

RECYT

Año 19 / N° 27 / 2017 / 46–50

Descripción de un caso de leucemia mieloide crónica con un cromosoma *Philadelphia* variante

A case of chronic myeloid leukemia with *Philadelphia* chromosome variant

Leandro G. Gutiérrez^{1,*}, Patricia C. Dos Santos¹, Amada Rolón¹, Ana M. Melnichuk¹, Carina F. Argüelles^{1,2}, Alberto S. Fenocchio^{1,2}

1 - Laboratorio de Citogenética y Genética Humana (LaCyGH), Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales (FCEQyN), Universidad Nacional de Misiones (UNaM), Instituto de Previsión Social de la Provincia de Misiones (IPSM) - Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT)

2 - Cátedra de Citogenética General, Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Misiones.

*E-mail: leandrogutierrez82gmail.com

Resumen

En 5–10% de los casos de Leucemia Mieloide Crónica (LMC), el cromosoma *Philadelphia* (Ph1) se origina como producto de translocaciones variantes (Ph1 variante). Estas últimas involucran otros autosomas además del 9 y 22 clásicamente implicados. Se presenta aquí un caso de LMC cuyo cromosoma Ph1 variante fue originado a partir de una translocación compleja que involucró los cromosomas 3, 9 y 22 [t(3;9;22)(p21,q34;q11)]. El análisis mediante FISH sugiere un mecanismo de formación en una etapa única, mientras el análisis por RT-PCR mostró la presencia del rearreglo molecular *BCR/ABL1* correspondiente a la isoforma p210. El paciente no presentó variaciones significativas en los parámetros de respuesta clínica (respuesta hematológica, respuesta citogenética y respuesta molecular) respecto de aquellos pacientes con el Ph1 estándar.

Palabras clave: Leucemia mieloide crónica; Cromosoma *Philadelphia*; Translocación variante.

Abstract

Among the CML there is a fraction of cases (5–10%) in which the *Philadelphia* chromosome (Ph1) originates from variant translocations (Ph1 variant), in which there are autosomes involved other than the classic 9 and 22. Here we report a case of CML where a variant Ph1 chromosome was originated from a complex translocation involving chromosomes 3, 9 and 22 [t(3,9,22)(p21,q34,q11)]. FISH analysis suggests that the mechanism of translocation occurred in a single step. Furthermore, the RT-PCR analysis also showed the presence of the classical molecular rearrangement corresponding to the *BCR/ABL1* p210 isoform. The patient showed no significant variations in the parameters of clinical response (hematologic, cytogenetic, and molecular response) from those patients carrying a standard Ph1 chromosome.

Keywords: Chronic myeloid leukemia; *Philadelphia* chromosome; Variant translocation.

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden clonal maligno de células madre hematopoyéticas pluripotentes, que resulta en un incremento de los linajes mieloide, eritroide y megacariocítico en sangre periférica (SP) acompañado de hiperplasia mieloide en médula ósea (MO) [1, 2]. El análisis citogenético generalmente revela la presencia de un cromosoma marcador característico, el cromosoma *Philadelphia* (Ph1) [3]. Este último es el resultado de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)] [4, 5]. Este rearreglo cromosómico genera el gen de fusión

BCR-ABL1, el cual se transcribe y traduce a una proteína oncogénica Bcr/Abl1 p210 con elevada actividad tirosina kinasa (TK), responsable de las manifestaciones clínicas en LMC [6, 7, 8].

Alrededor del 90% de los pacientes con LMC exhiben el cromosoma Ph1 como alteración citogenética patognomónica, sin embargo, un 5–10% presentan translocaciones variantes (Ph1 variantes), las que pueden involucrar a uno o más autosomas además de los cromosomas 9 y 22 generalmente implicados [9].

Los Ph1 variantes han sido clasificados en dos subgrupos, basados en el análisis citogenético: Ph1 variante simple, donde el cromosoma 22 se transloca con un

cromosoma diferente del 9, t(22;V), y los Ph1 variante compleja, donde los cromosomas 9 y 22 están involucrados en rearrreglos a uno o más cromosomas adicionales, t(9;22;V) [10, 11]. Todos los autosomas del complemento humano han sido implicados como posibles candidatos, sin embargo, la distribución de los puntos de ruptura no es al azar y presenta un marcado agrupamiento sobre algunas regiones cromosómicas particulares (1p36, 3p21, 3q21, 5q13, 6p21, 9q22, 11q23, 12p13, 19q13), sugiriendo que estas regiones son más proclives que otras a experimentar rupturas [12, 13].

Han sido propuestas dos vías diferentes para explicar la génesis de los Ph1 variantes: (1) un mecanismo que involucra una etapa única y (2) un mecanismo que involucra dos etapas [11, 14, 15]. El primero corresponde a un suceso único de rearrreglos donde ocurre una rotura simultánea de al menos 3 cromosomas diferentes, seguida de la reunión recíproca de los segmentos implicados [11, 16]. No obstante y de acuerdo con la literatura, este tipo de rearrreglo no conferiría ningún impacto en el fenotipo o en el pronóstico de la patología, respecto de pacientes con el cromosoma Ph1 estándar [14]. En cambio, un mecanismo de dos etapas, implica que, en un primer evento tiene lugar la translocación clásica t(9;22) la que es seguida de un segundo evento de translocación con un tercer cromosoma [11, 15]. Dicho mecanismo sugiere que la formación del Ph1 variante es en esencia producto de una evolución clonal [15; 17, 18; 19]. Por consiguiente, determinar el mecanismo involucrado en la formación del Ph1 variante podría tener relevancia clínica, ya que un mecanismo en dos etapas, al tratarse de evolución clonal, con la adquisición de nuevas alteraciones (la segunda translocación) estaría asociado con un peor pronóstico, falta de respuesta al tratamiento y una evolución acelerada de la enfermedad [14, 17, 20].

Materiales y Métodos

Se presenta el caso de un paciente masculino con LMC, de 48 años de edad. Al momento del diagnóstico, presentaba: 110.000 leucocitos/ml, 4.950000 hematíes/ml, 155.000 plaquetas/ml y un hematocrito de 40 %.

A partir de una muestra de MO se realizó el análisis citogenético convencional (Banda G) en 20 metafases describiéndose el cariotipo obtenido, siguiendo normas establecidas en el ISCN 2009 [21]. Asimismo se realizaron análisis de Hibridación in situ por fluorescencia (FISH por sus siglas en inglés) utilizando sondas doble fusión/doble color para el gen BCR/ABL1 (LIVE Probes, Lexel In Vitro), analizándose un total en 200 núcleos interfásicos. Por otro lado, a partir de una muestra de SP del paciente se evaluó, mediante RT-PCR-Nested (retro-transcripción- reacción en cadena de la polimerasa, en dos rondas consecutivas de amplificación anidada), la expresión del gen quimérico en sus dos variantes p210 (b2a2) y p210 (b3a2). Para la primer ronda de amplificación se utilizaron los cebadores NB1: 5'GAGCGTGCAGAGTG-GAGGGAGAACA3' y ABL3(-): 5'GGTACCAGGAGT-GTTTCTCCAGACTG3', y para la segunda ronda CA3(-): 5'TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG3' y BA2: 5'TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT3' [22].

Resultados

A través del estudio citogenético clásico se confirmó, en el paciente, la presencia del cariotipo: 46,XY,t(3;9;22)(p21;q34;q11)[20] (Fig. 1). El análisis mediante FISH con estrategia doble fusión/doble color, mostró un patrón de señales: 1 fusión (F), 2 rojos (R), 2 verdes (V) en todos los núcleos interfásicos analizados, patrón diferente al esperado para un Ph1 clásico (2F,1R,1V), (Fig. 2). Finalmente la amplificación por RT-PCR demostró la expresión de la isoforma p210 (b2a2) del gen quimérico BCR/ABL1 clásico (Fig. 3).



Figura 1: A y B: foto-micrografías de una misma célula en metafase donde se observa la translocación compleja t(3;9;22)(p21;q34;q11). C: Idiograma de los cromosomas 3,9 y 22 normales y de los derivados correspondientes implicados en la translocación compleja. Las flechas indican el sentido de la translocación.

Una vez confirmado el diagnóstico, el paciente inició tratamiento con Imatinib (IM) (400 mg/día), el cual continúa en la actualidad.

Discusión

En un 5–10%, la formación del gen quimérico BCR/ABL1 es producida a través de translocaciones variantes, donde aproximadamente la mitad de ellas han sido reportadas como complejas [9]. Si bien cualquier cromosoma puede estar involucrado en el rearrreglo, la t(3;9;22) es la más frecuentemente observada en casos de LMC, siendo 3p21 el punto de ruptura más comúnmente observado [9, 23, 24, 25].

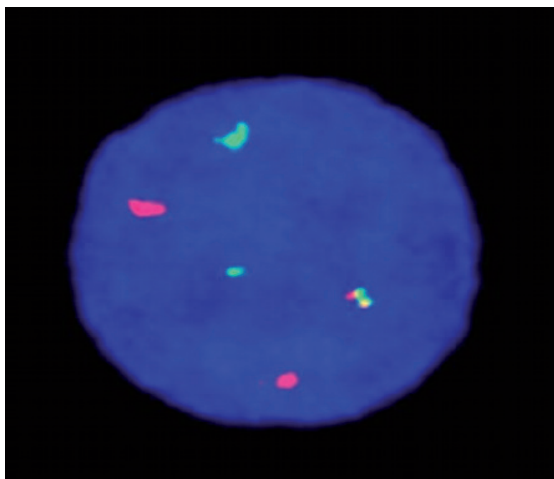
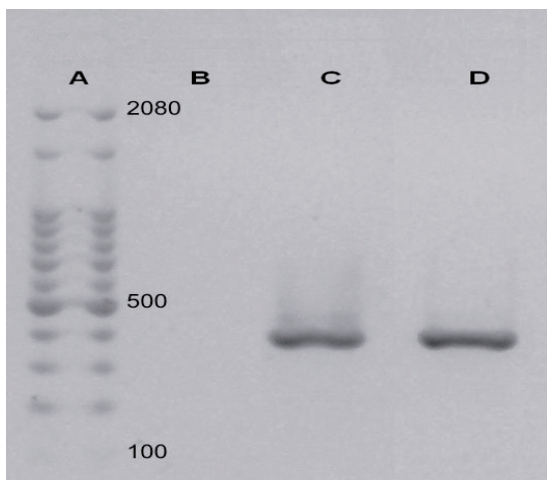


Figura 2: Fotomicrografía de una célula en interfase mostrando un patrón de señales coincidente con una translocación variante compleja. Señal amarilla (fusión) corresponde al gen BCR/ABL1. Señales rojas: una corresponde al der(9), mientras la restante pertenece al cromosoma 9 no implicado en la translocación. Señales verdes: una corresponde a la porción del gen BCR translocado al der(3), mientras que la señal restante pertenece al cromosoma 22 no involucrado en la translocación. **Figura 3:** Amplicones obtenidos a partir de una muestra de sangre periférica, mediante RT-PCR anidada para p210 (383pb). A: Marcador de peso molecular (100 pb); B: Control negativo (H₂O); C: control positivo; D: muestra del paciente con amplificación.

Los estudios sobre el valor pronóstico de las translocaciones complejas han producido resultados contradictorios

en etapas previas al empleo de inhibidores de tirosina kinasa (ITKs), como el Imatinib (IM) en el tratamiento de LMC [17]. Como mencionáramos previamente, un mecanismo en dos etapas implicaría una evolución clonal, lo cual lleva aparejado el progreso de la enfermedad; mientras que un mecanismo en una sola etapa, a pesar de su naturaleza compleja, pareciera no mostrar diferencias pronosticas respecto de pacientes con Ph1 [14, 17].

Si bien el análisis citogenético clásico con bandeo G es necesario para identificar los cromosomas involucrados en la translocación compleja, éste no resulta suficiente para dilucidar el mecanismo implicado, por ello el análisis complementario con FISH utilizando un enfoque doble fusión/doble color se torna necesario [19]. En el presente caso, el patrón de señales 1F, 2R, 2V hallado, es congruente con un mecanismo de translocación en una etapa, donde sólo puede detectarse la señal de fusión sobre el cromosoma Ph1 variante. Si por el contrario, se tratara de un mecanismo en dos etapas, el análisis por FISH hubiera revelado una segunda señal de fusión que correspondería al cromosoma der(9), similar a la señal encontrada en casos con Ph1 estándar, la que posteriormente se transloca (el segundo evento) al tercer cromosoma involucrado [18, 26].

Los puntos de vista respecto del pronóstico en estos pacientes son aún contradictorios para algunos autores. No obstante, es importante destacar que en casos particulares, o en algunas series pequeñas de casos informados en la literatura, donde incluso se han empleado regímenes de tratamiento superiores como lo son los ITKs, el pronóstico fue desfavorable [13, 15]. Recientemente una serie de reportes han indicado que la translocación compleja que involucra al brazo corto del cromosoma 3 (3p21), independientemente del mecanismo de translocación implicado, tiene un curso más agresivo bajo regímenes de tratamiento con Interferon-alfa o Hidroxiurea [27], o incluso con un régimen superior de tratamiento como es el caso de los ITKs [28]. Este pronóstico desfavorable pareciera ser el resultado de deleciones sobre el der(9) involucrado en la translocación compleja, las que son más frecuentes en estos casos [29], y que afectarían genes supresores de tumores explicando de esta forma el mal pronóstico observado en estos casos [30].

Sin embargo, los datos más recientes, obtenidos del análisis de grandes series de pacientes sugieren que, bajo regímenes de tratamiento superiores como los alcanzados con el uso de ITKs [31, 32], la presencia de un Ph1 variante no tendría impacto alguno sobre los valores de respuesta citogenética o molecular a largo plazo, independientemente del mecanismo o del número de cromosomas involucrados en el Ph1 variante [33, 34, 35]. Por lo tanto, las características hematológicas y el pronóstico clínico serían similares en pacientes con diagnóstico de LMC portadores de Ph1 y Ph1 variantes, cuando son tratados con IM o algún otro tipo de ITKs de primera línea [36, 37]. En nuestro caso, el paciente inició tratamiento con IM (400 mg/día), el que

continúa en la actualidad con muy buenos parámetros de respuesta hematológica, citogenética y molecular [33, 36, 38].

Conclusiones

Todos los clones analizados en el paciente presentaron el Ph1 variante descrito como único cambio. No se observaron metafases que presentaran otras alteraciones asociadas, lo que conjuntamente con el patrón de señales hallado de FISH, nos permite sugerir que la alteración observada es el resultado de tres rupturas simultáneas en una misma célula y no de un proceso de múltiples eventos. Por otra parte, y a pesar de la naturaleza genéticamente compleja del caso descrito en el presente trabajo, este hecho, no parece constituir un factor de peor pronóstico para la respuesta a tratamiento con IM como primera línea, conservando parámetros de respuesta hematológica, citogenética y molecular óptimos.

Sin embargo, resaltamos la importancia del análisis realizado y el informe del caso, lo que permitirá a futuro y con un número creciente de casos analizados y publicados, una correlación adecuada con los datos clínicos lo que podría en conjunto contribuir a esclarecer nuevos aspectos sobre los mecanismos subyacentes involucrados en translocaciones complejas así como las implicancias fenotípicas que ellas pudieran tener, no sólo en LMC, sino también en otros tipos de patologías oncológicas como algunos subtipos de leucemia mieloide aguda, leucemia linfoblástica aguda y diversos subtipos de linfomas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Comité Ejecutivo de Desarrollo e Innovación Tecnológica (CEDIT) por las becas otorgadas durante el desarrollo de este trabajo.

Bibliografía

- Kantarjian, H.; Talpaz, M.; Giles, F. [et al]. *New insights into the pathophysiology of chronic myeloid leukemia and imatinib resistance*. Annals of Internal Medicine 19; 145: 913–923. 2006.
- Kurzrock, R.; Kantarjian, HM.; Druker, BJ. [et al]. *Philadelphia Chromosome-Positive Leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics*. Annals International Medicine 10, 138: 819–830. 2003.
- Nowell, PC. & Hungerford, DA. *A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia*. Science, 132: 1497. 1960.
- Rowley, JD. *A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia*. Nature 243: 290–293. 1973.
- Rowley, JD. *The critical role of chromosome translocations in human leukemias*. Annual Review of Genetics 32: 495–519. 1998.
- Fröling, S. & Dohner, H. *Chromosomal abnormalities in cancer*. The New England Journal of Medicine 359: 722–34. 2008.
- Goldman, J. & Melo, J. *Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment*. The New England Journal of Medicine 349: 1451–1464. 2003.
- Melo, JV.; Hughes, TP. & Apperley, JF. *Chronic myeloid leukemia Hematology/American Society of Hematology* 1: 132–137. 2003.
- Heim, S. & Mitelman, F. *Cancer cytogenetics*, 3rd Edition. Hoboken, New Jersey, Wiley Blackwell, a John Wiley & Sons, Inc., publication. Cap 7, p179–207. 2009.
- Gallego, S.; Baialardo, E.; Gutiérrez, M. [et al]. *A new variant Ph translocation in chronic myeloid leukemia: t(Y;22)(p11;q11)*. Cancer Genetics and Cytogenetics 87: 75–78. 1996.
- Naumann, S. & Decker, H. *Genesis of variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelocytic leukemia*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 147: 18–22. 2003.
- Fisher, AM.; Strike, P.; Scott, C. [et al]. *Breakpoints of variant 9;22 translocations in chronic myeloid leukemia locate preferentially in the CG-richest regions of the genome*. Genes Chromosomes & Cancer 43: 383–389. 2005.
- Bennour, A.; Sennana, H.; Laatiri, A. [et al]. *Molecular cytogenetic characterization of variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia: genesis and deletion of derivative chromosome 9*. Cancer Genetics and Cytogenetics 194: 30–37. 2009.
- Richerbourg, S.; Eclache, V.; Perot, C. [et al]. *Mechanisms of genesis of variant translocation in chronic myeloid leukemia are not correlated with ABL1 or BCR deletion status or response to imatinib therapy*. Cancer Genetics and Cytogenetics 182: 95–102. 2008.
- Gorusu, M.; Benn, P.; Li, Z. [et al]. *On the genesis and prognosis of variant translocations in chronic myeloid leukemia*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 173: 97–106. 2007.
- Belli, C.; Alú, MF.; Alfonso, G. [et al]. *Novel variant Ph translocation t(9;22;11)(q34;q11.2;p15)inv(9)(p13q34) in chronic myeloid leukemia involving a one-step mechanism*. Cytogenetic and Genome Research 132, 4: 304–308. 2011.
- Reid, AG.; Huntly, BJ.; Grace, C. [et al]. *Survival implications of molecular heterogeneity in variant Philadelphia-positive chronic myeloid leukaemia*. British Journal of Haematology 121: 419–427. 2003.
- Yehuda, O.; Abeliovich, D.; Ben-Neriah, S. [et al]. *Clinical implications of fluorescence in situ hybridization analysis in 13 chronic myeloid leukemia cases: Ph negative and variant Ph-positive*. Cancer Genetics and Cytogenetics, 114:100–107. 1999.
- Reddy, KS. & Sulcova, V. *A FISH study of variant Philadelphia rearrangements*. Cancer Genetics and Cytogenetics

- tics, 118:121–131. 2000.
20. Loncarevic, IF; Romer, J.; Starke, H. [et al]. *Heterogenic molecular basis for loss of ABL1-BCR transcription: deletions in der(9)t(9;22) and variants of standard t(9;22) in BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia*. Genes Chromosomes & Cancer 34: 193–200. 2002.
 21. Shaffer, L.; Slovak, M. & Campbell, L. -editors-. *International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Cytogenetic and Genome Research. 2009.
 22. Cross, N. *Detection of BCR-ABL in Hematological Malignancies by RT-PCR*. Cotter F.E. Molecular Diagnosis of Cancer. Cap. 2, p. 25–36. 1996.
 23. **Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. (2013)**. Mitelman F, Johansson B & Mertens F. Available at <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>. (verificado: Sep 2015).
 24. Barbata, G.; Granata, G.; Bellanca, F. [et al]. *Complex translocation t(3;9;22) and paracentric inversion of chromosome 3 in blastic crisis of chronic myeloid leukemia*. Cancer Genetic and Cytogenetic 20: 305–309. 1986.
 25. Albano, F.; Anelli, L.; Zagaria, A. [et al]. *Non-random distribution of genomic features in breakpoint regions involved in chronic myeloid leukemia cases with variant t(9;22) or additional chromosomal rearrangements*. Molecular Cancer, 9:120. 2010.
 26. Bennour, A.; Bellâaj, H.; Youssef, B. [et al]. *Molecular cytogenetic characterization of Philadelphia-negative rearrangements in chronic myeloid leukemia patients*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 137:1329–1336. 2011.
 27. Buda, G.; Orciulo, E.; Maggini, V. [et al]. *Complex translocation t(3;9;22)(p21;q34;q11) at diagnosis is a negative prognostic index in chronic myeloid leukemia*. Leukemia research, 32: 192–194. 2008.
 28. Tan, J.; Cang, S.; Seiter, K. [et al]. *t(3;9;22) 3-Way chromosome translocation in chronic myeloid leukemia is associated with poor prognosis*. Cancer Investigation, 27:718–722. 2009.
 29. Gutiérrez, LG.; Belli, C.; Ferri, C. [et al]. *Clonal Evolution and Cytogenetic Changes in Chronic Myeloid Leukemia*. Urbano K., NOVA Publisher group: Advances in genetics Research. Vol. 11, Cap. 8, p. 181–200. 2014. Available at https://www.novapublishers.com/catalog/product_info.php?products_id=47854 (verificado Sep 2015).
 30. Specchia, G.; Albano, F.; Anelli, L. [et al]. *Derivative chromosome 9 deletions in chronic myeloid leukemia are associated with loss of tumor suppressor genes*. Leukemia & Lymphoma 45, 4: 689–694. 2004.
 31. Druker, B.; Talpaz, M.; Resta, D. [et al]. *Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia*. The New England Journal of Medicine 344-a: 1031–1037, 2001.
 32. Druker, B.; Sawyers, C.; Kantarjian, H. [et al]. *Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome*. The New England Journal of Medicine 344-b: 1038–1042, 2001.
 33. Baccarani, M.; Cortes, J.; Pane, F. [et al]. *Chronic myeloid leukemia: an update of concepts and management recommendations of European LeukemiaNet*. Journal of Clinical Oncology, 27: 6041–6051. 2009.
 34. Batty, N.; Kantarjian, H.; Borthakur, G. [et al]. *Patients with chronic myeloid leukemia with variant Philadelphia chromosome (Ph) translocations have a similar outcome as those with classic Ph when treated with imatinib or 2nd generation TKI*. Blood 112: 1108. 2008.
 35. Marzocchi, G.; Castagnetti, F.; Luatti, S. [et al]. *Variant Philadelphia translocations: molecular-cytogenetic characterization and prognostic influence on frontline imatinib therapy, a GIMEMA Working Party on CML analysis*. Blood, 117: 6793–6800. 2011.
 36. Baccarani, M.; Deininger, MW., Rosti, G. [et al]. *European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia*. Blood, 122: 872–884. 2013.
 37. Koshiyama, DB.; Capra, ME.; Paskulin, G. [et al]. *Cytogenetic response to imatinib treatment in Southern Brazilian patients with chronic myelogenous leukemia and variant Philadelphia chromosome*. Ann Hematol 92:185–189. 2013.
 38. Belligoy, L.; Bengio, R.; Bordone, J. [et al]. *Guías de tratamiento: Leucemia Mieloide Crónica*. Sociedad Argentina de Hematología. Editora: Silvina Palmer. Tomo II: 503. Available at http://www.sah.org.ar/guias_hematolo.asp. (verificado Sep. 2015).

Recibido: 23/06/2014.

Aprobado: 31/05/2016.