

Características citogenéticas y detección de anomalías de alto riesgo en mieloma múltiple

MARÍA EUGENIA LEGÜES^{1,2,a}, PAULINA MORALES^{1,a},
MERCEDÉS VALENZUELA^{1,a}, ANDREA ENCINA^{1,a},
MARÍA JOSÉ MARTÍ^{1,a}, CLAUDIA BASCUÑÁN^{1,a},
PAULINA CORNEJO^{1,a}, CAMILA PEÑA³,
MARÍA SOLEDAD UNDURRAGA¹

High risk cytogenetic abnormalities in patients with multiple myeloma

Background: Cytogenetic abnormalities observed in the bone marrow of patients with multiple myeloma (MM) are an important prognostic factor for risk stratification. **Aim:** To investigate karyotype characteristics and frequency of the high-risk cytogenetic abnormalities $t(4;14)$, $t(14;16)$ and $del(17p)$ in Chilean patients with MM. **Material and Methods:** We studied 30 patients with MM by conventional cytogenetics (CC) and fluorescent *in situ* hybridization of plasma cells selected using cytoplasmic immunoglobulin staining (cIg-FISH). **Results:** Overall, the two techniques in combination allowed us to identify clonal genetic abnormalities in 47% of patients. The $t(4;14)$ abnormality was observed in 19% of patients, $del(17p)$ was observed in 10% of patients, and $t(14;16)$ was not detected. **Conclusions:** Our results showed frequencies of high-risk abnormalities similar to those reported abroad. Cytogenetic studies should be performed routinely for all MM patients at the moment of diagnosis.

(Rev Med Chile 2019; 147: 61-64)

Key words: Chromosome Aberrations; Cytogenetics; Multiple Myeloma.

El mieloma múltiple (MM), neoplasia de células plasmáticas (CP) caracterizada por infiltración de la médula ósea (MO) y secreción de inmunoglobulinas monoclonales en suero u orina, tiene un curso progresivo e incurable, con un promedio de supervivencia de alrededor de 6 años con las nuevas drogas existentes¹. La citogenética convencional (CC), factor pronóstico importante, fue incorporada junto a la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), al score pronóstico (R-ISS) del *International Myeloma Working Group* (IMWG)², recomendándose estudiar la $t(4;14)$, $t(14;16)$ y deleción de 17p. La técnica de FISH en CP seleccionadas no está disponible en los hospitales públicos chilenos y no existen reportes nacionales

de la frecuencia de alteraciones genéticas en MM, por esta razón, decidimos investigar las características citogenéticas de pacientes con MM de nuestra institución.

Material y Métodos

Desde agosto de 2013 a julio de 2017 estudiamos 30 pacientes con MM. Veintiséis al diagnóstico y 4 en tratamiento.

La proporción de CP en MO se determinó por análisis morfológico.

Para la CC, se realizaron cultivos de MO de 24 a 96 h, sin estimulación mitótica, analizando

¹Laboratorio de Citogenética, Sección Hematología, Hospital del Salvador. Santiago, Chile.

²Departamento de Medicina Interna Oriente, Universidad de Chile. Santiago, Chile.

³Unidad de Hematología Clínica, Hospital del Salvador. Santiago, Chile.

^aTecnólogo médico.

Los autores declaran no tener conflictos de interés. Trabajo no recibió financiamiento.

Recibido el 26 de abril de 2018, aceptado el 17 de diciembre de 2018.

Correspondencia a:

María Eugenia Legües

Departamento Medicina Interna Oriente, Universidad de Chile.

Av. Salvador 486 1º piso.

Providencia, Santiago, Chile.

melegues@gmail.com

un mínimo de 20 metafases con bandeado G por paciente y describiendo las aberraciones según el Sistema Internacional para Nomenclatura Citogenómica (ISCN)³.

El método de cIg-FISH se realizó en MO heparinizada según el protocolo publicado por el grupo de la Dra. Michaux, de Lovaina⁴. En breve, fijación con ácido acético: metanol, tratamiento con pepsina a 0,005% y formaldehído a 1%, deshidratación con etanol a 70%, 90% y 100%, aplicación de sondas y denaturación a 80°. Hibridación por 16 h a 37 °C, lavados con SSC e incubación con anticuerpos anticadenas livianas κ y λ conjugados con FITC (DAKO). Coloración con DAPI/antifade y observación al microscopio de fluorescencia contando 100 CP como mínimo.

Sondas usadas: Vysis (Abbott Downers Grove IL, USA), de doble fusión: IGH/FGFR3, IGH/MAF, y P53. Los resultados se consideraron positivos cuando el porcentaje de CP alteradas excedió el valor de corte recomendado por el *European Myeloma Network*: 20% para pérdidas (deleciones) y 10% para aberraciones estructurales⁵.

Resultados

Como se observa en la Tabla 1, la mediana de edad de los 30 pacientes fue 54 años (rango 32-76 años). El 40% presentó estadio II y el 60% estadio III, según el ISS del IMWG. La mediana de CP en MO fue 48,5% (rango 5-98%).

En la Tabla 2 se presenta la CC y FISH de los casos que revelaron anomalías de alto riesgo: 6/30 (20%).

La CC, realizada a 26 pacientes, resultó evaluable en 22 (84,6%). Se observó cariotipo normal en 16/22 (72,7%) y anormal en 6 (27,3%). Las alteraciones encontradas fueron: hiperdiploidía cercana a tetraploidía en un caso (16,7%) e hipodiploidía de 37 a 45 cromosomas en 5 casos (83,3%), uno de ellos con una copia extra de 1q, como derivado (1;15) y un segundo clon con duplicación del número cromosómico y del derivado (1;15) (Tabla 2 caso 10, Figura 1 J). Los 4 restantes mostraron solo anomalías numéricas, siendo recurrentes las pérdidas de los cromosomas Y, 14, 15, 16, 17 y 22.

El cIg-FISH para t(4;14) fue evaluable en 27 pacientes y falló en 3. Resultó positivo en 18,5% de los casos (5/27), mostrándose en un caso 1/5 (20%) en su forma no balanceada, con pérdida

de una fusión (Tabla 2 caso 10). Para t(14;16), se realizó en 24 pacientes y no reveló casos positivos, observándose varios patrones de señales, todos negativos (Figura 1 D, E, F, G). Cuatro casos mostraron tres señales de IGH (Figura 1 F), tres de ellos eran t(4;14) positivos, comprobándose así la translocación con participación de la región IGH. El cuarto mostró también tres señales de IGH con la sonda para t(4;14), revelando que,

Tabla 1. Características generales de los pacientes con MM analizados

		n
Género	Masculino	17 (56%)
	Femenino	13 (44%)
Mediana de edad (años)		54 (32-76)
Inmunoglobulinas	IgA	8 (27%)
	IgG	14 (46%)
	Cadenas livianas	7 (23%)
	Biclonal	1 (4%)
ISS I		0
ISS II		12 (40%)
ISS III		18 (60%)

ISS: *International Staging System*.

Tabla 2. Citogenética y cIg-FISH en 6 casos de MM con alteraciones de alto riesgo

n	ISS	Citogenética	cIg-FISH	
			t(4;14)	del(17p)
3	II	N	(+) 47%	(-)
6	II	NR	NR	(+) 33%
10	II	Hipodiploide 17%, hiperdiploide 20%, N 63% ^a	(+) 82% ^b	(+) 84%
12	II	N	(+) 94%	(-)
14	III	Hipodiploide 15% ^c , N 85%	(+) 45%	(-)
26	III	N	(+) 51%	(+) 55%

cIg-FISH: hibridación *in situ* con fluorescencia, con marcación de inmunoglobulinas citoplasmáticas; MM: mieloma múltiple; ISS: *International Staging System*; N: normal; NR: no realizado; (+): resultado positivo; (-): resultado negativo. a) 38-41,XX,+1,der(1;15)(q10;q10),inv(7)(p15p21),-14,-16,-17,+22[cp3]/81~82,<4n>,XXXX,+1,der(1;15)(q10;q10)x2,-14,-17,-21[cp3]/46,XX[4]. b) 1R1V2F 23%, 1R1V1F 59% 2R2V 18%. c) 45,X,-Y[4]/46,XY[22]

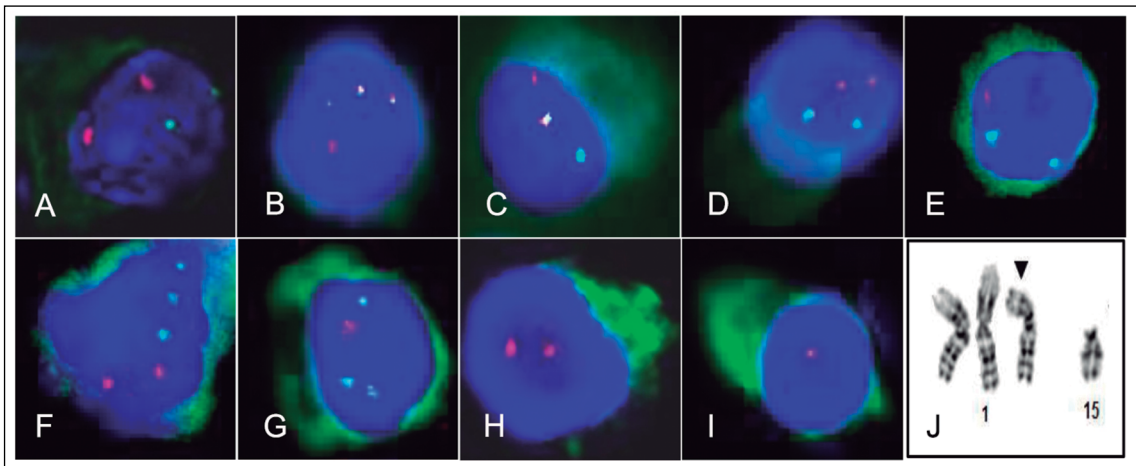


Figura 1. Imágenes de clg-FISH y citogenética en células plasmáticas. En **A**, **B** y **C**, la señal roja representa al gen *FGFR3*, la señal verde representa a *IGH*, y la amarilla es la fusión de las dos sondas debido a la $t(4;14)$. **A**, patrón normal, dos señales rojas y dos verdes (2R2V). **B**, patrón anormal típico, una señal roja, una verde y dos fusiones (1R1V2F) demuestran la $t(4;14)(IGH/FGFR3)$. **C**, patrón anormal atípico, una señal roja, una verde y una fusión (1R1V1F), revela la pérdida del derivado 14. En **D**, **E**, **F** y **G**, la señal roja corresponde al gen *MAF* y la señal verde a *IGH*. **D**, dos señales rojas y dos verdes (2R2V), patrón normal. **E**, una roja y dos verdes (1R2V) indica ausencia de una copia del gen *MAF* debido a monosomía 16 o deleción de 16q23. **F**, dos señales rojas y tres verdes (2R3V), indica una translocación entre *IGH* y otro gen participante. **G**, una señal roja y tres verdes (1R3V), indica ausencia de una copia del gen *MAF* (monosomía 16 o deleción de 16q23) y además, translocación entre *IGH* y otro gen participante. En **H** e **I**, la señal roja corresponde al gen *TP53*. **H**, patrón normal, dos señales rojas (2R). **I**, patrón anormal, 1R, demostrando deleción de una copia de *TP53*. **J**, cariotipo parcial que muestra un brazo q de cromosoma 1 extra, translocado a un cromosoma 15: +1,der(1;15)(q10;q10).

probablemente, porta una translocación entre *IGH* y un cromosoma no identificado con estas sondas. Dos casos revelaron pérdida de una señal del gen *MAF*, coincidiendo con monosomía 16 por CC, un tercero no tuvo CC por ausencia de mitosis en el cultivo. La deleción de 17p se realizó en 30 pacientes y resultó positivo en 3 (10%). Los patrones de señales obtenidos con esta sonda se observan en la Figura 1 H, I.

Discusión

La mediana de edad de los pacientes fue 54 años, algo inferior a lo descrito en la literatura, por ejemplo, Hungría y cols.⁶ encontraron una mediana de edad de 60,9 años en 850 pacientes latinoamericanos. Esta diferencia puede explicarse porque la mayoría de nuestros pacientes eran candidatos a trasplante autólogo de MO, que en nuestro sistema público se realiza solo hasta los 60 años.

Como se esperaba, la mayoría de los casos reveló un cariotipo normal (72,7%), acorde a la

baja actividad mitótica de las CP, es decir, el cariotipo normal deriva de la división de las células normales. La CC reveló en un caso (Tabla 2, caso 10), la ganancia de 1q, factor de mal pronóstico que es controversial, sin embargo, su presencia adicionalmente a la $t(4;14)$ y $del(17p)$ es predictora de un curso clínico adverso⁷. La proporción de casos hiperdiploides fue más baja que lo reportado en la literatura (16,7% vs ~40%), lo que puede explicarse por la edad de nuestros pacientes, ya que los hiperdiploides son típicamente los de más edad. Las pérdidas cromosómicas recurrentes que se encontraron en los casos hipodiploides son las frecuentemente reportadas⁸.

En cuanto al FISH, la incidencia de 18,5% de casos con $t(4;14)$ está dentro del rango de lo publicado por otros autores (15-20%)⁹. La Figura 1, A B y C, muestra CP normales y anormales con esta sonda.

La ausencia de $t(14;16)$ puede explicarse por su baja incidencia⁷.

La frecuencia de $del(17p)$, 10%, es similar a la reportada por otros autores⁷.

Algunas publicaciones indican que la proporción de CP con del(17p) es relevante para el pronóstico. Gang et al reportaron que el hallazgo de 50% de CP con del(17p) es un punto de corte que afecta el pronóstico¹⁰. Dos de nuestros pacientes mostraron un porcentaje superior a ese valor, solo uno de ellos está vivo a 2 años del diagnóstico.

Una falencia de nuestro estudio es el bajo número de pacientes, lo que impide el análisis del impacto de las anormalidades de alto riesgo en la sobrevida.

Sin perjuicio de lo anterior, demostramos que la técnica es factible, dando resultados similares a lo descrito en la literatura.

Debido a lo anterior, y a que, como ha sido demostrado por otros autores, estas técnicas permiten definir grupos de riesgo en MM y, por tanto, entregar tratamientos más individualizados, creemos que estas debieran ser realizadas de rutina como caracterización inicial de cada paciente en el sistema público.

Referencias

1. Kumar SK, Dispenzieri A, Lacy MQ, Gertz MA, Buadi FK, Pandey S, et al. Continued improvement in survival in multiple myeloma: changes in early mortality and outcomes in older patients. *Leukemia* 2014; 28: 1122-8.
2. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol* 2015; 33 (26): 2863-9.
3. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M. editors. *ISCN: an international system for human cytogenomic nomenclature*. S. Karger Publishers Inc; 2016.
4. Put N, Lemmens H, Wlodarska I, Konings P, Moreau Y, Hagemeijer A, et al. Interphase Fluorescence In Situ Hybridization on Selected Plasma Cells is Superior in the Detection of Cytogenetic Aberrations in Plasma Cell Dyscrasia. *Genes, Chromosomes & Cancer* 2010; 49: 991-7.
5. Ross F, Avet-Loiseau H, Ameye G, Gutiérrez N, Liebisch P, O'Connor S, et al. Report from the European Myeloma Network on interphase FISH in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2012; 97: 1272-7.
6. Hungria V, Malolino A, Martínez G, Oliveira DG, Bittencourt R, Peters L, et al. on behalf of the International Myeloma Working Group Latin America. Observational study of multiple myeloma in Latin America. *Ann Hematol* 2017; 96 (1): 65-72.
7. Bergsagel P, Mateos M-V, Gutiérrez N, Rajkumar S, San Miguel J. Improving overall survival and overcoming adverse prognosis in the treatment of cytogenetically high-risk multiple myeloma. *Blood* 2013; 121 (6): 884-92.
8. Sawyer J. The prognostic significance of cytogenetics and molecular profiling in multiple myeloma. *Cancer Genetics* 2011; 204: 3-12.
9. Fonseca R, Bergsagel PL, Drach J, Shanghnessy J, Gutiérrez N, Stewart AK, et al. International Myeloma Working Group molecular classification of multiple myeloma: spotlight review. *Leukemia* 2009; 23: 2210-21.
10. Gang A, Zengjun L, Yu-Tzu T, Chirag A, Qian L, Xiaoqi Q, et al. The impact of Clone Size on the Prognostic Value of Chromosome Aberrations by Fluorescence In Situ Hybridization in Multiple Myeloma. *Clin Cancer Res* 2015; 21 (9): 2148-56.