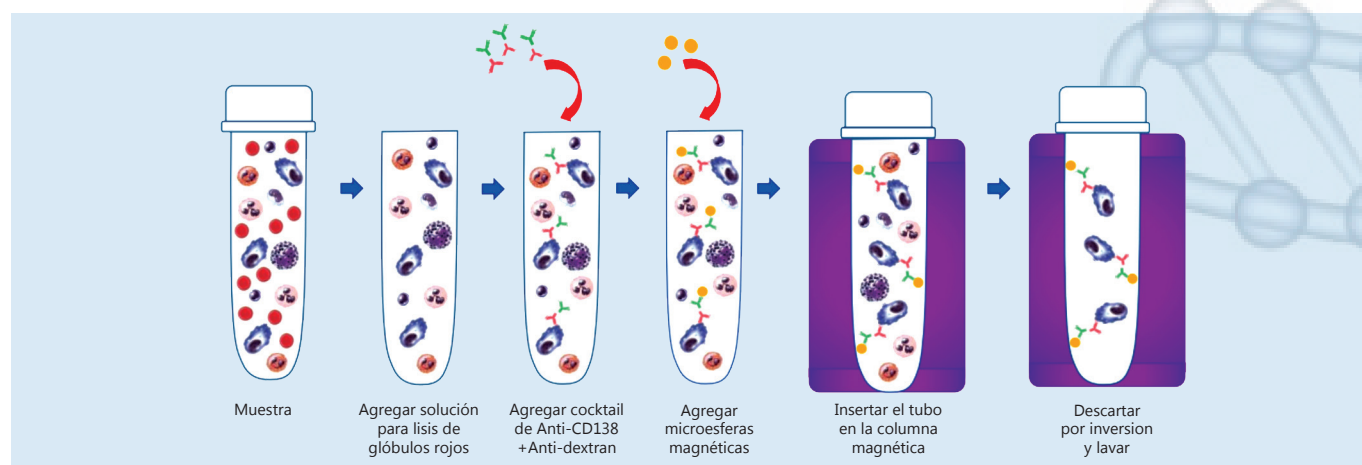


Figura 5: Esquema que resume la separación inmunomagnética delimitada de células plasmáticas, mediante anti-CD138 (marcador de superficie específico de las células plasmáticas) y anti-dextran para las microesferas magnéticas que contienen dextran. En el último paso, el tubo se retira del magneto y las plasmáticas se desprenden de la pared del tubo y se concentran por centrifugación. Luego de lavados, se pueden fijar para FISH o cultivar para citogenética convencional. Esto último se realiza dependiendo del volumen de muestra recibido. (STEMCELL™ Technology: EasySep™ Human Whole Blood CD138 Positive Selection Kit). (Esquema elaborado en **GeneticaLab** por Ana Lucía Zea R.).

► Referencias

- Kumar SK, Rajkumar SV. The Multiple Myelomas - Current Concepts in Cytogenetic Classification and Therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 15 (7):409-421 (2018). doi:10.1038/s41571-018-0018-y
- Lakshman A, Rajkumar SV, Buadi FK, Binder M, Gertz MA, Lacy MQ, et al. Risk stratification of smoldering multiple myeloma incorporating revised IMWG diagnostic criteria. *Blood Cancer Journal.* 8:59 (2018). doi: 10.1038/s41408-018-0077-4.
- Rajkumar SV, Dmopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos MV, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* 15(12):e538-48 (2014). doi:10.1016/S1470-2045(14)70442-5.
- Rajkumar SV. Multiple myeloma: 2014 Update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 89(10):999-1009 (2014). doi:10.1002/ajh.23810. Review.
- Saxe D, Seo EJ, Bergeron MB, Han JY. Recent advances in cytogenetic characterization of multiple mieloma. *Int J Lab Hem.* 41:5-14 (2019). doi: 10.1111/ijlh.12882. Review.
- Sonneveld P, Avet-Loiseau H, Lonial S, Usmani S, Siegel D, et al. Treatment of multiple myeloma with high-risk cytogenetics: a consensus of the International Myeloma Working Group. *Blood.* 16;127(24):2955-62 (2016). doi: 10.1182/blood-2016-01-631200.

4 Revisión de literatura

En la clasificación de la OMS de las neoplasias hematológicas, varias están definidas por la presencia de anomalías genéticas distintivas, que se suelen detectar mediante técnicas citogenómicas como el bandedo cromosómico, FISH y microarreglos. De ahí que estas metodologías hayan alcanzado gran importancia en la clasificación y el manejo clínico de pacientes con estas neoplasias. Por consiguiente, y para lograr homogeneidad en la aplicación de estos métodos analíticos, la “*European Cytogeneticists Association*” ha emitido recientemente (Dic. 2019) unas recomendaciones consenso que sirvan de **guía para laboratoristas y hematólogos**.

La siguiente Tabla y la referencia adjunta resumen estas importantes y útiles recomendaciones prácticas.

Tabla 6. Pruebas citogenéticas y genéticas recomendadas para diferentes neoplasias hematológicas.

Enfermedad	Prueba diagnóstica	Indicaciones	Metodología sugerida
Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	Cariotipo	Obligatorio	Bandedo cromosómico
	Fusión génica BCR-ABL	Obligatorio	FISH o métodos moleculares
	Mutación ABL1 cuando hay resistencia al tratamiento	Obligatorio	Métodos moleculares
Neoplasias Mielo-Proliferativas (NMP)	Mutaciones JAK2, CALR o MPL dependiendo de la razón de remisión	Indicado	Métodos moleculares
	Cariotipo	Opcional	Bandedo cromosómico
Neoplasia Mieloide/ Linfocitoide con eosinofilia	Fusiones génicas recurrentes PDGFRA, PDGFRB, FGFR1, PCM1-JAK2	Muy recomendado para la mayoría de los pacientes.	FISH o métodos moleculares
	Cariotipo	Recomendado en ausencia de fusiones génicas recurrentes	Bandedo cromosómico
Síndrome Mielodisplásico (SMD)	Cariotipo	Obligatorio	Bandedo cromosómico
	Anomalías cromosómicas específicas -5/5q-, -7/7q-, MECOM (panel extendido Trisomía del 8, 20q-, del TP53)	Recomendado ^a	FISH /SNP array / Métodos moleculares
	Análisis cromosómico de alta resolución y aCN-LOH ^b	Recomendado	SNP array
	Análisis de mutaciones de genes candidatos.	Recomendado	Métodos moleculares
Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	Cariotipo	Obligatorio	Bandedo cromosómico
	Mutaciones genéticas: <i>NPM1</i> , <i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>FLT3</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i>	Obligatorio	Métodos moleculares
	Fusiones génicas recurrentes: <i>PML-RARA</i> , <i>CBFB-MYH11</i> , <i>RUNX1-RUNX1T1</i> . Reordenamientos genéticos de <i>KMT2A</i> y <i>MECOM</i>	Recomendado ^c	FISH o métodos moleculares
Leucemia Linfocitoide Aguda	Fusiones génicas recurrentes	Obligatorio	FISH o métodos moleculares
	Hiperdiploidía	Recomendado	Bandedo cromosómico o SNP array o FISH
	Microdeleciones recurrentes	Recomendado en pediatría	MLPA, Array, Métodos moleculares
	Cariotipo ^d	Obligatorio	

Enfermedad	Prueba diagnóstica	Indicaciones	Metodología sugerida
Leucemia Linfoide Crónica	Deleción 13q14, <i>ATM</i> , <i>TP53</i> , trisomía 12	Obligatorio	FISH, SNP array o métodos moleculares
	Mutación <i>TP53</i> / IGHV en estado mutacional	Obligatorio	Métodos moleculares
	Cariotipo	Deseable para ensayos clínicos	
Mieloma Múltiple	t(4;14)e, t(14;16), deleciónTP53 ^e , ganancia 1q/del(1p)	Recomendado	FISH para reordenamientos genéticos
	t (11; 14), t (14; 20), estado de ploidía (panel extendido).		FISH o Array, MLPA para ganancias o pérdidas de números de copias
Otras neoplasias de células B maduras	Reordenamientos genéticos recurrentes dependiendo del diagnóstico diferencial		FISH
	Reordenamientos de <i>MYC</i> para pruebas de pronóstico ^f		FISH

- En casos de falla del cariotipo o donde haya sospecha morfológica de anomalía específica
- aCN-LOH: pérdida neutral de heterocigosidad.
- Para impacto pronóstico
- Puede no ser necesario para todos las LLA-B pediátricas donde solo se requiere una estratificación de riesgo básica
- Prueba mínima requerida
- Si se detecta el reordenamiento de *MYC*, deben examinarse *BCL2* y *BCL6* para el diagnóstico diferencial entre el linfoma de Burkitt y un linfoma de doble-hit.

► Referencias

Rack, K.A., van den Berg, E., Haferlach, C. et al. European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms. *Leukemia* 33, 1851–1867 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41375-019-0378-z>



📍 Torre Intermédica Centro de Especialistas
 Calle 7 No. 39-197
 Consultorios 918 - 919
 ☎ (+574) 321 33 40 - 321 29 29
 📠 315 506 5062
 ✉ geneticalabsas@gmail.com
 🌐 www.geneticalab.com.co
 Portafolio: ver página web
Medellín, Colombia