

## **Bloque II Hematología – MOM CNIO - 2012/2014**

Página 1 - La clínica y la patología molecular en el pronóstico del linfoma de Hodgkin

Página 7 - Diagnóstico molecular en linfomas

Página 12 - Opciones terapéuticas guiadas por la biología de leucemia linfocítica crónica.

Página 18 - Citogenética y hematología: una visión integradora

## **La clínica y la patología molecular en el pronóstico del linfoma de Hodgkin (por Carlos Montalbán)**

### **Progresión de los conocimientos básicos y diagnósticos**

1832 – Thomas Hodgkin: Descripción macroscópica.

1856 – Samuel Wilks: Enfermedad de Hodgkin

1878 – Greenfield: Descripción microscópica como cáncer linfático.

1898 – 1902: K. Sternberg & D. Reed: Célula RS

1926 – H. Fox: Estudio histológico de muestras originales

1956 – Gall & Mallory: Linfoma de Hodgkin vs Linfoma No Hodgkin

1966 – Lukes & Butler: Clasificación clásica

1985 – R. Dorfman: Inmunohistoquímica en las muestras originales

1994 – 1999 – Clasificación REAL/OMS. Enfermedad de Hodgkin se convierte en Linfoma de Hodgkin

1990s - CRS clonal, CRS: Linfocito B

2000s - Bases moleculares del LH

### **Evolución histórica del Linfoma de Hodgkin**

1832 – Thomas Hodgkin: Descripción macroscópica.

1898 – 1902: K. Sternberg & D. Reed: Célula RS

1963 – MOPP

1966 – Lukes & Butler: Clasificación clásica

1973 – ABVD

1990s – Naturaleza de la célula tumoral, relación con EBV.

1994 – 1999 – Enfermedad de Hodgkin se convierte en Linfoma de Hodgkin

1990s – Stanford V / BEACOPP

1990s – 2000s – Importancia de las imágenes funcionales PET

### **Pronóstico del linfoma de Hodgkin**

La supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad del linfoma de Hodgkin clásico a 80 meses es mayor de 80% y 70%, respectivamente (Montalbán, JCO, 2004).

### **Factores pronósticos en linfoma de Hodgkin**

1. Al diagnóstico
  - a. Inmediatos y accesibles
  - b. Complicación baja/media
2. Relacionados con la respuesta al tratamiento
  - a. Dependientes de tiempo, no inmediatos.
3. De alta tecnología
  - a. Retrospectivos
  - b. De referencia
4. Factores que dependen del paciente
  - a. Edad
  - b. Enfermedades concomitantes
  - c. HIV
  - d. Actitud del paciente
  - e. Adhesión al tratamiento

## **Linfoma de Hodgkin: inflamación y tumor**

La célula RS / CH es una célula linfoide que deriva del folículo (linfocito B), clonal. Hay un conjunto de células reactivas, inflamatorias que influyen en el tumor. Desde el punto de vista histológico el linfoma de Hodgkin se divide en varios subtipos como: predominio linfocitario, esclerosis nodular, celularidad mixta y depleción linfocitaria, con pronóstico desfavorable en los pobres en linfocitos. Los síntomas del linfoma de Hodgkin dependen de la masa tumoral (estadio y masas voluminosas), y de los mediadores (síntomas B, fiebre, astenia, prurito, pérdida de peso, velocidad de sedimentación globular, deshidrogenasa láctica, beta 2 microglobulina). Se categoriza entonces en dos tipos: Linfoma de Hodgkin inicial que se caracterizan por los estadios I y II no B y no voluminoso. El linfoma de Hodgkin avanzado incluye estadios III/IV, IIB o voluminoso.

Para tratar de establecer el riesgo al diagnóstico del International Prognostic Factor Project para linfoma de Hodgkin presentado en 1998 (NEJM, 1998: 339; 1506) que incluye los siguientes factores pronósticos adversos (se asigna 1 punto por cada factor): albúmina menor de 4 gramos/dL, hemoglobina menor de 10.5 gr/dL, sexo masculino, estadio IV, edad mayor de 45 años, leucocitos mayor de 15000/mm<sup>3</sup>, linfopenia menor de 600/mm<sup>3</sup> (o menos de 8% del recuento de leucocitos). La supervivencia global a 84 meses es de más de 80% para puntajes 0-2, 80% para puntaje de 3, 70% para puntaje de 4 y aproximadamente 55% para puntaje de 5 o más. De igual forma, la supervivencia libre de progresión para puntajes 0-2 es mayor de 80% a 84 meses comparado con aproximadamente 60% para puntajes iguales o mayores de 3. Este sistema de puntaje tiene las ventajas de que es fácil, inmediato, reproducible, universal, aplicable a linfoma refractario en tratamiento con altas dosis de quimioterapia seguida por terapia de progenitores hematopoyéticos. En contra de este sistema esta que hay pocos IPS altos, no identifica linfomas de Hodgkin muy avanzados, ni los linfomas de Hodgkin de MUY alto riesgo. Qué hacer con los estadios iniciales y es anulado por el BEACOPP-B. Los estudios recientes han mostrado que el IPF score para linfoma de Hodgkin avanzado tiene utilidad limitada en la era moderna que usan ABVD, factores estimulantes de colonias, mejores tratamientos de soporte, antibióticos. Un estudio retrospectivo de la British Columbia de Canadá entre 1990 y 2008 que incluyó 579 pacientes tratados con ABVD (con o sin radioterapia de campo comprometido) encontró que solo el estadio IV y la hemoglobina menor de 10.5 gr/dL eran factores pronósticos con Cox U/M. El IPF Score sólo fue pronóstico para FFP y OS, pero no identificó grupos de muy buen pronóstico, ni de muy mal pronóstico (Moccia A, et al). En el grupo español solo se encontró el estadio IV y la edad mayor de 45 de los factores pronósticos significativos del IPF score. Casi 100% de supervivencia a mayor de 150 meses sin ninguno de los factores, 70-75% para quienes tienen alguno y aproximadamente 50% en quienes tenían ambos (Guisado-Vasco P, et al. *Leukemia & Lymphoma*, 2012; 53(5):812-819).

## **Importancia del tratamiento**

Además, el tratamiento influye (obvio): sin tratamiento la supervivencia mediana era 1 año. Con solo alquilantes sube a casi 2 años. Con MOPP/ABVD la supervivencia a largo plazo sube a unos 70%, que sube a más de 80% con BEACOPP y a casi 90% con BEACOPP escalado. El tratamiento del linfoma de Hodgkin puede ser insuficiente (20% de muertes por linfoma de Hodgkin son por recaídas), excesivo con toxicidades a corto plazo (de

quimioterapia y radioterapia), o largo plazo como leucemias/síndromes mielodisplásicos, otros linfomas de Hodgkin, tumores sólidos, toxicidad cardíaca o pulmonar que aumentan dramáticamente con el paso de los años. La relación entre la eficacia y la seguridad de los esquemas modernos se evidencia en el seguimiento a 10 años del estudio CHSG HD9 del grupo alemán que incluyó pacientes con linfoma de Hodgkin avanzado y los aleatorizaron en 3 grupos: COPP/ABVD, BEACOPP y BEACOPP ESCALADO. La supervivencia global y libre de enfermedad fue inferior con COPP/ABVD. Sin embargo, el desarrollo de leucemia aguda y síndrome mielodisplásico fue mucho mayor con BEACOPP Escalado (Engert, JCO 2009; 27; 4548). El beneficio en supervivencia global del BEACOPP sobre el ABVD se cancela cuando se incorpora rescate con altas dosis y trasplante autólogo de células madres hematopoyéticas (Viviani S, et al. N Engl J Med, 365(3), July 21, 2011).

### **Importancia pronóstica de la respuesta al tratamiento**

#### **Respuesta al tratamiento de primera línea**

El FDG-PET después de 2 ciclos predica la supervivencia libre de progresión en enfermedad de Hodgkin. Los pacientes con FDG-PET negativo después de 2 ciclos tuvieron una supervivencia libre de progresión a 2 años del 96%, comparado con 0% (Hutchings et al, Blood 2006; 107:52).

#### **Recaídas precoces como factor pronóstico**

Los pacientes con enfermedad progresiva primaria tienen una supervivencia global a largo plazo baja del orden del 30%. Los pacientes que tienen recaídas tempranas tienen una supervivencia a largo plazo de aproximadamente 40%. Los pacientes con recaídas tardías tienen supervivencia a largo plazo de casi 60% (Josting et al. Current Opinion Oncol, 2000;12:403).

#### **Mediadores**

Los factores séricos pronósticos incluyen la velocidad de sedimentación globular, la beta 2 microglobulina, deshidrogenasa láctica, TNF/TNFR1, VCAM-1, ICAM-1, Interleukina 10, Interleukina 2, Interleukina 6, CD30, y muchos otros. Reactantes inflamatorios inespecíficos probablemente todos ellos reflejan masa tumoral y actividad.

Los marcadores moleculares en CRS/HR y microambiente con influencia pronóstica en 1990s. Favorables: CD15(-), Caspasa 3(+). Desfavorables: bcl2(+), Bax, p53 anormal, p21(+), Rb(-), Ki 67 alto, IL-6(+), índice apoptótico, células T citotóxicas activadas. Todo esto en análisis univariados.

El grupo español publica en Blood que hay un desenlace desfavorable en pacientes con linfoma de Hodgkin que tienen pérdida del Rb, expresión alta del Ki 67 y ausencia de la proteína I de membrana latente del virus de Epstein-Barr (Blood, 1997:90; 2429).

Cuando se analizan los microarreglos tisulares de células Hodgkin y Reed Sternberg evidencian alteraciones en los vías supresoras tumorales más importantes, así como los checkpoints de ciclo celular como: disminución de la p16, aumento de ciclina D y cdk6, aumento de Hdm2, aumento de p53, aumento de p21, aumento de SKP2, disminución de p27, aumento de ciclina E, aumento de cdk2, aumento de NF-KappaB, aumento de Bcl2, aumento de Bcl-Xl, aumento de survivina, aumento de las proteínas asociadas a EBV como

STAT1 y STAT3, aumento de ciclina A, aumento de Ciclina B1 y aumento de cdk1 (Garcia JF, et al. Blood, 2003;101:681). El mismo grupo encontró en un análisis multivariado que tres factores establecen el pronóstico: p53, Bcl-XL y TUNEL, estableciendo BRG categoría I con 0-1 factor, y categoría II con 2-3 factores (Motalbán C, JCO, 2004:22(9), May 1). La acumulación de alteraciones es clave. Los BRG son independientes del IPS.

La presencia de células T citotóxicas y regulatorias que infiltran el tumor pueden ser predictivo de desenlace en pacientes con linfoma de Hodgkin. La expresión de FOXP3 (característica de la T-reguladoras CD4+, CD 25+) y TIA-1 (Linfocitos T citotóxicos), así: el mejor pronóstico ocurre con alta expresión de FOXP3 y baja expresión de TIA-1. No entiendo el panel c de la diapositiva 37 de 62 (Álvaro et al. Clin Cancer Res, 2005; 11: 1473). Alvaro et al, también encuentra una correlación entre el microambiente reactivado y cambios moleculares en las vías de apoptosis y proliferación. Las células citotóxicas (CD8+, CD57+/NK, Granzima B+) favorecen la sobre-expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-XL, survivina, caspasa 3, NF-kB) en las células RS. El infiltrado genera de células inmunes (CD4+, CD57+NK, CTL) se incrementa la expresión de factores de crecimiento y proliferación como ciclina D y se afecta también la expresión de p16 y SKP2... Presencia de EBV (Tampoco entiendo si a favor o en contra) – (Clin Cancer Research 2008; 14: 685).

El grupo español de linfoma de Hodgkin hizo un análisis de expresión génica con microarreglos tisulares encontrando varios clusters: respuesta inmune, matriz extracelular / adhesión / señalización célula, apoptosis / señales de transducción, y el cluster 4 con ciclo celular. Se establece que el microambiente tumoral y los checkpoints mitóticos son factores claves en el pronóstico de los linfoma de Hodgkin clásico (Sanchez-Aguilera A, et al. Blood 2006; 108, 662-668).

Otro grupo encuentra que el perfil favorable exprese genes específicos B, apoptosis, FOXP3, BCL11A (un factor de transcripción expresado en células B normales). El perfil desfavorable se asocia a TIA1+, topoisomerasa 2 y respuesta Th1 contra EBV+ (Chetaille B, et al. Blood 2009;113:2765).

El TaqMan utiliza tejido fijado en parafina con análisis con RT-PCR en rutas biológicas. Se encontraron 11 genes relevantes que representan 4 vías funcionales: Apoptosis (bcl2, bcl2L1, casp3), ciclo celular (CCNA2, CDC2, HMMR, CCNE2, CENPF), Activación de macrófagos (LUYZ, STAT1), otros (IRF4), referencia... Se encontró un punto de corte de 0.3 con una excelente correlación entre el set estimado y de validación con una supervivencia libre de falla de 70-80% en los de bajo riesgo comparado con aproximadamente 45% en el grupo de mal pronóstico (mayor de 0.3) (Sanchez-Espiridon B, et al. SHLSG, Blood 2010;116:e12-e17). La integración del análisis de riesgo molecular (MRS) en estadio IV mejora la capacidad de clasificación permitiendo la identificación de pacientes de MUY ALTO RIESGO en quienes el IPS no tiene sinificación pronóstica.

La expresión de macrófagos asociados a tumores tiene factor pronóstico. La expresión de CD68 baja (0-5%) se asocia a una mejor supervivencia libre de progresión y supervivencia libre de enfermedad a los 10 años, que con expresión intermedia (5-25%) o alta (mayor de 25%) en enfermedad avanzada. En enfermedad temprana también se observa el mismo

patrón con una supervivencia libre de enfermedad a 10 años de 63% cuando la expresión de CD68 es mayor del 5%, comparada con 100% cuando es inferior al 5% (Steidl C, et al. NEJM, 2010; 362(10), March 11). Hay considerable controversia con otros marcadores de actividad de macrófagos como del CD163, LYZ y STAT1 que dan resultados conflictivos. El mismo CD68 no muestra resultados tan consistentes cuando se analizan en varios grupos. **Esto probablemente refleja el hecho de que hay dos subtipos de macrófagos asociados a tumores (TAM): los M1 clásicamente activados (con actividad antitumoral) y los activados por vías alternativas con fenotipo M2 (con actividad inmunosupresora y activadores del tumor). Lo que pasa es que no hay marcadores claros del estado funcional de los TAM, y la intensidad de la infiltración varía enormemente entre los casos.**

Microdissección y perfil de expresión génica de células RS muestran que estas son una entidad transcripcional única, más próxima a nLPHL que a PMBL. Tiene similitud con las células CD30+ derivadas de centro germinal y B extrafoliculares CD30+. Hay subexpresión de los genes implicados en los puntos de control del ciclo celular, mantenimiento de la integridad genómica y estabilidad cromosómica. Hay sobreexpresión de genes implicados en rutas de señalización oncogénicas y reprogramación del fenotipo celular. Se ratifican las funciones biológicas y genes previamente identificados por el SHLSG (Tiacci E, et al, diapositiva 57).

Otro estudio similar muestra subexpresión de los genes implicados en la señalización de TCR y BCR, reguladores transcripcionales (FOXO1, E2F5, IRF8, NFATC1, NFYB, POU2AF1). Incremento en los genes de la ruta NF-kB, JAK/STAT, señalización IL-6, IL-9, apoptosis mediada por células T citotóxicas y producción de IL-15. La sobreexpresión de genes asociados a NF-kB, complemento y proliferación de células hematopoyéticas, macrófagos y vasos sanguíneos se asocia a fallo de tratamiento (Steidl C, et al). Se ratifican los resultados del SHLSG, excepto que la firma molecular de macrófagos es adversa, en tanto que el grupo español la encuentra como asociada a buena respuesta.

### **Radioinmunoterapia**

La expresión de la isoforma de fibronectina oncofetal ED-B en tumores hematológicos permite terapia dirigida contra esta molécula con I 131 radiactivo L19SIP (Sauer S, et al. Blood 2009; 113: 2265).

### **Inmunocnjugados**

Los pacientes con Linfoma de Hodgkin en recaída tratados con Brentuximab-Vedotin (un inmunocnjugado un citotóxico unido a un Anti CD30) exhiben excelentes resultados.

La supervivencia relativa de los pacientes con linfoma de Hodgkin en Suecia desde 1973 hasta 2009 ha mejorado en forma sustancial en todos los grupos etareos (Sjoberg J, et al. Blood 2012; 119:990-996).

Concluye el Dr. Montalbán con una diapositiva en la que resume la evolución histórica estipulando en los 1940s se evaluaba el EFECTO (manifestaciones clínicas), y se tomaban

decisiones clínicas. En los 2000 se estudia la CAUSA como los factores intrínsecos de la enfermedad y las vías metabólicas de las células RS y el microambiente. El objetivo actual es la identificación rápida y fácil de puntos clave y dianas terapéuticas para tomar decisiones informadas por aspectos clínicos, moleculares y tratar las alteraciones claves.

### **Notas**

**Este resumen se basa exclusivamente en la interpretación de Mauricio Lema Medina de el pdf suministrado por el docente para el Master de Oncología Molecular / CNIO 2012-2014, así como la lectura de algunas referencias relevantes para clarificar los conceptos. No se basa en la clase impartida. Todos los aciertos son del docente, y todos los desaciertos son de Mauricio Lema Medina.**

No entiendo la diapositiva sobre la zona gris del linfoma de Hodgkin (10 de 62).

Versión I: 07.01.2013.

## **Diagnóstico molecular en linfomas (Clase por Juan F García)**

Las primeras 9 diapositivas son la clasificación de neoplasias linfoides de la WHO en su 4ta edición de 2008. Empieza la conferencia en el la diapositiva 10 estipulando que el diagnóstico de procesos linfoproliferativos es difícil y que se requieren de estudios moleculares adicionales para alcanzar o confirmar el diagnóstico en cualquier infiltrado linfoide B en el que la morfología e inmunofenotipo no son concluyentes; todas las proliferaciones T; procesos linfoproliferativos en pacientes inmunodeprimidos o trasplantados; evaluación de la relación clonal entre dos neoplasias linfoides en un paciente (discriminación entre recaída vs segundo tumor); clasificación de tumores (aberraciones cromosómicas particulares); estadiaje de linfomas (ocasionalmente).

### **Técnicas de estudio citogenético y molecular**

Las técnicas de estudio citogenético y molecular en los síndromes linfoproliferativos son:

1. Técnicas citogenéticas
  - a. Citogenética convencional: estudio del cariotipo y alteraciones cromosómicas. Se precisa tejido o células en fresco. Requiere de metafases, es lento y laborioso.
  - b. FISH: hibridización con sondas de DNA. Puede realizarse en metafase o interfase. Es rápido y sensible.
  - c. SKY: Marcaje de cada uno de los 24 cromosomas. Mayor sensibilidad que la citogenética convencional.
  - d. CGH: hibridización comparativa de DNA normal frente a tumoral. Detecta amplificación o delección, no translocaciones balanceadas.
2. Técnicas moleculares
  - a. Southern-blot: detección de secuencias específicas de DNA con sondas. Técnica lenta y compleja que precisa de grandes cantidades de DNA.
  - b. PCR: Amplificación de la secuencia diana mediante DNA polimerasa. Rápida y sencilla, alta sensibilidad, con el peligro de falsos positivos.
  - c. RT-PCR: PCR con retrotranscripción del RNA que permite el estudio de secuencias de RNA.
  - d. PCR cuantitativa: cuantificación de la cantidad de copias del gen problema (DNA, RNA, estudio de EMR).
3. Técnicas de análisis molecular “masivo”
  - a. CGH arrays
  - b. cDNA arrays
  - c. Tissue microarrays.

### **Patología molecular en síndromes linfoproliferativos**

Se estudian las mutaciones somáticas de IgH, se hace análisis de clonalidad B o T, se detectan reordenamientos o translocaciones específicas y se buscan virus como EBV o HHV8.

Dependiendo del inmunofenotipo de las neoplasias de células B podemos encontrar las siguientes anormalidades moleculares (todos con rearrreglos de las genes Ig H, K o L):

1. B-LBL (precursor en medula ósea): t(1;19) E2A/PBX1, con IgVH no mutada.
2. B-CLL (Naïve en sangre periférica): Trisomía 12, Del11q asociado al gen ATM, Del17p asociado a p53. IgVH no mutada.
3. MCL (Naïve en la zona del manto del ganglio linfático): t(11;14) del gen de CCND1 de Ciclina D1 (también conocido como BCL1). IgVH no mutada o mutada.
4. FCL (CB - Centroblasto en la GC- zona germinal): t(14;18) del gen BCL2. IgVH mutada.
5. BL: t(8;14) o t(8;?) asociado al gen c-MYC. IgVH mutada.
6. DLBCL (CC del GC): 3q27 asociado a BCL2, t(14;18) asociado al BCL2. IgVH mutada.
7. MZL (Linfocito B maduro de la Zona Marginal): t(11;18) API2/MALT1, t(14;18) asociado al gen MALT1, t(1;14) asociado al BCL10. IgVH mutada.
8. LPL (célula madura en sangre periférica): t(9;14) asociado al gen PAX. IgVH mutada.
9. B-CLL (Célula de memoria B): del 13q. IgVH mutada.

De igual forma las neoplasias de células T tienen anomalías moleculares que incluyen rearrreglos de los receptores de células T (TCR).

1. Precursor de célula linfocítica (en medula ósea, TdT+, HLA-DR+, CD34+)
2. Protimocito (en médula ósea, TdT+, HLA-DR+, CD34+, CD3+, CD7+, CD2+): Tiene rearrreglo del TCR delta y gamma.
3. Timocito inmaduro (en la corteza tímica, TdT+, CD3+, CD5+, CD7+, CD2+). Tiene rearrreglo del TCR delta, beta y gamma.
4. Timocito común (en la corteza tímica, TdT+, CD3+, CD5+, CD7+, CD2+, CD1+, CD4/CD8+). Tiene rearrreglo del TCR gamma y beta (y, posiblemente, alfa) y puede tener rearrreglo o delección del TCR delta.
5. Timocito maduro (en la medula tímica, TdT+, CD3+, CD5+, CD7+, CD2+, CD4+ y CD8-). Tiene rearrreglo del TCR gamma, beta y alfa, y delección del TCR delta.
6. Timocito maduro (en la medula tímica, TdT+, CD3+, CD5+, CD7+, CD2+, CD4- y CD8+). Tiene rearrreglo del TCR gamma, beta y alfa, y delección del TCR delta.
7. Linfocito T Helper (en sangre periférica y órganos linfoides, CD5+, CD7+, CD2+, CD4+ y CD8-). Tiene rearrreglo del TCR gamma, beta y alfa, y delección del TCR delta.
8. Linfocito T Supresor (en sangre periférica y órganos linfoides, CD5+, CD7+, CD2+, CD4- y CD8+). Tiene rearrreglo del TCR gamma, beta y alfa, y delección del TCR delta.

Las leucemias T precursoras (T-ALL y T-LBL) se pueden identificar las siguientes anomalías moleculares: t(11;14)(p13;q11); rearrreglo 10q24 (TLX1); del(6q); del(9p); trisomía 8; y translocaciones de 14q11, 11q23 o 14q32. En el linfoma anaplásico de células grandes hay t(2;5) con NPM-ALK.

En los linfomas de células T periféricas se encuentran cariotipos complejos. En el linfoma de células T hepatoesplénico hay isocromosoma 7. En los linfomas angioinmunoblásticos

puede haber trisomías de 3 y 5. En el linfoma de células T anaplásico (ALCL) hay t(2;5); t(2;?).

### **Receptores antigénicos**

1. BCR e inmunoglobulinas: dos cadenas ligeras (kappa o lambda), dos cadenas pesadas (mu, delta, gamma, alfa, épsilon), regiones variables (V) y constante (C).
2. TCR: proteínas de membrana, son heterodímeros (de cadenas alfa/beta en 95%, y de cadenas Gamma/Delta en el 5%), regiones variables (V) y constante (C), se asocia a la molécula de CD3 (que tiene a su vez dominios gamma, delta y épsilon).

La organización genómica germinal de los genes de inmunoglobulinas y del TCR y tiene la forma VDJ-C en IgH en el locus 14q32; TCR alfa/delta en el locus 14q11; y el TCR Beta en el locus 7q34. Para la Ig Kappa, Ig Lambda y el TCR gamma la organización carece de los dominios D, quedando sólo el VJ-C en los loculi 2p11, 22q11 y 7p15, respectivamente. Los rearrreglos de VDJ están mediados por la vía del complejo de recombinasa con las proteínas RAG1 y RAG2 que reconocen y cortan el DNA en las secuencias señales de recombinación (RSS), configurando V(D)J configurando anticuerpos de baja afinidad (IgM) en la médula ósea. Posteriormente, la selección antigénica en el centro germinal causa hipermutaciones somáticas y recombinación de cambio de clase creando anticuerpos de alta afinidad (IgA, IgG, etc).

### **Mutación somática del IgVH y su implicación pronóstica en neoplasias de células B**

La mutación IgVH tiene implicaciones en el curso clínico y supervivencia de las neoplasias de células B pequeñas como el CLL. Las CLL con genes IgH no mutadas son de mal pronóstico (tienen preferencia por los VI-69); en tanto que las CLL con IgVH mutadas con mejor pronóstico con preferencia V4-34 (Freda K, et al. Blood 2004 15(103): 4389-95). Dependiendo del tipo de mutación del IGVH se establece el pronóstico: IGVH1-69 (no mutada) con mal pronóstico en un extremo. En el otro, IGVH4-34 (monorreactivo), con pronóstico bueno. En la mitad están IGHV3-21 ("biased"), IGHV3-23 ("superantígenos").

Aproximadamente 20% de las CLL son mutadas o no mutadas. Las no mutadas tienen pobre pronóstico. Hay asociación de 13q- y mutación de CLL. La mutación de IgVH está asociada a +12 con transformación de Richter y mal pronóstico. Otras aseveraciones de la diapositiva 23 no las entiendo.

### **Análisis de clonalidad mediante PCR en el diagnóstico de síndromes linfoproliferativos.**

Hay factores técnicos que condicionan el resultado como el gen diana utilizado (IGH, IGL, IGK, TCRG, TCRB, TCRA, TCRD), los primers empleados, las condiciones del PCR y el sistema de electroforesis (agarosa, acrilamida, electroforesis capilar & GeneScan). Los genes diana para establecer clonalidad por PCR incluyen IgH, IgK, IGL, TCRB, TCRG, TCRD, aberraciones clonales como t(14;18) del BCL2-IGH o t(11;14) del BCL1-IGH. Se explica en tortuosa precisión en las diapositivas 29 a 39. No entendí ni mu.

Las limitaciones de los estudios de clonalidad

1. Sensibilidad limitada; la clonalidad no es sinónimo de malignidad
  - a. Proliferaciones monoclonales de células B: MGUS, proliferación de EBV, proliferación de células B asociada a crioglobulinemia mixta por HCV, proliferación de células B relacionados con la edad, y enfermedad autoinmune.
  - b. Proliferación monoclonales de células T: T-LGL, enfermedad celíaca y estimulación crónica.
2. Los rearrreglos de Ig y TCR no son marcadores de lineaje pues pueden ocurrir en linfomas de otro lineaje, leucemias mieloides agudas. De hecho, un rearrreglo de TCR puede ocurrir en células B inmaduras, y el rearrreglo TCR alfa beta puede ocurrir en neoplasias gamma delta, y viceversa.
3. Pseudoclonalidad u oligoclonalidad, resultados falsos positivos y falsos negativos.

### **Patología molecular en el diagnóstico de linfomas – Ejemplos específicos**

1. t(14;18) en linfoma folicular: Presente en 80-90% de los linfomas foliculares, asociada a desregulación del BCL2 que inhibe la apoptosis. Hay MBR y mcr en 70% y 30%, respectivamente. Con variantes t(2;18) y t(18;22). Ocurre en un 20-30% DLBCL. Se puede detectar por citogenética y FISH por PCR con una sensibilidad por 100%.
2. t(11;14) en linfoma del manto: sobre-expresión de Ciclina D1 que es detectable con inmunohistoquímica y con sensibilidad del 100% con FISH.
3. t(11;18)(q21;q21), t(1;14)(p22;q14), y t(14;18)(q32;q21) en linfomas tipo MALT, afectando el API2/MALT1, BCL10, IGH/MALT1. Se asocia a linfoma de MALT no relacionado con el H. Pylori, con infiltración transmural e invasión linfática perigástrica, pobre respuesta al tratamiento y con expresión nuclear aumentada del BCL10.
4. Alteraciones citogenéticas y pronóstico en CLL-B con alteraciones cromosomales como del17p, del 11q, trisomía 12q (o normal) y del13q con supervivencias medianas de 36, 96, 132 y 144 meses, respectivamente.
5. t(8;14) en C-MYC (y t(2;8) o t(8;22)) en linfomas tipo Burkitt.
6. BCL2 o BCL6 pueden ser sobre-expresados en DLBCL.
7. Doble hit con MYC/8q24 junto con BCL2/18q21 (o BCL6/3q27, entre otros) se asocia a linfoma de células B no clasificable con características intermedias entre DLBCL y BL.

### **Euro-FISH**

Estandarización de la detección de translocaciones en patología: tiene como objetivo validar un protocolo de análisis de FISH para entidades seleccionadas de linfoma. Utilizando la técnica de FISH de señal dividida.

El protocolo incluye:

1. DLBCL: IGH, BCL2, BCL6 que se encuentra en 20-30%
2. MCL: CCDNI, IGH positivo en 75%
3. B-CLL/SLL: IGH, BCL2 positivo en 40-50%
4. FCL: IGH, BCL2 positivo en 70-95%

5. Gastric MALT: MALT positivo en 30%
6. Splenic MZL: Adel7q21-q32 positivo en 40%
7. BL: MYC positivo en 80%
8. LPL: PAX5 positivo en 50%
9. ALCL: ALK positivo en 70%
10. T-LBL: TCRA, TCRB, TCRG, TCRD, TCL1 positivo en 33%
11. BCL10 1p22 para MALT/DLBCL/FCL
12. BCL3 19q13 para B-CLL
13. IGK 2p11 (en vez de IGH)
14. IGL 22q11 (en vez de IGH)

### **Virus y linfomagénesis**

Los virus EBV, HHV8, HTLV-I y HCV se asocian a linfomas, así:

1. EBV: BL (90% en zonas endémicas), HL, PTLPD, DLBCL, Primary effusion lymphoma, Granulomatosis linfomatoide, Leucemia NK agresiva, linfoma NK/T nasal, Linfoma de células T angioinmunoblástico.
2. HHV8: Primary effusion lymphoma, linfoma asociado a enfermedad de Castleman multicéntrica
3. HTLV-I: Leucemia/Linfoma de células T del adulto.
4. HCV: Linfoma linfoplasmocítico, MZL y otros NHL con crioglobulinemias mixta.

El EBV incrementa la supervivencia de los linfocitos B por inhibición de la apoptosis por su actividad BCL2-lik por el BHRF-1, así como el incremento en la expresión del BCL2 por el LMPI. Además, índice proliferación celular por LMPI por su interacción con proteínas asociadas a TNF e inducción del IL10, EBNA2 por posible transactivación del LMPI, BCRF1 que es homólogo a la IL-10 y EBNA-LP que forma complejos con p53 y Rb. El EBV también induce recombinasas que originan translocaciones cromosómicas (como RAG1 y RAG2 por la EBNA1), así como el escape a la respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos.

El virus HHV8 puede ser detectado por PCR de distintas secuencias virales. Una significativa parece ser la ORF72 que es un homólogo a la ciclina D. También se puede detectar con IHQ contra el LANA (antígeno latente nuclear)

### **Conclusión**

- 1. Las herramientas de diagnóstico molecular aportan información valiosa para el diagnóstico de procesos linfoproliferativos, identificación de clonalidad B/T, mutaciones somáticas, reordenamientos específicos, virus, etc.**
- 2. Proporcionan información diagnóstica, predictiva de respuesta a terapia y pronóstica.**
- 3. Es preciso conocer los fundamentos de las técnicas empleadas**
- 4. Ninguna técnica individual proporciona un diagnóstico**
- 5. Siempre deben considerarse los resultados en el apropiado contexto morfológico, fenotípico y clínico**

- 6. *Perpectivas: nuevas técnicas de análisis multigenético como análisis rutinario de secuencias IGH/TCR, herramientas pronósticas y predictivas y herramientas para selección de terapia y monitorización de respuesta.***

#### **Notas**

**Este resumen se basa exclusivamente en la interpretación de Mauricio Lema Medina de el pdf suministrado por el docente para el Master de Oncología Molecular / CNIO 2012-2014, así como la lectura de algunas referencias relevantes para clarificar los conceptos. No se basa en la clase impartida. Todos los aciertos son del docente, y todos los desaciertos son de Mauricio Lema Medina.**

Versión I: 07.01.2013.

## **Opciones terapéuticas guiadas por la biología en leucemia linfocítica crónica (CLL) por Francesc Bosch**

### **Generalidades**

La CLL es la leucemia más común en los adultos mayores, con una incidencia de 5.4 por 100.000 personas-año, constituyéndose en 30% de las leucemias. Para establecer el diagnóstico de CLL se requiere de más de 5000 linfocitos B / uL por al menos 3 meses, con clonalidad confirmada por citometría de flujo, con morfología de linfocitos pequeños de apariencia madura (menos de 55% con morfología de prolinfocitos). Se establece el concepto de linfocitosis B monoclonal (MBL) para cuando hay menos de 5000 / uL (y en ausencia de evidencia de enfermedad linfoproliferativa). Desde el punto de vista del inmunofenotipo, la CLL se caracteriza por la coexpresión de CD5, CD19, CD23, CD79b, Smlg y CD20. El diagnóstico diferencial incluye el linfoma del manto MCL (CD5+, CD23-, Smlg+++), y el linfoma folicular FL (CD5-, CD10+, Smlg+++).

### **CLL & MBL**

Se encuentran clones de CLL en 5% de individuos "normales", con una transformación a CLL en 1% por año, 10% en familiares de primer grado.

### **Célula de origen de la CLL**

Desde el punto de vista del inmunofenotipo las células CLL son compatibles con linfocitos B naïve CD5+ (CD5+/CD23+/IgMBajo/IgDBajo). Desde el punto de vista de la mutación de los genes IgVH se encuentra que aproximadamente la mitad de las CLL tienen mutación del IgVH sugiriendo dos orígenes: Centro germinal y Post-centro germinal (GC y Post-GC, respectivamente). Al analizar las células madres hematopoyéticas se encuentra que hay una proporción normal de CD34+/CD38- sin rearrreglos del IgHV. La selección clonal de los linfocitos CLL suceden en una fase madura de su desarrollo. Pese a estos fenotipos maduros, las células madres hematopoyéticas (HSC) con capacidad de autorenovación son las dianas principales de la patogénesis de CLL pues las HSC de pacientes con CLL tienen la capacidad de generar clones de linfocitos B parecidos a CLL.

### **Impacto pronóstico del estado mutacional en CLL**

La supervivencia mediana en los no mutados es de 117 meses, comparado con 293 meses en los mutados (Hamblin et al, Blood, 1999). La IgHV no mutada se asocia a una respuesta aumentada del receptor de células B (BCR) con mayor proliferación, adquisición de nuevas anomalías genéticas y peor pronóstico (Zenz et al, Nature Reviews Cancer, 2010). Hay una relación entre la expresión de ZAP-70 y el estado mutacional de CLL (al igual que el CD38).

### **Patogénesis molecular de CLL**

Actualmente desconocida. No hay una alteración genética específica. Se encuentran aberraciones genómicas recurrentes en más del 80% de los pacientes como: del(11q) en 18% con el gen ATM como principal candidato, +12 en 16%, del(17p) en 7% con p53 como principal candidato y del(13q14) en el 55%, que también se ha encontrado en otros tumores, y parece estar relacionada con TSG. No se han encontrado mutaciones o

metilaciones de promotor en 13q14. La supervivencia varía en forma importante con la presencia de estas aberraciones. Los pacientes con del(13q) tienen mejor pronóstico que, y la +12 tienen un pronóstico similar un cariotipo normal. La del(11q) exhibe un pronóstico desfavorable, pero las anomalías del cromosoma 17 tienen el peor pronóstico con una supervivencia mediana varias veces inferior a los otros (Dohnner, et al. NEJM, 2000).

### **13q MDR en CLL**

Migliozza describió que en la región 13q involucrada en CLL hay varios genes como el miR-15a y miR-16-1, DLEU2 y DLEU1 (Blood, 2001). Los ratones MDR-/- y con MiR-15a y 16-1 -/- desarrollan MBL, CLL y linfomas no Hodgkin (Klein et al, Cancer Cell 2010). Los ratones que MDR-/- tienen un curso más agresivo que los que tienen miR15a/A6-1 -/-.

### **Deleciones y mutaciones del TP53 en CLL**

En pacientes no tratados, hay deleción del 17p en un 5%, mutaciones del p53 en un 10%. En los pacientes con CLL y del(17p) entre el 53% y 94% de los casos tienen mutación alélica. El 44% de los pacientes con refractariedad a la Fludarabina tienen alteraciones en el TP53 o del cromosoma 17p (Zenz, et al, Blood, 2009). El porcentaje de células CLL con deleción del 17p(p53) establece la probabilidad de respuesta completa así: 44% a 61% cuando ocurren en menos de 20% de las células CLL, y es 0% cuando es mayor de 20% de las células CLL (Catovsky et al, Blood, 2004; 104). La respuesta completa con FCM es del 55% en un estudio, pero se observó que la probabilidad de respuesta completa con del(17p) es del 0%, comparada con 70% en ausencia de la misma, con un p altamente significativo y superior a variables clínicas (Bosch F, Clin Cancer Res 2008). Lo mismo se observó en el estudio CLL8 en donde los pacientes que recibieron Rituximab y tenían 17p- derivaron un beneficio menor del anticuerpo, con una muy mala supervivencia mediana de aproximadamente 3 años (Hallek M, et al, Lancet, 2010). Para ratificar que es la alteración en el p53 la que explica la pobre supervivencia en pacientes con 17p-, Zenz, presenta curvas de supervivencia de pacientes con TP53 mutadas y del(17p) en pacientes incluidos en el estudio CLL4 de Fludarabina vs Fludarabina Ciclofosfamida. Ambas curvas se sobremontan y exhiben una supervivencia muy baja similar a las ya discutidas (JCO, 2010).

### **Vía de daño de DNA**

El p53 es un sensor de daño de DNA, al igual que el ATM y el miR-34a (este último se activa por el p53, en condiciones normales). Daños en cualquiera de los 3 se ha implicado en la patogénesis de CLL, y en la refractariedad a quimioterapia. En ausencia de alteraciones del p53/17p, los niveles bajos del miR-34a se asocian a una pobre respuesta a citostáticos.

### **Otras mutaciones en CLL diferentes a p53**

NOTCH1 en 10%, MYD88 en 3%, SF3B1 6%.

### **Mutaciones de NOTCH1 en CLL**

En el 2000 se detectó una mutación nueva en el dominio PEST del NOTCH1, activante, en CLL que le confiere una supervivencia más corta, y un incremento en la probabilidad de transformación Richter (31%). Se observa en 21% de los CLL quimiorrefractarios. La

función del gen NOTCH1 define el linaje de células T en los precursores comunes de linfocitos. Es un oncogén e las leucemias linfoides agudas de linaje T (50%). El NOTCH1 causa proliferación, diferenciación y afecta la apoptosis. La activación constitutiva de NOTCH1 y NOTCH2 en CLL causan resistencia a la apoptosis.

### **MYD88**

El MYD88 estimula el Toll-Like receptor. Tiene una prevalencia de 88% en la macroglobulinemia de Waldenstrom, 6% en el MZL esplénico, 30% DLBCL (en el tipo ABC) y 3% en CLL.

### **SF3B1**

Se encuentra alterado en 90% de los MDS con sideroblastos en anillos, y en 6-15% de los CLL. Se asocia a del(11q) y a quimiorresistencia a la fludarabina.

### **Microambiente**

Implicación de los pseudofolículos en la medula ósea y los ganglios linfáticos en CLL

Las células CLL interactúan con las células estromales vía V-CAM y la CCL2. Con las células FDC a través de V-CAM e I-CAM, CXCR-5 y CXCL-13. Con NLC interactúan con la unión CD38-CD31, CXCL-12, BAPF y CpG DNA secretado con el TLR9 linfocitario. Con los linfocitos T interactúa con CD40 y CD40L de las células T. Todos estos procesos están modificados por la activación del BCR, especialmente cuando la molécula ZAP70 coparticipa del proceso, estimulando la BLK que desencadena la PLC gama2 que convierten PIP2 en PIP3 y DG. El PIP3 sirve de sustrato para la PI3k/AKT. El DG estimula la PKC que activa la NF-kB y la RAS/MEK/Erk. Uno de los efectos más importantes de la CLL es CCR7, con incremento de expresión, señalización y migración hacia CCL21. La resultante es que la ZAP-70 provoca aumento de infiltración de linfocitos B malignos en la medula ósea (también hay incremento en la respuesta al SDF-1alfa que es el ligando de CXCR4).

### **CLL “acelerada”**

Los centros proliferativos (Pcs): son áreas pálidas con un patrón pseudofolicular compuesto por prolinfocitos y parainmunoblastos (células T CD4+ y células dendríticas) con alta tasa proliferativa. Se observan en aproximadamente 20% de las biopsias de CLL. Se asocia a CLL con actividad clínica agresiva: alta expresión ZAP-70 y de niveles de LDH. En general, los pacientes requieren de tratamiento y se asocia a una supervivencia corta. Gine, et al. Presentó la supervivencia de un grupo de pacientes con CLL estratificados en: no acelerada, acelerada y transformación Richter. Encontró que la supervivencia mediana fue de 75, 34 y 4 meses, respectivamente (Haematologica 2010;95:1526-1533).

### **Tratamiento en CLL**

La evolución de tratamiento de CLL va desde el Clorambucilo, seguido por Fludarabina, combinaciones con Fludarabina y Rituximab combinado con quimioterapia. La combinación de Fludarabina + Ciclofosfamida + Rituximab (FCR) exhibió una tasa de respuesta de 95%, con una respuesta completa del 72% (Tam CS, et al. Blood 2008; 112: 975-980). En el estudio fase III CLL8 los alemanes encontraron una tasa de respuesta de 94% con FCR, con una tasa de respuesta completa de 44.7%, ambas superiores a FC. La

supervivencia libre de progresión mediana fue de 42 meses con FCR y 32 meses con FC. Basados en este estudio, FCR se convirtió en el estándar de tratamiento en CLL (Hallek et al, Lancet, 2010, 1164).

### **Mutación de p53 / 17p- y sus implicaciones terapéuticas en CLL**

Como ya hemos visto, hay resistencia a tratamientos con citostáticos y rituximab cuando hay alteraciones de las vías ATM y p53. Se postulan tratamientos que exploten otras vías como alemtuzumab (que estimula ADCC / lisis celular mediada por complemento), altas dosis de esteroides (que activan las vías Bim/PUMA), ABT-263 que estimula la apoptosis por vía independiente de p53, Lenalidomida que afecta el microambiente, Flavopiridol que inhibe la proliferación, trasplante alogénico que tiene un efecto celular.

### **Lenalidomida en CLL**

La lenalidomida causa una serie de efectos en las células CLL que incluyen: 1. Activación de las células CLL y mejoría en la presentación de antígeno medida por incremento en CD40 y CD1c. 2. Incremento en la sensibilidad a la apoptosis por incremento de FAS, BID, CFLAR, DR5 y APRIL. 3. Incremento de la quimioatracción de las células T activadas por incremento en CCL3 y CCL4. 4. Incremento en las moléculas de adhesión como ICMA1, LFA3. 5. Incremento en la señal OX40 por incremento del OX y el OXL. 6. Upregulación (disculpe el barbarismo) del citoesqueleto con incremento del RND1, FMNL3, ARHGAP3.

### **Vía del BCR como diana molecular en CLL**

La vía BCR estimula la supervivencia y apoptosis, división celular y la migración celular, así como el reclutamiento de células T vía CCL3 y CCL4. Por todas estas razones, se considera una diana terapéutica válida en CLL. Hay estudios clínicos en fases tempranas con inhibidores de la PI3K delta (GS1101/CAL-101), inhibidores de la Burton Tyrosine Kinase (BTK) como el ibrutinib (antes conocido como PCI-32765), inhibidores de Syk (R-406), etc (ver diapositiva número 68 para considerar el suicidio).

### **Estrategias adaptadas al riesgo en CLL**

A modo de conclusión termina el Dr. Bosch con dos magníficas diapositivas con, las siguientes viñetas que resumen el futuro del tratamiento en CLL:

1. 17p-/TP53 anormal: son claramente quimiorresistentes, hay sensibilidad potencial al alemtuzumab, esteroides, antagonistas al BCR. Considerar RIC-Alo en fases tempranas.
2. Del(11q)/Disfunción ATM: Alta tasa de respuesta con FCR, con duración corta. Se debe considerar terapia post-remisión con consolidación y mantenimiento.
3. +12: Alta expresión de CD20, se asocia a mutaciones del NOTCH1.
4. Del12q14 (miR15/16): alta respuesta y duración de la respuesta. Se asocia a una recuperación medular incompleta. Considerar regímenes con menor toxicidad hematológica.
5. IgVH no mutada / Alta expresión de ZAP-70: Duración de respuesta corta a pesar de obtener MRD negativo. Considerar mantenimiento.

## **Notas**

**Este resumen se basa exclusivamente en la interpretación de Mauricio Lema Medina de el pdf suministrado por el docente para el Master de Oncología Molecular / CNIO 2012-2014, así como la lectura de algunas referencias relevantes para clarificar los conceptos. No se basa en la clase impartida. Todos los aciertos son del docente, y todos los desaciertos son de Mauricio Lema Medina.**

Versión I: 07.01.2013.

# **Citogenética y Hematología: Una visión integradora (Por Juan C. Cigudosa)**

## **Temario**

### **Introducción**

#### **Síndromes Mieloproliferativos**

##### **Leucemia mieloide crónica**

##### **Típicos y atípicos**

#### **Síndromes Mielodisplásicos**

#### **Papel de la genómica en la oncohematología: leucemia mieloide aguda**

## **Introducción**

### **Una vez más, la story de la Leucemia Mieloide Crónica (CML)**

1956 – 46 cromosomas en el humano

1960 – Nowel & Hungerford: cromosoma Philadelphia en CML

1970 – Prieto, Egozcue: t(9;22)(q34;q11)

1973 – Rowley: t(9;22)(q34;q11)

1985 – Heisterkamp: fusión bcr/Abl

1996 – Druker: TKI

2011 – Druker: estudio IRIS

En la CML hay una translocación donde el c-abl ubicado en el 9q34 se ubica adjunto al 22q11 (denominado cromosoma Philadelphia), creando un gen de fusión denominado bcr/abl.

El gen abl tiene varios dominios: Ia y Ib (controladores de actividad); SH3 y SH2 (reguladores de la actividad TK de SH1); SH1 (con actividad tirosina kinasa); dominios de unión al DNA y en la p145ABL hay una fijación a la actina. La proteína ABL tiene funciones proliferativas, adherencia y regula apoptosis. La proteína de fusión BCR-ABL se forma de tal manera que los genes Ia y Ib del ABL se pierden y la proteína resultante queda constitutivamente activa (p210BCR-ABL).

El BCR-ABL activa varias rutas como la MAPK, APK/JUN y lo hace a través de la unión GRB2 al dominio SH2. La GRB2 termina activando el RAS que a su vez desencadena todas las cascadas mencionadas. Ras, a su vez, se une a la proteína CBL que activa la PI3k vía CRK. El BCR-ABL también activa la ruta JAK-STAT mitogénica, y causa sobre-expresión de MYC independiente de Ras. Además de todo lo anterior, el BCR-ABL establece complejos multiméricos con proteínas de adhesión como paxlina y talina, capaces de unirse a la F-actina, lo que sugiere una acción directa sobre el citoesqueleto celular causando una redistribución de la proteína hacia el citoplasma por anclaje al actin-binding domain.

El imatinib (antes conocido como STI571) se une al sitio de unión del ATP interfiriendo con su fosforilación, constituyéndose en un inhibidor de tirosina kinasa (TKI) con actividad contra: c-ABL, v-ABL, p210BCR-ABL, p185BCR-ABL, TEL-ABL, PDGFR alfa, PDGFR Beta, TEL-PDGFR y c-Kit.

El ejemplo de la CML previamente mencionado corresponde al paradigma de investigación en hematología oncológica en la que: 1. Se identifican cambios cromosómicos no casuales, 2. Causan cambios genéticos, 3. Dan origen al fenotipo oncológico, 4. Son útiles para diagnóstico, pronóstico y tratamiento.

### **Síndromes Mieloproliferativos**

Se caracterizan por la proliferación de los elementos mieloides hematopoyéticos (Daaaah!), y se clasifican según su(s) elemento(s) de origen en: mastocitosis sistémica (mastocitos), policitemia vera (eritrocitos), trombocitemia esencial (plaquetas), leucemia eosinofílica crónica (eosinófilos), leucemia mielode crónica (neutrófilos o monocitos), leucemia mielomonocítica crónica (neutrófilos o monocitos) o mielofibrosis primaria (neutrófilos o monocitos). Su diagnóstico depende de la integración de hallazgos clínicos, en sangre periférica, tinciones de hematoxilina y eosina en la médula ósea, así como tinciones de reticulina en la médula ósea.

Con la citogenética clásica se identificaron varias anomalías asociadas a síndromes mieloproliferativos como: trisomía 8 que ocurre en el 10% de los síndromes mieloproliferativos), del(13)(q12-13q22-31) que se observa en 10% de Policitemia Vera y MFI, del(20)(q11) que se observa en 30% de policitemia vera y 10% de MFI, -5/del(5)(q11-12;q31-35) que se observa en 10% de MFI y -7/del(7)(q11-36) en síndromes mieloproliferativos infantiles.

Los estudios genómicos han demostrado mutaciones activantes que explican el fenotipo tumoral de muchos síndromes mieloproliferativos, así: KITD816V y FIP1L1-PDGFR para mastocitosis sistémica, JAK2V617F o JAK2 Exón 12 para policitemia vera, JAK2V617F o MPLW515L/K para trombocitopenia esencial, o mielofibrosis primaria, FIP1L1-PDGFR para leucemia eosinofílica crónica, BCR-ABL para CML. En tanto que TEL-PDGFRB, BCR-PDGFR, TEL-JAK2 u otras fusiones de tirosina kinasas pueden dar origen a la leucemia mielomonocítica crónica.

Como se observa, alteraciones en la vía JAK2 pueden ser importante para policitemia vera, trombocitemia esencial, leucemia mielomonocítica crónica y mielofibrosis primaria. En condiciones normales, la JAK2 se activa cuando la eritropoyetina se liga a su receptor. Cuando hay mutación del JAK2 (como la V617F), se produce su activación constitutiva, causando activación de genes importantes para la proliferación y supervivencia por medio de las STAT. Además la JAK2 causa proliferaciones de PI3K y Ras. Existen modelos patogénicos que buscan explicar las varias presentaciones de los síndromes mieloproliferativos asociados a mutaciones del JAK2, pero no dejan de ser especulaciones en los que se postulan que tanto la policitemia vera como la trombocitosis esencial pueden terminar como mielofibrosis por la adquisición de nuevas mutaciones.

### **Los síndromes mieloproliferativos atípicos**

Se definen molecularmente, e incluyen a: 1. Mastocitosis sistémica y leucemia eosinofílica crónica con reordenamiento del PDGFR alfa, 2. Leucemia eosinofílica crónica y síndrome mieloproliferativo con reordenamiento PDGFR Beta, 3. Mastocitosis sistémica con mutación del c-Kit, y 4. Síndrome mieloproliferativo asociado a 8p11/FGFR18 causado por

fusiones del FGFR1. 5. Leucemia neutrofílica crónica en la que se encuentra la mutación del JAK2 en 20%, 6. Leucemia mielomonocítica crónica en la que se encuentra la mutación del JAK2 en 3%, 7. Leucemia mielomonocítica juvenil en la que se encuentra: PTPN11 en 30%, NFI en 15% y Ras en 15%. Otros síndromes mieloproliferativos atípicos como la leucemia basofílica crónica, síndrome hipereosinofílico, leucemia eosinofílica crónica sin definición molecular, MS sin definición molecular y el SMP no clasificado no tienen genes candidatos que los expliquen, hasta hoy.

## **Síndromes Mielodisplásicos (MDS)**

### **Temario de MDS**

#### **Cambios citogenéticos y cambios genéticos**

#### **Nuevas técnicas de análisis citogenéticos**

#### **Valor pronóstico del resultado citogenético: nueva propuesta.**

Al establecer el diagnóstico de síndrome mielodisplásico siempre hay que realizar estudio citogenético por: 1. Tiene valor diagnóstico pues hay características altamente específicas del SMD, 2. Valor pronóstico pues se han incorporado en los IPSS de síndromes mielodisplásicos, 3. Puede ayudar a la selección de tratamiento, como por ejemplo con la lenalidomida en los síndromes 5q-.

#### **Alteraciones cromosómicas en MDS primarios.**

En un 30-50% de los MDS hay pérdidas o ganancias cromosómicas. En un 30% hay del(5q), -7/dl(7q) o +8. En un 10% hay del(20)(q11q13), i(17)(q10) y del(12p). Hay otras anormalidades recurrentes menos frecuentes. Las translocaciones equilibradas son muy raras (menos de 1%). En una base de datos integrada que incluyó 2664 pacientes se establece que se trata de una neoplasia heterogénea desde el punto de visto citogenético.

#### **Alteraciones cromosómicas en MDS secundarios**

Se observan alteraciones cromosómicas en 80-90%, con elevada incidencia de cariotipos complejos (con 3 o más alteraciones citogenéticas), y son de mal pronóstico. Los MDS secundarios a agentes alquilantes incluyen alteración de los cromosomas 5 (5q-) y del cromosoma 7 (monosomía 7 y 7q-), con mayor proporción de cariotipos complejos. Los MDS secundarios a inhibidores de la topoisomerasa II se asocian a reordenamientos del 11q23 (MLL) y de 21q22 (RUNX1).

#### **Alteraciones citogenéticas en MDS pediátricos**

Se observan alteraciones citogenéticas en el 50-70% de los MDS pediátricos. Las alteraciones del cromosoma 7 como única o asociada a otras alteraciones se observa en el 53% de los pacientes con cariotipo alterado. La monosomía 7 se asocia a pronóstico incierto, y puede desaparecer en forma espontánea. El índice IPSS es poco útil en pediatría porque las alteraciones de buen pronóstico, tales como 5q-, 20q- y pérdida del cromosoma Y son MUY poco frecuentes en este grupo etario.

#### **Alteraciones citogenéticas en la leucemia mielomonocítica crónica (CMML)**

Se observan alteraciones citogenéticas entre el 20% y 40% de los pacientes con CMML. Las más comunes son: +8, -7/7q- y alteraciones estructurales del 12p. Se encuentran

cambios genéticos (mutaciones) en: NRAS/1p13 (40%), RUNX1/21q22 (38%), AXL1/20q11.1 (43%), c-CBL/11q23.3 (5-48%), TET2/4q24 (30-50%). La mutación del c-CBL se asocia a un mal pronóstico con una supervivencia mediana de 5 meses. Se observan mutaciones de c-CBL durante la evolución de la enfermedad. El MDS/NMP o CMML con t(5;12)(q31-33;p12) y reordenamiento ETV6/PDGFR Beta se consideran una entidad específica.

### **Alteraciones citogenéticas sugestivas de MDS**

Ciertas alteraciones citogenéticas son sugestivas de MDS en casos de citopenias persistentes sin rasgos morfológicos definitivos de MDS. Estas son: -5/5q-, -7/7q-, i(17)(q10), del(17p), -13, del(13q), del(12p), del(9q), idic(X)(q13), t(11;16), t(3;21), t(1;3), t(2;11), inv(3), t(6;9). Así como cuando hay alteraciones complejas que incluye alguna de las alteraciones anteriores. No son particularmente sugestivas de MDS: 8+, 20q- y -Y.

Por qué las alteraciones +8, 20q- y -Y no son indicativas de MDS? Porque estas alteraciones pueden observarse en pacientes con anemia aplásica u otros desórdenes citopénicos que tienen una buena respuesta a una terapia inmunosupresiva y/o no muestran evidencia de MDS después de un seguimiento largo. Además, el -Y se observa en individuos de edad avanzada, incluso 2.5% de los varones mayores de 60 años sin enfermedad hematológica. Se recomienda considerarla clonal cuando se observe en más del 75% de las metafases analizadas.

### **Mutaciones de TET2 en MDS**

El gen TET2 comprende 11 exones en una región de 150kB. TET1 ("ten eleven translocation") está fusionado con MLL en la t(10;11)(p12;q23). Se observan mutaciones de TET2 en: 20-30% de los MDS, 30-50% de las CMML, 10% de los NMP y 33% de las AML. La presencia de mutaciones de TET2 se relaciona con un recuento elevado de leucocitos y monocitos, predominio del sexo masculino y tendencia a transformación a leucemia. Las mutaciones de TET2 son un marcador de buen pronóstico, excepto para CMML en las que son de mal pronóstico. El TET2 se considera un gen supresor de tumores y marcador en patología mieloide con citogenética normal. La mutación de TET2 es la alteración genética en los MDS.

### **Evolución de la citogenética: SNP/CGH array**

Se recomienda complementar la citogenética con la FISH o SNP/CGH array en casos con ausencia de metafases, casos con cariotipo normal y detección de alteraciones muy pequeñas (17p-).

### **Evaluación pronóstica del MDS**

En las versiones iniciales del IPSS (1997) se incorporaron 4 alteraciones del cariotipo en el sistema de riesgo: 1. Buen pronóstico: del(5q), del(20q), Y-, y cariotipo normal. 2. Mal pronóstico: alteraciones del cromosoma 7 y cariotipo complejo. 3. Pronóstico intermedio: otras alteraciones.

Nuevos hallazgos, sin embargo, hacen que en 2009 (Haase, D, et al.) se proponga una nueva categorización de subgrupos citogenéticos que incorporan 15 alteraciones distintas, así:

1. Bueno (supervivencia mediana de 50 meses): cariotipo normal, del(5q), del(12p), del(20q), +21, -Y, trisomía 1q, t(11q23), del(11q), todas como anomalía única. La combinación del(5q) con otra alteración pertenece también a esta categoría.
2. Int-1 (supervivencia mediana de 29.7 meses): der(3q), +8 (como anomalía única), t(7q), +19, -21, otras anomalías simples, otras anomalías dobles.
3. Int-2 (supervivencia mediana de 15.6 meses): complejo =3, -7/7q-, -X, -7/7q- con otra alteración.
4. Malo (supervivencia mediana de 5.9 meses): complejo mayor de 3.

El tiempo medio de 25% de transformación a AML es de 71.9, 16.2, 6 y 3 meses para los riesgos buenos, int-1, int-2 y malo, respectivamente.

### **“Conclusiones**

1. **Valor pronóstico del cariotipo y su utilidad para la confirmación del diagnóstico en casos con alteraciones cromosómicas típicas de MDS.**
2. **Nuevos marcadores genéticos: TET2, ASX, RPS14, c-CBL...**
3. **En casos con un cariotipo normal o sin divisiones, considerar la aplicación de la SNP/CGH array para la detección de ganancias, pérdidas y UPD/LOH-CNN (SNP array).**
4. **El IPSS se basa en el resultado de la citogenética convencional, no en los resultados de FISH, ni los de SNP/CGH arrays.**
5. **Pendiente la actualización del IPSS con nuevas categorías citogenéticas.**
6. **Incluyen las nuevas tecnologías, la citogenética sigue siendo el gold standard para la caracterización de los MDS.”**

### **Papel de la genómica en la leucemia mieloide aguda (AML)**

La AML es una enfermedad genética, y se han logrado establecer anomalías cromosómicas relacionadas con ciertos fenotipos de AML así: t(1;22) relacionada con los megacarioblastos (gen OTT/MAL); der(16) y t(9;11) para monoblastos (genes CBPB/MYH11 y AF2/MLL, respectivamente); t(15;17) para promielocitos (gen PML/RAR alfa); t(8;21) genes ETO/AML1 (también conocida como RUNX1/RUNX1T1) y t(3;21) genes EVI1/AML1 para CFU-EO o CFU-BA.

Hay 10 aberraciones balanceadas comunes en 15% de las AML. Las 4 más comunes son: t(8;21), t(15;17), der(11q23), inv(16) que se encuentran en 4.3%, 4.1%, 2.4% y 2.3%, de las AML, respectivamente.

Los genes implicados en AML se han clasificado en 2 categorías: Clase I son los genes que activan la proliferación celular. Los genes Clase II son los que bloquean la diferenciación. Los genes clase I son c-Kit, FLT3-ITD, FLT3-TKD, NRAS, KRAS, NPM1, PTPN11 (con frecuencia 12%, 5-15%, 3%, 12%, 6%, 6%, 4-6%, respectivamente). Las mutaciones que bloquean la diferenciación se dividen en reordenamientos como AML1/ETO, PML/RAR alfa, reordenamientos MLL; y mutaciones con pérdida de función: C/EBP alfa (6%), AML1, GATA1.

### **Caracterización pronóstica de AML basada en el cariotipo.**

Desde hace varios años sabemos que la citogenética establece el riesgo de AML, así: 1. De pronóstico favorable (supervivencia a largo plazo de 70%): t(8;21), inv(16), t(15;17). 2. Pronóstico intermedio (supervivencia a largo plazo de 25%): cariotipo normal, +8 y 3. Pronóstico adverso (supervivencia a largo plazo de 8%): cariotipo complejo, t(6;9), del(5q).

Estudios posteriores han demostrado que los perfiles de expresión con micro-arrays (AmpliChip Leukemia) permiten la subclasificación de leucemias con un poder discriminatorio superior a todo lo previamente existente. Específicamente, permite la t(8;21), t(15;17), inv(16), MLL, C normal + Otras, C complejo.

### **CGH en AML**

La CGH (hibridación genómica comparada) permite la detección de pérdidas y ganancias genómicas por hibridación competitiva de DNA tumoral y normal de referencia. La intensidad de fluorescencia se establece con la razón verde/rojo que sirve para evaluar la ganancia o pérdida relativa de los segmentos cromosomales. Las técnicas de CGH permiten una evaluación cuantitativa de aberraciones genómicas. Se han encontrado aberraciones genómicas en 90% de las AML y sirve para establecer el grado de inestabilidad genómica, con valor pronóstico independiente así: 1. Estable, con supervivencia mediana de 23 meses, 2. Moderadamente inestable: con supervivencia mediana de 11.63 meses, y 3. Altamente inestable con supervivencia mediana de 2.87 meses. En la diapositiva 97 hay una serie de deleciones de 5q, 7q, 16q y 17q que se asocian a los grupos de inestabilidad alta entre 15-30%, cada uno, lo que hace pensar que son MARCADORES de inestabilidad genómica, y que es ésta la que confiere el pronóstico adverso. Estos hallazgos han permitido **concluir que: 1. En la AML no hay recurrencia de alteraciones específicas de deleción o duplicación. 2. La inestabilidad genómica no específica es la aberración genética más frecuente en AML. 3. La AML puede segregarse mediante arrCGH en grupos de inestabilidad genómica con valor pronóstico superior al de los grupos citogenéticos. Las deleciones en regiones específicas están relacionadas con el grupo de alta inestabilidad genómica y pueden ser empleadas como marcadores de mal pronóstico.**

### **Notas**

**Este resumen se basa exclusivamente en la interpretación de Mauricio Lema Medina de el pdf suministrado por el docente para el Master de Oncología Molecular / CNIO 2012-2014, así como la lectura de algunas referencias relevantes para clarificar los conceptos. No se basa en la clase impartida. Todos los aciertos son del docente, y todos los desaciertos son de Mauricio Lema Medina.**

No entiendo la diapositiva sobre la zona gris del linfoma de Hodgkin (10 de 62).

Versión I: 07.01.2013.