FISIOPATOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA EN PACIENTES AMBULATORIOS

Manno, Fabrizio[1]; Pérez, Santiago[1]; Di Vita, Santiago[2]; Gonzales, Mariano[2];Bertalot, Sibila[2]; Manzur, Alejandra[2]; Rodriguez, Maria Victoria[2]; Ghersevich, Sergio[1].
[1]Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR. [2]Laboratorios CIBIC.

INTRODUCCIÓN

Esta presentación está basada en los protocolos utilizados para analizar muestras de leucemia mieloide crónica (LMC) en el Laboratorio Cibic, institución en donde llevamos a cabo la instancia de PPO. La LMC se caracteriza por el desbalance y desarrollo anormal de células de estirpe mieloide que se encuentran en sangre periférica. Se produce cuando una célula madre pluripotente sufre una transformación maligna, derivando en una mieloproliferación clonal, lo que conduce a una sobreproducción de granulocitos maduros e inmaduros. Se presenta con un estadio "benigno" asintomático que finalmente da lugar a estadios acelerados o blásticos con signos y síntomas más importantes.

FISIOPATOLOGÍA

Como resultado de una translocación recíproca se produce la fusión entre los brazos largos de los cromosomas 9 (que contiene el gen ABL1) y 22 (que contiene el gen BCR), que dará origen al cromosoma Phi o Philadelphia ([t(9;22)(q34;q11)]), originando así al gen de fusión BCR/ABL. Este es un gen quimérico con actividad oncogénica, que codifica una tirosina quinasa quimérica que se encuentra constitutivamente activa. Esto resulta en la adquisición de un fenotipo leucémico.

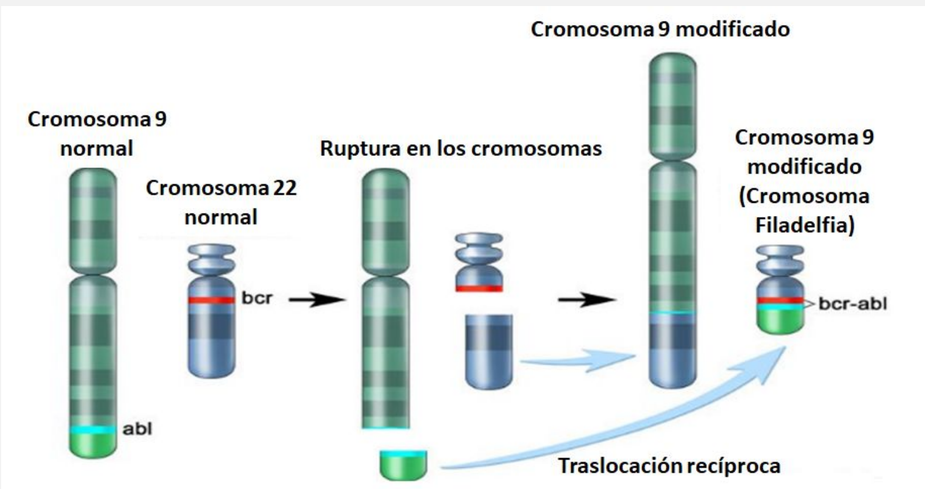

***Figura 1**: Esquema de la translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22 que da lugar al cromosoma filadelfia.*

DIAGNÓSTICO

***Tabla 1**: Resultados de laboratorio asociados a las fases crónicas y aceleradas de la LMC.*

	FASE CRÓNICA	FASE ACELERADA
Hemograma	• Leucocitosis con basofilia y eosinofilia. • Ligera anemia	• Leucositosis con > 10% de basófilos • Anemia y trombocitopenia
Extendido de sangre periférica	• Vuelvo armónico de granulocitos con ausencia de Hiatus leucémico • Blastos + promielocitos < 10% • Alteraciones morfológicas de granulocitos (FAL disminuida)	• Aumento de blastos + promielocitos sin superar 10%
Extendido de médula ósea	• Hiperplasia granulocítica • Ausencia de Hiatus leucémico • Índice L/E: 10:1 • Eritropoyesis aumentada	• Incremento de la hiperplasia granulocítica • Presencia de fibrosis medular
Estudios moleculares	Transcripto del gen BCR/ABL: +	Transcripto del gen BCR/ABL: +
Estudios citogenéticos	Cromosoma Phi: +	Nuevas anomalías citogenéticas.
Laboratorio	Aumento de Vitamina B12, LDH, Transcobalamina 1 e histamina.	

SEGUIMIENTO

RESPUESTA HEMATOLÓGICA	RESPUESTA MOLECULAR	RESPUESTA CITOGENÉTICA
Hemograma cada 2 semanas hasta normalización del mismo con desaparición de células inmaduras en sangre periférica.	Se controla la respuesta al tratamiento hasta alcanzar niveles indetectables del transcripto BCR-ABL.	Recuento < 35% de células con cromosoma Phi+, que indican evolución favorable (en una remisión completa este porcentaje llega a ser 0).

CONCLUSIONES

La evolución de las técnicas genéticas y moleculares permitió mejorar el diagnóstico y monitoreo de la LMC. La evaluación de la carga tumoral a través de la cuantificación de transcritos BCR-ABL1, demuestra que estamos en un proceso de constante progreso en el manejo de esta patología, resultando en la extensión de la sobrevida de los pacientes. De esta manera, se generó un cambio en el seguimiento de esta enfermedad, colocando al laboratorio bioquímico en un lugar clave.

METODOLOGÍAS Y RESULTADOS

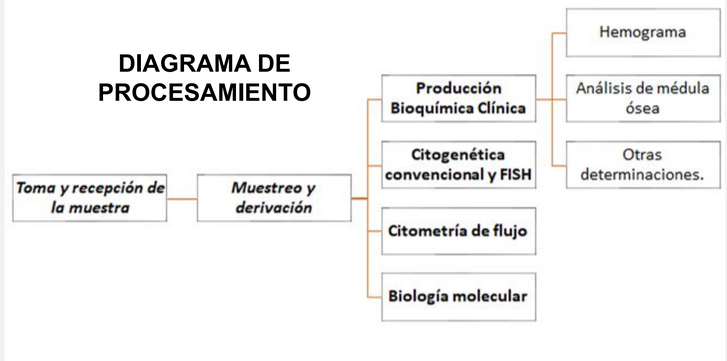

***Figura 2**: Esquema ilustrativo de las áreas del sector productivo del laboratorio Cibic relacionadas al diagnóstico y seguimiento de la LMC.*

CITOGENÉTICA

CARIOTIPO CONVENCIONAL: DETERMINACIÓN DE LA t(9;22)

Análisis microscópico de las metafases y determinación de cromosomas y anomalías numéricas y/o estructurales.

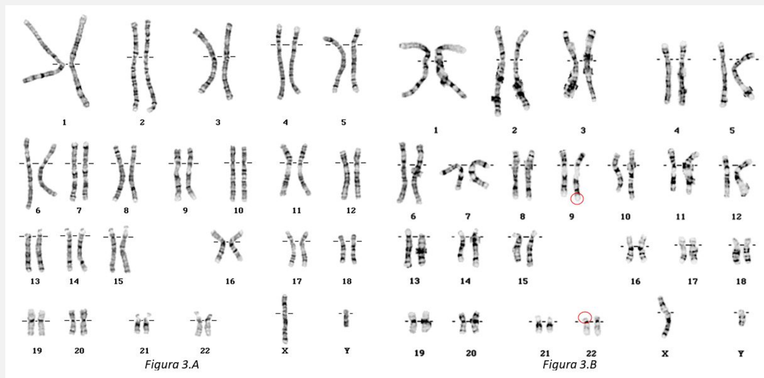

***Figura 3**: A) Se observa un cariotipo en metafase normal. B) Se observa un cariotipo en metafase con presencia de una translocación 9;22 señalada con círculos rojos, compatible con LMC. Imagen proporcionada por Laboratorio Cibic.*

HIDRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU (FISH): CONFIRMACIÓN DE LA t(9;22)

Utilización de 2 sondas específicas acopladas con fluoróforos (rojo o verde) correspondientes a la región traslocada del cromosoma 9 (gen ABL) y la otra a la región del cromosma 22 (gen BCR). En las traslocaciones se observa la presencia de una señal de fluorescencia superpuesta de los fluoróforos de ambas sondas (amarillo) .

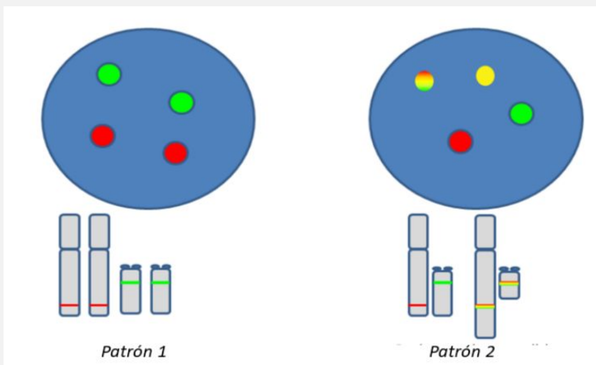

***Figura 4:** Patrón 1: núcleo con ausencia de traslocaciones donde se visualizan ambos pares de sondas separadas con sus respectivos colores. Patrón 2: núcleo con translocación 9;22 positiva que se visualiza como presencia de bandas color amarillo, suma de las dos sondas en un mismo punto.*

CITOMETRIA

INMUNOTIPIFICACIÓN DE SANGRE PERIFÉRICA O MEDULA ÓSEA

Evaluación cuali-cuantitativa de las diferentes poblaciones celulares. Se utilizan paneles de anticuerpos para determinar conjuntos de marcadores de superficie. El cóctel para Síndromes Mielodisplásicos (SMD)1 evalúa la maduración granulocítica, el SMD2 la maduración de monocitos y de la serie eritroide, y el LST analiza los marcadores de linfocitos T y la maduración de los linfocitos B.

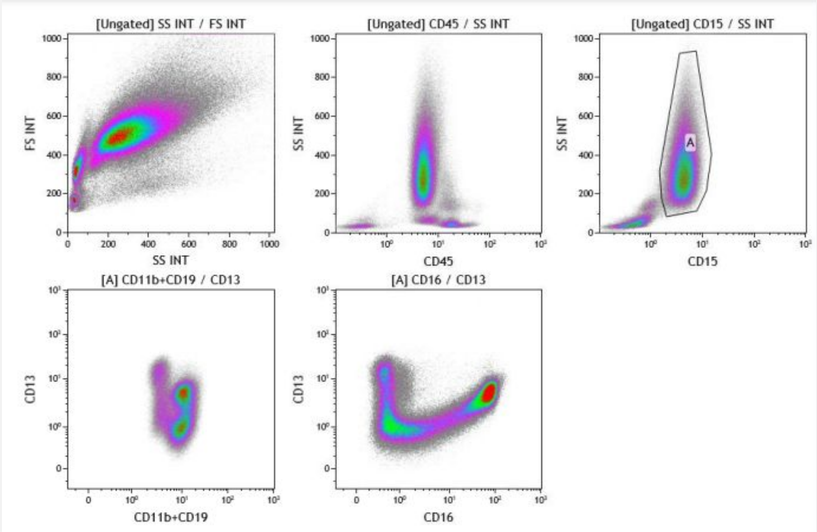

***Figura 5:** Se observan gráficos del tipo "Dot Plot" del resultado del perfil fenotípico de las poblaciones linfocitarias estudiadas en una muestra de LMC a partir del uso de anticuerpos monoclonales dirigidos contra los diferentes antígenos CD presentes a nivel de la membrana de dichas células.*
Imagen proporcionada por Laboratorio Cibic.

BIOLOGÍA MOLECULAR

RT-qPCR BCR/ABL

Retrotranscripción de un solo paso seguida de PCR cuantitativa en tiempo real, con cebadores que amplifican específicamente los posibles transcritos p210 y p190 del rearreglo **BCR/ABL.** Se utilizan sondas TaqMan[R] unidas a fluoróforos. Los niveles de transcritos de BCR-ABL se miden y reportan en relación a la referencia endógena estándar del transcripto ABL.

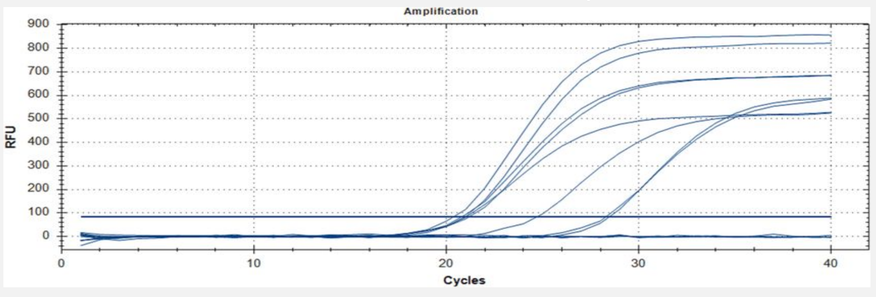

***Figura 6:** Ejemplo de un perfil de amplificación por PCR en tiempo real.*