

qChip Hemo

Background

Las neoplasias malignas de célula B madura incluyen una variedad de enfermedades hematológicas que resultan de la proliferación clonal de linfocitos B maduros e inmunocompetentes (Tabla 1). Con frecuencia el diagnóstico preciso de los mismos es dificultoso, y requiere considerar en conjunto las manifestaciones clínicas, la morfología, el inmunofenotipo, y los estudios citogenético y molecular, especialmente en los casos en los cuales solamente hay enfermedad leucémica y no hay presencia de enfermedad ganglionar. Los síndromes linfoproliferativos crónicos de célula B no clasificables (SLPC-B NOS) representan un porcentaje bastante elevado de los casos leucémicos que no pueden encajarse en ninguna clasificación concreta por falta de características específicas y únicas de cada entidad (morfología, fenotipo, manifestaciones clínicas...). La caracterización genética y molecular es esencial no solo para definir las diferentes entidades, sino también para poder estratificar los pacientes en bajo y alto riesgo y, en consecuencia, orientar la intervención terapéutica más adecuada y su monitorización.

Tabla 1. Neoplasias linfoides de célula B madura.

Denominación	Incidencia
Leucemia linfática crónica (LLC)	35% de las neoplasias linfoides. Es la leucemia más común en adultos de países occidentales.
Linfoma de células del manto (LCM)	3-10% de las neoplasias linfoides
Linfoma esplénico de la zona marginal (LZME)	raro (<2% de las neoplasias linfoides)
Tricoleucemia (TL)	raro (<2% de las neoplasias linfoides)
Linfoma linfoplasmacítico (LLP)	raro (1% de las neoplasias linfoides)
Leucemia prolinfocítica (LPL-B)	extremadamente raro (1% de las leucemias linfocíticas)
Linfoma MALT	7-8% de los linfomas B, y 50% de linfomas gástricos primarios
Linfoma de la zona marginal de células B ganglionar (LZM)	1.5-1.8% de las neoplasias linfoides
Linfoma folicular (LF)	20% de las neoplasias linfoides. Es el segundo linfoma más común en adultos de países occidentales.
Linfoma difuso de células B grandes (LDCG)	20% de las neoplasias linfoides. Es el linfoma más común en adultos de países occidentales.
Síndromes linfoproliferativos de célula B pequeña no clasificables (SLPC-B NOS)	25-30% de las neoplasias linfoides

La incidencia de las neoplasias linfoides varía en diferentes áreas geográficas. La leucemia linfática crónica (LLC) es el tipo de leucemia más común en países occidentales, representando hasta un 35% del total de leucemias, con una incidencia anual de 2-6 por 100.000 habitantes, llegando a 12-15/100,000 en personas de +60 años [1]. La LLC se caracteriza por la proliferación y acumulación progresiva de linfocitos-B de pequeño tamaño y apariencia madura, que se manifiesta en un número excesivo de linfocitos en sangre. Se trata de una enfermedad muy heterogénea tanto a nivel molecular como clínico: en algunos pacientes no se observa una evolución clínica durante años (los

pacientes están asintomáticos y no requieren tratamiento), mientras que otros paciente sí requieren tratamiento. De entre éstos últimos, la mayoría responden bien a la terapia, mientras que otros no responden o suelen recaer a los pocos años del tratamiento. En los pacientes con enfermedad progresiva la supervivencia mediana es de tan solo 5-8 años. Los costes del tratamiento de los pacientes con LLC son elevados, y un tratamiento innecesario o inadecuado puede ser perjudicial para el paciente, igual que lo son los costes derivados para el sistema de salud.

Biomarcadores de pronóstico en la LLC

Aproximadamente el 80% de los casos de LLC presentan alteraciones genéticas en las células B en el momento del diagnóstico, entre las cuales destacan las variaciones de número de copia en el ADN. Las principales alteraciones son la pérdida de 13q14, la pérdida de 11q23, la trisomía 12 y, con menor frecuencia, las pérdidas de 17p13. Los factores pronóstico más potentes en la LLC incluyen la delección de 17p y/o mutación en el gen *TP53*, la delección de 11q23 y/o mutación en el gen *ATM*, el estado mutacional del gen de las inmunoglobulinas (IgVH), mutación en el gen *NOTCH1*, los marcadores séricos (timidina quinasa, β 2-microglobulina, y CD23 soluble), marcadores celulares (ZAP-70 y expresión de CD38), el estadio clínico y la edad del paciente [2-5]. Hay una jerarquía importante en estos factores pronósticos y la mayoría de ellos están relacionados entre sí. En particular, los casos con pérdida de 17p y/o mutación de *TP53* se asocian con peor pronóstico [6] y con resistencia al tratamiento (formas refractarias a fludarabina, o drogas alquilantes y análogos de purinas) [7], una rápida progresión de la enfermedad, un menor tiempo hasta el primer tratamiento y un pronóstico muy malo. Por todo ello, se considera el factor pronóstico genético más potente; los pacientes jóvenes con delección 17p13 y los pacientes con una respuesta pobre a la terapia intensiva son buenos candidatos para el trasplante alogénico de células madre. Del mismo modo, los pacientes con pérdida de 11q23 tienen una progresión de la enfermedad más rápida [6] y se caracterizan por presentar múltiples adenopatías [8], generalmente enfermedad en estadios avanzados y una supervivencia muy inferior. Por lo tanto, en estos casos sería beneficioso un régimen más intenso de quimioterapia (administración de Rituximab, por ejemplo) para mejorar la eficacia del tratamiento [9]. La presencia de ganancias/amplificaciones focales de 2p16 en etapa temprana de pacientes con LLC se asocia con progresión cariotípica, con estadios avanzados y con la necesidad de tratamiento en un periodo corto de tiempo y con una peor supervivencia global. Por último, la detección de la pérdida de 6q es un marcador recurrente de progresión de la LLC, con un elevado número de linfocitos en sangre, múltiples adenopatías al diagnóstico y un intervalo libre de tratamiento más corto. Las ganancias de 3q y 8q también son un marcador pronóstico independiente que se asocia un curso clínico agresivo. Las ganancias de 3q y las pérdidas de 8p también se asocian a un tiempo menor antes del primer tratamiento. Finalmente, la presencia de una elevada complejidad de alteraciones genómicas (detectada mediante microarrays de SNP o de CGH) considerada generalmente como 4 o más alteraciones por caso, está también asociada de manera importante con un tiempo libre de enfermedad más corto y una peor supervivencia global. Por otro lado, aproximadamente el 50% de los casos presenta pérdidas de 13q14, que se correlacionan estrechamente con un curso clínico indolente de la enfermedad, especialmente cuando se detecta como única anomalía. Finalmente, es también destacable el hecho que en las LLC (y otros SLPC-B) las alteraciones genéticas con relevancia clínica son ganancias y pérdidas (y no translocaciones cromosómicas). Es por todo esto, que la detección de estos biomarcadores genéticos en pacientes con LLC es de suma importancia en la práctica clínica (Tabla 2). Todos estos ejemplos ponen de manifiesto la influencia del avance del conocimiento de las alteraciones genéticas en las decisiones terapéuticas.

Cabe destacar que, hasta el momento, estos parámetros de pronóstico tienen mucho interés en el contexto de los ensayos clínicos, pero **aún no han sido recomendados para la práctica clínica de rutina debido a que la información que se obtiene no permite, hoy por hoy, modificar el manejo clínico de los pacientes.**

Hoy en día, la citogenética convencional y el FISH son las técnicas estándar que se utilizan en las rutinas clínicas para detectar las alteraciones de número de copias en pacientes con LLC. La citogenética clásica requiere del cultivo de las células tumorales, lo que supone una fuente común de fracaso experimental, debido a la falta de proliferación de células B tumorales, hasta el punto que con cierta frecuencia, las metafases que se obtienen no son de buena calidad (algunas veces sólo se

obtienen metafases de células normales que ‘contaminan’ las tumorales). Por otro lado, la resolución del cariotipo es muy baja, con lo que pequeñas deleciones (como las de 13q14.3, que se encuentra en aproximadamente el 50% de los casos) pasan fácilmente desapercibidas. Como norma general, la citogenética convencional se complementa con el FISH sobre núcleos interfásicos, que aporta mayor resolución. Habitualmente se emplean kits comerciales con 4 sondas loci-específicas: 11q23 (incluyendo el gen *ATM*), 13q14.3, 17p13 (incluyendo gen *TP53*) y una sonda centromérica del cromosoma 12 para detectar la trisomía 12. En cada experimento, se deben evaluar como mínimo 200 núcleos, con lo que los costes en tiempo-persona acostumbran a ser elevados. Ambas técnicas requieren mucho tiempo de preparación, una interpretación subjetiva y, por otra parte, el FISH es sólo capaz de detectar un número discreto de alteraciones (las 4 alteraciones recurrentes ya conocidas), mientras que las alteraciones en 2p, 3q, 6q, 8p, 8q, no son detectadas mediante estos kits. Dichas alteraciones, aunque poco frecuentes, tienen un impacto pronóstico adverso en la enfermedad. Otra desventaja del uso de la técnica FISH para el estudio de la LLC es que no se obtiene información sobre la complejidad genómica ni sobre la presencia de cromotripsis, un fenómeno de rotura catastrófica y reparación del ADN recientemente descrito, con una elevada incidencia en casos de cáncer [10].

Tabla2. Significado clínico de las alteraciones genéticas en LLC, ordenadas de "mayor" a "menor" riesgo.

Alteración	Diana	Frecuencia	Detectado por kit FISH	Indicador pronóstico
Deleción 17p13 y/o mutación <i>TP53</i>	<i>TP53</i>	3-10%	✓	El peor pronóstico. Candidato a tratamiento alternativo o trasplante alogénico
Deleción 11q23	<i>ATM</i>	15-28%	✓	Malo. Candidato a régimen quimioterápico más intenso
Ganancia 3q	3q27	2-4%	✗	Malo
Ganancia 8q	8q24	2-4%	✗	Malo
Pérdida 8p	-	2-4%	✗	Malo
Deleción 6q	6q23	3-10%	✗	Malo/intermedio
Ganancia 2p	2p16	5-28%	✗	Malo/intermedio
Trisomía 12	-	10-20%	✓	Intermedio
Deleción 13q14	<i>mir-15a/16-1</i>	50-60%	✓	Bueno

El qChip® Hemo

qChip® Hemo es un microarray de oligonucleótidos para hibridación genómica comparada, destinado al estudio de las alteraciones genéticas presentes en los Síndromes linfoproliferativos crónicos de célula B (SLPCs-B). Este microarray se ha desarrollado en colaboración con la Unidad de Hematopatología, del Hospital Clínic de Barcelona, cuyo responsable lidera el Consorcio Internacional de Investigación del Proyecto Genoma de la Leucemia Linfática Crónica (ICGC-CLL).

Características del *qChip® Hemo*

El *qChip® Hemo* es un microarray de oligonucleótidos basado en un diseño mixto, dirigido (*targeted*) con cobertura global (o *backbone*). En su primera versión (v1.0), las sondas que componen el *backbone* permiten la detección de alteraciones de tamaño medio (1 sonda/115Kb, en promedio) fuera de las regiones de alteración recurrente del genoma de la LLC. En cambio, la densidad de sondas es mucho más elevada y permite la detección de pequeños reordenamientos (Tabla 3) en las regiones diana, que incluyen entre otras regiones alteradas de manera recurrente en LLCs (11q23, 13q14.3, 17p, 2p, 18q ...), nuevas alteraciones identificadas en el consorcio ICGC-CLL, empleando arrays de muy alta resolución (2q37, 3p21, 10q24, ...), determinados genes supresores de tumores (*CDKN2a*, *TP53*, *BIM* ...) y oncogenes (*BCL2*, *REL*, ...); además de regiones importantes para el diagnóstico diferencial con otras neoplasias de células B o síndromes linfoproliferativos de células B pequeñas no especificado. El microarray contiene, además, sondas que cubren 2 loci de inmunoglobulinas como control de clonalidad. Finalmente, el estudio global de alteraciones, también permite la detección de fenómenos de cromotripsis.

En resumen, el array permite detectar:

- Regiones conocidas frecuentemente alteradas en la LLC / SLPC-Bs.
- Oncogenes y genes supresores de tumores conocidos, alterados en neoplasias hematológicas.
- Regiones alteradas en otras neoplasias leucémicas que presentan el diagnóstico diferencial con CLL (p.e. pérdida de 7q3).
- Regiones de inmunoglobulinas (IG) de cadena ligera kappa e IGs de cadena pesada.
- Presencia de cromotripsis.

El diseño de *qChip® Hemo* lo hace ideal como herramienta de diagnóstico y pronóstico de neoplasias hematológicas con LLC y otros SLPC-Bs. Permite el estudio completo y exhaustivo de una muestra clínica, en un único experimento y con el único requisito de entre 300-500ng de ADN de una muestra de tumor con al menos 30% de contenido de células tumorales, lo cual es fácil de obtener dado que la mayoría de neoplasias linfoides leucemizadas tienen una 'carga tumoral' generalmente muy elevada. Así pues, se evita la necesidad de cultivo de células, el requisito de altas cantidades de ADN y la necesidad de muestras tumorales altamente enriquecidas. Además, el ADN se puede obtener a partir de muestras frescas, muestras criopreservadas, así como a partir de tejidos fijados en formol y embebidos en parafina.

El diseño permite el análisis de 8 casos en un solo microarray (formato 8x60K), cuyos resultados pueden estar listos en 3-5 días laborables, y pueden ser utilizados por el hematólogo/clínico como apoyo en establecer un diagnóstico más preciso y estratificar los pacientes en grupos de alto/bajo riesgo, lo cual va a influir en la decisión entre las distintas opciones terapéuticas existentes. Esta metodología permite un rápido procesamiento de muestras, con una mínima intervención humana en comparación con el FISH tradicional que se utiliza actualmente, que consume mucho tiempo (tanto técnica como en el análisis) y de interpretación más subjetiva.

Ventajas

- *Screening* de las alteraciones de número de copia en regiones de reordenamiento recurrente con valor pronóstico [5], así como de todo el genoma con elevada especificidad y sensibilidad (en comparación con FISH que solo detecta alteraciones en 4 regiones)
- Menor tiempo de respuesta y mayor robustez técnica (i.e. probabilidad de entregar un resultado), al partir de ADN y no requerir cultivo celular.
- Posibilidad de realizar análisis a partir de ADN extraído de tumores parafinados o células fijadas.
- Mayor capacidad de análisis gracias a un análisis más rápido y objetivo.

Validación

Para determinar la especificidad y la sensibilidad del *qChip® Hemo*, los resultados se compararon con los obtenidos empleando la combinación de técnicas que conforman el actual "*gold standard*" asistencial: cariotipo convencional y FISH. Algunos de los casos también se estudiaron mediante otros arrays de mayor resolución (p.e., SNP6.0 Affymetrix y Agilent 1M). Se estudiaron un total de 2 controles normales y 134 casos de CLL, 98 de ellos con información de FISH. Los estudios comparativos revelaron una concordancia muy elevada ($\geq 80\%$) en comparación con las distintas sondas de FISH, en la gran mayoría de situaciones discordantes, se trata de alteraciones no detectadas mediante el array, y con un porcentaje de alteración por FISH usualmente inferior al 10-20%. El resto de alteraciones discordantes, suele deberse a que el array y el FISH se han realizado en distintas fechas (entre 1 y 10 años de diferencia) y en el caso de la muestra progresada se han adquirido algunas alteraciones que no estaban al principio (Salaverria et al, en preparación).

Bibliografía

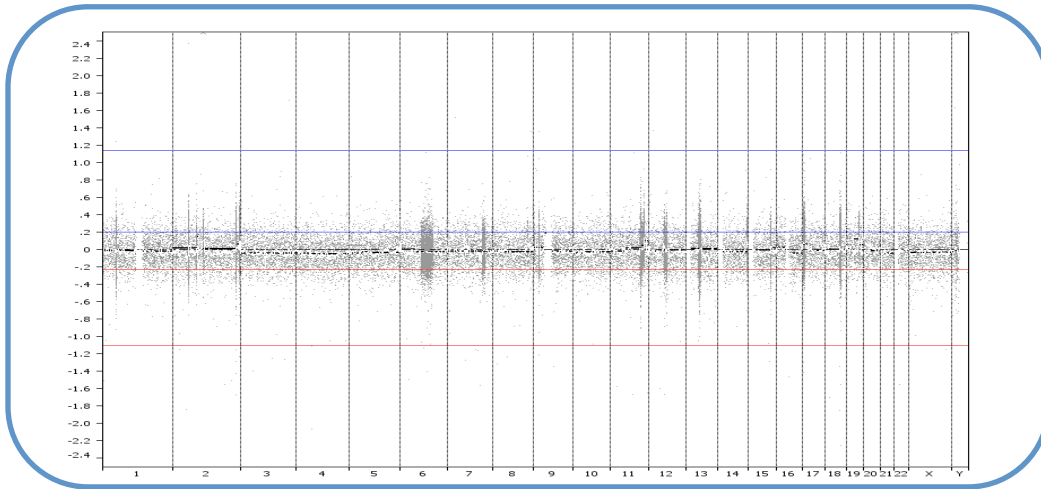
1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press: Lyon, 2008.
2. Zenz, T., Mertens, D., Kupperts, R., Dohner, H. & Stilgenbauer, S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Rev. Cancer* 10, 37-50 (2010).
3. Costa P, Ghosh J, Giles S, De Witte A. Simultaneous detection of copy number and copy-neutral LOH using a single microarray. Agilent Technologies, Application note. November 2010.
4. Houldsworth J, Guttapalli A, Thodima V, Yan XJ, Mendiratta G, Zielonka T, Nanjangud G, Chen W, Patil S, Mato A, Brown JR, Rai K, Chiorazzi N, Chaganti RS. Genomic Imbalance Defines Three Prognostic Groups for Risk Stratification of Chronic Lymphocytic Leukemia Patients. *Leuk Lymphoma*. 2013. PubMed PMID: 24047479.
5. Rosenquist R, Cortese D, Bhoi S, Mansouri L, Gunnarsson R. Prognostic markers and their clinical applicability in chronic lymphocytic leukemia: where do we stand? *Leuk Lymphoma*. 2013 PubMed PMID: 23480493
6. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910–1916.
7. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012; 26: 1458– 1461.
8. Dohner H, Stilgenbauer S, James MR, et al. 11q deletions identify a new subset of B-cell chronic lymphocytic leukemia characterized by extensive nodal involvement and inferior prognosis. *Blood*. 1997; 89: 2516–2522 .
9. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010 ; 376 : 1164 – 1174 .
10. P.J. Stephens, C.D. Greenman, B. Fu, F. Yang, G.R. Bignell, L.J. Mudie, E.D. Pleasance, K.W. Lau, D. Beare, L.A. Stebbings et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development *Cell* 2011 ; 144 : 27–40

Tabla 3. Regiones incluidas en el *qChip® Hemo* (version 1.0) hg19.

Cromosoma	Start	End	Tamaño	Gen/región	Densidad
chr11	108082602	108252729	170127	ATM	Muy alta
chr13	50556688	50699677	142989	DLEU2,7/miRs	Muy alta
chr17	7563917	7591659	27742	TP53	Muy alta
chr2	60676446	60782012	105566	BCL11A	Muy alta
chr2	61104447	61151158	46711	REL	Muy alta
chr2	231090445	231223847	133402	SP140	Muy alta
chr8	128747629	128753930	6301	cMYC	Muy alta
chr10	103818600	104498019	679419	NFKB2	Alta
chr13	48007849	54010887	6003038	13q14.2-q14.3	alta
chr14	106328955	106808955	480000	IGH	alta
chr17	6500001	10700000	4199999	17p13.1	alta
chr18	56250406	61070906	4820500	MALT1,BCL2	alta
chr2	16050000	16150000	100000	MYCN	alta
chr2	60500000	61500000	1000000	BCL11A, REL	alta
chr2	230055752	231666905	1611153	2q36.3-q37.1	alta
chr2	89118885	89438885	320000	IGK	alta
chr3	47828962	48491828	662866	MAP4	alta
chr6	31386262	31475391	89129	HCP5, HCG26 y MIC1B	alta
chr9	21798721	22125806	327085	MTAP, P16,P15	alta
chr9	4985086	5128182	143096	JAK2	alta
chr11	106000000	118000000	12000000	11q22.3-q23.3	media
chr3	168022793	171624795	3602002	EVI1	media
chr6	78000000	120000000	42000000	6q14.1-q22.3	media
chr7	124449746	136150979	11701233	7q31-q33	media

Cobertura muy alta: 1 sonda cada 100pb; alta: 1 sonda cada 1500pb; media: 1 sonda cada 10.000pb; y un "backbone" de cobertura media-baja: 1 sonda cada 116.000bp.

Distribución de las sondas en el **qChip® Hemo**. En este gráfico se puede apreciar el enriquecimiento de sondas en las regiones específicas de neoplasias hematológicas, en especial la LLC.



Detección de las alteraciones características de la LLC mediante el **qChip® Hemo**: deleción de 13q4.3, deleción de 17p, deleción de 6q, y deleción de 11q.

