



*Estudio comparativo entre CpG oligonucleótido e IL2/TPA, en la obtención de metafases para el análisis citogenético de pacientes con Leucemia Linfoide Crónica.*

Orientadores:

- Dra. Faride Uturbey
- Dra. María Noel Spangenberg

Integrantes:

- Br. Celeste Fagúndez †
- Br. Fernanda Fagúndez
- Br. Antonella Farabelli
- Br. Nicolás García †
- Br. Leandro Gómez †
- Br. Sebastián Machado †

Departamento de Genética, Facultad de Medicina

Hospital Maciel

Ciclo de Metodología Científica II- 2018-10-02

Grupo 49

# Índice

---

Resumen:	3
Introducción:	3
Objetivos	9
Objetivo General	9
Objetivos específicos	9
Metodología	9
Materiales y métodos	9
Recolección de datos:	10
Normas Éticas	11
Resultados:	12
Discusión	16
Conclusiones y perspectivas	18
Referencias bibliográficas:	19
Agradecimientos:	21
Anexos	22
Anexo 1	22
Anexo 2	25
Anexo 3	26
Anexo 4	28

## Resumen:

---

Los objetivos de este trabajo fueron: poner a punto la técnica citogenética para determinar el pronóstico de los pacientes con LLC, comparar la eficacia del nuevo mitógeno con el TPA tradicional utilizando el índice mitótico.

Se incluyeron 21 pacientes de la policlínica de leucemia linfocítica crónica. Se obtuvieron muestras de sangre periférica que se cultivaron de manera simultánea con ambos mitógenos.

Hubo una diferencia estadísticamente significativa en la cantidad y la calidad de las metafases obtenidas bajo estimulación con CpG. Esto nos permite mejorar la eficacia del diagnóstico citogenético en la Leucemia Linfocítica Crónica y establecer la nueva técnica como protocolo en el laboratorio de genética.

*Palabras claves: Leucemia Linfocítica Crónica, pronóstico, cultivo con CpG.*

## Introducción:

---

La leucemia linfocítica crónica es una enfermedad producida por acumulación de linfocitos B maduros en médula ósea y ganglios linfáticos, secundaria a defectos en la apoptosis y en menor medida aumento de la proliferación linfocitaria. Es la leucemia más frecuente en adultos siendo la edad media de diagnóstico 65 años con ligero predominio en hombres. (1)

Es una enfermedad de comportamiento clínico heterogéneo. Un tercio no tiene manifestaciones clínicas ni progresión, un segundo tercio luego del diagnóstico progresa y un tercer grupo que debuta o progresa rápidamente como una enfermedad grave poli sintomática.(1)

En este contexto es importante definir factores que permitan prever el comportamiento y la necesidad de tratamiento. Se han establecido entonces clasificaciones clínicas con valor pronóstico como las de Rai y Binet, marcadores paraclínicos como el CD38 por citometría de flujo, ZAP-70, y marcadores de alteraciones genéticas por citogenética convencional, hibridación in situ o biología molecular.(2)

Desde el punto de vista citogenético ha sido muy dificultoso la obtención de división celular y metafases dado que corresponden a poblaciones celulares con defectos de la apoptosis y baja tasa proliferativa. Aun con la utilización de mitógenos de tipo 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) se logran solo un 40% de división celular del total de muestras. La introducción, según trabajos internacionales, del mitógenos CpG-IL2 aumenta la tasa de resultados a un 80% y ha permitido además establecer el mal pronóstico del cariotipo complejo. (3)

En nuestro medio se utiliza TPA que tiene una baja capacidad de inducir mitosis en comparación con CpG-IL2.

En trabajos realizados previamente se demuestran la mayor eficacia del CpG- IL2 en la obtención de metafases en comparación con el mitógeno utilizado en nuestro medio (TPA). (3)

Este trabajo plantea poner a punto esta técnica en nuestro medio para optimizar el diagnóstico citogenético en LLC.

#### Antecedentes

##### Antecedentes bibliográficos

La LLC es una enfermedad neoplásica hematológica de estirpe linfoide que se caracteriza por una proliferación y acumulación descontrolada de linfocitos de tipo B que tiene la peculiaridad de ser inmunoincompetentes.

La clínica de esta enfermedad se debe a la infiltración de médula, ganglios y otros tejidos por dichas células. Estas tienen una alteración de la apoptosis más que un defecto en la proliferación.

Es la leucemia más frecuente en adultos y su incidencia aumenta con la edad.

La bibliografía informa que la edad promedio de incidencia es a partir de los 65 años.

Es una enfermedad cuya etiología se desconoce sin embargo el riesgo de padecerla es 2 -7 veces superior en familiares de primer grado. Aunque en la mayoría de los casos es una enfermedad incurable, en estos últimos años se han logrado importantes progresos en el tratamiento.

Esta enfermedad presenta un clínica heterogénea. En más de la mitad de los casos el diagnóstico se realiza por azar, en individuos completamente asintomáticos, que se realizan un hemograma por otras razones

En los casos sintomáticos el cuadro clínico se caracteriza por adenopatías bilaterales y simétricas, con o sin hepato-esplenomegalia, astenia, adinamia, mal estado general. A diferencia de otros trastornos linfoproliferativos, la fiebre, sudoración y pérdida de peso no son frecuentes. Se puede sospechar en un paciente que presente infecciones a repetición ya sea de etiología viral o bacteriana.(1) (4)

El hemograma pone de manifiesto una Leucocitosis con linfocitosis superior a 5000 linfocitos/mL, con un perfil inmunofenotípico característico: CD5+, CD 19 +, CD20 débil, CD23 +.

Dada la heterogeneidad en el comportamiento de la LLC se hizo necesario establecer criterios para protocolizar inicio de tratamiento y establecer pronóstico. Los indicadores de tratamiento, son mayormente clínicos (enfermedad sintomática), y dentro de los marcadores pronósticos en la actualidad tiene un rol destacado el estudio citogenético (convencional y FISH).

Los factores pronósticos en esta patología pueden dividirse en(5):

1) Derivados del paciente: edad, comorbilidades

2) Derivados de la enfermedad: estadio, alteraciones citogenéticas (del(13q), del(11q), del(17p), trisomía 12), estado mutacional de IgVH (mutado/no mutado), alteraciones mutacionales (NOTCH1, SF3B1 y

BIRC3), CD38, ZAP-70, proteína-lipasa, tiempo de duplicación linfocitario corto <12 meses, cifra de linfocitos, patrón de infiltración difuso en MO, proporción de prolinfocitos, B2MG.

Dentro de la valoración clínica, la estratificación pronóstica más importante es la de Rai y Binet, aún en la actualidad sigue manteniéndose vigente por su fácil aplicación (examen físico y datos obtenidos del hemograma) y sigue manteniendo impacto pronóstico.

La clasificación de Rai establece 5 estadios para LLC. Aquellos que poseen un riesgo bajo son un estadio 0 y se caracterizan por tener una linfocitosis aislada.

La mediana de supervivencia es 16 años y a los 10 años es de 65%.

Los estadios 1 y 2 se consideran de riesgo intermedio. El estadio 1 esta caracterizados por presentar linfocitosis y adenopatías mientras que el estadio 2 linfocitosis más hepato y/o esplenomegalia. La mediana de supervivencia en estos dos grupos es de 8 años y a los 10 años es del 45%.

Los estadios 3 y 4 se consideran de alto riesgo. El estadio 3 se caracteriza por tener linfocitosis y anemia (Hb <11g/dL). Mientras que el estadio 4 se caracteriza por linfocitosis mas plaquetopenia (<100x10<sup>9</sup>/L). La mediana de supervivencia de esta población es de 2,5 años y a los 10 años es del 15%.

Por otro lado, los estadios de Binet consisten en clasificar a los pacientes con diagnostico de LLC en 3 estadios A, B y C.

El estadio A se considera de bajo riesgo y se caracteriza por linfocitosis y menos de 3 áreas linfoides afectadas. En estos pacientes la mediana de supervivencia es de 15 años y a los 10 años del 65%.

El estadio B o Riesgo intermedio esta caracterizado por linfocitosis y 3 o más áreas linfoides afectadas. La mediana de supervivencia es de 5 años y de 25% a los 10 años.

El estadio C o de alto riesgo esta caracterizado por pacientes con diagnóstico de LLC que a su vez presentan anemia (Hb <10 g/dL) y/o plaquetopenia (<100x10<sup>9</sup>/L).

Los pacientes en estadio 3 o más o C deberán recibir tratamiento, mientras que aquellos con menor grado en la clasificación deberán evaluarse de manera individual. (1)

En aquellos pacientes que van a recibir tratamiento se deberá establecer la presencia de factores pronósticos y factores de resistencia para decidir protocolo terapéutico.

Para la elección del tratamiento la única alteración de importancia actual es la del 17p (influye en la elección del tratamiento, pero no en el momento de inicio del mismo).

Los criterios para indicación de terapia onco-específica son la presencia de enfermedad sintomática: fatiga severa, síntomas B, amenaza de función de órgano, enfermedad voluminosa (esplenomegalia > 6 cm del reborde costal, ganglios linfáticos >10 cm), anemia o trombopenia progresiva o refractarias a tratamiento corticoideo, linfocitosis  $\geq$  200.000- 300.000 o síntomas de leucostasis.

Este trabajo se centra en optimizar la técnica para obtener diagnostico por citogenética convencional.

Tanto el valor pronóstico como la orientación terapéutica implican hallazgos citogenéticos por citogenética convencional (CGC) y por FISH. La CGC se basa en la obtención de metafases y preparación cromosómica, a partir de una muestra de sangre periférica en un medio de cultivo adecuado y con mitógenos específicos que inducen la división celular. Posteriormente se realiza el procesamiento de la muestra, para esto se detiene el cultivo con el uso de colchicina, un inhibidor del huso mitótico que permite obtener metafases para el posterior análisis. A continuación se realiza el tratamiento con solución hipotónica y la fijación de la muestra con una solución metanol/ ácido acético. Por último se realiza el extendido y el bandeo cromosómico. (ANEXO 4)

Dentro de los parámetros pronósticos más importantes en la LLC se encuentran las alteraciones citogenéticas. Estas pueden ser detectadas tanto por CGC como por citogenética molecular (FISH), sin embargo cada una de estas técnicas presentan ventajas y dificultades. Las alteraciones citogenéticas con demostrado impacto pronóstico son la del (13) (q14), del (11)(q22-q23), +12 (trisomía 12) y del(17)(p13).(6)

El FISH ha sido la herramienta de diagnóstico citogenético para los cuatro marcadores clásicos, sin embargo sólo define alteraciones buscadas, no puede definir otras alteraciones que hoy sabemos tienen impacto pronóstico de valor como la del (6q21), o el cariotipo complejo. Por otro lado la CGC puede definir el cariotipo complejo y la presencia de evolución clonal sin embargo ha tenido un desarrollo dificultoso a causa del bajo índice mitótico de las células de LLC. Deben aplicarse ambas técnicas.

Es importante mencionar que la CGC tuvo un desarrollo e implementación dificultosa a lo largo del tiempo debido al bajo rendimiento de los primeros mitógenos utilizados en esta técnica.

La técnica utilizada en consecuencia para establecer pronóstico fue el FISH.

Döhner propone un modelo jerárquico predictivo que depende de anomalías identificadas por esta técnica.

Gracias a los criterios de Döhner se pudieron identificar las 4 anomalías clásicas más comunes, la delección 13q (si está aislada) de mejor pronóstico, la delección 17p de peor pronóstico y el compromiso 11q y +12, de pronóstico intermedio.(7)(8)

Además debemos destacar que los factores biológicos son independientes de los factores clínicos de Rai y Binet.

Alteraciones citogenéticas.

Las principales alteraciones citogenéticas son:

13q.14.3

Se encuentra presente en aproximadamente en el 50% de los casos de LLC.

Es la alteración más común y está asociada a un mejor pronóstico. En el cromosoma 13 se encuentra una región de delección mínima de 29Kb que contiene el denominado gen supresor tumoral DLEU2.

Esta se presenta más frecuentemente de forma heterocigota. Puede también presentarse de forma homocigota y en algunos casos las células tiene mezcla de alteraciones heterocigotas y homocigotas.(7)

11q.22.23

Se encuentra entre el 6 y el 20% de los pacientes, esta clínicamente asociado con linfadenopatías significativas que pueden ser primarias o secundarias aunque más a menudo es subclonal.

La región crítica de 11q-22-23 contiene el gen ATM (Ataxia-Telangectasia mutada) esta codifica una proteína que actúa dentro de la cascada de la proteína p53.

Predomina en pacientes jóvenes de sexo masculino, sobre todo en la forma tumoral de la enfermedad. Se asocia a un mal pronóstico.(7)

+12

Se encuentra 11 a 25% de los casos y es considerado un marcador de riesgo intermedio. Está asociado a más anomalías cromosómicas como +18 y +19, del14q y translocaciones t(14;18), t(14;19), t(8;14).

Algunos investigadores consideran que la trisomía 12 es una anomalía clonal temprana, la LLC puede evolucionar secundariamente con la aparición de aberraciones cromosómicas secundarias o mutaciones que afectan particularmente a los genes NOTCH1, TP53, SF3B1 y FBXW7. (7)

17p13.

Se identifican en menos del 10% de los pacientes en el momento del diagnóstico. Sin embargo se encuentra en el 30 a 50% de los pacientes con resistencia al tratamiento lo que lo convierte en la anomalía más frecuente adquirida después del tratamiento.

En condiciones normales, las células al ser sometidas a estrés celular producido por la quimioterapia activan la ruta del p53 para lograr la apoptosis.

Proceso que no ocurre en la delección 17p por lo que las células anormales no son eliminadas acumulando anomalías cromosómicas adicionales.

En el momento de detectada esta anomalía tiene una supervivencia de 5 años, si se detecta al seguimiento y agrega otras anomalías la supervivencia disminuye de 12 a 18 meses.

En este caso destacamos que si bien el estudio Citogenética es utilizado para determinar el pronóstico de la LLC, en esta delección puntualmente el estudio permite definir el tratamiento. (7)

La evolución clonal es la adquisición de nuevas alteraciones citogenéticas que incluyen en el desarrollo y la evolución de la LLC. Las primeras en aparecer son las delecciones clonales (delección heterocigotas 13q, trisomía 12, MYD88, mutación NOTCH 1), mientras otras aparecen secundariamente como delecciones subclonales (mutaciones TP53, ATM, SF3B1, delecciones homocigotas 13q, ganancia 2p). (7) (9)



El cariotipo complejo comprende tres o más anomalías cromosómicas. Se detecta en el 16% de los pacientes. La complejidad se asocia con la disminución de la supervivencia, existiendo asociación entre el cariotipo complejo y deleciones 17p y 11q. (7)

### *Mitógenos*

El CpG DSP30 es un oligonucleótido corto de seis nucleótidos de citosina y guanina que actúa a través del receptor de membrana Toll like receptors 9 (TLR9). Los TLR9 son una familia de proteínas de membrana que se expresan en linfocitos B y otras células del sistema inmunitario.

La localización celular de los toll like receptors es a nivel de la membrana plasmática y la membrana de los endosomas, son componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa y reconocen patrones moleculares de microorganismos. El TLR9 reconoce CpG no metilados de ADN de bacterias y virus. Su estimulación induce proliferación, activación de los linfocitos y producción de anticuerpos.

La interleucina 2 (IL2) es una proteína de 153 aminoácidos que actúa a través del receptor presente en la membrana de los linfocitos IL2R. Una vez unido a su receptor activa la proliferación de los linfocitos B.

Con el uso conjunto de CpG/IL2 aumenta la obtención de metafases y el hallazgo de alteraciones citogenéticas al 80% de los cultivos de pacientes con LLC.(2).

## Objetivos

---

### Objetivo General

Poner a punto la técnica citogenética para determinar el pronóstico de pacientes con LLC.

### Objetivos específicos

1. Introducir en nuestro medio el cultivo con CpG IL2 en pacientes con LLC.
2. Comparar la eficacia del nuevo mitógeno con el TPA tradicional utilizando el índice mitótico.

## Metodología

---

### Materiales y métodos

Se realizó un estudio comparativo utilizando dos mitógenos que se utilizan en la técnica citogenética convencional para determinar el pronóstico de LLC. Esto nos permitió poner a punto el cultivo con CpG-IL2.

Población de estudio: pacientes con diagnóstico de LLC, que no recibieron tratamiento en los últimos 12 meses. Muestra: pacientes de LLC de la policlínica de LLC del Hospital Maciel, que tenían la patología confirmada y se encontraban en seguimiento de su enfermedad, en el periodo de julio-setiembre del 2018. El muestreo fue no probabilístico, Incluyendo los individuos que cumplían los criterios.

Para este estudio trabajamos con un “n” de 21 individuos que cumplieron con los siguientes criterios de Inclusión:

- pacientes con confirmación diagnóstica de LLC por inmunofenotipo.
- pacientes que no estuvieran o hubieran estado en tratamiento con quimioterapia y/o inmunosupresores en el último año o pacientes en etapa de Watch and wait.

### **Criterios de exclusión:**

-Pacientes con diagnóstico de LLC que al momento del estudio estuvieran recibiendo tratamiento o que lo hubieran recibido en los últimos 12 meses. Ya que ésta produce un efecto inhibitorio adicional de la división celular.

- Pacientes con recaída precoz, definida como aquella que se produce en el primer año después del tratamiento. En estos casos la clona es más proliferante y corresponde aquellas quimioresistentes y con mayor alteraciones citogenéticas acumuladas.

Variables:

Las variables que aplicamos a este estudio son:

Numero de metafases: conteo de metafases por observación microscópica directa con aumento de 10x20. Escala cuantitativa continua.

Índice mitótico: cociente entre la cantidad de metafases y la cantidad de núcleos más metafases. Escala cuantitativa continúa.

### **Recolección de datos:**

El método de recolección fue a través de selección dirigida de pacientes de la policlínica de referencia y observación de historias clínicas.

Los pacientes acudieron a dicha policlínica para el control de su patología de base. En dicha instancia los encargados de la investigación solicitaron el consentimiento informado (ANEXO 1) de forma verbal y escrita a los pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.

Una vez obtenido los consentimientos se procedió a realizar la extracción de las muestras en la misma instancia que se realizó la extracción para el hemograma de control, por lo cual no se realizaron maniobras invasivas adicionales para la obtención de las muestras utilizadas en nuestra investigación.

Las muestras de sangre periférica recolectadas llegaron al Departamento de Genética de Facultad de Medicina por medio de cadetería en las condiciones adecuadas para su traslado, el mismo fue realizado bajo estrictas condiciones de seguridad, en recipientes aislados y refrigerados en gradillas adecuados, en un plazo no mayor de 6 horas.

Con las muestras se realizaron dos cultivos celulares, uno tratado con TPA utilizando el protocolo habitual del Departamento de Genética (ANEXO 2) y el otro con CPG-IL2 para el cual utilizamos el protocolo validado en el Hôpital Pitié-Salpêtrière, UPMC Paris (ANEXO 3) que fueron analizados.

El investigador que realizó los cultivos era distinto al que cuantificaba las metafases obtenidas en cada cultivo.

Las muestras utilizadas en el Departamento de Genética de la facultad de medicina fueron reversiblemente anonimizadas, adjudicándole un número a cada una.

Luego que se realizó la técnica, las muestras fueron descartadas con los requisitos de seguridad pertinentes.

En base a los resultados obtenidos de ambos cultivos celulares procedimos a la comparación de los mismos mediante el índice Mitótico para comprobar la eficacia del nuevo mitógeno utilizado.

Se realizó la comparación de los índices mitóticos promedios de DSP30-IL2 y TPA. Trabajamos con un error de tipo 1 de 0,05.

Para determinar si los datos distribuían normalmente utilizamos el test Shapiro Wilk, al constatar que la variable no distribuye normalmente utilizamos para su análisis la Prueba de suma de rangos de Wilcoxon con signo.

## Normas Éticas

El estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital Maciel, institución donde se lleva a cabo el proyecto y por el comité de ética de la Facultad de Medicina. Se adapta a las normas de Helsinki.

## Resultados:

Cumplieron los criterios de inclusión 21 pacientes, las características de los pacientes incluidos se resumen en la siguiente tabla: Tabla 1.

En la tabla 2 se incluyen los resultados de los cultivos de los dos mitógenos evaluando número de metafases e índice mitótico.

*Tabla 2: Datos obtenidos del estudio*

PACIENTES	METAFASES		NÚCLEOS		INDICE MITOTICO	
	TPA	CPG	TPA	CPG	TPA	CPG
1	56	8	14905	10343	0,0037	0,0007
2	32	80	27992	42983	0,0011	0,0019
3	51	110	25044	22910	0,002	0,0047
4	80	755	39498	38757	0,002	0,0191
5	0	0	0	0	COAGULADO	COAGULADO
6	0	0	0	0	COAGULADO	COAGULADO
7	37	360	7724	8645	0,046	0,4
8	195	158	11261	31988	0,0047	0,0049
9	19	7	48372	44967	0,0004	0,0002
10	0	177	12842	20986	0	0,0084
11	0	0	0	0	COAGULADO	COAGULADO
12	18	185	10839	24142	0,0017	0,0076
13	2	29	19960	19296	0,0001	0,0045
14	18	22	7557	8354	0,0024	0,0026

15	94	311	13355	12733	0,007	0,0238
16	37	387	20188	25233	0,0018	0,0151
17	147	71	8125	6884	0,0177	0,0102
18	127	162	18079	19812	0,007	0,0081
19	236	352	17289	20150	0,0135	0,0171
20	69	183	6420	6843	0,0107	0,026
21	179	306	21714	30099	0,0081	0,01

Para el análisis de los resultados obtenidos durante el trabajo experimental lo primero que debimos determinar fue si los datos distribuían normalmente. Para esto utilizamos el test Shapiro Wilk de normalidad para los datos extraídos de las metafases y el índice mitótico.

La hipótesis nula fue que la variable distribuía normalmente y la hipótesis alternativa que no distribuía normalmente. El resultado del test fue estadísticamente significativo con un alfa del 0,05 por lo tanto rechazamos la hipótesis nula, consiguientemente tenemos evidencia estadística suficiente para decir que los datos no poseen una distribución normal. Los p valores en este caso fueron de 0,03118 y 0,01113 para las metafases de los cultivos con TPA y CpG respectivamente y de  $1,511 \times 10^{-5}$  y  $3,243 \times 10^{-8}$  para el índice mitótico de TPA y CpG respectivamente. Debido a que las muestras no distribuyen normalmente analizamos los resultados con una rama de la estadística denominada Estadística no Paramétrica.

De los 21 pacientes ingresados, 3 fueron descartados debido a que las muestras no se recibieron en condiciones adecuadas (coaguladas), 2 fueron descartados por presentar valores extremos, uno con muy alto índice mitótico y otro con muy alto número de metafases vinculado a características biológicas del paciente.

Los 16 pacientes restantes se analizaron como se describió.

El siguiente paso fue determinar si la cantidad de metafases obtenidas en los cultivos con CpG fue mayor que las obtenidas con TPA y si esa diferencia es estadísticamente significativa, por lo cual planteamos el siguiente contraste de hipótesis:

- $\mu_0$ : La mediana de las diferencias entre las metafases con CpG y TPA son iguales a 0.
- $\mu_A$ : La mediana de las diferencias entre las metafases con CpG y TPA son distinta de 0.

**Tabla 3: Conteo de Metafases**

Pacientes	Metafases	
	TPA	CPG
1	56	8
2	32	80
3	51	110
4	195	158
5	19	7
6	0	177
7	18	185
8	2	29
9	18	22
10	94	311
11	37	387
12	147	71
13	127	162
14	236	352
15	69	183
16	179	306

**Tabla 4: Comparación de Índice Mitótico**

Pacientes	INDICE MITOTICO	
	TPA	CPG
1	0,0037	0,0007
2	0,0011	0,0019
3	0,002	0,0047
4	0,0047	0,0049
5	0,0004	0,0002
6	0	0,0084
7	0,0017	0,0076
8	0,0001	0,0045
9	0,0024	0,0026
10	0,007	0,0238
11	0,0018	0,0151
12	0,0177	0,0102
13	0,007	0,0081
14	0,0135	0,0171
15	0,0107	0,026
16	0,0081	0,01

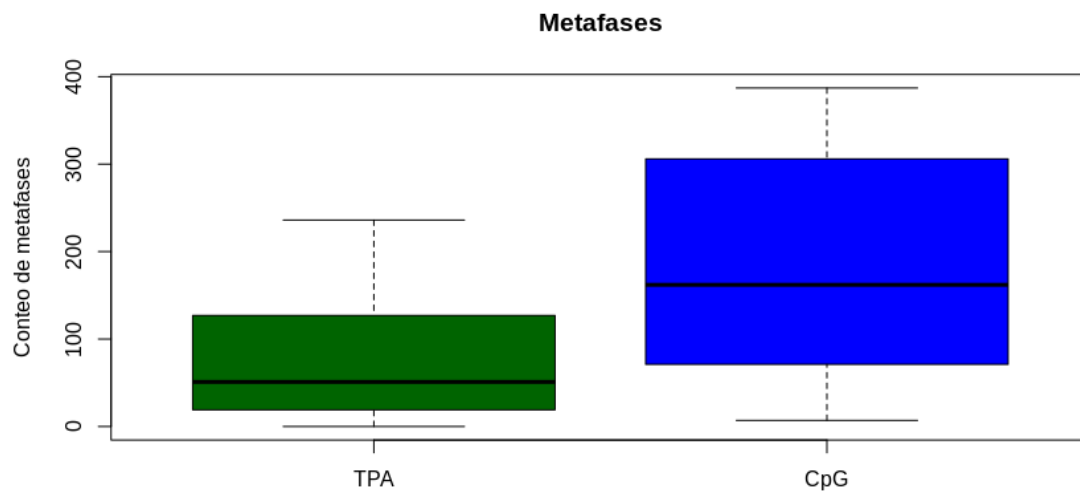
Para contestar a esta pregunta utilizamos la **Prueba de suma de rangos de Wilcoxon con signo** que permitió concluir que tenemos evidencia estadísticamente significativa a un nivel de significación del 5% para decir que los valores de las metafases en los cultivos realizados con CpG son mayores que los valores de TPA, con un p-valor 0,009975.

Por último hicimos la comparación de los índices mitóticos para cada uno de los dos cultivos aplicando también Test de Wilcoxon con signo. En este caso las hipótesis a plantear fueron las siguientes:

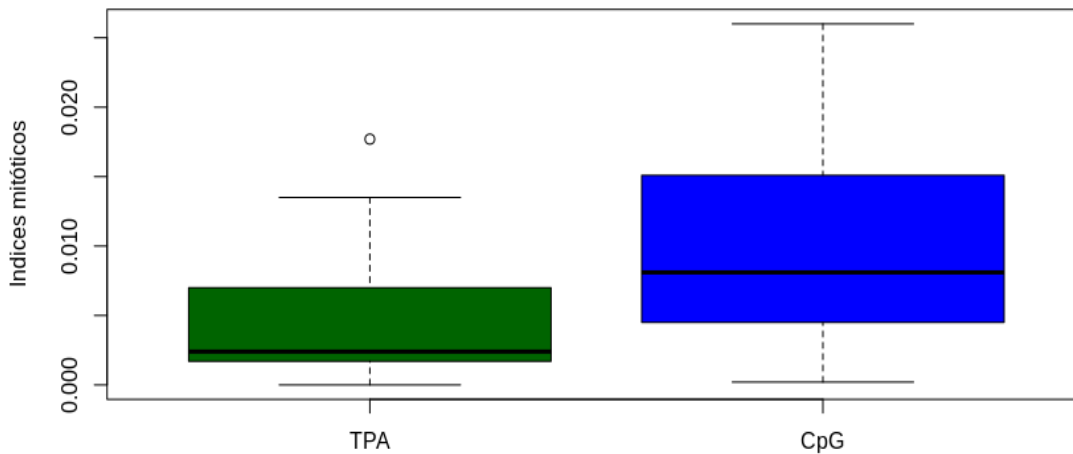
- $\mu_0$ : La mediana de las diferencias entre los Índices mitóticos con CpG y TPA son iguales a 0.
- $\mu_A$ : La mediana de las diferencias entre los Índices mitóticos con CpG y TPA son distinta de 0.

Con la aplicación del test concluimos que tenemos evidencia estadísticamente significativa con un nivel de significación del 5% para decir que los valores del índice mitótico en los cultivos realizados con CpG son mayores que los valores con TPA, con un p-valor de 0,007751.

Se representa a continuación los datos gráficamente para cada caso, mediante un boxplot para metafases e índice mitótico. Figura 1 y 2.



**Figura 1: Representación grafica del conteo de metafases con TPA y CpG**



**Figura 2** Representación grafica de los índices mitóticos con TPA y CpG.

## Discusión

Para la elección de la muestra decidimos utilizar pacientes sin tratamiento médico o que el mismo estuviera alejado por lo menos un año para evitar alteraciones en los resultados. De los 21 participantes se descartaron 5. No se tomaron en cuenta las variables edad y sexo debido a que no eran significativas para el análisis, vinculando esto al n muy pequeño de nuestra muestra. Todos los individuos participantes se encuentran en el estadio IA de LLC.

Cada muestra fue cultivada bajo las mismas condiciones, el mismo medio de cultivo siendo la única variable el mitógeno. El conteo de metafases y núcleos fue realizado por observadores independientes quienes hicieron el análisis de los datos.

De la población total se excluyeron 2 pacientes que su conteo de metafases e índices mitóticos arrojaron valores extremos muy alejados de la media.

No hubo diferencia en cuanto al éxito de los cultivos, 95% para TPA y 100% para CPG. Esto es debido al n muy bajo de nuestra muestra.

No se constato diferencia significativa en el número de núcleos (células que no entraron en división) en los cultivos con ambos mitógenos. Esto confirma que en los dos cultivos se utilizó idéntica celularidad.

Nuestro trabajo nos permitió acercarnos a los resultados obtenidos a nivel internacional que demuestran que el CpG-IL2 tiene mayor eficacia en la obtención de metafases en número y calidad. Figura 3 y 4.



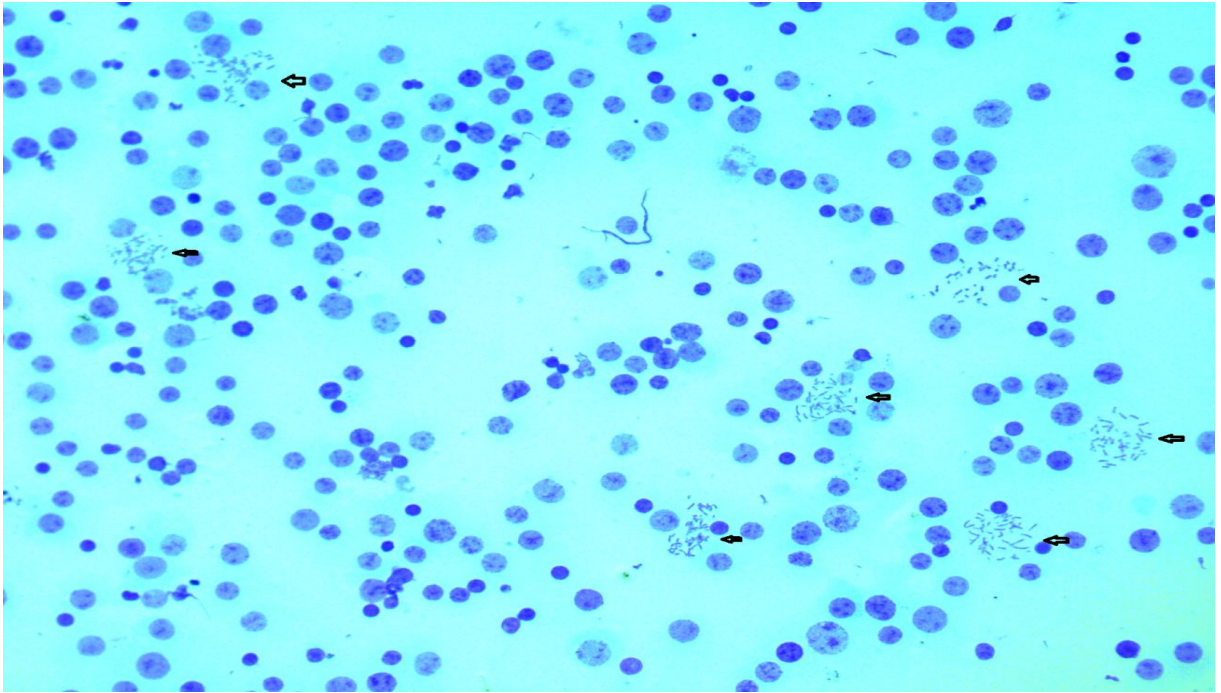


Figura 3: Fotografía de un preparado cultivado con el mitógeno CpG-IL2. Se observan varias metafases (flechas negras) distribuidas por todo el campo.

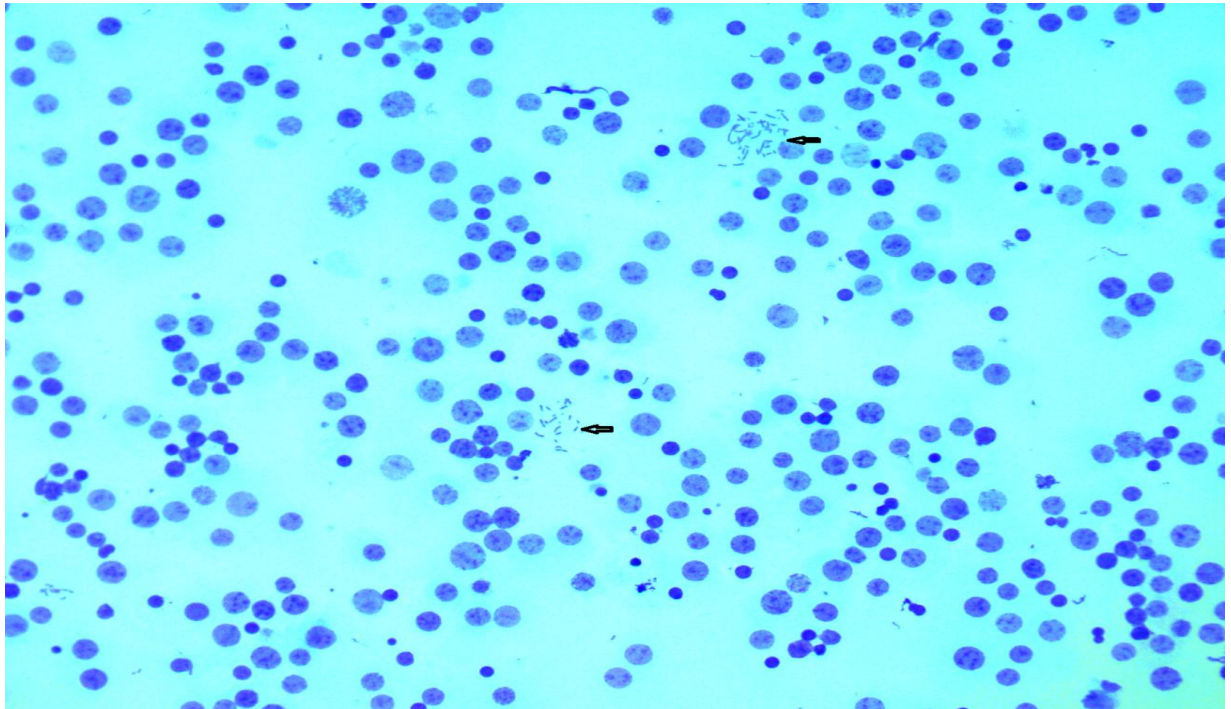


Figura 4: Fotografía de un preparado cultivado con el mitógeno TPA. Se observan dos metafases aisladas (flechas negras).

## Conclusiones y perspectivas

---

La utilización de CpG-IL2 como mitógeno sistemáticamente mejora la obtención en cantidad y calidad de las metafases permitiendo un diagnóstico citogenético más certero.

Este trabajo permitió la puesta a punto de un protocolo y demostrar su superioridad frente a la técnica utilizada en nuestro medio. A partir de los resultados de este estudio se implementará el uso de CpG como mitógeno de forma sistemática en el departamento de Citogenética.

## Referencias bibliográficas:

---

1. J.L. Vives Corrons JS-S. Hematología Clínica. 5.a Madrid, España: ELSEVIER; 2006. p. 491-498.ed. Vol. 1.
2. Lin X, Chen J, Huang H. Immunostimulation by cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotides in combination with IL-2 can improve the success rate of karyotype analysis in chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Biomedical Science*. 28 de septiembre de 2016;73(3):110-4.
3. Heerema NA, Byrd JC, Dal Cin PS, Dell' Aquila ML, Koduru PRK, Aviram A, et al. Stimulation of chronic lymphocytic leukemia cells with CpG oligodeoxynucleotide gives consistent karyotypic results among laboratories: a CLL Research Consortium (CRC) Study. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. diciembre de 2010;203(2):134-40.
4. E. Beutler, M.A. Lichtman, B.S. Coller, T.J. Kipps, U. Seligson. Edición en español de: *Williams Hematology*, 6<sup>th</sup> ed. Marban libros. 2005.
5. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and treatment: HALLEK. *American Journal of Hematology*. septiembre de 2017;92(9):946-65.
6. Steven L. Gersen, Martha B. Keagle. *Clinical Cytogenetics*. 2th edición. Human Press. Inc. 2005.
7. Nguyen-Khac F, Borie C, Callet-Bauchu E, Eclache V, Struski S. Cytogenetics in the management of chronic lymphocytic leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Annales de Biologie Clinique*. 20169-10;(5):561-567.
8. Bruce D. Cheson. *Chronic Lymphoid Leukemias*. 2th edición. Marcel Dekker, 2001.
9. Karakosta M, Manola KN. The parallel application of karyotype interphase and metaphase FISH after DSP-30/IL-2 stimulation is necessary for the investigation of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*. 20 de octubre de 2016;21(9):526-35.
10. D.E. Rooney. *Human Cytogenetics: malignancy and acquired abnormalities*. 3th edición. Oxford University Press. 2001
11. John Swansbury. *Cancer Cytogenetics, methods and protocols*. Human Press. Inc. 2003.
12. Robert R. Pagano. *Estadística para las ciencias del Comportamiento*. 7th ED. Cengage learning Latín América. Thomsom. 2006

13. Montoya Montoya G. Confidencialidad en salud e investigación. En: Lolas Stepke F, Quezada A, Rodríguez E. Investigación en Salud. Dimensión Ética. 1º ed. Santiago de Chile, CIEB-Universidad de Chile, 2006: Pag 217-228

14. Bota A, Estévez A, Fernández L, Hernández M, Hevia A, Lara C, et al. Comités de evaluación ética y científica de la investigación en seres humanos en los países latinoamericanos y del Caribe. En: Lolas Stepke F, Quezada A, Rodríguez E. Investigación en Salud. Dimensión Ética. 1º ed. Santiago de Chile, CIEB-Universidad de Chile, 2006: Pag 59-80.

15. Rodríguez Yunta E, Moreno Exebio L. Los principios éticos y la conducción responsable de la investigación. En Lolas Stepke F, Quezada A, Rodríguez E. Investigación en Salud. Dimensión Ética. 1º ed. Santiago de Chile, CIEB-Universidad de Chile, 2006: Pag 279 – 292.

16. Abascal Alonso M. et col. Recomendaciones sobre los aspectos éticos de las colecciones de muestras y bancos de materiales humanos con fines de investigación biomédica. Rev. Esp. Salud Pública 2007; 81 (2): 95-111.

## Agradecimientos:

---

Queremos agradecer al laboratorio de Citogenética del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina por el apoyo durante todo el proyecto de investigación. En especial a Dra Vanina Silva, Dra Viviana Diaz y Lic. Jorge Souto. Nuestro especial agradecimiento a la Dra Hematóloga Landoni por recibirnos en su consulta en la policlínica de leucemia linfoide crónica del Hospital Maciel. Agradecer a los pacientes por aceptar participar en este proyecto, sin los cuales no hubiera sido posible su realización. Por último a la asistente Lic. Valentina Colestro y Dra. Vania Medina por su apoyo en métodos cuantitativos.

# Anexos

---

## Anexo 1

Hoja de Información para el paciente.

En facultad de medicina en 6to año se lleva a cabo un proyecto de investigación científica aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina, el cual busca poner en práctica los diversos conocimientos aprendidos en la carrera.

En esta investigación buscamos demostrar la mayor eficacia de un estimulante de la división celular utilizado en técnicas citogenéticas para el pronóstico de Leucemia Linfoide Crónica (LLC), comparándolo con el estimulante que se utiliza en nuestro medio. Por esta razón buscamos la colaboración de pacientes con diagnóstico de LLC que no hayan recibido tratamiento.

El procedimiento consta en extraer 10cm más de sangre periférica aprovechando la extracción que habitualmente se utiliza para el control de su patología de base (LLC). Por lo tanto no se correrán riesgos ni se realizarán maniobras invasivas adicionales a las necesarias para el seguimiento de su enfermedad.

La muestra será utilizada únicamente para la realización de este estudio y el sobrante será descartado.

Una vez obtenida la muestra será enviada al Laboratorio de genética del Hospital Maciel o del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina de la

Universidad de la Republica para su procesamiento. El mismo consiste en desarrollar a partir de la muestra dos cultivos celulares cada uno con un tipo de estimulante celular y determinar cual tiene mayor eficacia.

Su colaboración en dicha investigación podría arrojar resultados que aumenten el conocimiento científico sobre el pronóstico y tratamiento de LLC en nuestro medio.

Es importante aclarar:

1. No recibirá un beneficio directo de esta investigación.
2. No alterara la conducta médica actual.

Es importante que tenga en cuenta que si decide ser parte de este proyecto tiene la libertad de abandonarlo cuando usted lo desee sin ningún tipo de repercusiones.

Destacamos que su información personal será anónima y no recibirá ningún tipo de retribución económica por su participación.

En el caso que desee saber acerca los resultados de la investigación nos contactaremos con usted para informarlo.

Esta investigación esta supervisada por Dra. Faride Uturbey y la Dra. María Noel Spangenberg y se llevara a cabo en el periodo de Julio a Octubre de 2018.

Usted se podrá contactar a través de la siguiente vía:

- Teléfono Departamento de Genética- Facultad de Medicina: 2924 34 14. Interno 3469

Consentimiento Informado:

El proyecto “Estudio comparativo entre CpG oligonucleótido y IL2/TPA, en la obtención de metafases para el análisis citogenético de pacientes con Leucemia Linfoide Crónica sin tratamiento” tiene como objetivo poner a punto la técnica citogenética para determinar el pronóstico de pacientes con LLC. El proyecto se llevará a cabo en el Departamento de Genética de la Facultad de Medicina.

Si está de acuerdo el abajo firmante

Declara haber entendido la información proporcionada, que se le permitió realizar preguntas y obtener las debidas respuestas.

Firmó por lo tanto, este documento como expresión de mi libre conformidad.

PACIENTE

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CI \_\_\_\_\_

Fecha \_\_\_\_\_

TESTIGO

Nombre \_\_\_\_\_

Firma \_\_\_\_\_

CI\_\_\_\_\_

Fecha\_\_\_\_\_

INVESTIGADOR PRINCIPAL

Nombre\_\_\_\_\_ Firma\_\_\_\_\_

CI\_\_\_\_\_ Fecha\_\_\_\_\_

Laboratorio de Citogenética. Dpto de Genética. Facultad de Medicina. UDELAR.

Gral. Flores 2125

29243414 Int. 3469/346



## Anexo 2

### Protocolo TPA

#### Equipamiento y reactivos:

- Solución stock de TPA: 100  $\mu\text{g/ml}$  disuelto en Etanol absoluto o DMSO, almacenar congelado en la oscuridad. Hacer una solución de trabajo de 2 a 5  $\mu\text{g/ml}$  en RPMI antes de utilizarlo.
- Cámara de flujo laminar.
- PBS.

#### Método:

1. Prepara 2 cultivos de medula ósea y 2 cultivos de sangre periférica.
2. Al principio del periodo de cultivo añadir 0,2 ml de la solución de trabajo a cada cultivo para conseguir una concentración final de 50 ng/ml.
3. Incubar un cultivo de sangre y uno de medula ósea durante 3 días y uno de cada uno durante 5 días.
4. Añadir colcemid y reducir el tiempo de incubación a 15 minutos debido a que las células estimuladas con TPA son particularmente propensas a una contracción cromosómica excesiva si son sobretratadas.
5. Prelavar los cultivos tratados con TPA en PBS antes del tratamiento con hipotónica para obtener una preparación más limpia de los cromosomas.
6. Incubar los cultivos tratados con TPA en hipotónica por 30 minutos.
7. Continuar con la cosecha y hacer laminas.

## Anexo 3

Protocolo CpG-IL2

Preparación de IL2

Referencia de producto: IL-2 humana recombinante (E.Coli)

AmpliTech ref: 18NC09430504p

50000 U (25 µg) en 5 ml de PBS y 1 mg/ml BSA.

Almacenar a -20°C.

250 pruebas.

Concentración usada para el cultivo: 20 U/ml.

Procedimiento de reconstitución (debajo de la campana de flujo laminar):

- Solución comercial posee la concentración correcta para alícuotas en tubos de 20 µl (250x20 µl).
- Almacenar a -20°C.
- Agregue 20 ml de esta solución para un cultivo de 10 ml.

Preparación de CpG Oligonucleótido

Referencia de producto: DSP30 TibMolBiol 8119468

500 nmol en forma liofilizada para ser almacenado a 4°C.

50 pruebas.

Concentración usada por el cultivo: 1 µM.

Procedimiento de reconstitución (debajo de la campana de flujo laminar):

- Centrifugar el tubo a la máxima velocidad por unos segundos.
- Tomar el liofilizado en 500 µl de agua estéril, agitar el vórtex, esperar unos minutos para una buena disolución.
- Concentración: 1 nmol/µl por lo tanto 0,001 µmol/µl.

Alícuotas en tubos de 10 $\mu$ l.

Almacenar a -20 oC.

Agregue 10  $\mu$ l de esta solución para un cultivo de 10 ml

(10  $\mu$ l de solución para 0,001  $\mu$ mol/ml = 0,01  $\mu$ mol diluido en 10 ml  $\rightarrow$

concentración en el recipiente: 0,001  $\mu$ mol/ml por lo tanto 1  $\mu$ mol/l por lo tanto

1 $\mu$ M).

Repetir este paso hasta que el sobrenadante quede claro.

## Anexo 4

### PROTOCOLO DE CULTIVO Y DETENCIÓN

#### CULTIVO:

1. Registro.
2. En la cámara de flujo laminar previamente limpia con alcohol 70°, se traspasa la muestra a tubo cónico.
3. Se toma aproximadamente 0,5 ml de la muestra y se realiza el conteo celular.
4. Se realiza el cultivo en 9 ml del medio adecuado (MarrowMax) en frascos de cultivo. De ser necesario agregar estimulantes (por ej, TPA).
5. Dejar en estufa a 37°C el tiempo necesario según patología.

#### DETENCIÓN:

1. Agregar a cada caj 10 µl dr Bret y 0,5 mL de colchicina. Se deja durante 1 h a 37°C.
2. Traspasar la muestra a tubo cónico previamente rotulado.
3. Centrifugar durante 10' y sacar el sobrenadante.
4. Agregar 10 mL de solución hipotónica a 37o C y resuspender haciendo espuma. Dejar temperatura a 37o C durante 20'.
5. Agregar 4 -5 gotas de fijador 3:1 y resuspender.
6. Centrifugar 10' y retirar el sobrenadante hasta 1 cm por encima del pellet.
7. Agregar 1 mL de 3:1 lentamente por las paredes del tubo y resuspender suavemente, luego agregar 4 a 6 mL más (según el tamaño del pellet).
8. Dejar 15' a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 5' y retirar el sobrenadante.
10. Agregar 4 cm de 3:1 y resuspender.
11. Centrifugar 5' y retirar el sobrenadante.

12. Agregar 1 mL de 3:1 (dependiendo de la cantidad de pellet).

## PROTOS DE EXTENDIDO Y BANDEO

### EXTENDIDOS:

1. Limpiar y rotular los portaobjetos a utilizar. Tirar 2 gotas del preparado sobre el portaobjetos a una distancia de 10 a 20 cm.

2. Dejar secar a temperatura ambiente durante unos minutos, o con ayuda

Procurar almacenar el pellet en un tubo eppendorf rotulado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . de un secador (en condiciones de alta humedad).

### BANDEO G :

Para esta técnica se utilizan preparados envejecidos durante 1 semana o en estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  durante 30'.

1. Preparar 3 koplíng:

- A: 25 mL de Suero fisiológico (NaCl 0,9 g/mL).

25 mL de Solución Fosfato.

100  $\mu\text{L}$  de Tripsina en solución. (10X)

- B: 40 mL de Suero fisiológico.

- C: 45 mL de buffer Sorensen.

5 mL de Giemsa.

Se recomienda comenzar probando el tiempo de digestión con 1 preparado de cada paciente y fijar el tiempo óptimo de bandeo.

Se recomienda cambiar la Solución del Koplíng C cada 3 tandas de bandeo.

2. Sumergir los preparados en el koplíng A por 1 minuto.

3. Lavar los preparados en el koplíng B.

4. Sumergir los preparados en el koplíng C durante 2' o más (controlar la tinción en microscopio).

## PROTOCOLO FISH

### PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA FISH:

- 1) Registro.
- 2) Traspasar la muestra a tubo cónico.
- 3) Centrifugar a 2500 rpm durante 10 min.
- 4) Extraer capa de blancos y traspasarla a un nuevo tubo cónico previamente rotulado.
- 5) Agregar 10 mL de solución hipotónica a 37°C y resuspender bien haciendo espuma. Dejar temperatura a 37°C durante 20´.
- 6) Agregar 4 -5 gotas de fijador 3:1 y resuspender.
- 7) Centrifugar 10´ y retirar el sobrenadante hasta 1 cm por encima del pellet.
- 8) Agregar 1 mL de 3:1 lentamente por las paredes del tubo y re suspender suavemente, luego agregar 4 a 6 mL más (según el tamaño del pellet).
- 9) Dejar 15´ a temperatura ambiente.
- 10) Centrifugar 5´ y retirar el sobrenadante.
- 11) Agregar 4 cm de 3:1 y resuspender.
- 12) Centrifugar 5´ y retirar el sobrenadante.

Repetir este paso hasta que el sobrenadante quede claro.

13) Hacer los extendidos tirando 2 gotas sobre el porta objetos. Los preparados se dejan en estufa a 37°C.

14) Agregar 1 mL de 3:1 (dependiendo de la cantidad de pellet).

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Utilizamos un kit comercial (Dako) y sondas comerciales (Vysis) utilizando diluciones de las mismas en aquellas que sea necesario.

Tampón de lavado

Diluir 1/20 en agua destilada. (solución 1).

Formaldehído 37%

Diluir 5ml en 45 ml de solución tampón de lavado

Alcoholes

Prepara tres soluciones de alcohol, 70%. 90% y 100%

Tampón astringente

Diluir 1/20 en agua destilada (solución 2).

DÍA 1

1. Sumergir las láminas en formaldehído 37% durante 2 min.
2. Traspasar las láminas a un koplín con solución 1 y dejarlas durante 5 min. Repetir este paso en solución 1 nueva 5min.
3. Deshidratar las láminas en alcohol 70%, 90% y 100% 2 min en cada uno.
4. Dejar secar en posición vertical.
5. Hibridizar con la sonda correspondiente. En oscuridad.
6. Cubrir las láminas con cubre objetos.
7. Programar el HyBrite: desnaturalización a 82o C durante 5 min, hibridación a 45o C de 14-20 horas.
8. Colocar las láminas y correr el programa.

DIA 2

Todos los pasos deben realizarse en oscuridad.

1. Preparar 2 koplín con solución 2.
2. Colocar uno de ellos en baño a 65o C.
3. Retirar las láminas de Hybrite y sumergirlas en koplín con solución 2 ( a temperatura ambiente) el tiempo necesario para que se desprendan los cubre objetos.
4. Sumergir las láminas en koplín a 65o C durante 10 min.

5. Traspasar las láminas a koplín con solución 1 durante 4 min a temperatura ambiente. Repetir en solución 1 nueva durante 4 min.
6. Deshidratar las láminas en alcohol 70%, 90% y 100% durante 2 min en cada uno.
7. Dejar secar en posición vertical.
8. Aplicar 5  $\mu$ l de DAPI.
9. Guardar láminas en freezer durante 24 hrs.
10. Observar láminas al microscopio.