

ANÁLISIS CITOGENÉTICO EN INDIVIDUOS CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO

César Paz y Miño^{1,2}, Verónica Dávalos¹, J.Christian Pérez¹, Ligia Ocampo⁴,
Diana Jácome³, Juan Sguirla³, Francisco Cevallos³, Frank Weilbauer³,
Tatiana Rodríguez⁵, Paola E. Leone^{1,2}.

¹Laboratorio de Genética Molecular y Citogenética Humana. Departamento de Ciencias Biológicas.

²Unidad de Genética. Facultad de Medicina. Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
Apartado 17-01-2148. Quito.

³Servicio de Hematología. Cruz Roja Ecuatoriana. Quito.

⁴Laboratorio de Genética. Instituto Nacional del Cáncer. SOLCA. Quito.

⁵Hospital de la Policía. Quito-Ecuador.

RESUMEN

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son desórdenes hematopoyéticos en los que, se ha demostrado, ocurren cambios cromosómicos no al azar, por lo que es conveniente que el diagnóstico hematológico sea respaldado por un análisis citogenético. En este estudio se presenta el análisis cromosómico de 33 individuos diagnosticados hematológicamente con SMD. En relación a los hallazgos citogenéticos, el 42,42% de los pacientes presentaron anomalías cromosómicas, entre ellas +8, 5q-, -7 y +18. Este es el primer estudio citogenético en individuos con SMD que se realiza en el país, por lo que aún no hay datos estadísticos al respecto, pero se espera sea la pauta para investigaciones posteriores en que los resultados hematológicos se sustenten con un estudio citogenético.

PALABRAS CLAVES: Síndrome mielodisplásico, citogenética, leucemia, célula madre hematopoyética.

ABSTRACT

The myelodysplastic syndromes (MDS) are hematopoietic disorders where, it has been demonstrated, non random chromosomal changes occur, reason why it is convenient that the hematological diagnosis be backed up by a cytogenetic analysis. This trial presents the chromosomal analysis of 33 patients whose hematological diagnosis was MDS. In relation to the cytogenetic discoveries, 42,42% patients presented chromosome anomalies, such as +8, 5q-, -7, and +18. This is the first cytogenetic study on patients with MDS that is carried out in Ecuador, reason why there is no information or statistic data about it, but we hope it would set the pace for further research where the hematologic results would be sustained by cytogenetic studies.

KEY WORDS: Myelodysplastic syndrome, cytogenetic, leukemia, hematopoietic stem cell.

INTRODUCCIÓN

Los síndromes mielodisplásicos (SMD) son un grupo de desórdenes hematopoyéticos caracterizados por una proliferación anormal y defectos en la diferenciación y maduración de las células hematopoyéticas.¹ El desorden se origina en la célula madre en la que ha ocurrido una mutación, la cual probablemente le confiere una selectiva ventaja proliferativa con respecto a las demás células madre.² El clon derivado de esa célula madre anormal va reemplazando progresivamente a las células hematopoyéticas normales; como resultado se presentan un amplio rango de manifestaciones clínicas, siendo las más

características una médula ósea hiper celular y la pancitopenia periférica. Estos síndromes afectan principalmente a personas mayores de 50 años; en el Ecuador no se conoce su incidencia, pero en E.U.A. es de 0.5 a 1 en 100.000.³

Según la clasificación French-American-British (FAB), se han establecido subtipos de SMD basados en el porcentaje de blastos en la sangre periférica y en la médula (Tabla No. 1).

Cuando el porcentaje de blastos en la médula es mayor a un 30%, ya se considera una leucemia mieloide aguda (LMA); es por esto que muchas veces se considera a los SMD como síndromes preleucémicos, pero hay que tener en cuenta que sólo del 10 al 40% de pacientes con SMD llegan a

a desarrollar LMA, esto dependerá de la ventaja de crecimiento del clon anormal y su velocidad de expansión. El riesgo de progresar a una LMA se ha visto que está asociado con la presencia de clones con múltiples arreglos cromosómicos o con una única anomalía que involucre delección parcial o monosomía del cromosoma 7⁽⁴⁾.

En lo que se refiere a análisis citogenéticos, ningún cambio cromosómico es específico para SMD, todos caracterizan también otros desórdenes mieloides, aunque se ha visto que los cambios cromosómicos no ocurren al azar, al menos al inicio de la enfermedad; por el contrario, parecen estar limitados y, consecuentemente, deben tener un rol específico en el desarrollo de la enfermedad. Los cambios cromosómicos descritos han sido asociados con la causa del SMD, así los cambios cromosómicos comunes en un SMD primario (SMD-p), los cambios cromosómicos en un SMD asociado a la exposición a mutágenos y los SMD relacionados con terapia (SMD-t) se presentan en la tabla No. 2.

Se ha encontrado que de todas estas anomalías 5q- es la más frecuente en AR; -5,-7, der (12p) en ARB y +8, der (11q) en ARS.2 Recientemente se reportó un caso de pentasomía 8q en mielodisplasia y su posible rol en la etiología de la leucemia está en discusión⁽⁵⁾.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron citogenéticamente las médulas óseas de 33 pacientes con SMD, referidos de la Cruz Roja Ecuatoriana y el Hospital de la Policía. Para el análisis se consideró el diagnóstico hematológico y la edad y sexo del paciente. La muestra de médula ósea se extrajo por punción directa de cresta iliaca y se recolectó en un frasco con heparina. Luego se preparó la muestra para el estudio cromosómico utilizando la técnica directa y cultivo corto de 24 horas^{1,6}; se colocó la muestra en 5cc de medio de cultivo RPMI 1640, añadiendo suero Newborn a una concentración de 13,5% penicilina-estreptomina 0,075ml, glutamina 0,075ml y hipes buffer 0,025ml. Se agregó 250 microlitros de colchicina y se incubó por hora y media a 37°C. Pasado ese tiempo, se aplicó la técnica habitual: choque hipotónico con cloruro de potasio al 0,54% en agua por 20 minutos, fijador de Carnoy (1:3, ácido acético: metanol) por 20 minutos y 3 lavados consecutivos. Luego se extendieron las muestras y se tiñeron con Giemsa, finalmente se llevó a cabo la técnica de bandas

GTG (Tripsina Giemsa). Las placas se observaron al microscopio y se contabilizaron un mínimo de 20 metafases por caso, anotándose las alteraciones numéricas y estructurales presentes en cada uno.

RESULTADOS

De los 33 pacientes con SMD estudiados, 13 mujeres y 20 hombres, 14 casos (42,42%) presentaban anomalías cromosómicas como se muestra en la tabla No. 3. Las anomalías encontradas fueron +8, 5q-, +18 y -7, además de hiperploidias y fragilidad en 2 y 3 casos, respectivamente. La anomalía +18 se encontró en 4 casos, a pesar de no ser descrita en las tablas de anomalías más frecuentes. Para las anomalías -7, 5q- y +8 se identificaron 1, 2 y 3 casos respectivamente. De los 20 pacientes menores de 50 años, 5 presentaron anomalías cromosómicas (25%). Se presenta un sólo caso con dos defectos cromosómicos (3,03%), a diferencia de cariotipos normales (57,58%) y rearrreglos únicos (39,39%) que se observaron con mayor frecuencia.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados confirman que entre las anomalías cromosómicas presentes en los SMD están +8, 5q- y -7, aunque muestran que el porcentaje de pacientes con anomalías es del 42,42%, mientras otros investigadores han reportado una incidencia del 48 al 73%.⁷ Tal discrepancia podría deberse a tres causas: Primero, un problema en el diagnóstico hematológico. Segundo, heterogeneidad genética en nuestra población en relación a las poblaciones extranjeras en las que se han realizado estos análisis, teniendo en cuenta que este es el primer estudio de SMD en el país, por lo que no hay datos para establecer comparaciones y llegar a conclusiones con una mayor precisión. Tercero, se necesitarían hacer otros análisis citogenéticos para incrementar la incidencia de rearrreglos cromosómicos en los casos estudiados. Por otro lado, la anomalía +18, presente en 4 de los casos, aunque no se encuentra en las tablas de alteraciones cromosómicas más frecuentes en los SMD, ya ha sido informada en análisis anteriores.^(1,4) Con respecto a las edades de los pacientes, estas oscilan entre los 7 y 85 años, siendo más del 50% menores de 40 años (20 casos). Si se considera que los SMD aparecen principalmente en personas mayores, se podría pensar que el resultado

hematológico, al referir al paciente con SMD, no coincidió con el análisis citogenético; pero estudios recientes han reportado casos de SMD en menores de 50 años, incluso infantes por lo que se debería reconsiderar lo expuesto, anotando que los casos de SMD en menores son relativamente raros, aunque no ausentes.^{8,9,10} De estos 20 casos, 5 presentaron anormalidades, tal vez porque el desarrollo de la enfermedad se inició más temprano, aunque esto no se podría asegurar ya que no se hizo un seguimiento de los pacientes, causa por la que tampoco se podría confirmar la aparición de arreglos secundarios durante el curso de la enfermedad.

Los análisis hematológicos no establecieron el subtipo de SMD, así que no se ha establecido la relación entre subtipo y anormalidad que presenta; pero según la revisión bibliográfica podría esperarse que se tratara de una AR y una ARS, en el caso de las anormalidades más frecuentes 5q- y +8, respectivamente.

Las historias no incluían datos que nos permitan categorizar si se trató de un SMD-p, SMD-t o SMD debido a la exposición a mutágenos.

En 3 casos se reporta fragilidad y en 2 hiperploidía, lógico resultado de un síndrome caracterizado por proliferación anormal; así como otros rearreglos +18, -7 y -13.

Por todo lo anterior, queda clara la importancia del trabajo hematológico y citogenético en conjunto: cualquier diagnóstico hematológico de un síndrome que, se conozca, está relacionado con anomalías cromosómicas, debe estar respaldado por un análisis citogenético ya que esto resultaría útil para establecer sobrevida del paciente y hacer un seguimiento post-tratamiento. El análisis citogenético facilita también el diagnóstico en pacientes con inexplicada anemia, macrocitosis, neutropenia o trombocitopenia en los cuales no hay incremento de blastos y hay muy poca evidencia morfológica de displasia.⁷ Además, la naturaleza del cambio en el cariotipo podría indicar hasta que punto el SMD ha aparecido por la influencia de mutágenos ambientales; y se podría cuantificar un incremento en la agresividad de la enfermedad, ya que conforme esta avanza aparecen anormalidades cromosómicas adicionales que se evidenciarían en el estudio citogenético.

En los últimos años, también se han realizado estudios moleculares en SMD y se han identificado oncogenes que estarían relacionados con el desarrollo de la enfermedad. Este es el caso de los oncogenes N-ras y K-ras cuya activación,

se ha demostrado, juega un rol importante en la leucemiogénesis tanto de las leucemias relacionadas con terapia como en los SMD.^{11,12,13}

Investigaciones recientes reportan que mutaciones ras involucran un mal pronóstico en infantes con LLA e incrementan el riesgo de transformación a leucemias en pacientes con SMD.¹⁴ La activación de estos oncogenes se ha demostrado en aproximadamente un 35% de pacientes con SMD. Se han reportado mutaciones en el gen FMS, el cual codifica para el receptor CSF-1, en un 16% de casos con SMD y datos preliminares indican que defectos en genes supresores de tumor, tales como p53 contribuirían en el desarrollo de la enfermedad.¹¹ Se ha planteado la hipótesis que el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) jugaría un rol importante en la patofisiología de la inefectiva hematopoyesis observada en SMD.⁸ Se han establecido también correlaciones entre pacientes con mutaciones en el gen FLT3 y transformación a leucemias con antecedentes de mielodisplasia apoyando el hecho que la acumulación de eventos genéticos, incluyendo duplicación de FLT3, conlleva a un mal pronóstico.¹⁵ Se ha estudiado además la expresión de Fas y su rol en la inducción a apoptosis en la médula ósea en pacientes con SMD, y se sugiere que el sistema Fas-FasL jugaría un rol importante en este sistema.^{16,17,18}

A nivel de diagnóstico, se están utilizando también técnicas como PCR y FISH para la caracterización de aberraciones cromosómicas presentes en los SMD, se han mapeado así los puntos de ruptura entre los marcadores TCF-7 y IL-9 en el cromosoma 5, y OL-7 y s30A4 en el cromosoma 16.¹⁹

Las investigaciones en SMD están además enfocadas hacia la búsqueda de tratamientos alternativos al trasplante alogénico de médula y quimioterapia, los cuales conllevan altos riesgos en pacientes mayores de 55 años. Recientes estudios están probando la eficacia de la utilización de factores de crecimiento hematopoyéticos (HGF) para estimular la producción de células sanguíneas en la médula ósea, o estimular a las células hematopoyéticas normales residuales para su transformación a glóbulos rojos maduros en pacientes con SMD; así como también la administración de vitaminas, hormonas esteroideas y agentes inmunosupresivos para controlar la pancitopenia y la hiper celularidad de la médula.³ En este punto, el análisis citogenético sería de gran utilidad para establecer la eficacia del tratamiento utilizado, conociendo que el número de rearreglos y anormalidades

crmosómicas aumenta conforme avanza la enfermedad.
De esta forma se podrían relacionar los análisis hematológicos con los resultados citogenéticos, tanto para establecer el diagnóstico, la sobrevida del paciente y los efectos del tratamiento.

Tabla 1 SUBTIPOS DE SMD SEGÚN LA CLASIFICACIÓN FAB*

Tipo	Sangre periférica	Médula ósea
Anemia refractoria (AR)	< 1% blastos	<5% blastos
A.R. con sideroblastos (ARS)	<1% blastos	15% sideroblastos
A.R. con exceso de blastos (AREB)	>5% blastos	5-20% blastos
A.R.E.B. en transformación (AREB-t)	>5% blastos	21-30% blastos
Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	<5% con > 1x10 ⁹ /L monocitos	0-20% blastos + promonocitos

Fuente: Sandberg, 1990¹

*Se considera a la anemia refractoria sin exceso de blastos (ARSB) equivalente a la anemia refractoria (AR).

Tabla 2 CAMBIOS CROMOSÓMICOS COMUNES EN SMD

SMD-p	SMD-mutágenos	SMD-t
-7	t (6;9)	del (5q)
+8	t (2;11)	del (7q)
del (5)	(q12q34)	t (1;7) -5
del (7q)		del (12p)
del (11q)		t (1;7) (p11;p11)
del (12) (q11q13)		Pueden estar acompañados por
del (13q)		+8
del (20) (q11q13)		-17
		+21
		t (3p)
		t (6p)
		t (19 q o p)
		t o dup(Xq13)
		t (Xp11)

Fuente: Sandberg, 1990¹ y Jotterand-Bellomo et al., 1990².

Tabla 3 PACIENTES CON SMD ESTUDIADOS

Caso No.	Código	Sexo y edad	Diagnóstico	Resultado citogenético
1	M-1	M/30	SMD	46,XY
2	M-2	M/30	SMD	46,XY
3	M-6	M/70	SMD	46,XY/47,XY,+18
4	M-7	M/70	SMD	46,XY
5	M-8	F/20	SMD	46,XX
6	M-15	M/26	SMD	46,XY
7	M-19	F/12	SMD	46,XX
8	M-23	F/42	SMD	46,XX(80%)/fra 20%
9	M-25	M/73	SMD	46,XY
10	M-27	M/66	SMD	46,XY(58%)/48,XY,+18,+18
11	M-30	F/81	SMD	46,XX
12	M-32	M/21	SMD	46,XY
13	M-35	F/17	SMD	46,XX(62%)/fra (38%)
14	M-54	F/40	SMD	46,XX (80%)/44,-7,-15(20%)
15	M-55	M/19	SMD	46,XY
16	M-56	M/24	SMD	46,XY
17	M-81	M/66	SMD	46,XY(80%)/hiperploide(20%)
18	M-82	F/17	SMD	46,XX,5q-
19	M-100	F/17	SMD	46,XX
20	M-101	M/55	SMD	46,XY(80%)/frag20%
21	M-109	M/7	SMD	46,XY
22	M-110	M/85	SMD	46,XY(20%)/hiperploide(80%)
23	M-119	M/26	SMD	46,XY
24	M-126	M/12	SMD	46,XY
25	M-168	M/10	SMD	46,XY
26	M-200	M/51	SMD	47,XY,+8
27	M-234	F/20	SMD	46,XX
28	MP-O	F/19	SMD	46,XX
29	MP-P	F/66	SMD	47,XX,+8
30	MP-Q	M/67	SMD	47,XY,+18/47,XY,+8
31	MP-R	M/16	SMD	46,XY,5q-
32	MP-S	F/78	SMD	47,XX,+18
33	MP-T	F/63	SMD	46,XX

AGRADECIMIENTOS

Al Proyecto BID-FUNDACYT-PUCE N° III, quienes financiaron parcialmente la presente investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sandberg, A.: The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia. Segunda Edición, pp. 521-569. Elsevier Editora, New York, 1990.
2. Partier, V.: van Melle, G.: Beris, P.: Schmidt, P.: Tobler, A.: Haller, E.: Jotterand Bellomo, M.: Hematologic, clinical and cytogenetic analysis in 109 patients with primary myelodysplastic syndrome. Cancer Genet. Cytogenet. 78: 219-231, 1994.
3. Castro-Malaspina, H.: Myelodysplastic Syndromes Answer Book. Aplastic Anemia Foundation of America, Maryland, 1996.
4. Jotterand-Bellomo, M.: Partier, V.: Schmidt, P.: Beris, P.: Cytogenetic analysis of 54 casos of myelodysplastic syndrome. Cancer Genet. Cytogenet. 46: 157-172, 1990.
5. Kwong, Y.: Chan, T.: Pentasomy 8q in myelodysplasia. Cancer Genet. Cytogenet. 100: 179-181, 1998.
6. Sandberg, A.: Abe, S.: Cytogenetic techniques in hematology. Cll. Haematol. 9: 19, 1980.
7. Rooney, D.: Czepulkowski, H.: Human Cytogenetics. A practical Approach. Segunda Edición, pp. 50-58. Series Editoras: D. Rickwood y B.D. Hames, Oxford, 1992.
8. Winter, S.: Hanissian, G.: Harville, T.: Ware, R.: Tumor necrosis factor-alpha suppresses hematopoiesis in children with myelodysplasia. Med. Pediatr. Oncol. 28: 69-74, 1997.
9. Mielot, F.: Bader-Meunier, B.: Tchernia, G.: Dommergues, J.: Myelodysplasia in children and mitochondrial cytopathias. Pathol. Biol. 45: 594-599, 1997.
10. Anónimo.: Forty-four cases of childhood myelodysplasia with cytogenetics.
11. Bartam, C.: Molecular genetic aspects of myelodysplastic syndromes. Hemat. Oncol. Clin. of North America. 6: 557-569, 1992.
12. Brian, S.: Reis, M.: Oncogene Involvement in Myelodysplasia and Acute Myeloid Leukemia. Tumor Biol. 11: 44-58, 1990.
13. Inokuchi, K.: Amuro, N.: Futaki, M.: Dan, K.: Shinohara, T.: Kuriya, S.: Okazaki, T.: Nomura, T.: Transforming genes and chromosome aberrations in therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome. Ann. Hematol. 62: 211-216, 1991.
14. Parry, T.: The non-random distribution of point mutations in leukaemia and myelodysplasia pointer to their aetiology. Leuk. Res. 21: 559-574, 1997.
15. Horike, S.: et al. Tandem duplication of the FLT3 receptor gene are associated with leukemic transformation of myelodysplasia. Leukemia. 11: 1442-1446, 1997.
16. Bouscary, D.: et al. Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndrome. Leukemia. 11: 839-845, 1997.
17. Kitawa, M.: et al. Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. Leukemia. 12: 486-492, 1998.
18. Irvine, A.: Magill, M.: Somerville, L.: McMillin, M.: Spontaneous intramedullary apoptosis is present in disorders other than myelodysplasia. Exp. Hematol. 26: 435-439, 1998.
19. Van Soest, R.: et al. Sublocalization of the breakpoint of a t(5;6) in myelodysplasia. Cancer Genet. Cytogenet. 100: 5-9, 1998.