

## El Rol de los Mitógenos en el Análisis Citogenético de la Leucemia Linfocítica Crónica y Otras Neoplasias de Células B Maduras

## The Role of Mitogens in the Cytogenetic Analysis of Chronic Lymphocytic Leukemia and other Mature B-Cell Neoplasms

Eder Cano Pérez<sup>1,2\*</sup>, Génesis García Díaz<sup>3</sup>, María Carolina Fragozo Ramos<sup>4</sup>, Karen Gómez Avilez<sup>5</sup>, Jaison Torres Pacheco<sup>1</sup>, Fabián Porras Borja<sup>3</sup> and Fernando Cruz Quishpe<sup>3</sup>

Fecha de recepción: Apr 23, 2020, Fecha de aceptación: June 04, 2020, Fecha de publicación: June 11, 2020

### Editorial

Las neoplasias de célula B madura son un grupo heterogéneo de tumores hematopoyéticos que derivan de cualquier etapa del desarrollo de células B maduras, se clasifican según el inmunofenotipo y el genotipo de las células tumorales en comparación a las etapas normales de la célula B. Dentro de este grupo de enfermedades se encuentra la Leucemia Linfocítica Crónica/Linfoma linfocítico de células pequeñas (LLC/LLP), en primera instancia se considera que la LLC es una patología idéntica al LLP, sin embargo, las manifestaciones clínicas son diferentes. De ese modo, el término LLC se usa cuando la enfermedad se manifiesta en sangre periférica, mientras que el término LLP se usa cuando la afectación es principalmente nodal [1]. La LLC corresponde a la forma más común de leucemia en el mundo occidental, donde representa más del 30% de todos los casos de leucemia en adultos. A menudo se considera una enfermedad indolente, pero de hecho muestra amplia variabilidad clínica en términos de resultados, con algunos pacientes que sobreviven durante décadas sin terapia y algunos que mueren por enfermedad progresiva en unos pocos años. La heterogeneidad clínica de la LLC requiere parámetros para estratificar a los pacientes en subgrupos de pronóstico y adaptar el tratamiento que va desde "observar y esperar" hasta el trasplante alogénico de células madre. En la práctica clínica se han integrado diferentes factores como los sistemas de estadificación clínica, el tiempo de duplicación de linfocitos, la beta-2 microglobulina, la expresión de CD38 y ZAP70, el estado de mutación del gen de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulina (IgHV, por sus siglas en inglés) y las anomalías genéticas determinadas por citogenética convencional o hibridación fluorescente in situ (FISH, por sus siglas en inglés) [2].

La citogenética clásica o convencional permite visualizar a escala general el genoma de un individuo a través del cariotipo, permitiendo detectar anomalías cromosómicas recurrentes y características citogenéticas útiles en el establecimiento del

- 1 Grupo de Investigación UNIMOL, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia
- 2 Maestría en Genética, Universidad Simón Bolívar, Barranquilla, Colombia
- 3 Centro Especializado en Genética Médica (CEGEMED), Quito, Ecuador
- 4 Especialización en Medicina Interna, Universidad de Cartagena, Cartagena de Indias, Colombia
- 5 Programa de Bacteriología y Laboratorio clínico, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia

### \*Correspondencia:

Eder Cano Pérez

✉ ecanop@unicartagena.edu.co

diagnóstico, pronóstico e información necesaria para la elección de una terapia apropiada en diversas neoplasias hematológicas, ubicando a la citogenética convencional como un prerrequisito esencial en el manejo del paciente leucémico. Sin embargo, la detección de estas anomalías cromosómicas a través del análisis de metafase se hace más difícil debido a que las células B maduras (como las células de la LLC) se encuentran predominantemente en la fase G0/G1 del ciclo celular y no se someten fácilmente a la mitosis en cultivo, ocasionando que durante los análisis se obtengan metafases insuficientes e inadecuadas, además de una sobrepoblación de la actividad mitótica de las células no tumorales sobre las células neoplásicas [3].

Durante las últimas décadas el uso de la citogenética convencional ha jugado un papel pronóstico relativamente menor en la LLC. La incapacidad de los mitógenos tradicionales para promover eficazmente la división de las células en la LLC fue un impedimento importante para este objetivo. En su lugar, la citogenética molecular (FISH) que no requiere células en división, se ha aplicado al uso clínico en esta enfermedad, con una tasa de anomalías detectadas entre el 75-80% de los casos [4]. Si bien

FISH permite la detección de anomalías genéticas en células interfásicas, sólo detecta anomalías para los genes/loci de las sondas aplicadas; por lo tanto, no detecta todas las anomalías cromosómicas microscópicamente visibles e importantes como factor pronóstico de la LLC, razón por el cual hay una gran insistencia e interés en mejorar los métodos de cultivo.

Ante las limitaciones asociadas con la proliferación defectuosa intrínseca que dificulta el análisis de metafase en LLC, se ha intentado estimular las células anormales con mitógenos tradicionales de células B tales como la hierba carmín (PWM), el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), [también designado como 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)] y lipopolisacárido (LPS), no obstante, los resultados han sido variables. Particularmente, se ha demostrado que TPA activa la proteína quinasa C (PKC) (posiblemente aumentando el  $Ca^{2+}$  libre de citoplasma) e induce la proliferación en los linfocitos, por esta razón TPA es uno de los mitógenos de células B de más uso en los laboratorios de citogenética en el mundo. Aunque TPA aumenta la tasa de división celular en cultivo, este y los otros mitógenos tradicionales tienen una tasa de detección que oscila entre el 40 a 50% para las anomalías citogenéticas en la LLC [3,5].

Como alternativa, durante las últimas décadas se han probado nuevos mitógenos o combinaciones de mitógenos que intentan aumentar esa tasa de detección. A principios del 2000, un estudio demostró que oligodesoxinucleótidos sintético inmunoestimulantes (ODN) como el DSP30 contienen regiones CpG no metilados que inducen significativamente la expresión de los receptores funcionales de IL-2 de alta afinidad en células B-LLC en comparación con las células B normales. Además, también demostraron que la adición de interleucina 2 (IL-2) a las células estimuladas con DSP30 aumenta la proliferación tanto en las células B normales como en las células B-LLC, sin ningún efecto coestimulador sobre la producción de citocinas o la expresión de moléculas de superficie en las células B normales. Por el contrario, la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 aumentó en las células B-LLC, y la expresión de CD80 y CD86 aumentó aún más cuando se usó IL-2 como un co-estimulante [6]. Estudios posteriores demostraron que la combinación de DSP30 más IL-2 en cultivos permitía la detección de las aberraciones cromosómicas en el 80% de los casos de los pacientes con LLC, estableciendo que la tasa de aberración es comparable a las tasas detectadas por FISH [4,7].

Las investigaciones fueron más allá, diferentes estudios alrededor del mundo realizaron comparaciones en la tasa de éxito y detección de anomalías cromosómicas en LLC entre la combinación DSP30 más IL-2 y los mitógenos tradicionales, especialmente TPA. Los resultados, aunque variables sostienen en su mayoría que el oligonucleótido DSP30 más IL-2 aumenta la tasa de detección de las anomalías citogenéticas en cultivo. En referencia, un estudio realizado en Asia reportó que los cultivos con DSP30 más IL-2 tuvieron una tasa de detección del 67% comparado con TPA (44%) ( $p < 0.001$ ). La tasa de cultivo exitoso no fue significativamente diferente ( $p > 0.05$ ) [8]. En Bélgica, Put et al. reportaron una mayor detección de anomalías con DSP30 más IL-2 (51,2%) en comparación con TPA (38,2%) ( $p < 0.001$ ), similar al estudio previo, no se observó diferencia significativa en cuanto a la tasa de éxito en cualquiera de las técnicas de estimulación

empleadas ( $p = 0,082$ ) [5]. Wren y cols combinaron los mitógenos TPA más DSP30 e IL-2, la tasa de éxito del cultivo combinado fue mayor (100%) comparado con la tasa de éxito del cultivo individual con TPA (94,1%) y con DSP30 más IL-2 (82,4%); sin embargo, esto no fue estadísticamente significativo. Así mismo, no hubo diferencia significativa entre los cultivos combinados y los cultivos individuales con TPA y DSP30 más IL-2 en términos de tasa de anomalía (52.9%, 41.2% y 29,2% respectivamente) [9].

Otras neoplasias de células B maduras además de la LLC, incluyen: linfoma folicular, linfoma de células del manto, linfoma de zona marginal, linfoma linfoplasmático y leucemia de células pilosas. Al igual que las células LLC, las células tumorales en este grupo de enfermedades vs. generalmente no responden bien a los mitógenos de células B estándar, y como se ha mencionado previamente se sabe que los oligonucleótidos CpG estimulan la división de las células B de forma general (no es específica de las células LLC) [6], por lo que algunos estudios investigaron el impacto del uso combinado de DSP30 e IL-2 para detectar anomalías citogenéticas en otros tumores de células B madura. Al respecto, una serie de 76 casos con al menos 6 tipos de neoplasias realizada en Asia reportó una tasa de detección de anomalías de 55% con DSP30 más IL-2 vs. 38% de PWM [10]. En Francia, Struski et al obtuvieron hallazgos afines, con una tasa de detección de anomalías de 57% con DSP30 más IL-2 vs. 33% con TPA en una serie de 52 casos con 9 neoplasias diferentes [11]. Estas investigaciones indican que al igual que LLC, el uso de oligonucleótido inmunoestimulador DSP30 en combinación con IL-2 es un estimulante eficiente en diferentes neoplasias de células B maduras.

En general, el uso de oligodexirribonucleotido coestimulado con IL-2 mejora el análisis citogenético en LLC y otros desordenes linfoproliferativos de células B maduras, sin embargo, dentro de las limitaciones de esta técnica es que requiere de mucha mano de obra y su costo es un obstáculo para los laboratorios citogenéticos de rutina. Además, depende de los niveles de expresión de CD40 de superficie siendo menos aplicable para la práctica habitual. En consecuencia, seguir realizando esfuerzos por establecer métodos eficientes, costo efectivo y reproducibles para el análisis citogenético de patologías como la LLC es de suma importancia y necesidad.

## Referencias

1. Swerdlow SH, Campo E, Pileri SA, Harris NL, Stein H, et al. (2016) The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127: 2375-2390.
2. Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE (2004) Prognosis at diagnosis: Integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 103: 1202-1210.
3. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, et al. (1990) Prognostic Subgroups in B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Defined by Specific Chromosomal Abnormalities. *N Engl J Med* 323: 720-724.
4. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T (2007) Comprehensive genetic characterization of CLL: A study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgVH status and immunophenotyping. *Leukemia* 21: 2442-2451.

5. Put N, Konings P, Rack K, Jamar M, Roy NV, et al. (2009) Improved detection of chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia by conventional cytogenetics using CpG oligonucleotide and interleukin-2 stimulation: A Belgian multicentric study. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 843-853.
6. Decker T, Schneller F, Kronschnabl M, Dechow T, Lipford GB, et al. (2000) Immunostimulatory CpG-oligonucleotides induce functional high affinity IL-2 receptors on B-CLL cells: Costimulation with IL-2 results in a highly immunogenic phenotype. *Exp Hematol* 28: 558-568.
7. Dicker F, Schnittger S, Haferlach T, Kern W, Schoch C (2006) Immunostimulatory oligonucleotide-induced metaphase cytogenetics detect chromosomal aberrations in 80% of CLL patients: a study of 132 CLL cases with correlation to FISH, IgVH status, and CD38 expression. *Blood* 108: 3152-3160.
8. Liaw FPS, Lau LC, Lim AST, Lim TH, Lee GY, et al. (2014) CpG Oligonucleotide and Interleukin 2 stimulation enables higher cytogenetic abnormality detection rates than 12-o-tetradecanolyphorbol-13-acetate in Asian patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Int J Hematol* 100: 545-553.
9. Wren C, Moriarty H, Marsden K, Tegg E (2010) Cytogenetic investigations of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 198: 155-161.
10. Shi M, Cipollini MJ, Crowley-Bish PA, Higgins AW, Yu H, et al. (2013) Improved detection rate of cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia and other mature B-Cell neoplasms with use of CpG-oligonucleotide DSP30 and interleukin 2 stimulation. *Am J Clin Pathol* 139: 662-669.
11. Struski S, Gervais C, Helias C, Herbrecht R, Audhuy B, et al. (2009) Stimulation of B-cell lymphoproliferations with CpG-oligonucleotide DSP30 plus IL-2 is more effective than with TPA to detect clonal abnormalities. *Leukemia* 23: 617-619.