

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAT DE CIÈNCIES**

**TESI DOCTORAL**

**CONTRIBUCIÓ DE LA CITOGENÈTICA CONVENCIONAL  
I LA HIBRIDACIÓ *IN SITU* A L'ESTUDI DE LES  
GAMMAPATIES MONOCLONALS**

**Memòria presentada per Elisabet Lloveras i Caballé per assolir el grau de  
Doctora en Ciències Biològiques per la Universitat Autònoma de  
Barcelona.**

**Bellaterra, desembre 2003.**

**CONTRIBUCIÓ DE LA CITOGÈNÈTICA CONVENCIONAL  
I LA HIBRIDACIÓ *IN SITU* A L'ESTUDI DE LES  
GAMMAPATIES MONOCLONALS**

Memòria presentada per  
**ELISABET LLOVERAS CABALLÉ**  
per assolir el grau de Doctora en Ciències Biològiques  
per la Universitat Autònoma de Barcelona

Tesis realitzada sota la direcció de  
**FRANCESC SOLÉ RISTOL** i **LOURDES FLORENSA BRICHS**  
al Departament de Citogenètica i Biologia Molecular  
de l'Hospital del Mar de Barcelona

**Francesc Solé**

**Lourdes Florensa**

**Elisabet Lloveras**

**A tota la meva família**  
**A en Quim i la Blanca**

**A tots aquells que,  
d'una manera o altre,  
heu participat en aquest projecte**

**moltes gràcies**

# ÍNDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>1</b>
1.1. MOTIVACIÓ PERSONAL PEL PROJECTE	2
1.2. DEL LIMFÒCIT B A LA CÈL.LULA PLASMÀTICA	3
1.2.1. Introducció a la hematopoesi	3
1.2.2. Limfopoesi	3
1.2.2.1. Anatomia funcional dels teixits limfoides	3
1.2.2.2. Del limfòcit B a la cèl.lula plasmàtica	5

1.2.2.3. Immunoglobulines	11
1.3. GAMMAPATIES MONOCLONALS	14
1.3.1. MIELOMA MÚLTIPLE	16
1.3.1.1. Epidemiologia i etiologia	16
1.3.1.2. Criteris diagnòstics	17
1.3.1.3. Característiques ontogèniques	18
1.3.1.4. Característiques morfològiques i immunològiques	19
1.3.1.5. Característiques citogenètiques i gèniques	22
1.3.1.5.1. Translocacions que afecten la cadena pesada de les immunoglobulines	26
1.3.1.5.2. Delecions a la banda 13q14	29
1.3.1.5.3. Alteracions al cromosoma 1	31
1.3.1.5.4. Altres alteracions	31
1.3.2. GAMMAPATIES MONOCLONALS DE SIGNIFICAT INCERT	33
1.3.2.1. Epidemiologia i etiologia	33
1.3.2.2. Criteris diagnòstics	34
1.3.2.3. Característiques morfològiques i immunològiques	34
1.3.3. Característiques citogenètiques i gèniques	35
1.3.4. ONCOGENÈSI DEL MIELOMA MÚLTIPLE	38
1.3.5. LEUCÈMIA DE CÈL.LULES PLASMÀTIQUES	44
1.3.5.1. Epidemiologia i etiologia	44
1.3.5.2. Criteris diagnòstics	44
1.3.5.3. Característiques morfològiques i immunològiques	44
1.3.5.4. Característiques citogenètiques i gèniques	45
1.4. OBJECTIUS	46
<b>2. MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>47</b>
2.1. Pacients	48
2.2. Mètodes	48
2.2.1. Extracció i conservació de les mostres de medul.la òssia	48
2.2.2. Tècnica de citogenètica convencional	49
2.2.3. Mètode MAC	51

2.2.4. Tècnica d'hibridació in situ fluorescent (o FISH, <i>fluorescence in situ hybridization</i> )	52
2.2.5. Tècnica MGG-FISH (May-Grünwald Giemsa-Hibridació <i>in situ</i> fluorescent)	56
ANNEX 1. REACTIUS I SOLUCIONS	59
<b>3. ARTICLES</b>	<b>66</b>
3.1. <b>Article 1:</b> The contribution of cytogenetics and <i>in situ</i> hybridization in the study of monoclonal gammopathies of undetermined significance	67
3.2. <b>Article 2:</b> Cytogenetic and FISH studies in 60 patients with multiple myeloma and plasma cell leukaemia	
3.3. <b>Article 3:</b> Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) studies in four cases of plasma cell leukemia (PCL)	68 69
ANNEX 1	70
<b>Article 1-annex 1:</b> May-Grünwald Giemsa-Fluorescence in situ hybridization (MGG-FISH) technique applied to a plasma cell leukemia	71
<b>Article 2-annex 1:</b> A new case of Turner syndrome associated with multiple myeloma	72
<b>Article 3-annex 1:</b> Técnicas de hibridación in situ (HIS). Fundamento y aplicaciones en neoplasias hematológicas	73
<b>4. DISCUSSIÓ</b>	<b>74</b>
4.1. Contribució de la citogenètica convencional i la hibridació in situ a l'estudi de les gammopaties de significat incert (article 1)	75
4.2. Contribució de la citogenètica convencional a l'estudi dels mielomes. Valoració de la monosomia 18 mitjançant	

tècniques de FISH (article 2 i article 2- annex 1) )	78
4.3. Contribució de la citogenètica convencional i la FISH a l'estudi de la leucèmia de cèl.lules plasmàtiques (article 2, article 3 i article 1- annex 1) )	80
<b>5. CONCLUSIONS</b>	<b>82</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>85</b>



# 1. INTRODUCCIÓ

## 1. INTRODUCCIÓ

### 1.1. MOTIVACIÓ PERSONAL PEL PROJECTE

Les gammopaties monoclonals de significat incert són un calaix de sastre. El més preocupant d'aquesta entitat és que aproximadament el 25% d'aquests pacients asimptomàtics poden evolucionar a un procés limfoproliferatiu.

L'ús de la hibridació *in situ*, entre altres tècniques de citogenètica molecular, ha permès en la última dècada caracteritzar una mica millor aquests pacients. Quan ens vam proposar aquest treball hi havia molt poc coneixement sobre l'estat pre-leucèmic d'aquesta entitat.

La motivació per realitzar aquest projecte ha vingut dels integrants de l'inicial equip del Servei de Citologia Hematològica dirigit per la Dra Woessner que s'ha mantingut unit malgrat el seu pas per diferents centres:

-L'interès de la Dra Soledad Woessner i la Dra Lourdes Florensa per trobar marcadors que permetin identificar aquells pacients amb risc d'evolucionar a mieloma múltiple.

-L'interès del Dr Francesc Solé en caracteritzar citogenèticament els pacients afectes d'una discriàsia plasmocel.lular.

El projecte l'he pogut dur a terme per:

-L'aprenentatge de l'estudi cromosòmic al microscopi gràcies al meu director de tesi, el Dr Francesc Solé.

-L'aprenentatge de les tècniques d'hibridació *in situ* fluorescent gràcies per la Dra Blanca Espinet.

-L'aprenentatge de totes les altres tècniques utilitzades en el treball pels tècnics de laboratori de l'equip de la Dra Woessner sobretot a la Rosa M<sup>a</sup> Vilà.

## 1.2. DEL LIMFÒCIT B A LA CÈL.LULA PLASMÀTICA

### 1.2.1. Introducció a la hematopoesi

L'hematopoesi és el mecanisme fisiològic responsable de la formació continuada dels diferents tipus d'elements sanguinis, que els manté dins els límits de la normalitat en la sang perifèrica.

Actualment es coneix que en l'home existeix una cèl.lula mare pluripotent amb capacitat de proliferació, diferenciació i autorenovació. Aquesta s'anomena cèl.lula mare limfomieloide (CFU-LM, *colony formation unit-lymphomyeloid*). A partir de la CFU-LM apareixen la cèl.lula germinal limfoide (CFU-L) i la cèl.lula germinal mieloide (CFU-M) que originaran els diferents tipus cel·lulars (limfoides i mieloides) a sang perifèrica.

### 1.2.2. Limfopoesi

#### 1.2.2.1. Anatomia funcional dels teixits limfoides

El sistema limfoide està format pels òrgans limfoides primaris o centrals i els secundaris o perifèrics. En l'home adult, la medul·la òssia i el timus desenvolupen el paper d'òrgans primaris. En aquests s'originen els limfòcits B i T a partir de la cèl.lula mare hematopoètica pluripotent; posteriorment maduren sense requerir la presència d'antígens. Els limfòcits que maduren a la medul·la òssia es denominen limfòcits B (B de Bursa de Fabricius) i són els responsables de produir anticossos com a resposta a l'estímul antigènic. Els que maduren al timus es denominen limfòcits T (T de timus) i són els responsables de les respostes immunes produïdes per cèl·lules. Els ganglis limfàtics, la melsa i el teixit limfoide associat a les mucoses, pell i tub digestiu on s'inicien les respostes immunes pertanyen als òrgans limfoides secundaris.

Un cop els limfòcits abandonen els òrgans primaris passen a la circulació sanguínia que els transporta a qualsevol punt de l'organisme. Posteriorment, són recollits dels teixits pels vasos limfàtics perifèrics que els

conduïxen als diferents ganglis limfàtics i des d'aquests poden tornar a la sang i als teixits, o bé, passar a la melsa on poden quedar emmagatzemats.

### ***Medul·la òssia***

La medul·la òssia pot considerar-se com un teixit tou contingut dins un estoig ossi que cedeix les cèl·lules hematopoètiques més madures a la circulació en els moments adequats; la majoria d'aquestes cèl·lules completen la seva maduració en l'arbre vascular o en els teixits.

El microambient medul·lar engloba un conjunt de diverses proteïnes, mucopolisacàrids, citoquines, factors angiogènics i diferents tipus cel·lulars (cèl·lules endotelials, limfòcits T, macròfags, cèl·lules reticulars i adipòcits), entre altres factors no tant coneguts. Cada tipus cel·lular es desenvolupa en un ambient específic de la medul·la, denominat nínxol, que està format per elements del microambient que, a més d'intervenir en el procés de diferenciació cel·lular, ofereixen a la cèl·lula suport físic i un punt d'adhesió.

El procés de diferenciació del sistema limfoide B es produeix en dues fases, una independent i una altra depenent d'antigen. La primera té lloc a la medul·la òssia en absència d'estimulació antigènica. Aquesta fase dona lloc a un reservori de limfòcits capaços de respondre a l'acció dels antígens (limfòcits B verges) .

### ***Gangli limfàtic***

Els ganglis limfàtics són acúmuls encapsulats de cèl·lules, principalment limfòcits B i T, estratègicament situats en tot el sistema limfàtic i distribuïts per tot l'organisme. Aquests presenten una forma esfèrica o ovalada. La seva càpsula és de teixit connectiu. Just per sota de la càpsula es troben les cèl·lules fagocítiques formant una malla que es denomina sinus subcapsular. Immediatament cap a l'interior del gangli troben una zona molt rica en limfòcits i macròfags, empaquetats en estructures esfèriques anomenades fol·licles. La zona que ocupen els fol·licles es denomina còrtex ganglionar. En aquesta zona es troben a més a més les cèl·lules accessòries.

L'estructura típica d'un gangli consisteix en una capa més externa (còrtex o zona B), una intermitja (paracòrtex o zona T), i una capa interna (medul·la). En el còrtex s'observen els limfòcits primaris constituïts per limfòcits B verges procedents de la medul·la òssia. Els fol·licles secundaris es constitueixen quan els limfòcits del fol·licle primari pateixen una estimulació antigènica i es transformen en cèl·lules blàstiques; aquestes tenen tendència a posar-se en el centre del fol·licle constituint el centre germinal, que queda envoltat d'una corona de petits limfòcits anomenada mantell fol·licular. Les cèl·lules plasmàtiques i les cèl·lules plasmocitoides o limfoplasmòcits constitueixen la fase final del procés de diferenciació del blasto B del centre germinal. Els precursors de les cèl·lules plasmàtiques migren del centre germinal per ubicar-se a la medul·la òssia i experimentar la seva transformació a cèl·lula plasmàtica. La cèl·lula plasmàtica també pot originar-se en el gangli a partir d'altres cèl·lules B, com el centròcit, o de les cèl·lules del centre germinal.

### 1.2.2.2. Del limfòcit B a la cèl·lula plasmàtica

Els **limfòcits B** procedeixen de la mateixa cèl·lula germinal que els limfòcits T, esdevenen competents immunològicament a la medul·la òssia, el fetge fetal i possiblement la placenta, i actuen com a equivalents de la Bursa de Fabricius de les aus. El desenvolupament de la CFU-L per donar origen als diversos tipus de limfòcits B es produeix sota la influència d'una sèrie de contactes adhesius amb les cèl·lules de l'estroma cel·lular i de diverses citoquines i quimioquines produïdes per aquestes últimes. Aquest és un procés totalment independent dels estímuls exògens i està presidit pel reordenament dels gens de les immunoglobulines a la membrana cel·lular per a formar el receptor de cèl·lules B (BCR, *B-cell receptor*) que permetrà el reconeixement de l'antigen. Cal recordar que les immunoglobulines (Ig) tenen una unitat bàsica constituïda per dues cadenes pesades (que poden ser de cinc tipus diferents:  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$  o  $\epsilon$ ) i dues cadenes lleugeres (que poden ser de dos tipus diferents:  $\kappa$  o  $\lambda$ ) (Veure l'apartat 1.2.2.3) .

El precursor més immadur del limfòcit B es denomina pro-B (o pre-pre-B o pre-B I). A mida que el progenitor limfoide comú progressa cap el llinatge B, s'inicia el reordenament dels gens de les Ig, que comença pel de les cadenes pesades (H, de *heavy*), mapats al cromosoma 14, amb la recombinació dels segments D-J (cèl.lula pro-B inicial) i segueix amb la recombinació del segment V amb el complex D-J recombinat (cèl.lula pro-B tardana). Aquest estadi presenta reordenament de la cadena H de la IgM, anomenada cadena  $\mu$ , que representa la primera indicació de compromís amb la línia B, però encara no s'expressen immunoglobulines de superfície. El següent precursor en la línia de maduració és el limfòcit pre-B (o pre-B II). Es passa a aquest estadi quan un segment recombinat V-D-J és productiu i dóna lloc a la síntesi de cadenes  $\mu$ , que es localitzen principalment al citoplasma, i en una petita part, a la membrana, unides a pseudocadenes lleugeres (SL), formant el que s'anomena IgM subrogada de membrana o pre-BCR. Encara no s'expressen cadenes lleugeres ni immunoglobulines de superfície. Posteriorment es reordenen els gens de les cadenes lleugeres (L, de *light*); en una primera etapa es reordenen els gens V-J del locus kappa (mapats al cromosoma 2), i si cap dels productes obtinguts és productiu, es reordenen els del locus lambda (mapats al cromosoma 22). Quan un reordenament és productiu es sintetitzen les cadenes lleugeres, que s'uneixen amb les cadenes  $\mu$  i la cèl.lula passa a expressar IgM a la membrana. Així s'arriba a l'estadi de limfòcit B immadur. En aquesta cèl.lula, el contacte IgM-Antigen (Ag) dóna lloc a una sèrie de processos que s'encarreguen d'eliminar per apoptosi (delecció clonal) o inactivació funcional (anèrgia clonal), o modificar (canviant l'especificitat de la IgM per un procés anomenat "revisió del receptor") aquells limfòcits que hagin generat una IgM amb autoreactivitat, és a dir, amb capacitat de reconèixer substàncies pròpies com si fossin estranyes. Els limfòcits B immadurs que superen aquesta purga, migren cap a la perifèria per a completar la seva maduració i esdevenir limfòcits B madurs verges.

Els limfòcits B madurs verges (també anomenats *naïf*, que no han entrat en contacte amb l'Ag per el qual són específiques les Ig que expressen) passen a expressar també IgD a membrana. Així, les IgM i IgD de

membrana d'un d'aquests limfòcits tenen les mateixes regions VH i VL, és a dir, la mateixa especificitat per l'antigen, així com les mateixes cadenes L (kappa o lambda). Els limfòcits B madurs verges (mIgM+, mIgD+) passen de la medul·la a la sang perifèrica (constitueixen la minoria de la població limfocitària circulant, entre un 5 i un 15%) i es dirigeixen als òrgans limfoides secundaris on se situen les zones immunològicament B dependents.

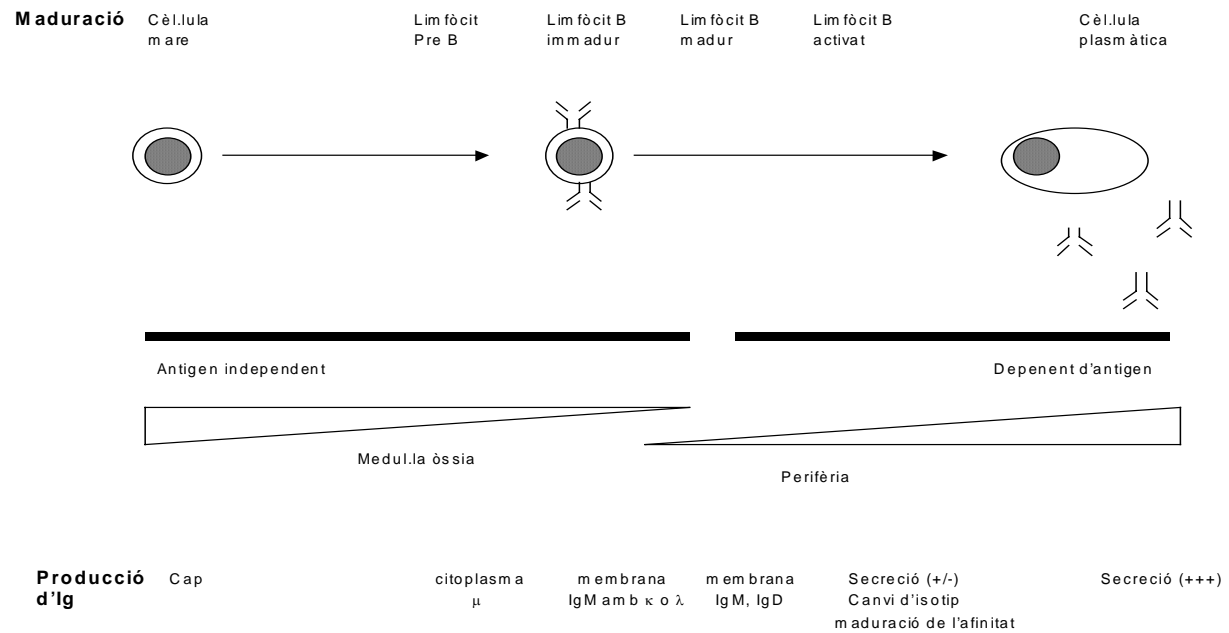
En els òrgans limfoides secundaris (fonamentalment els ganglis limfàtics), quan el limfòcit B madur verge entra en contacte amb l'antigen, amb la cooperació del limfòcit T CD4+, es produeix un procés d'activació i proliferació que origina una expansió clonal. Les cèl·lules B madures que no han rebut un estímul antigènic tenen els gens de les cadenes pesades de les Ig reordenats, però no mutats. Cada cèl·lula està compromesa a una cadena pesada i a una cadena lleugera determinades, i tota la seva progènie expressarà les mateixes cadenes. Mentre que els precursors B són cèl·lules proliferatives que produeixen limfòcits B madurs immunocompetents, les cèl·lules verges es troben en fase de repòs fins que interaccionen amb l'antigen. Les cèl·lules verges circulen per la sang perifèrica i formen part d'una petita fracció de cèl·lules B dels fol·licles primaris i de la zona del mantell (cèl·lules B recirculants). Quan el limfòcit B madur verge colonitza el fol·licle limfoide i entra en contacte amb l'antigen origina cèl·lules blàstiques que entren en el fol·licle i formen el centre germinal. Els blastes proliferen i produeixen centroblastes, que no expressen IgS. Posteriorment, els centroblastes esdevenen centròcits, que tornen a expressar IgS. Els centròcits són estimulats per antígens presentats per les cèl·lules dendrítiques fol·liculars i s'activen. Llavors abandonen els fol·licles secundaris com a limfòcits B memòria o com a precursors de les cèl·lules plasmàtiques. La majoria dels precursors de les cèl·lules plasmàtiques migren des del gangli cap a la medul·la òssia per transformar-se en **cèl·lules plasmàtiques madures**; una minoria pot madurar a cèl·lula plasmàtica en el propi fol·licle. Les cèl·lules plasmàtiques secretores d'immunoglobulines representen l'estadi final de transformació antigènica del limfòcit petit B verge, i tenen com a característica la detecció d'Ig en el seu citoplasma (Figura 1).

El limfòcit B reconeix l'antigen quan entra al centre germinal mitjançant l'anticòs que té unit a la membrana cel.lular. Durant aquest procés, el seu ADN genòmic està sotmès a hipermutacions. El procés d'hipermutació somàtica és un procés fisiològic que es produeix en el centre germinal del gangli limfàtic, quan el limfòcit entra en contacte amb l'antigen. Durant aquest procés, l'ADN genòmic del limfòcit està sotmès a una sèrie de canvis de nucleòtids, que poden determinar canvis en els aminoàcids que codifiquen, per tant, canvis en l'afinitat i especificitat de l'anticòs per l'antigen, que pot augmentar, disminuir o desaparèixer. Els limfòcits amb hipermutacions somàtiques que augmenten la seva afinitat per l'antigen són seleccionats i sobreviuen, mentre que els limfòcits als quals les hipermutacions somàtiques fan disminuir o perdre l'afinitat per l'antigen, entren en apoptosi i moren (Küppers i col, 1999).

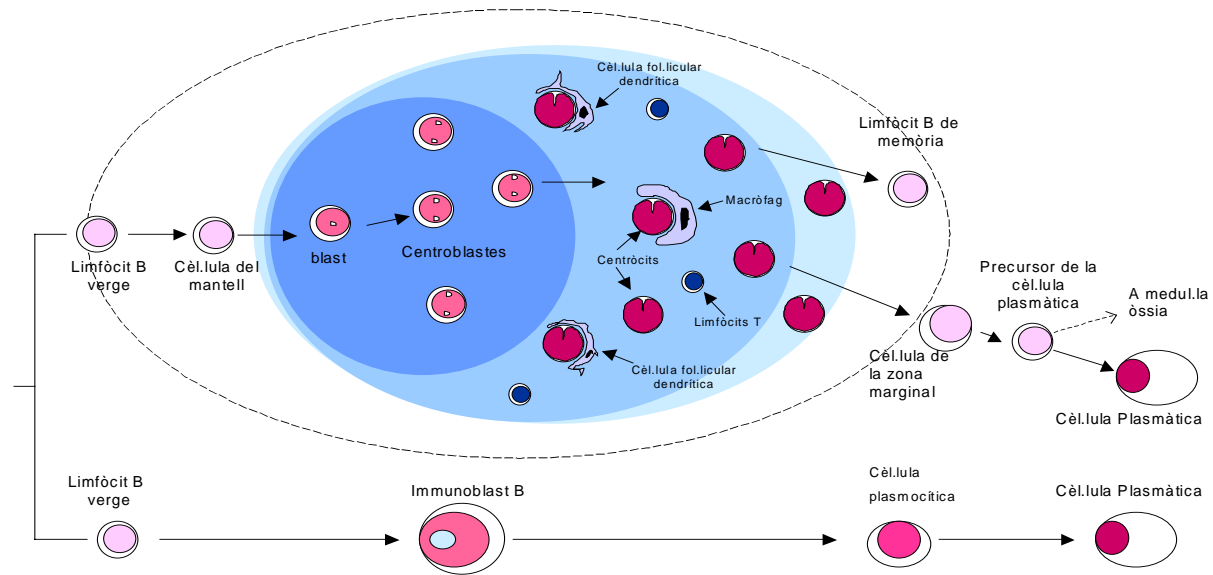
Alguns limfòcits B que surten del fol.licle tornen a l'estat quiescent del limfòcit B petit amb memòria immunològica i poden sobreviure mesos o anys. Aquestes cèl.lules presenten característiques morfològiques i immunofenotípiques indistingibles del limfòcit B madur, tot i que a la membrana ja no expressen IgD sinó IgG, o IgM i IgG, o IgA i tenen activitat ATPasa i 5'-nucleotidasa. Aquests limfòcits passen a integrar-se al reservori de limfòcits B recirculants del mantell o corona i en la resposta secundària a anticossos seran els precursors de les cèl.lules secretores d'anticossos. Alguns limfòcits B madurs que no han estat activats per antígens, es situen a les zones T del gangli i allà, després de rebre un estímul antigènic, esdevenen immunoblastes, cèl.lules que poden seguir el procés d'estimulació fins a cèl.lula plasmàtica (Figura 2) (Fanboin i Satz, 1994; Roitt i col, 1997; Gallart i col, 2000).



**Figura 1.** Maduració i diferenciació dels limfòcits B (Celada, 1994).



**Figura 2.** Esquema de la transformació dels limfòcits B en el fol.licle limfoide secundari (Woessner i Florensa, 2000).



### 1.2.2.3. Immunoglobulines

La molècula d'immunoglobulina juga un paper control en la resposta humoral, unint-se a patògens estranys i reclutant els sistemes efectors necessaris per eliminar-los. Per això aquesta molècula presenta dues característiques aparentment antagonistes -diversitat i uniformitat- ja que ha de tenir una superfície variable per a reconèixer epítops estranys i una superfície constant que pugui ser reconeguda per mecanismes efectors. Aquesta unió paradòxica entre una regió variable i una constant va permetre concebre la idea de dos gens, una cadena polipeptídica.

La immunoglobulina és un tetràmer compost de dues cadenes lleugeres idèntiques (L) i dues cadenes pesades (H) idèntiques, unides entre si i que consten de dues regions principals: la regió variable (V) i la regió constant (C). El domini variable es genera per l'associació entre les regions variables de les cadenes lleugeres i pesades i és responsable del reconeixement de l'antigen. La principal característica dels gens de les immunoglobulines és la diversitat de proteïnes que codifiquen. Un mamífer té l'habilitat de produir entre  $10^6$ - $10^8$  anticossos diferents. Si cada cadena lleugera i pesada estigués codificada per un gen individual, més de la meitat de la part codificant del genoma humà seria requerit. Aquest no és el cas. S'han desenvolupat uns mecanismes per generar un repertori molt divers a partir d'un número limitat de gens d'immunoglobulines.

#### ***Organització genòmica***

El complex que codifica la cadena pesada de les immunoglobulines està situat a 14q32, el que codifica per les cadenes lleugeres  $\kappa$  es troba a 2p12 i per  $\lambda$  a 22q11. Cada un d'aquests complexos està format per tres o quatre regions V (variable), D (diversitat), J (unió) i C (constant) (Figura 3).

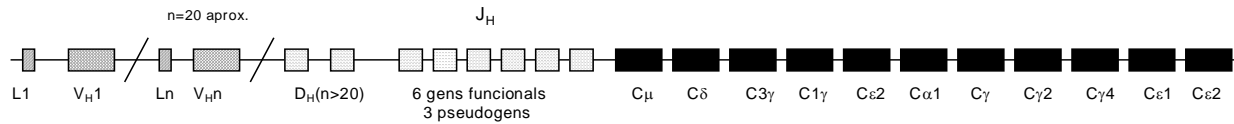
La recombinació somàtica de l'ADN de les immunoglobulines està implicada en la generació de diversitat d'anticossos. L'associació combinatòria de diferents segments gènics V, D i J permet una àmplia generació de diferents especificitats d'anticossos. El màxim número possible de combinacions és

el producte del número d'exons V, D i J a cada locus. Cada clon de limfòcits B i la seva progènie expressa una combinació única de gens V, D i J.

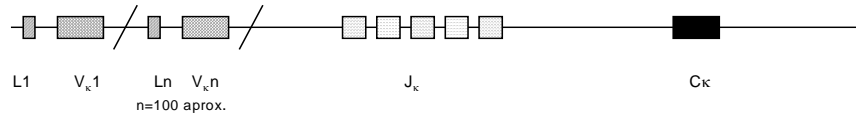
A més a més de la diversitat generada a nivell gènic, un cop hi ha hagut una estimulació antigènica, els gens de les cadenes lleugeres i pesades pateixen una sèrie d'alteracions estructurals denominades mutacions somàtiques. Aquestes mutacions afecten principalment als gens de la regió V i són responsables de la maduració de l'afinitat dels anticossos. La taxa de mutació somàtica es calcula que és  $10^4$  vegades superior a la d'altres gens. Com a conseqüència, la seqüència de nucleòtids d'anticossos derivats d'un clon de limfòcits B pot diferir entre un 1 i un 5% de la seqüència original.

**Figura 3.** Organització del gen de les immunoglobulines. Cada gen CH està compost per diversos exons. L=seqüència líder, V=variable, D=diversitat, J=unió, C=constant (Celada, 1994).

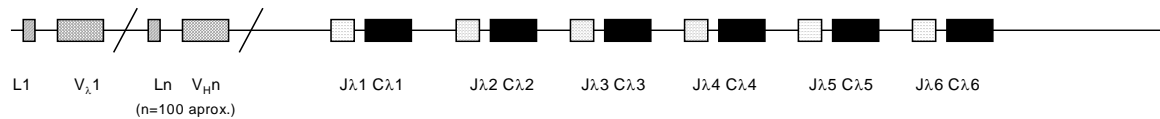
**Locus de la cadena pesada (cromosoma 14)**



**Locus de la cadena lleugera κ (cromosoma 2)**



**Locus de la cadena lleugera λ (cromosoma 22)**



### 1.3. GAMMAPATIES MONOCLONALS

Les gammapaties monoclonals representen un grup de diverses patologies caracteritzades per un augment de la proliferació, maligna o no, d'un clon de cèl.lules plasmàtiques que tenen capacitat de produir una immunoglobulina o un fragment d'aquesta, que es pot detectar en sang i/o orina en forma d'una banda o component monoclonal (M).

En aquestes patologies s'afecten les cèl.lules secretores d'immunoglobulines, el limfoplasmòcit i/o la cèl.lula plasmàtica, estadis terminals del limfòcit B.

Les cèl.lules plasmàtiques van ser descrites acuradament per Ramón y Cajal el 1890 durant un estudi de condilomes sifilítics. Ell creia que les cèl.lules plasmàtiques eren constituents normals del teixit connectiu. El 1895, Marschalkó va descriure les característiques de les cèl.lules plasmàtiques, incluint la cromatina en roda de carro, posició excèntrica del nucli, una àrea perinuclear destenyida i un citoplasma esfèric o irregular (Kyle, 2000).

Recentment, el grup "The international myeloma working group" ha publicat un treball en el qual s'han revisat els criteris pel diagnòstic i classificació de les gammapaties monoclonals amb l'objectiu de produir definicions simples i fàcilment usables en la rutina (The International Myeloma Working Group , 2003).

A la Taula 1 s'enumeren els processos patològics que cursen amb gammapaties monoclonals; el treball que es presenta s'ha centrat en les tres entitats remarcades en negreta i seran descrites en el transcurs de la Introducció.

**Taula 1.** Classificació de les gammopaties monoclonals (Woessner i Florensa, 2000).

**Gammopaties monoclonals de significat incert (GMSI)**

**Mieloma múltiple** (IgG, IgA, IgD, IgE, IgM i cadenes lleugeres)

Variants:

Mieloma quiescent

Mieloma no secretor

Mieloma osteoescleròtic

Plasmocitoma solitari ossi

Plasmocitoma (extramedul.lar) solitari extraossi

**Leucèmia de cèl.lules plasmàtiques**

Macroglobulinèmia de Waldenström

Malalties per dipòsit de cadenes pesades ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\delta$ )

Amiloidosis primària

Malalties per depòsit de cadenes lleugeres

Gammopaties biclonals

### 1.3.1. MIELOMA MÚLTIPLE

El mieloma múltiple (MM) és una proliferació neoplàsica de cèl·lules plasmàtiques que probablement ha estat present durant segles. Els primers casos que podrien haver-se considerat com a mielomes van ser descrits per Morse i col (1974) en esquelets d'indis americans datats entre els anys 200-1300 DC (Kyle, 2000).

#### 1.3.1.1. Epidemiologia i etiologia

El mieloma múltiple representa l'1% de totes les neoplàsies i una mica més del 10% de totes les hemopaties malignes. La mitjana d'edat es situa al voltant dels 65 anys. Únicament el 12 i el 2% dels pacients tenen menys de 50 anys i 40 anys, respectivament. En pacients menors de 30 anys el MM és excepcional (0.3% dels casos) (Bladé, 2001).

La patogènesi de mieloma múltiple depèn dels factors de creixement que són els responsables de la supervivència, proliferació i diferenciació de les cèl·lules mielomatoses en el moll de l'os. Algunes citoquines que actuen com a factors de creixement per les cèl·lules mielomatoses són: IL6 (interleuquina 6), LIF ("leukemia inhibitory factor"), OSM ("oncostatin M"), IL-11 (interleuquina 11), CNTF ("ciliary neurotrophic factor"), G-CSF ("granulocyte colony-stimulating factor") i IFN- $\alpha$  (interferó- $\alpha$ ) (Klein i col, 1995). La IL6 té un interès particular en aquest procés. La IL6 provoca la supervivència i/o expansió de les cèl·lules mielomatoses no només estimulant la divisió cel·lular sino també inhibint l'apoptosi (Gadó i col, 2000). Rettig i col (1997) van atribuir un paper patogènic a les cèl·lules dendrítiques de l'estroma medul·lar infectades pel virus HHV8 que produeix un homòleg viral a la IL6 humana (Said i col, 1997). Aquestes dades van fer sorgir numerosos estudis que debaten aquesta primera hipòtesi (Bouscary i col, 1998; Schönrich i col, 1998). Ablashi i col (2000) van estudiar 362 pacients afectes de GMSI i 110 MM per detectar, mitjançant assajos serològics, anticossos IgG contra HHV8 per tal de determinar si aquest virus podria jugar un paper en la transformació d'una GMSI a MM. La conclusió



va ser l'absència d'una evidència epidemiològica de la participació del virus HHV8 en la patogènesi del MM. Aquesta dada ha estat recentment confirmada per Tedeschi i col (2001) ja que no van trobar evidència significativa per una associació entre l'infecció per HHV8 i el risc de desenvolupar un MM.

Un fet acceptat actualment és que el mieloma múltiple és un procés de múltiples passos ("multistep") que en alguns casos, no tots, l'estadi inicial es manifestaria en forma d'una gammapatia monoclonal de significat incert. Hallek i col (1998) van proposar per primer cop un model de patogènesi molecular del mieloma. Sembla ser que hi hauria una progressió ordenada d'una cèl.lula plasmàtica normal; cap a una GMSI on les cèl.lules estarien immortalitzades però no transformades i per tant no s'acumularien progressivament ni causarien destrucció de l'os; cap a un mieloma intramedul.lar on les cèl.lules estarien confinades al microambient del moll de l'os, s'acumularien i causarien destrucció de l'os; cap a un mieloma extramedular on les cèl.lules proliferarien més ràpidament i creixerien en la sang (leucèmia de cèl.lules plasmàtiques) o en altres llocs extramedul.lars. Aquest procés es detallarà en el transcurs de la Introducció (veure l'apartat 1.3.4 de la Introducció).

### 1.3.1.2. Criteris diagnòstics

El diagnòstic de mieloma múltiple no acostuma a oferir dubtes degut a que el pacient presenta símptomes propis de la malaltia i anomalies de laboratori. Els criteris diagnòstics mínims es citen a la Taula 2.

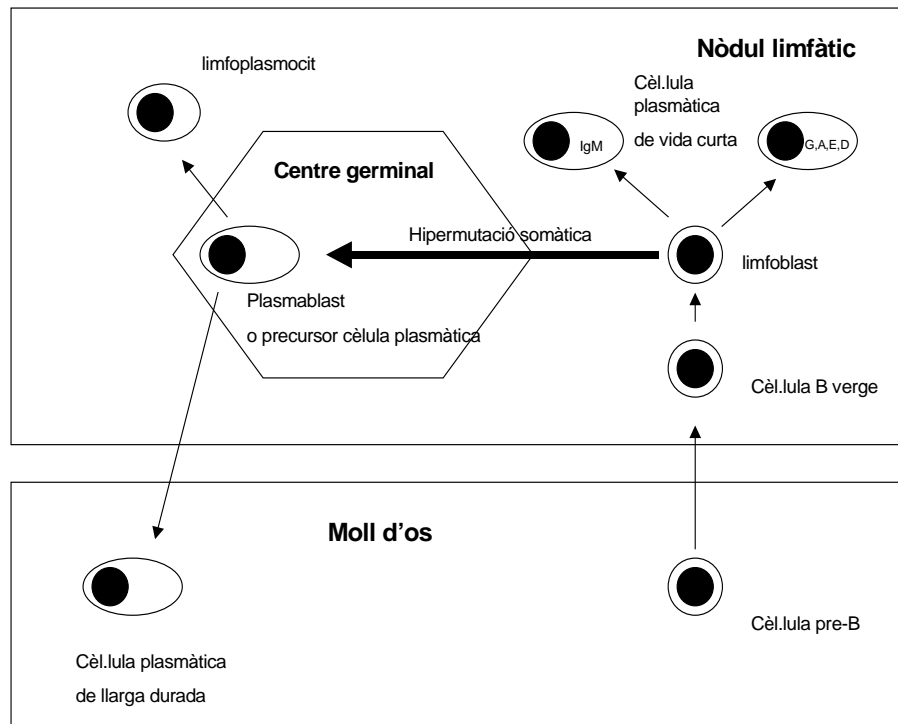
**Taula 2.** Criteris diagnòstics mínims del mieloma múltiple (Bladé, 2001).

Component monoclonal sèric $\geq 30$ g/l
Presència de cadenes lleugeres a l'orina
Plasmocitosi medul.lar $> 10\%$
Lesions osteolítiques (no atribuïbles a cap altre causa)

### 1.3.1.3. Característiques ontogèniques.

En el mieloma múltiple, la cèl.lula maligne té característiques similars a la cèl.lula plasmàtica de llarga durada (Figura 4). L'origen d'aquesta cèl.lula neoplàsica ha estat extensament debatut. Els estudis moleculars dels gens de les Ig indiquen que la "stem cell" candidata per la cèl.lula clonal del mieloma múltiple és un limfòcit B activat que molt probablement ha passat a través del centre germinal del nòdul limfàtic (Kosmas i col, 2000). Les anàlisis de la regió V del gen de la cadena pesada de les Ig revela que la cèl.lula plasmàtica maligne mostra un reordenament VDJ únic, clonal que ha patit canvi d'isotip de  $C_{\mu}$  a  $C_{\alpha}$  o  $C_{\gamma}$ . L'existència d'una cèl.lula B precursora de les cèl.lules plasmàtiques madures encara és tema de debat. Per una banda, Zandecki i col, 1997, troben que mentre que les cèl.lules plasmàtiques circulants estan clarament relacionades amb el clon de cèl.lules mielomatoses, els limfòcits B, CD20+, no presenten alteracions citogenètiques. Nickenig i col (2001) combinant les tècniques de hibridació in situ fluorescent amb la tinció citomorfològica estàndard de May-Grünwald-Giemsa (MGG-FISH) i amb immunofenotip (FICTION) van determinar que únicament les cèl.lules plasmàtiques eren aberrants en el mieloma múltiple, ni les CD34+, ni les línies cel.lulars mieloides, limfoides o eritroides estarien involucrades en el clon maligne. Per altra banda, Zojer i col, 2002, evidencien que les cèl.lules B CD19+ circulants estan altament relacionades amb les cèl.lules plasmàtiques malignes en el mieloma i en la GMSI. Recentment, estadis inicials de cèl.lules B amb VDJ clonals idèntics a les cèl.lules plasmàtiques mielomatoses han estat detectats però el seu paper en el procés de la malaltia no està clar. Brian i col, 2002 i Pilarski i col, 2003 han suggerit que existeixen cèl.lules circulants que expresen l'ideotip del mieloma múltiple. Aquestes persisteixen malgrat la quimioteràpia i per tant serien les responsables de la recaiguda.

**Figura 4.** Desenvolupament normal de la cèl.lula plasmàtica (Hallek i col, 1998).



#### 1.3.1.4. Característiques morfològiques i immunològiques

La cèl.lula plasmàtica mielomatososa pot presentar el nucli de contorn irregular amb petites protuberàncies constituïdes per mitosis anòmales. En ocasions apareixen estrangulacions que confereixen al nucli un aspecte fol·liaci, multilobulat i que són la traducció òptica de feixos de microfilaments de situació paranuclear, només visibles a nivell ultraestructural. Aquestes dades morfològiques constitueixen un dels signes més característics de malignitat cel·lular. La multinuclearitat és freqüent i el seu significat advers és discutit. Es poden observar inclusions intranuclears anomenades cossos de Dutcher. Segons el grau de maduració cel·lular la cromatina pot aparèixer més o menys laxa, a diferència de la cèl.lula plasmàtica normal en

la que apareix la cromatina condensada amb l'aspecte característic de "roda de carro". El citoplasma presenta una tonalitat que oscil·la entre el blau marí i el rosat (cèl.lules plasmàtiques flamejades, que també es poden observar en situacions reactives i de normalitat). El citoplasma pot presentar inclusions de tipus variat: inclusions blavoses, similars als bastons d'Auer, de naturalesa immunoglobulínica; cossos de Russell de naturalesa proteica (si ocupen tot el citoplasma la cèl.lula s'anomena cèl.lula de Mott). També es pot observar una degeneració vacuolar que en ocasions extremes abarca tot el citoplasma. Esporàdicament es poden observar cèl.lules amb imatges de fagocitosi. El citoplasma pot presentar un contorn desfilat. Amb freqüència es desprenen parcel·les del citoplasma pel fenomen de la clasmatosi.

No és una dismòrfia concreta sinó la suma de diverses un indicador de malignitat, encara que hi hagi una xifra reduïda de cèl.lules plasmàtiques (Woessner i Florensa, 2000). S'ha intentat correlacionar l'aspecte morfològic de la cèl.lula mielomatososa amb el tipus d'immunoglobulina monoclonal segregada, els resultats estan resumits a la Taula 3.

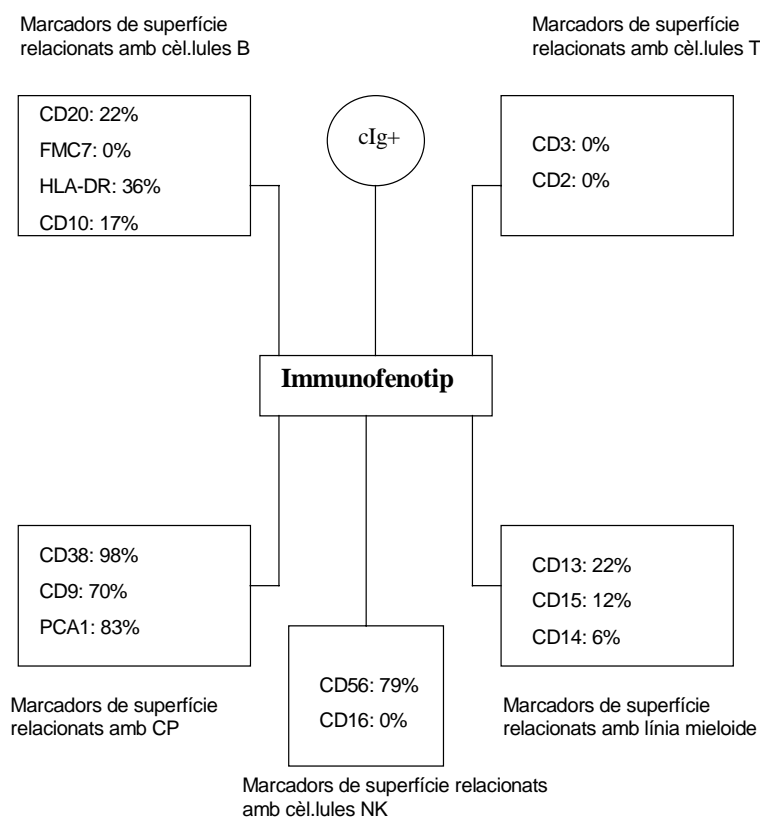
**Taula 3.** Correlació immunocitològica dels mielomes (Woessner i Florensa, 2000).

<b>Correlació immunocitològica dels mielomes</b>	
Tipus immunològic	Atributs citològics
Mieloma IgG	CP tipus Marchalkó més o menys diferenciades
Mieloma IgA	CP flamejades, tesauròcits de Paraskevas
Mieloma IgD	CP de perfil nuclear irregular Tendència a la leucemització
Mieloma IgE	CP de tamany petit Tendència a la leucemització
Mieloma Bence-Jones	Sense atributs citològics propis
Mieloma IgM	Tendència a la configuració limfoplasmocítica
Mieloma no secretor	Abundants CP amb cossos d'inclusió (Russell, Dutcher), cèl.lules de Mott
Mieloma biclonal	2 clons diferents de cèl.lules plasmàtiques

CP: cèl.lula plasmàtica

La diferenciació de les cèl.lules precursors limfoides cap a limfòcits B madurs va acompanyada per canvis característics del antígens de superfície cel.lulars. Les cèl.lules plasmàtiques i els seus precursors, els limfoplasmòcits, són fenotípicament diferents però ambdós expressen CD38. A diferència de les cèl.lules plasmàtiques madures, els limfoplasmòcits expressen CD22, CD35, receptors de superfície IgE i cadena lleugera d'immunoglobulina intracitoplasmàtica. Les subpoblacions de cèl.lula plasmàtica normal madura presenten un immunofenotip heterogeni que pot expressar antígens de cèl.lula B inicials (CD19, CD20, CD10), antígens mieloides (CD13, CD33), HLA-DR, antígens hematopoètics comuns (CD45) i molècules d'adhesió (CD11b,CD11c). A la Figura 5 es mostren les característiques immunofenotípiques de les cèl.lules plasmàtiques del mieloma múltiple.

**Figura 5.** Característiques fenotípiques de les cèl.lules plasmàtiques del mieloma múltiple (San Miguel i col, 1995).



Malgrat que molts antigens són expressats igual per la cèl.lula plasmàtica normal que per la mielomatososa, n'hi ha alguns que són únics per la cèl.lula plasmàtica del mieloma múltiple. La molècula d'adhesió CD56, està altament expressada en algunes cèl.lules mielomatoses però no en la cèl.lula plasmàtica normal. Algunes cèl.lules mielomatoses perden l'expressió de CD19 (Hallek i col, 1998).

### **1.3.1.5. Característiques citogenètiques i gèniques**

Els estudis citogenètics realitzats en pacients afectes de mieloma múltiple presenten una incidència de cariotips anormals que varia del 29 al 66%. Aquest percentatge tan baix s'ha associat a que la cèl.lula plasmàtica té una taxa de proliferació molt baixa i per tant la obtenció de metafases és dificultosa. Els cariotips estudiats en aquests pacients representen sovint altres tipus cel.lulars. Això s'ha confirmat amb la realització d'estudis de FISH en que el percentatge d'alterats pot augmentar fins al 90% (Drach i col, 1995; Flactif i col, 1995) .

S'han realitzat alguns estudis per comparar si la incidència de cariotips anormals varia en funció del tipus de cultiu cel.lular (Taula 5). Hi ha controvèrsia de resultats ja que alguns conclouen que el número de metafases alterades és superior en cultius estimulats (Facon i col, 1993; Hernández i col, 1998) i en canvi altres obtenen millors resultats en cultius llargs sense estimular (Smadja i col, 1995; Brigaudeau i col, 1997).

Els estudis citogenètics en pacients afectes de mieloma múltiple indiquen que la majoria presenten un cariotip hiperdiploide i presència d'alteracions numèriques i estructurals que es repeteixen. Les alteracions numèriques més freqüents inclouen trisomies 3, 5, 7, 9, 11, 15 i 19 i monosomia 13. Una de les alteracions estructurals més freqüent afecta la cadena pesada de les immunoglobulines situada a 14q32. Aquesta normalment es troba implicada en translocacions amb diferents parelles. Les alteracions estructurals que afecten el cromosoma 1, aparentment sense locus específic, també han

estat descrites. Altres alteracions estructurals recurrents serien delecions a 13q, delecions a 6q i alteracions a 11q (Drach i col, 2000).

A la Taula 6 es recullen els resultats citogenètics obtinguts en diferents estudis publicats a partir del 1995 de series de pacients afectes de mieloma múltiple.

**Taula 5.** Percentatge de cariotips anormals usant tipus de cultius diferents.

<b>temps de cultiu</b>	<b>Estimulants</b>	<b>% alterats</b>	<b>Cita</b>
6 dies	GM-CSF	50%	Facon i col (1993)
6 dies	GM-CSF+IL6	45%	
6 dies	GM-CSF+IL6+IL3	20%	
3 dies	Sense estimular	54.5%	Smadja i col (1995)
4-7 dies	GM-CSF+IL6	26.6%	
3 dies	Sense estimular	42%	Brigaudeau i col (1997)
3 dies	GM-CSF+IL6	35%	
3 dies	GM-CSF+IL6 +IL4+IL2+TNF $\alpha$	25%	
6 dies	Sense estimular	19%	
6 dies	GM-CSF+IL6	18.5%	
6 dies	GM-CSF+IL6 +IL4+IL2+TNF $\alpha$	6.7%	
3 dies	Sense estimular	11-42%	
5 dies	GM-CSF+IL6	18-43%	Hernández i col (1998)
5 dies	IL4	53%	

**Taula 6.** Alteracions citogenètiques detectades per citogenètica convencional en les principals series publicades de pacients afectes de mieloma múltiple.

Cita	N	Cultiu	%alt.	Alteracions numèriques	Alteracions estructurals
Lai i col (1995)	151	6 dies + GM-CSF GM-CSF+IL6 IL6+IL3 GM-CSF+IL6+IL3	47%	+3,+5,+7,+9,+11,+15,+19 -8,-13,-14,-20,-X,-Y 30% hiperdiploid 15% hipodiploid	14q32 #7 #19
Sawyer i col (1995)	200	SE	32%	+3,+5,+7,+9,+11,+15,+19, +21 -13	14q32 #1
Tricot i col (1995)	155	1 a 2 dies SE	39%	+3,+5,+9,+11 -13	11q 13q- 14q32
Weh i col (1995)	80	3 o 4 dies +IL6	35%	+3,+11,+19,+15,+5,+18 -13,-16,-X,-17	1q 11q,14q,1p 3q,6q
Calasanz i col (1997a)	280	SE estimulats	31%	46% hiperdiploid 14% hipodiploid	14q32 16q22 22q11 #1
Calasanz i col (1997b)	111	SE estimulats	39%	30% hiperdiploid 27.5% hipodiploid	14q32 16q22 22q11 i#1 17p,11q13,6q,13q-
Smadja i col (2001)	208	3 dies SE	66%	+3,+5,+7,+9,+11,+15,+19 54% hiperdiploid 46% hipodiploid	#1 14q32,22q11,2p12 8q24 i 6q 11q13 del 8p21
Nilsson col* (2003)	783	-	-	+3,+5,+7,+9,+15,+21 -13 41.4% hiperdiploids 26.5% hipodiploids	1p22,1p13,1p11, 1q10,1q21,6q21, 8q24,11q23,14q32, 17p11,19q13, 22q11

\* Estudi de 783 cariotips anormals estrets de la base de dades de Mitelman



L'ús de noves tècniques de citogenètica molecular (veure article 3- Annex 1) [hibridació in situ fluorescent (FISH: “fluorescence in situ hybridization”), hibridació genòmica comparada (CGH: “comparative genomic hybridization”)] que no necessiten obtenir cèl.lules en divisió (metafases) ha donat evidència que probablement cada pacient afecte de mieloma múltiple presenta un cariotip alterat. Els primers estudis es varen realitzar amb sondes centromèriques per les aneuploidies més freqüentment observades en els cariotips alterats de pacients afectes de mieloma. Així es va trobar una incidència d'aproximadament el 90% d'alteracions numèriques davant del 50% que s'havia determinat per citogenètica convencional (Zandecki i col, 1996) (Taula 7).

**Taula 7.** Percentatge d'alteracions numèriques detectades per tècniques d'hibridació in situ fluorescent descrites a la literatura.

00Cita	Sondes centromèriques	%alteracions
Drach i col, 1995	1,3,7,8,11,12,16,17,18 i X	89%
Flactif i col,1995	3,7,8,9,11 i 15	96%
Taberneró i col, 1996	1,3,6,7,8,9,10,11,12,13,15,17,18, X i Y	80%
Pérez-Simon i col, 1998	1,3,6,7,8,9,10,11,12,13,15,17,18, X i Y	81%

N: número de pacients

Alguns estudis han determinat la influència de les alteracions numèriques en el pronòstic. Sembla ser que el número de cromosomes és determinant en quant al pronòstic (Calasanz i col, 1997; Smadja i col, 2001; Fonseca i col, 2003). En el treball de Smadja i col (2001) la hipodiploidia es presenta com a un factor pronòstic independent en pacients afectes de mieloma múltiple.

L'ús de la hibridació in situ també ha permès definir millor alguns cariotips obtinguts per citogenètica convencional i determinar amb precisió el percentatge en que es troben algunes alteracions tan estructurals com numèriques.

#### **1.3.1.5.1.** Translocacions que afecten la cadena pesada de les immunoglobulines.

Les translocacions que afecten a 14q32 són freqüents i sovint tenen lloc en estadis inicials de la patogènesi del mieloma múltiple. Podem diferenciar entre les translocacions primàries i secundàries (Bergsagel i col, 2001, 2003). Les translocacions primàries (40% dels pacients afectes de mieloma) tenen lloc en el centre germinal i solen ser conseqüència d'errors en el procés de canvi d'isotip de les Ig o menys sovint errors d'hipermutació somàtica. Les parelles descrites per aquestes translocacions són: 11q13, 6p21, 4p16 i 16q23. A les translocacions secundàries (20% dels pacients afectes de mieloma) els punts de trencament a 14q32 no estan a prop de la regió de canvi d'isotip o de les seqüències V(D)J. Els "partners" per les alteracions secundàries són 8q24, 6p25, 20q11 i altres no recurrents. El 40% dels pacients restants no presenten alteracions a 14q32.

**t(11;14)(q13;q32).** Aquesta alteració es troba entre el 4 i el 12% dels casos estudiats per citogenètica convencional (Laï i col, 1995; Tricot i col, 1995; Smadja i col, 2001). Per FISH el percentatge de pacients amb aquesta alteració augmenta fins al 16% (Fonseca i col, 2002). Aquesta translocació implica al gen CCND1 provocant una sobreexpressió de la proteïna ciclina D1 que es pot demostrar amb una tinció immunohistoquímica. La ciclina D1 té un paper clau en la regulació del cicle cel·lular, particularment en la progressió de les cèl·lules de la fase G1 a S. Aquesta alteració s'havia associat a un curs agressiu de la malaltia (Fonseca i col, 1998, 1999). Recentment, el grup de la clínica Mayo (Fonseca i col, 2002) en un estudi amb 336 pacients afectes de mieloma múltiple, dels quals el 16% presenta una t(11;14)(q13;q32), no han confirmat aquestes dades.

L'amplificació del gen de la ciclina D1 també pot estar produïda per altres mecanismes i el percentatge augmenta fins al 30% dels pacients afectes de mieloma (Hoechtlen-Vollmar i col, 2000). La translocació t(11;14) ha estat associada a una morfologia limfoplasmocítica i CD20+ (Robillard i col, 2003).

En resum, els pacients afectes de mieloma múltiple que presenten la t(11;14)(q13;q32) representen un subgrup de pacients que es caracteritzen, majoritàriament, per la sobre-expressió de la ciclina D1, morfologia limfoplasmocítica, amb poca probabilitat de ser hiperdiploides i CD20+.

**t(6;14)(p21;q32).** Aquesta alteració es troba en aproximadament el 4% dels pacients afectes de mieloma múltiple (Sawyer i col, 1998; Sawyer i col, 2000). Com a conseqüència de la translocació es disregula l'oncogen de la ciclina D3 (Shaughnessy i col, 2001).

**t(4;14)(p16.3;q32).** Aquesta alteració es troba aproximadament en el 10 % dels casos (Fonseca i col, 2001) mitjançant tècniques d'hibridació in situ. Per citogenètica convencional és indetectable ja que és una translocació críptica. Com a conseqüència de la translocació es disregulen dos gens amb potencial oncogènic: FGFR3 ("fibroblast growth-factor receptor 3") situat al der(14) (Richelda i col, 1997) i MMSET ("multiple myeloma SET domain") al der (4) (Chesi i col, 1998). Aquesta alteració s'ha associat a la presència de IgA i del(13). A més a més, aquests pacients solen presentar nivells augmentats de  $\beta_2$ -microglobulina i una elevada activitat proliferativa. Tots aquests paràmetres estan associats a mal pronòstic i per tant explicarien la curta supervivència observada en aquests pacients.

**t(14;16)(q32;q23).** El gen implicat en aquesta translocació és el proto-oncogen c-MAF (Chesi i col, 1998). El gen c-MAF és un membre d'una família de factors de transcripció involucrats en processos cel·lulars bàsics incluint proliferació, diferenciació i resposta a IL6. Recentment, s'ha descrit que un altre gen, WWOX, també es troba al punt 16q23. Els pacients amb aquesta alteració presenten característiques molt similars als que tenen la t(4;14) amb una supervivència curta (Fonseca i col, 2003).

*Paper de les ciclines en el mieloma múltiple*

Hi ha tres gens de les ciclines tipus D (D1, D2 i D3) que codifiquen per proteïnes, cada un interacciona amb les quinases dependents de ciclina D, cdk4 o cdk6, que fosforilen el RB i així es regula un procés que promou la transició de la fase G1 a S del cicle cel·lular. Malgrat les diferències en els models d'expressió i d'algunes propietats funcionals, sembla ser que les ciclines D1, D2 i D3 són intercanviables per la fosforilació del RB. Els resultats descrits a la literatura donen llum a la importància de la disregulació de la via de les ciclines D mitjançant una translocació amb la cadena pesada de les immunoglobulines tant directament (ciclina D1-11q13; ciclina D3-6p21) com indirectament (ciclina D2-16q23, 4p16).

Bergsagel i col (2003) han estudiat l'expressió de la ciclina D en un llarg número de pacients afectes de mieloma múltiple i s'han trobat que gairebé tots expressen algun tipus de ciclina D ectòpicament, un resultat incongruent amb un tumor amb un índex de proliferació tan baix. En aquests anàlisis un 60% no presentaven cap translocació primària, però expressaven ciclina D1 en un 35%, ciclina D2 en un 20% i en un 5% no expressaven cap tipus predominant. Amb les dades generades per la literatura aquest grup proposa una classificació molecular dels mielomes basada en les translocacions primàries i el tipus de ciclina D que presenten (TC) (Taula 8).

Altres cromosomes implicats en t(14q32) són: 8q24 (c-MYC), 18q21 (BCL-2), 6p21.1 (?), 11q23 (MLL), 19q13 (BCL-3), 6p25 (MUM1/IRF4) i altres com 1p13, 1q21, 3p11, 7q11, 12q24 i 21q22.

**t(8;14)(q24;q32) o variants.** Les translocacions tipus Burkitt t(8;14)(q24;q32) i les seves variants t(2;8)(p11;q24) i t(8;22)(q24;q11) en les quals es juxtaposa el gen c-MYC ubicat al cromosoma 8 a la cadena pesada o lleugeres (Lambda i Kappa) de les immunoglobulines també s'observen en alguns pacients afectes de mieloma múltiple. Encara que els reordenaments de c-MYC han estat identificats en el 15% dels pacients (Avet-Loiseau i col, 2001a) només un 25% d'aquests són conseqüència de

la translocació. Aquests s'han associat a un pronòstic desfavorable (Yamamoto i col, 1998).

**Taula 8.** Classificació molecular del mieloma múltiple basada en les translocacions primàries i el tipus de ciclina D que presenten (TC) (Bergsagel i col, 2003).

Classe	Translocació IgH primària	Tipus de ciclina	Diploidia	Incidència	Supervivència
TC1	6p21	D3	No-hiper	3%	88%
	11q13	D1	No-hiper	15%	
TC2	CAP	D1lo	?Hiper	35%	?51%
TC3	CAP	CAP	?Hiper	3%	?49%
	CAP	D2	?Hiper	20%	
TC4	4p16	D2	?No-hiper	18%	23%
	16q23	D2	?No-hiper	6%	

Supervivència total als 80 mesos

### 1.3.1.5.2. Delecions a la banda 13q14.

Les delecions a 13q han estat detectades mitjançant tècniques de citogenètica convencional en el 15-20% dels pacients afectes de mieloma múltiple i mitjançant l'ús de FISH aquesta proporció pot augmentar fins al 50% (Drach i col, 2000). Fins ara no està clar quin gen s'inactivaria producte d'aquesta deleción. S'han realitzat diversos estudis per intentar determinar l'extensió de la pèrdua del cromosoma 13 però fins ara no s'ha trobat una regió mínima comunitment delecionada. Alguns estudis consideren que les pèrdues a 13q es correspondrien majoritàriament a monosomies (Avet-Loiseau i col, 2000; Fonseca i col, 2001) mentre que d'altres consideren que les delecions intersticials s'observarien amb igual freqüència que les monosomies (Nomdedeu i col, 2001). Veure Taula 9.

Les anomalies del cromosoma 13 s'han identificat com a un factor pronòstic advers independent ja que s'han correlacionat amb una activitat proliferativa

augmentada (Zojer i col, 2000). Els pacients amb alteracions al cromosoma 13 també s'associen amb una pitjor resposta al tractament i curta supervivència (Facon i col, 2001; Worel i col, 2001; Fonseca i col, 2002). La detecció d'alteracions al cromosoma 13 és dues o tres vegades més freqüent usant les tècniques d'hibridació in situ que per citogenètica convencional. Això fa qüestionar-se si l'ús d'una o altra tècnica dona la mateixa informació en quant al pronòstic de l'alteració. Kaufmann i col (2003) en un estudi de 118 pacients afectes de mieloma múltiple, han detectat en un 13% presenten delecions al cromosoma 13 per citogenètica convencional *versus* un 36% per FISH. Ambdós grups de pacients presentaven iguals valors en quant a la supervivència i es diferenciaven d'aquells que no tenien alteracions al cromosoma 13.

**Taula 9.** Alteracions al cromosoma 13: monosomies i/o delecions.

Cita	N	Sonda usada	% alteracions	interpretació
Avet-Loiseau i col, 2000	234	13q11-12 13q14 (Rb,D13S319, D13S25)	42% (92% dels alterats eren monosomia 13)	La majoria són monosomies
Schaughnessy i col, 2000	50	13q11, 13q12(D13S221), 13q12(BRCA 2), 13q14(RB, D13S1150, D13S272, AFMa301wB5, D13S25), 13q21 (D13S31), 13q22(D13S1619), 13q34(D13S258)	86% 70% a D13S272 64%D13S31	Heterogeneïtat en l'extensió de la delecio que podria estar lligada amb estadis de progressió de la malaltia
Fonseca i col, 2001	325	13q14 (LSI 13 (Rb), D13S319), 13q14.3 (D13S25), 13qSTP (subtelomèrica,D13S327)	54% ( 13q14) (85% dels alterats també del a D13S25 i D13S327)	La majoria són monosomies
Nomdedeu i col, 2002	14	D13S159 (13q32.2) D13S1267 (13.3tel)	78% 36%monosomies 64%delecions	La incidència de delecions és elevada.

### 1.3.1.5.3. Alteracions al cromosoma 1.

Un 40% dels pacients afectes de mieloma múltiple que presenten un cariotip alterat per citogenètica convencional, presenta una alteració al cromosoma 1. Les bandes més freqüentment implicades són les següents: 1q10 (14%), 1p11 (8%), 1q21 (7%), 1q11 (6%) i 1q22 (5%) (Nilsson i col, 2003). Aquestes alteracions solen donar-se en estadis avançats de la malaltia interpretant-se com a translocacions cromosòmiques secundàries. També és freqüent observar una translocació de tot el braç llarg sencer originant una còpia extra de 1q creant una trisomia parcial de braç llarg. Els mecanismes implicats en la inestabilitat de 1q poden estar associats amb heterocromatina pericentromèrica descondensada que pot permetre la recombinació i formació de translocacions inestables del braç llarg del cromosoma 1 (Sawyer i col, 1998).

### 1.3.1.5.4. Altres alteracions.

A nivell gènic, apart d'aquells gens desregulats producte d'una alteració citogenètica que ja s'han comentat, també ha estat descrita tant l'expressió aberrant d'oncogens (RAS) com de gens supressors de tumors (p53, p16, p15). També s'ha relacionat amb aquesta neoplàsia hematològica: reguladors clau de la mort cel·lular programada (BCL-2, fas), de l'expansió tumoral (metal·loproteinases) i de la resposta a drogues (topoisomerasa II alfa) (Kastrinakis i col, 2000).

#### *Mutacions als gens N- i K-ras*

Les mutacions a membres de la família de gens RAS estan entre les més freqüentment trobades a pacients afectes de mieloma múltiple. Liu i col (1996) en un estudi de cooperatiu van detectar una incidència del 39% (n=160) de mutacions al gen RAS. Aquests casos s'han associat a un curs clínic agressiu ja que sembla ser que incrementen la seva freqüència amb la progressió de la malaltia. Així, mentre són rarament detectats en GMSI, són més freqüents en mielomes (9-30%) i finalment es troben en la majoria de

pacients amb leucèmia de cèl.lules plasmàtiques (63-70%). S'ha suggerit que les mutacions dels oncogens RAS contribueixen al creixement independent d'IL6 i a la supressió de l'apoptosi de les cèl.lules mielomatoses (Drach J i col, 2000).

#### *Alteracions al gen supressor de tumors P53*

El gen supressor de tumors P53, localitzat al cromosoma 17p13, està implicat en el control de la proliferació, diferenciació i apoptosi cel.lular. De la inactivació d'aquest gen per mutació o per pèrdues al·lèliques en resulta el desenvolupament o progressió tumoral. Drach i col (1998) en un estudi de 75 pacients afectes de mieloma múltiple van observar una incidència del 33.8% amb delecions del gen p53. Aquestes dades posteriorment van ser qüestionades per altres grups d'investigadors, Corradini i col, 1994; Avet-Loiseau i col (1999b) i Schultheis i col (1999) que varen trobar una incidència molt més baixa de delecions (entre un 9 i 10%). Els primers van suggerir que aquestes diferències en els percentatges podien ser degudes a que les cèl.lules plasmàtiques malignes presenten menys eficiència d'hibridació i per tant podria tractar-se de falsos positius.

#### *Hipermetilació dels gens p16<sup>INK4A</sup> i p15<sup>INK4B</sup>*

Els gens p15 com p16 són inhibidors de les quinases ciclina-depenents. Aquests dos gens veïns han estat mapats a la banda 9p21. No s'han detectat mutacions o delecions d'aquests gens en pacients afectes de mieloma múltiple. Per altra banda s'ha conegut un altre mecanisme, la hipermetilació, a través de la qual es produeix el silenci transcripcional d'aquests gens (Ng i col, 1997; Tasaka i col, 1998).

#### *Alteracions a bcl-2*

La oncoproteïna bcl-2 és un inhibidor característic de la mort cel.lular programada. Alts nivells d'expressió de bcl-2 han estat detectats en



aproximadament tres quarts de pacients afectes de mieloma múltiple (Miguel-García i col, 1998).

### *Mutacions a l'antigen fas*

Les cèl.lules activades o transformades que expressen l'antigen fas a la seva superfície són susceptibles de morir per cèl.lules immunes efectores que expressen el receptor. Mutacions a l'antigen fas podrien causar la pèrdua de la seva funció i contribuir a la patogènesi i progressió del mieloma en alguns pacients ( Landowski i col, 1997).

## **1.3.2. GAMMAPATIES MONOCLONALS DE SIGNIFICAT INCERT**

### **1.3.2.1. Epidemiologia i etiologia**

Aquesta entitat és la més freqüent de totes les gammapaties monoclonals (67%). En un estudi recent (Kyle i Rajkumar, 2003) s'estima que la seva incidència en la població general és del 3% pels individus majors de 70 anys i de l'1% en individus de més de 50 anys.

En un sèrie publicada recentment per la Clínica Mayo, de 1384 casos de pacients afectes de GMSI, s'estimava que el risc de progressió a mieloma múltiple o a una patologia relacionada és del 12, 25 i 30% als 10, 20 i 25 anys respectivament. Els pacients amb IgM i IgA mostren un risc de progressió més gran que els IgG. El risc de progressió es manté fins i tot en aquells pacients que ja porten 25 anys amb una gammapatia monoclonal estable (Kyle, 2002).

Fins ara es desconeix l'agent causal de les gammapaties monoclonals de significat incert (GMSI).

### 1.3.2.2. Criteris diagnòstics

Les GMSI es caracteritzen per la presència a sèrum de component monoclonal <30g/L, l'absència o mínimes quantitats de component monoclonal a l'orina (<50 mg/dia), plasmocitosi medul.lar inferior al 10%, absència de lesions lítiques, anèmia, hipercalcèmia i insuficiència renal. Un 4% de les GMSI són biclonals. Els criteris clínics per identificar una GMSI es citen a la Taula 10.

**Taula 10.** Criteris diagnòstics de les GMSI (Besses i Sans-Sabrafen, 2001).

Component monoclonal sèric <30 g/l  
 Proteinúria de Bence-Jones negativa o mínima  
 Plasmocitosi medul.lar <10%  
 Absència d'anèmia, hipercalcèmia, insuficiència renal i osteolisi

Existeixen una sèrie de circumstàncies que poden originar gammopaties monoclonals transitòries: pacient portador d'anticossos anti-VHI (2%), algunes malalties infeccioses, portador de transplantament renal (30%), portador d'un transplantament de medul-la òssia (50%) i hipersensibilitat a fàrmacs.

### 1.3.2.3. Característiques morfològiques i immunològiques

El diagnòstic diferencial entre una gammopatia monoclonal maligne i de causa desconeguda i el mieloma múltiple pot ser difícil sobretot quan el mieloma està en fase asimptomàtica o estabilitzada durant anys. La contribució de la citologia convencional a aquesta problemàtica no és absolutament resolutive.

En les GMSI les cèl.lules plasmàtiques presenten una positivitat d'hidrolasa àcida una mica menor que l'observat en el plasmocitoma. També s'ha apuntat l'escassa incidència de limfòcits biclonals circulants en les

gammapaties benignes amb el mateix isotip que la proteïna mielomatosa, a diferència del que passa quan s'esdevé la seva transformació maligna.

L'expressió de CD56 i de la proteïna p170 s'ha utilitzat també per diferenciar MM de GMSI. (Woessner i Florensa, 2000).

En les GMSI es diferencien dues subpoblacions de cèl.lules plasmàtiques. En una, les cèl.lules plasmàtiques són policlonals, expressa constantment CD38 i és CD19+ i negativa per CD56; aquesta subpoblació expressa un fenotip idèntic a les cèl.lules plasmàtiques normals. Una altra subpoblació mostra el model oposat: les cèl.lules plasmàtiques són clonals, CD38+, CD19- i acostuma a ser CD56+; aquesta subpoblació presenta un perfil fenotípic similar a la cèl.lula mielomatosa (Ocqueteau i col, 1998).

### **1.3.3. Característiques citogenètiques i gèniques**

Les alteracions citogenètiques de les cèl.lules plasmàtiques dels pacients afectes de GMSI han estat motiu d'estudi aquests últims anys. Fins a l'actualitat, només s'han descrit alteracions citogenètiques detectades mitjançant la tècnica de citogenètica convencional en el treball publicat per Calasanz i col (1997a) amb 19 pacients afectes de GMSI. Aquest grup troba alteracions citogenètiques en el 25% dels pacients, entre les que es destaquen la implicació de 14q32, del(16)(q22) i del(22)(q11). Aquests resultats no han estat confirmats per cap altre grup.

Degut a que aquests pacients es caracteritzen per una baixa proporció de cèl.lules plasmàtiques al moll de l'os i a més a més per una capacitat proliferativa molt baixa (Greipp i col, 1983; Boccadoro i col, 1984) recentment tots els estudis han estat enfocats en detectar alteracions citogenètiques mitjançant tècniques que no requereixin la divisió cel.lular (veure l'article 3 de l'annex I).

L'any 1995 es van realitzar els primers estudis de citogenètica interfàsica aplicada a pacients amb GMSI i el resultat va ser l'evidència de que les cèl.lules plasmàtiques d'algunes GMSI presentaven alteracions cromosòmiques numèriques clonals pels mateixos cromosomes implicats en aneuploidies en MM.

Drach i col (1995) van aïllar les cèl.lules plasmàtiques de 36 pacients amb GMSI i les van hibridar amb les sondes centromèriques dels cromosomes 3, 7, 11 i 18 obtenint un percentatge d'aneuploidies del 52%; Zandecki i col (1995) en van estudiar 28 amb les sondes centromèriques dels cromosomes 3, 7, 9 i 11 i van obtenir el 61% dels pacients amb alteracions numèriques. En ambdós casos s'havien escollit les sondes pels cromosomes més freqüentment implicats en alteracions numèriques en pacients afectes de mieloma múltiple.

Un cop es va determinar que es podien trobar alteracions citogenètiques mitjançant les tècniques de FISH s'han anat realitzant estudis posteriors amb la intenció de buscar punts en comú entre les GMSI i els MM.

Ackerman i col (1998) van descriure l'absència de delecions monoal·lèliques del gen de la P53 en GMSI mentre que en pacients amb MM i LCP si s'han descrit mutacions i delecions d'aquest gen (Corradini i col, 1994; Drach i col, 1998; Avet-Loiseau i col, 1999b i Schultheis i col, 1999).

Les alteracions estructurals que afecten a la banda 14q32 s'han pogut detectar en un 46% dels pacients afectes de GMSI (Avet-Loiseau i col, 1999a; Fonseca i col, 2002). Les parelles descrites per aquestes alteracions han estat: 11q13 en el 15-25% , 4p16 en el 2-9% i 16q23 en el 5%.

Alteracions al cromosoma 13 poden ser trobades entre el 21-45% de les cèl.lules plasmàtiques de pacients amb GMSI.

A la Taula 11 es pot veure un resum dels estudis realitzats mitjançant hibridació *in situ* a pacients afectes de GMSI.

**Taula 11.** Principals sèries publicades de pacients estudiats per FISH aillant la cèl.lula plasmàtica en pacients amb GMSI.

Autors i any	N	Sonda	% Alterats
Drach i col,1995	36	Centromèriques #3, #7, #11, #18	52% aneuploidies
Zandecki i col, 1995	28	Centromèriques #3, #7, #9, #11	61% aneuploidies
Ackermann i col, 1999	15	Seqüència única 17p13	0% delecionats
Avet-Loiseau i col, 1999	19	Seqüència única 13q14	21% del (13)(q14)
Avet-Loiseau i col, 1999	100	Seqüència única 14q32 i	46% t(IgH) 15% t(11;14)(q13;q32) 2% t(4;14)((p16.3;q32) 21% del (13)(q14)
Konigsberg i col, 2000	29	Seqüència única 13q14	45% del (13)
Fonseca i col, 2001	52	Translocacions IgH i #4	9.6% t(4;14)(p16.3;q32)
Fonseca i col, 2002	62	Translocacions IgH, IgL, IgK i #4, 11, i16 $\Delta$ 13	46% t(IgH) 11% t(IgL/ K) 25% t(11;14)(q13;q32) 5% t(14;16)(q32;q23) 21% del (13)(q14)
Rasillo i col, 2003	30	Centromèriques #6,#9,#13,#17	57% aneuploidies

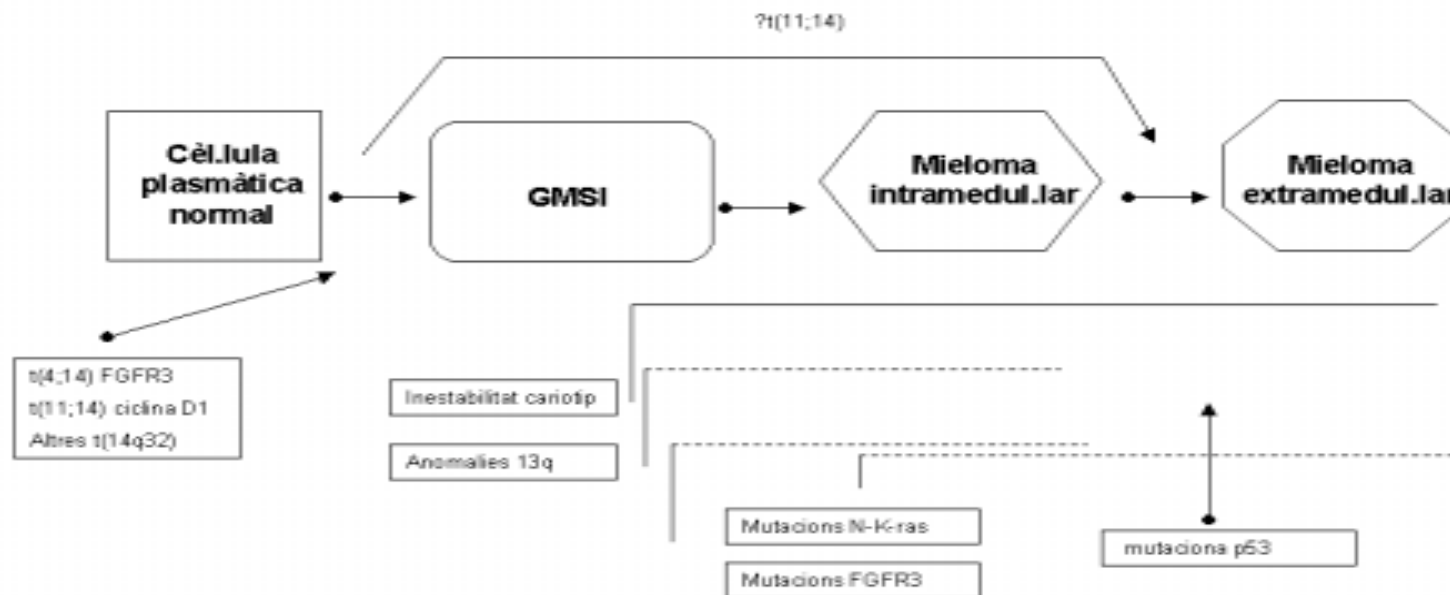
N: número de pacients

#### 1.3.4. ONCOGENÈSI DEL MIELOMA MÚLTIPLE

Els avenços en la determinació d'alteracions citogenètiques, gràcies a les tècniques de FISH aplicades directament sobre la cèl.lula plasmàtica, han evidenciat en la última dècada que realment el mieloma múltiple és un procés "multistep" tal com es sospitava.

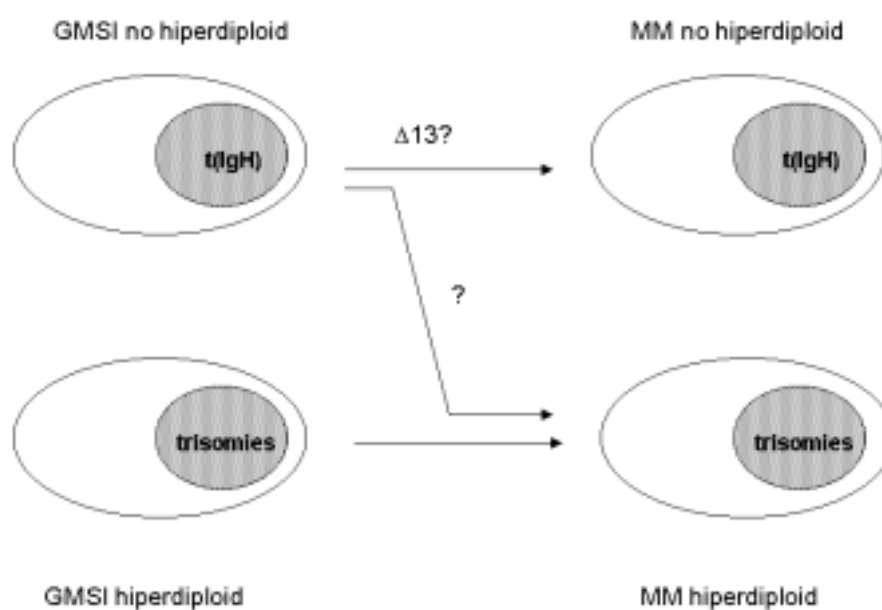
L'any 1998, Hallek i col van apuntar aquesta hipòtesi i van proposar un model de progressió de GMSI fins al mieloma extramedul.lar. Segons aquest model, les alteracions a 14q32 podrien ser un esdeveniment inicial, la monosomia 13 es desconeix en aquest any si està present en GMSI. La disregulació de c-MYC sembla ser un tret comú però no està clar en el moment que passa. Alteracions al gen FGFR3 condueixen a la independència de lligand i progressió clínica. Mutacions a l'oncogen RAS estan associades a la progressió clínica i les mutacions de P53 s'associen a mieloma extra medul.lar. Veure la figura 6.

**Figura 6.** Successos genètics progressius en el mieloma múltiple (Hallek i col, 1998).



En la última dècada s'han realitzat diversos estudis aplicant tècniques de citogenètica convencional en pacients afectes tant de GMSI com de mieloma múltiple per tal de determinar millor el procés "multistep". Recentment, han estat proposats dos models. Per una banda, el grup de la Clínica Mayo proposa dues vies patogèniques per la generació de neoplàsies de la cèl.lula plasmàtica: en una, el succés inicial serien les translocacions que afecten a la cadena pesada de les immunoglobulines (associades a un cariotip no-hiperdiploide), la segona, amb una lesió gènica no definida, afavoriria l'acumulació de còpies extres de cromosomes i estaria relacionada amb translocacions secundàries de IgH (Figura 7).

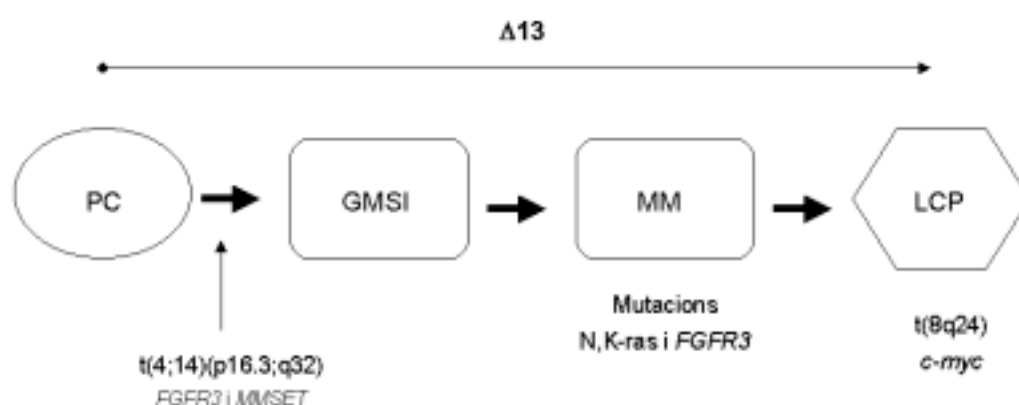
**Figura 7.** Hipòtesis de dues vies patogèniques diferents per l'origen clonal del mieloma múltiple (Fonseca i col, 2003).





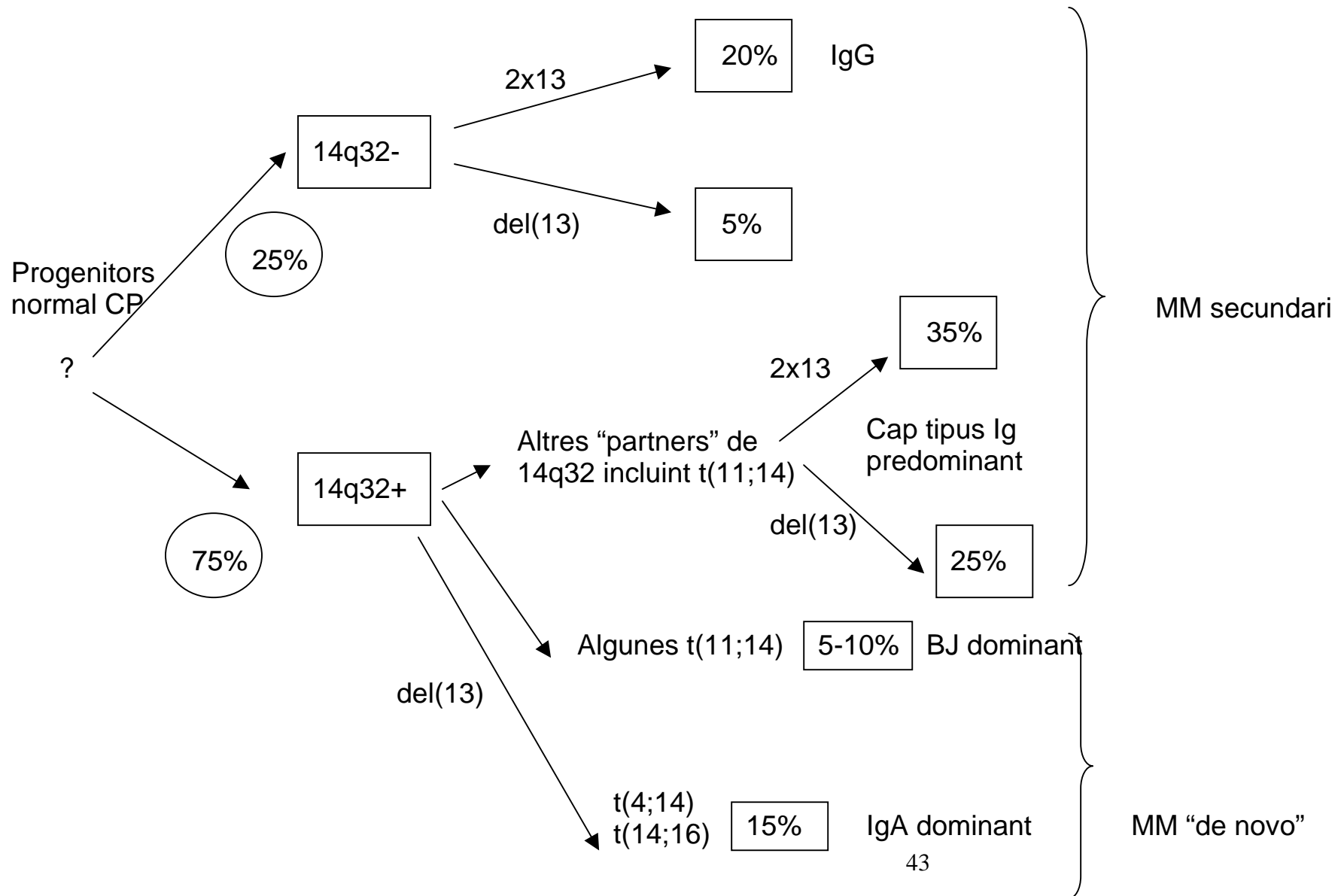
Per altra banda, aquest mateix grup proposa un model de progressió de GMSI a MM amb la translocació  $t(4;14)(p16.3;q32)$  (Figura 8). Degut a la estreta associació que troben entre la presència d'alteracions del cromosoma 13 i la presència de  $t(4;14)$ , però no de la situació oposada, suggereixen que les alteracions del cromosoma 13 ocorren abans que la translocació. Aquests postulen que el mieloma múltiple amb la  $t(4;14)(p16.3;q32)$  representa un subtipus de mieloma múltiple únic.

**Figura 8.** Model de progressió de GMSI i MM amb la translocació  $t(4;14)(p16.3;q32)$  (Fonseca i col, 2001).



El grup francès proposa un model “multistep” en el qual les translocacions a 14q32 representen un succés inicial en un subgrup de mieloma múltiple. En aquest model les alteracions del cromosoma 13 representarien canvis secundaris encara que inicials possiblement conduït per translocacions 14q32 específiques com t(4;14) o t(14;16). El subgrup de pacients que no presenten reordenaments a la banda 14q32 es caracteritzen perquè solen ser IgG però amb una baixa incidència d’alteracions en el cromosoma 13; aquests solen tenir més estabilitat genòmica i probablement una presentació indolent (Figura 9).

**Figura 9.** Model per l'oncogènesis del mieloma (Avet-Loiseau i col, 2002)



### **1.3.5. LEUCÈMIA DE CÈL.LULES PLASMÀTIQUES**

#### **1.3.5.1. Epidemiologia i etiologia**

La leucèmia de cèl.lules plasmàtiques es presenta de novo en el 60% dels casos (leucèmia de cèl.lules plasmàtiques primària) o bé, constitueix la manifestació leucèmica d'un mieloma múltiple (40% dels casos) en la seva fase terminal (leucèmia de cèl.lules plasmàtiques secundària).

La seva incidència és de menys del 5% dels casos de malalties de la cèl.lula plasmàtica.

No es coneix la causa perquè només una petita part de pacients amb mieloma presenta una LCP (Bladé, 2001).

#### **1.3.5.2. Criteris diagnòstics**

La leucèmia de cèl.lules plasmàtiques ve definida per un xifra de cèl.lules plasmàtiques circulants superior o igual a  $2 \times 10^9$  /L o per l'observació de plasmòcits atípics a la sang perifèrica en proporció igual o superior al 20% de la totalitat leucocitària.

#### **1.3.5.3. Característiques morfològiques i immunològiques**

Les cèl.lules plasmàtiques que es leucemitzen solen ser força ovalades i el seu tamany és significativament menor que les del mieloma, fet que facilita el pas hemoperifèric. En ocasions, les cèl.lules plasmàtiques ofereixen aspectes morfològics aberrants, com incisuració nuclear, multilobularitat o nuclis de configuració monocitoide. Poden adquirir característiques de tanta immaduresa que s'hagi de recórrer a l'estudi ultraestructural per la seva identificació.

Fenotípicament, les cèl.lules plasmàtiques són iguals que les del mieloma i solen expressar antígens B associats a etapes ontogèniques precoces (CD10 i CD20) (Woessner i Florensa, 2000).

#### 1.3.5.4. Característiques citogenètiques i gèniques

La leucèmia de cèl.lules plasmàtiques és una patologia que es presenta amb poca freqüència. Degut a això hi ha poques sèries importants a la literatura. Les alteracions citogenètiques que s'han descrit solen ser les mateixes observades en el mieloma múltiple en estadis avançats (Smadja i col, 1991; Jonveaux i Berger, 1992; Azar i col, 1997; Nordgren i col, 2000). Recentment, Avet-Loiseau i col (2001) han recollit la sèrie més gran descrita a la literatura de pacients afectes de LCP (número de pacients=40). Aquests van detectar una incidència de cariotips anormals en el 68% dels pacients. Un 80% dels pacients presentaven alteracions 14q32. Les parelles recurrents eren: 11q13, 4p16 i 16q23. En aquesta sèrie els pacients amb una translocació t(11;14) (q13;q32) s'associen a una supervivència més llarga.

Els pacients amb leucèmia de cèl.lules plasmàtiques presenten un perfil amb hipodiploidia, pseudodiploidia i monosomia 13 que pot explicar la curta supervivència d'aquests pacients.

## 1.4. OBJECTIUS

Els objectius d'aquest treball són els següents:

1. Determinar mitjançant el mètode MAC (Morfologia, Anticòs, Cromosoma) si les tècniques de citogenètica convencional són útils per a estudiar pacients afectes de GMSI.
2. Estudiar mitjançant sondes centromèriques la presència d'alteracions numèriques en pacients afectes d'una GMSI amb cariotip normal.
3. Avaluar l'aplicació de les tècniques d'hibridació in situ fluorescent sobre el total de cèl.lules de la mostra de moll d'os en pacients amb GMSI per facilitar la seva incorporació en les proves de rutina (evitar aïllar la cèl.lula plasmàtica per trobar alteracions).
4. Analitzar les alteracions citogenètiques detectades en els pacients afectes de mieloma múltiple i comparar els resultats amb els descrits a la literatura a la recerca de noves alteracions.
5. Avaluar la presència de monosomia 18 en pacients afectes de mieloma múltiple pel seu probable efecte pronòstic advers.
6. Analitzar les alteracions citogenètiques detectades en els pacients afectes de leucèmia de cèl.lules plasmàtiques i comparar els resultats amb els descrits a la literatura a la recerca de noves alteracions.

## **2. MATERIAL I MÈTODES**

## 2.1. PACIENTS

Aquest treball consisteix en l'estudi citogenètic de mostres de moll d'os en 114 malalts afectes de discràsies plasmocel·lulars classificats de la següent manera:

- 50 malalts afectes de gammapatia monoclonal de significat incert
- 57 malalts afectes de mieloma múltiple
- 7 malalts afectes de leucèmia de cèl·lules plasmàtiques

Les mostres provenen de l'Hospital Central l'Aliança, l'Hospital de l'Esperança, l'Hospital del Mar, l'Hospital San Camil i l'Hospital Germans Trias i Pujol (Can Ruti) de Barcelona.

## 2.2. MÈTODES

Per realitzar la tècnica de citogenètica convencional, el mètode MAC, la tècnica d'hibridació in situ fluorescent i May-Grünwald Giemsa-hibridació in situ fluorescent s'ha treballat sempre amb mostres de medul·la òssia. La repartició de la mostra per a la realització de les diferents tècniques es mostra a la Figura 1.

### 2.2.1. EXTRACCIÓ I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES DE MEDUL·LA OSSIA

#### A. Extracció

Les mostres de medul·la òssia s'obtenen per punció aspirativa, habitualment a nivell esternal o bé de l'espina ilíaca posterosuperior. La primera fracció de medul·la òssia que s'aspira és la més rica en cèl·lules, però a mesura que l'extracció continua, la mostra es contamina amb sang medul·lar. Per aquesta raó, és aconsellable utilitzar la primera fracció per al cultiu cel·lular.

La mostra de medul·la òssia es recull en un tub amb 5 mL de medi RPMI-1640 i heparina sòdica o de liti a l'1%.



## **B. Conservació**

La mostra de medul·la òssia s'ha de posar a cultivar tan aviat com sigui possible després de la seva extracció per obtenir el màxim de cèl·lules en divisió. En cas que la mostra s'hagi de transportar o guardar unes hores abans de cultivar, és recomanable fer-ho a temperatura ambient o bé a 37°C.

### **2.2.2. TÈCNICA DE CITOGENÈTICA CONVENCIONAL**

#### **A. Cultiu**

-Descongelar un flascó amb medi complet (RPMI 1640, Sèrum boví fetal, L-Glutamina, Penicilina-Estreptomycina, Heparina), a temperatura ambient o al bany maria a 37°C.

-Centrifugar la mostra de medul·la òssia durant 8 minuts a 1500 rpm. Un cop centrifugada, es procedeix a extreure la capa blanca (rica en cèl·lules mononucleades) amb una pipeta Pasteur estèril.

-Dipositar el material cel·lular dins el flascó de medi i homogeneitzar manualment.

-Obrir una mica el tap del flascó i col·locar-lo a l'estufa de cultiu a 37°C i 5% CO<sub>2</sub> durant 24-48 hores.

-Agitar el cultiu per inversió una vegada cada dia.

#### **B. Processat de la mostra**

-Dues hores abans d'iniciar el processat de la mostra, cal afegir 100 µl de Colcemid (antimitòtic) al flascó i deixar-lo actuar dins de l'estufa, a 37°C.

-Abocar el contingut del flascó a un tub de plàstic estèril per procedir amb el procés d'extracció del cultiu.

-En cas que s'hagi d'aplicar el mètode MAC, es separa 1 mL de la mostra en cultiu i es processa segons l'apartat 2.2.3.

-Centrifugar la mostra durant 7-8 min. a 1500 rpm.

-Descartar el sobrenedant (vigilant perquè el sediment cel·lular pot quedar poc enganxat i es pot perdre), i resuspendre el sediment cel·lular.

- Afegir solució hipotònica de KCl (0.075 M) preescalfada a 37°C al tub amb el sediment cel.lular. Aquesta solució s'afegeix gota a gota i agitant fins els 2 primers mil.lilitres i després a raig fins a 8-10 mL.
- Col.locar el tub al bany maria a 37°C durant 30 minuts.
- Centrifugar 7-8 min. a 1500 rpm.
- Descartar el sobrenedant i resuspendre el sediment cel.lular. Afegir fixador Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic), primer gota a gota i agitant fins a 1-2 mL i després a raig fins a 8-10 mL.
- Centrifugar 7-8 min. a 1500 rpm.
- Repetir el procés de fixació de 3 a 5 vegades fins que el sobrenedant sigui transparent i el sediment cel.lular blanc.
- Fer extensions, 4-6 de cada tub. Assecar les extensions a la placa calefactora a 50°C, i envellir-les a la placa calefactora a 100°C durant 1 hora.

### **C. Tècniques de bandes**

Les preparacions obtingudes s'analitzen seguint la tècnica de bandes G amb tampó de Sörensen i colorant de Wright. En aquest cas, es tenyeixen les preparacions amb una solució composta per 3 parts de tampó de Sörensen i 1 part de colorant de Wright durant 2-6 minuts (dependrà de si el colorant és acabat de fer o si és vell), s'esbandeixen amb aigua de l'aixeta i s'assequen amb un paper de filtre.

### **D. Anàlisi microscòpica i nomenclatura de citogenètica convencional**

S'han estudiat un mínim de 20 metafases per cada cas al microscopi òptic, amb l'objectiu de x100 d'immersió. Cal cariotipar un mínim de 5 metafases i comptar les restants. Per al cariotipatge s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital Cytovision (Applied Imaging).

Les anomalies cromosòmiques s'han descrit seguint la nomenclatura ISCN 1995. Es considera que una alteració cromosòmica és clonal quan la mateixa alteració estructural o guany d'un cromosoma es troba com a mínim en dues metafases o, en cas de ser una pèrdua d'un cromosoma, es troba com a mínim en tres metafases.

### **2.2.3. MÈTODE MAC (MORFOLOGIA, ANTICÒS, CROMOSOMA)**

#### **A. Tipus de mostra**

Un cop s'ha processat el cultiu de medul·la òssia per fer l'estudi citogenètic i s'ha posat l'antimitòtic colcemid, es separa 1 mL de la mostra amb la qual es realitzarà el mètode MAC.

#### **B. Processat de la mostra**

- Resuspendre 1mL de la mostra cultivada de medul·la òssia en 2.8 mL d'hipotònic MAC.
- Incubar durant 5 min. a 37°C al bany maria agitant suaument.
- Distribuir la suspensió en les càmeres citocentrífugues (0.2 mL en cada càmera).
- Centrifugar a 500g durant 10 min. per tal d'obtenir cèl·lules en mitosis amb la membrana cel·lular i el citoplasma preservats.
- Deixar assecar les preparacions a temperatura ambient durant tota la nit.
- Les preparacions poden emmagatzemar-se, tapades amb paper d'alumini, a -20°C fins al moment en que s'efectuïn les tècniques d'identificació cel·lular.

#### **C. Anàlisis immunoenzimàtics-identificació cel·lular**

##### **C.1. Protocol**

- Fixar les preparacions amb metanol-acetona durant 5 min.
- Rentar amb el tampó TBS.
- Aplicar l'anticòs monoclonal sobre les preparacions humides .
- Incubar durant 30 min. en una cambra humida.
- Rentar les preparacions amb TBS i assecar l'excés de líquid.
- Aplicar la immunoglobulina de conill anti-ratolí diluïda 1/20 en TBS que contingui sèrum humà a igual dilució.
- Incubar durant 30 min. en una cambra humida.
- Rentar les preparacions amb TBS i assecar l'excés de líquid.

- Aplicar el complex FAAFA (fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina) dil·luït a l'1/50 en TBS.
- Incubar durant 45 min. en una cambra humida.
- Rentar les preparacions amb TBS.
- Incubar les preparacions durant 30 min. a temperatura ambient amb la solució A filtrada.
- Rentar amb aigua de l'aixeta.
- Contrastar amb hematoxilina de Mayer durant 15 min.
- Rentar amb aigua de l'aixeta.
- Montar amb Glicergel.

#### **D. Identificació del llinatge cel·lular de les cèl·lules en divisió.**

S'han estudiat un mínim de 10 metafases per cada cas al microscopi òptic, amb l'objectiu de x100 d'immersió. Les cèl·lules positives es reconeixen per presentar un precipitat de color vermell brillant.

#### **2.2.4. TÈCNICA D'HIBRIDACIÓ IN SITU FLUORESCENT (o FISH, *FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION*)**

##### **A. Tipus de mostres**

Les mostres per a la realització la tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH, *fluorescence in situ hybridization*) procedien de les mostres de moll d'os processades segons la tècnica de citogenètica convencional. Aquestes mostres havien estat emmagatzemades amb el fixador Carnoy (3 parts de metanol i 1 part d'àcid acètic) a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $-80^{\circ}\text{C}$ . El període d'emmagatzematge de les mostres abans de realitzar la tècnica de FISH va ser variable, des de pocs dies fins a 6 anys.

## B. Protocol

El protocol que s'utilitza en aquest tipus de sondes consisteix en seguir bàsicament les instruccions que dóna la casa comercial (Vysis, en el nostre cas).

-Fer una extensió de la mostra amb fixador i marcar amb un llapis de punta de diamant la zona on posarem la sonda.

-Preparar la sonda: barrejar 5.6 µL de tampó d'hibridació (formamida al 65%, dextran sulfat al 10% i 20xSSC) amb 0.8 µL de la sonda i 1.6 µL d'aigua destil·lada estèril.

-Centrifugar la barreja de la sonda de 1 a 3 segons (fer un pols).

-Escalfar la barreja de la sonda a 74°C durant 5 min. al bany maria per a la desnaturalització i tornar a fer un pols.

-Col·locar el tub dins la cambra humida que tindrem sobre la placa calefactora a una temperatura de 45-50°C.

-Desnaturalitzar la mostra en una solució de formamida al 70% durant 5 min. a 74°C al bany maria.

-Deshidratar la mostra en una sèrie d'etanols: al 70%, 85% i 100% durant 1 min. a temperatura ambient per aturar el procés de desnaturalització i evitar la renaturalització de l'ADN.

-Deixar la mostra dreta perquè regalimi tot el líquid i col·locar-la a la placa com a màxim dos min. abans de posar-hi la sonda.

-Col·locar 8µL de la barreja de la sonda sobre la part del porta marcada, tancar amb un cobraobjectes net de 20x20 i segellar amb cola. Incubar tota la nit en una cambra humida de 37°C per aconseguir la reacció d'hibridació.

-Fer els rentats de post-hibridació.

-Treure la cola i col·locar el porta dins un bany de formamida al 50% a 45°C i durant 10 min. i repetir el procés dos cops més.

-Fer un rentat en una solució de 2xSSC a 45° durant 10 min.

-Fer un rentat en una solució de 2xSSC-Tween-20 a l'1% a 45° durant 5 min.

-Deixar la mostra dreta perquè regalimi tot el líquid i posar 10µL de DAPI II (DAPI + *Antifade*) dins la zona marcada del portaobjectes i col·locar un

cobreobjectes a sobre. El DAPI és un fluorocrom que s'uneix de forma inespecífica a tot l'ADN.

-Mantenir les preparacions a  $-20^{\circ}\text{C}$  en una caixa fosca fins al moment de l'anàlisi al microscopi de fluorescència. És aconsellable deixar un mínim de mitja hora abans de procedir a la lectura.

Les sondes utilitzades han estat les següents:

*-Sondes centromèriques:*

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 3 (CEP 3): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11.1 del cromosoma 3. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange* o *Spectrum Green*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 7 (CEP 7): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 7. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange* o *Spectrum Green*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 11 (CEP 11): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 11. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green* o *Spectrum Orange*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 12 (CEP 12): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 12. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 18 (CEP 18): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 18. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green* o *Spectrum Orange*.

*-Sondes específiques de locus:*

. Sonda específica de locus de la regió 13q14 (LSI 13, Rb locus, band 13q14): aquesta sonda abarca la regió 13q14 on es localitza el gen de retinoblastoma (RB1 o Rb). S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

.Sonda específica de locus de la regió 17p13.1 (LSI p53): Aquesta zona abarca una regió de 130 Kb a 17p13.1 on es localitza el gen TP53. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

.Sonda específica de locus de la regió 11q13 (LSI cyclin D1): Aquesta zona abarca la regió 11q13 on es localitza el gen de la ciclina D1. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Orange*.

### **C. Observació al microscopi de fluorescència i obtenció d'imatges de FISH**

Les preparacions s'han examinat en un microscopi òptic amb dispositiu d'epifluorescència NIKON Eclipse 600. S'han utilitzat els objectius de x10 i x100. Per obtenir imatges de FISH s'ha utilitzat el sistema d'anàlisi d'imatges digital Cytovision (Applied Imaging).

### **D. Criteris de valoració de la FISH i establiment dels nivells de tall per a cada tipus de sonda**

Els criteris utilitzats en la valoració de la FISH han estat els següents:

Nombre de cèl.lules analitzades:

- Sondes centromèriques: s'han analitzat un mínim de 500 nuclis per cas.
- Sondes específiques de locus: s'han analitzat un mínim de 200 nuclis per cas.

L'establiment dels nivells de tall per a la determinació de certesa d'existència d'alteracions cromosòmiques:

- Sondes centromèriques i específiques de locus: per cada tipus de sonda s'ha aplicat la tècnica de FISH en una sèrie de 10 individus control sans (mostres de medulla òssia).

En les *sondes centromèriques* s'han valorat un total de 500 nuclis per cas, fent un recompte del nombre de nuclis amb cap, un, dos, tres i quatre o més senyals. Els nivells de tall per establir la diferència entre els resultats veritablement positius i els falsos positius per a monosomies, trisomies i tetrasomies s'obtenen de calcular la mitjana  $\pm 2$  vegades la desviació estàndard ( $M \pm 2SD$ ). Aquests nivells de tall per a sondes centromèriques en el nostre laboratori s'han establert a 5% per a trisomies i 10% per a monosomies.

En les *sondes específiques de locus* s'han valorat un total de 200 nuclis per cas, fent un recompte del nombre de nuclis amb cap, un, dos, tres i quatre o més senyals. Els nivells de tall per establir la diferència entre els resultats veritablement positius i els falsos positius per a delecions, trisomies i tetrasomies parcials per la regió estudiada s'obtenen també de calcular la mitjana  $\pm 2$  vegades la desviació estàndard ( $M \pm 2SD$ ). Aquests nivells de tall per a sondes de locus específic en el nostre laboratori s'han establert a 5% per a detecció de guanys i 15% per a detecció de pèrdues o delecions.

### **2.2.5. TÈCNICA MGG-FISH (May-Grünwald Giemsa-Hibridació in situ fluorescent)**

#### **A. Tipus de mostra**

Les mostres per a la realització la tècnica de MGG-FISH procedien de les extensions realitzades a partir de les mostres de moll d'os obtingudes segons l'apartat 2.2.1.A. Aquestes mostres tenyides amb May-Grünwald Giemsa podien estar emmagatzemades embolicades amb paper d'alumini a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ . El període d'emmagatzematge de les mostres abans de realitzar la tècnica va ser variable, des de pocs dies fins a màxim 6 mesos.



## **B. Protocol**

### **B.1. Tinció i emmagatzematge**

- Fixar la mostra al tenyir amb May-Grünwald, prèviament filtrada, durant 30 seg.
- Afegir per ambdós costats de l'extensió una mica d'aigua de l'aixeta i deixar actuar durant 3 min.
- Rentar amb aigua de l'aixeta.
- Tenyir amb Giemsa, prèviament filtrat i dil.luït en la proporció de dues o tres gotes de colorant per cada mililitre d'aigua destil.lada, durant 15-20 min.
- Rentar amb aigua de l'aixeta i deixar assecar
- Embolicar cada extensió tenyida per separat amb paper d'alumini.
- Emmagatzemar a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **B.2. Estudi morfològic i fotografia.**

- Descongelar l'extensió, en cas que estigüés emmagatzemada, lentament. Deixar 30 min. a la nevera i després 30 min. a temperatura ambient abans de treure el paper d'alumini.
- Col.locar un cobreobjectes i observar al microscopi òptic amb oli d'immersió.
- Fotografiar les cèl.lules i anotar les coordenades on estan situades per tal de localitzar les mateixes cèl.lules un cop s'ha aplicat la tècnica de FISH.

### **B.3. Tècnica de FISH**

- Preparar la sonda: barrejar 7  $\mu\text{L}$  de tampó d'hibridació (formamida al 65%, dextran sulfat al 10% i 20xSSC) amb 1  $\mu\text{L}$  de la sonda i 2  $\mu\text{L}$  d'aigua destil.lada estéril.
- Centrifugar la barreja de la sonda de 1 a 3 segons (fer un pols).
- Escalfar la barreja de la sonda a  $74^{\circ}\text{C}$  durant 5 min. al bany maria per a la desnaturalització i tornar a fer un pols.
- Col.locar el tub dins la cambra humida que tindrem sobre la placa calefactora a una temperatura de  $45-50^{\circ}\text{C}$ .

- Desnaturalitzar la mostra en una solució de formamida al 70% durant 3 min. A 70-72°C al bany maria.
- Deshidratar la mostra en una sèrie d'etanols: al 70%, 85%, 90% i 100% durant 1 min. en fred per aturar el procés de desnaturalització i evitar la renaturalització de l'ADN.
- Deixar la mostra dreta perquè regalimi tot el líquid i col.locar-la a la placa com a màxim 2 min. abans de posar-hi la sonda.
- Col.locar 8µL de la barreja de la sonda sobre la part del porta marcada, tancar amb un cobreobjectes net de 20x20 i segellar amb cola i s'incuben tota la nit en una cambra humida de 37°C per aconseguir la reacció d'hibridació.
- Fer els rentats de post-hibridació.
  - Treure la cola i col.locar el porta dins un bany de formamida al 50% a 39-40°C i durant 10 min. i repetir el procés dos cops més.
  - Fer tres rentats en una solució de 2xSSC a temperatura ambient durant 5 min.
  - Fer un rentat en una solució de 4xSSC-Tween-20 al 0.05% a temperatura ambient durant 5 min.
- Deixar la mostra dreta perquè regalimi tot el líquid i posar 10µL de DAPI II (DAPI + *Antifade*) dins la zona marcada del portaobjectes i col.locar un cobreobjectes a sobre. El DAPI és un fluorocrom que s'uneix de forma inespecífica a tot l'ADN.
- Mantenir les preparacions a -20°C en una caixa fosca fins al moment de l'anàlisi al microscopi de fluorescència. És aconsellable deixar un mínim de mitja hora abans de procedir a la lectura.

La sonda utilitzada ha estat la següent:

*-Sondes centromèriques:*

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 18 (CEP 18): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 18. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green*.

. Sonda de la regió centromèrica del cromosoma 11 (CEP 11): aquesta sonda abarca la regió p11.1-q11 del cromosoma 11. S'ha utilitzat marcada directament amb *Spectrum Green*.

#### **B.4. Observació al microscopi de fluorescència i obtenció d'imatges de FISH**

Les preparacions s'han examinat en un microscopi òptic amb dispositiu d'epifluorescència NIKON Eclipse 600. S'han utilitzat els objectius de x10 i x100. Un cop localitzades les cèl.lules que havien estat fotografiades segons l'apartat B.2, es compten les senyals d'hibridació que presenten.

### **Annex 1. REACTIUS I SOLUCIONS**

#### **2.2.2. Tècnica de citogenètica convencional**

##### *1. Components del medi de cultiu:*

- RPMI-1640 (Biological Industries)
- Heparina sòdica 1% (Rovi)
- Sèrum boví fetal (Biological Industries)
- L-Glutamina 200 mM (Biological Industries)
- Penicil.lina (10.000 UI/mL)-Estreptomicina (10µg/mL) (Gibco)

##### *Preparació:*

El medi de cultiu es prepara en una campana de fluxe laminar. A una ampolla de 100 mL de medi de cultiu RPMI-1640, s'afegeix 1 mL d'heparina sòdica o de liti (1%). Es treuen 20 mL de la barreja (es faran al.líquotes de 5 mL que s'utilitzaran per a la recollida de mostres de medul.la òssia). Als 80 mL de medi restants s'afegeixen: 17 mL de sèrum boví fetal (17%), 2 mL de L-Glutamina (2%) i 1 mL de Penicil.lina-Estreptomicina (1%). S'aliquoten els 100 mL de medi complet en flascons de cultiu de plàstic estèril de 25 cc, amb 10 mL a cada flascó. Es conserven a -20°C fins al moment del seu ús.

2. *Antimitòtic:*

- Colcemid 10µg/mL (Biological Industries)

3. *Hipotònic:*

- Solució de clorur potàssic 0.075 M (Merck)

4. *Fixador Carnoy:*

- Carnoy
  - .3 parts de metanol p.a. (Merck)
  - .1 part d'àcid acètic p.a. Merck)

5. *Colorant*

- Colorant de Wright (Sigma)
  - .0.25% en metanol p.a. (Merck)
  - . Agitar durant una hora a temperatura ambient
  - . Filtrar
  - . Incubar durant 72 hores en estufa a 37°C
  - . Conservar a la nevera fins el moment de ser utilitzat
- Tampó de Sørensen
  - .4,539 mg/mL fosfat monopotàssic (Merck)
  - .5,938 mg/mL fosfat disòdic (Merck)

**2.2.3. Mètode MAC**

1. *Hipotònic*

- Hipotònic MAC:
  - .glicerol 50mM (Merck)
  - .clorur potàssic 5 mM (Merck)

- .clorur sòdic 10 mM (Merck)
- .clorur magnèsic 0.8 mM (Merck)
- .sacarosa 10 mM (Merck)

## 2. Fixador

- Metanol (Merck)/Acetona (Merck) (1:1)

## 3. Anticòsos monoclonals

- CD3 (Dako) dil.luït amb TBS 1/20
- MOP7 (Dako) dil.luït amb TBS 1/500

- TBS: solució tris-salina

- .100 mL tampó tris-HCL 0.5M pH 7.6
- .900 mL NaCl 0.9%

- Tampó tris-HCl 0.5M pH 7.6

- .250 mL Tris-hidroximetil-aminometà (60.5g/L) (Merck)
- .180 mL àcid clorhídric (49 mL/L) (Merck)
- .570 mL aigua destil.lada

- Tampó tris-HCl 0.1M pH 8.2

- .250 mL Tris-hidroximetil-aminometà (12.1g/L) (Merck)
- .110 mL àcid clorhídric (9.8 mL/L) (Merck)
- .640 mL aigua destil.lada

## 4. Detecció indirecte

- Anticòs pont

- .Immunoglobulina de conill anti-ratolí (Dako)

- Complexe FAAFA (Dako)

-Solució A

- .2 mg naftol AS-MX fosfat (Sigma)
- .0.2 mL N,N-dimetilformamida (Merck)
- .9.8 mL tampó tris-HCl 0.1M ph 8.2
- .10 mg roig ràpid TR (Sigma)
- .0.1 mL solució de levamisol (0.24 g/10 mL aigua destil.lada) (Sigma)

-Hematoxilina de Mayer (Merck)

-Glicergel (Dako)

## 2.2.4. Tècnica d'hibridació in situ

### 1. Desnaturalització

- Solució de formamida al 70%
  - . Formamida, p.a. (Merck)

### 2. Deshidratacions

- Solucions d'etanol, p.a. (Merck) al 70, 90 i 100%

### 3. Sondes

-Centromèriques

- . *Alpha satellite 3 DNA probe* (CEP 3) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
- . *Alpha satellite 7 DNA probe* (CEP 7) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
- . *Alpha satellite 11 DNA probe* (CEP 11) marcada amb *Spectrum Green* (Vysis)
- . *Alpha satellite 12 DNA probe* (CEP 12) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)

. *Alpha satellite 18 DNA probe* (CEP 18) marcada amb *Spectrum Green* (Vysis)

- Específiques de locus

- . Sonda LSI 13 (13q14, Rb) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
- . Sonda LSI p53 (17p13) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)
- . Sonda LSI cyclin D1(11q13) marcada amb *Spectrum Orange* (Vysis)

4. *Rentats de posthibridació*

- Solució de formamida al 50%

- . Formamida, p.a. (Merck)

- Solució de 20xSSC (pH 6.2-6.3)

- .88.23 mg/mL citrat trisòdic dihidratat (Merck)
- .175.32 mg/mL clorur sòdic (Merck)

- Solució de 2xSSC

- .100 mL de 20xSSC
- . 900 mL d'aigua destil.lada

- Solució de 2xSSC/Tween-20 al 0.1%

- . 100 mL de 20xSSC
- . 900 mL d'aigua destil.lada
- . 1mL de Tween-20 (Sigma)

5. *Detecció de la hibridació*

- DAPI II (DAPI+*Antifade*) (Vysis)

## 2.2.5. Tècnica MGG-FISH

### B.1. Tinció May-Grünwald Giemsa

.May-Grünwald (Merck)

.Giemsa (Merck)

### B.3. Tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH)

#### 1. *Desnaturalització*

- Solució de formamida al 70%

. Formamida, p.a. (Merck)

#### 2. *Deshidratacions*

- Solucions d'etanol, p.a. (Merck) al 70, 85, 90 i 100%

#### 3. *Sondes*

-Centromèriques

. *Alpha satellite 18 DNA probe* (CEP 18) marcada amb *Spectrum Green* (Vysis)

#### 4. *Rentats de posthibridació*

- Solució de formamida al 50%

. Formamida, p.a. (Merck)

- Solució de 20xSSC (pH 6.2-6.3)

.88.23 mg/mL citrat trisòdic dihidratat (Merck)

.175.32 mg/mL clorur sòdic (Merck)

- Solució de 2xSSC

.100 mL de 20xSSC



. 900 mL d'aigua destil.lada

- Solució de 4xSSC/Tween-20 al 0.05%

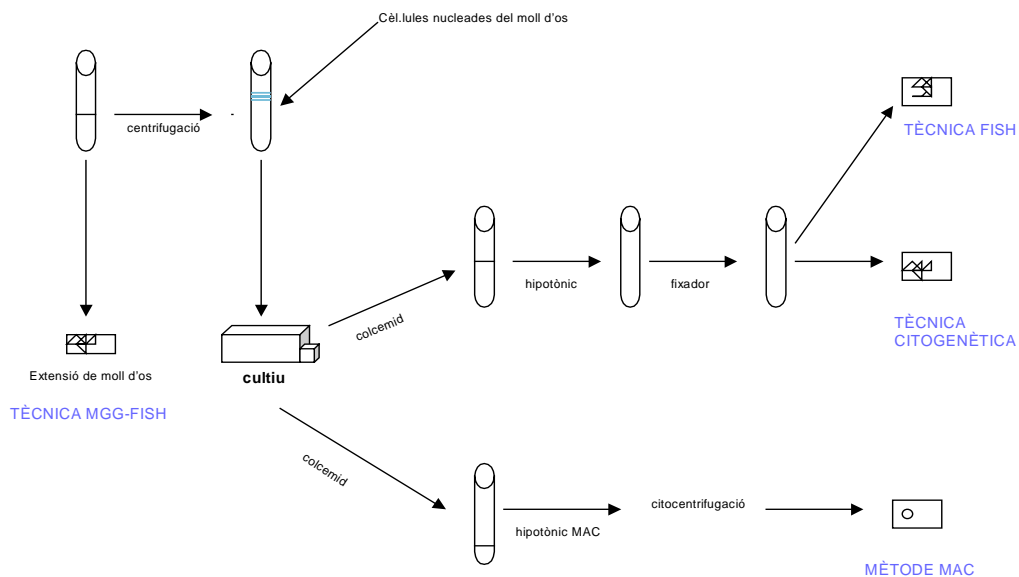
. 250 mL de 20xSSC

. 750 mL d'aigua destil.lada

. 0.5 mL de Tween-20 (Sigma)

5. Detecció de la hibridació

- DAPI II (DAPI+Antifade) (Vysis)



**Figura 1.** Repartició de la mostra per realitzar les diferents tècniques.

### **3. ARTICLES**

**3.1. ARTICLE 1:** “Contribution of cytogenetics and *in situ* hybridization in the study of monoclonal gammopathies of undetermined significance”. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 132: 25-29, 2002.

## Contribution of cytogenetics and in situ hybridization to the study of monoclonal gammopathies of undetermined significance

Elisabet Lloveras<sup>a,\*</sup>, Francesc Solé<sup>a</sup>, Lourdes Florensa<sup>a</sup>, Carles Besses<sup>b</sup>, Blanca Espinet<sup>a</sup>, Miguel Gil<sup>c</sup>, Ma Encarnación Pérez-Vila<sup>a</sup>, Carmen Pedro<sup>b</sup>, Eugènia Abella<sup>b</sup>, Jordi Sans-Sabrafen<sup>b</sup>, Soledad Woessner<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Laboratori de Citologia Hematològica, Laboratori de Referència de Catalunya, Departament de Patologia, Hospital del Mar, IMAS, Barcelona, Spain

<sup>b</sup>Servei d'Hematologia Clínica, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Unitat de Lípids i Epidemiologia Cardiovascular, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner-IMAS, Barcelona, Spain

Received 26 March 2001; received in revised form 1 May 2001; accepted 3 May 2001

### Abstract

Monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS) are characterized by the presence of a monoclonal protein in serum in quite asymptomatic patients. Ten to 33% of MGUS patients eventually will develop overt multiple myeloma, but no single laboratory test exists that can predict changes toward a malignant evolution. The aim of the present study was to apply conventional cytogenetics, the MAC (morphology, antibody, chromosome) method and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques in a series of 50 MGUS patients and 4 “smoldering” multiple myeloma patients to test the usefulness of their approaches as predictive methodologies. All patients studied by conventional cytogenetics presented a normal karyotype independent of the culture conditions used. The MAC method revealed that all mitotic cells showing a normal karyotype were positive for anti-MOP7 or anti-CD3 in 12 patients studied. In addition, two of them presented a numerical abnormality detected by FISH. Using a FISH technique with direct labeled centromeric probes for chromosomes 3, 7, 11, and 18 we showed a numerical abnormality in eight of 35 patients (23%) with a normal karyotype. The common occurrence of MGUS and the fact that they may evolve toward lymphoproliferative disorders displays the importance of being able to identify laboratory results that are capable of predicting the evolution of these patients. In the literature, patients who presented an IgA peak of immunoglobulin type have been associated with a higher risk of evolving to a malignant condition. Our study shows the correlation of MGUS patients who presented monosomy 18 with the presence of an immunoglobulin peak of the IgA type. Prospective follow-up is needed to evaluate the clinical value of monosomy 18 as a predictive factor for defining a high risk of malignant transformation in MGUS patients. © 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS) are characterized by the presence of a monoclonal protein in the serum without evidence of any causal disease, such as multiple myeloma (MM), Waldenström macroglobulinemia, primary amyloidosis, or any other related disorder. Clinically, MGUS patients have a benign course but after 20 years of follow-up, 10 – 33% of them will develop overt MM [1,2]. Although the origin of MM is largely un-

known, Hallek et al. [3] proposed a model for a multistep transformation process. There appears to be an ordered progression from a normal plasma cell: (1) to MGUS, where the cells are immortalized but not transformed and do not progressively accumulate or cause bone destruction; (2) to intramedullary myeloma where the cells are confined to the bone marrow microenvironment, accumulate and cause bone destruction; and (3) to extramedullary myeloma where the cells proliferate more rapidly and appear in the blood (plasma cell leukemia) or in other extramedullary sites. This model summarizes the possible timing of genetic events in relation to clinical progression. Monoclonal gammopathies of undetermined significance would be an intermediate condition between normality and malignant myelomatous disease [4,5].

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-248-30-35; fax: +34-93-221-19-20.

E-mail address: elloveras@hotmail.com (E. Lloveras).

Avet-Loiseau et al. [6] proposed a model of two groups of MM, post-MGUS MM with a high incidence of monosomy 13 and de novo MM in which other genetic events might be involved. The hypothesis that loss of chromosome 13 may play a role in the MGUS/MM transition was described by Smadja et al. [7]. Recently, the presence of structural chromosome changes (14q32 abnormalities) has been demonstrated as an early event in MGUS patients [8]. More data are needed to elucidate the theoretical model for plasma cell oncogenesis.

Several studies evaluated the correlation of different hematologic variables with the risk of malignant transformation in MGUS patients [2,9–12]. Greco et al. [12] hypothesized that high proliferative activity (assessed by serum IL-6 level) together with changes in immunophenotypic and genotypic profile characterize MGUS patients, showing a high monoclonal component and this group of patients is subject to more malignant transformations. Bladé et al. [2] concluded that the IgA immunoglobulin type was the only variable associated with a higher probability of malignant transformation.

Cytogenetic studies in MGUS are not useful to detect evolution of these patients because the low number and the low proliferation of plasma cells. In contrast, using fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques, numerical chromosome changes have been identified in bone marrow plasma cells in at least 50% of MGUS patients [13–15] and the chromosomes involved are the same as in MM patients [16–18].

The present study was performed in order to: (1) ascertain the contribution of conventional cytogenetics in the study of MGUS patients, (2) to determine the lineage involvement of mitotic cells by means of the MAC method, and (3) to demonstrate the presence of numerical abnormalities using an interphase FISH technique.

## 2. Patients and methods

### 2.1. Patients

Fifty patients with MGUS and 4 patients with “smoldering” multiple myeloma were included in this study. The diagnosis was based on the following criteria: presence of a monoclonal Ig peak in serum, no radiographic osteolytic lesions, and no clinical symptoms. The patients were referred because of the finding of an M-component in a routine laboratory study or during admission to different departments of the hospital because of unrelated disorders. Clinical characteristics are shown in Table 1 and 2.

### 2.2. Cytogenetic studies

Cytogenetic studies were performed on bone marrow (BM) aspirates. Three cultures were established: (1) a 24-h culture in 19 patients, (2) a 72-h culture in 10 patients, and (3) a 72-h culture stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) (Sigma) in 25 patients. The culture medium was RPMI 1640 (Biological Industries) supplemented with 20% fetal calf serum and 2% L-glutamine (Biological Indus-

Table 1

Main clinical features at presentation of 50 monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS) and 4 smoldering multiple myeloma patients

Parameter	Mean $\pm$ SD	Range
Age (year)	68.2 $\pm$ 13.7	32–90
Hb (g/dL)	13.4 $\pm$ 1.8	9.6–18.4
WBC ( $\times 10^9/L$ )	7.2 $\pm$ 2.6	2.6–14.8
Platelet count ( $\times 10^9/L$ )	221.4 $\pm$ 116.4	108–936
$\beta_2$ -microglobulin (mg/L)	2.34 $\pm$ 1.05	1.3–5.2
LDH(U/L)	308.5 $\pm$ 82.04	189–603
Bone marrow plasma cells (%)	8.27 $\pm$ 5.38	1–26

tries). After incubation, cultures were exposed to Colcemid (0.1  $\mu$ g/ml) (Biological Industries) during 2 h, a hypotonic (0.075 M) treatment was done during 30 min at 37°C, followed by 2 to 5 washes in Carnoy (methanol:acetic acid, 3:1). G-banding was performed after treating the slides in a slide warmer at 100°C for 1 h, and they were then stained with Wright solution. A minimum of 20 metaphases per case were analyzed. Karyotypes were described according to the ISCN [19].

### 2.3. Morphology, antibody, chromosome (MAC) method

The Morphology, antibody, chromosome method was performed in 12 patients. This method was used to determine the cell lineage of the mitotic cells. This method allows a simultaneous analysis of immunologic phenotype, cell morphology, and karyotype on the same mitotic cell, which has been described in detail previously [20]. Briefly, after adding Colcemid to the culture, 1 ml of it was resuspended in 2.8 ml of MAC hypotonic (50 mM glycerol, 5 mM KCl, 10 mM NaCl, 0.8 mM CaCl<sub>2</sub>, and 10 mM sucrose). After being mixed for 5 min at 37°C, the suspension was divided into cytocentrifuge chambers and centrifuged at 500 g during 10 min to obtain slides that contained mitotic cells whose cytoplasm and cell membrane were preserved. Cell lineages were identified with monoclonal antibodies in the alkaline phosphatase-antialkaline phosphatase (APAAP) staining method. The myeloperoxidase antibody (MOP7, DAKO) was used as a marker for granulocytic/monocytic lineage mitotic cells and anti-CD3 (DAKO) for T lineage involvement in mitotic cells. At least, 10 metaphases per case were analyzed.

### 2.4. Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Fluorescence in situ hybridization was applied in 35 patients. For FISH studies, air-dried slides from conventional

Table 2

M-component type

Heavy chain	No. of patients	%	Kappa	Lambda
IgG	34	63	16	18
IgA	15	28	8	7
IgM	4	7	3	1
Biclonal (IgA + IgM)	1	2		Both
Total	54		27	26

chromosome preparations were used. Spectrum orange direct labeled chromosome 3- and 7-specific alpha satellite DNA probes and spectrum green direct labeled chromosome 11 and 18-specific alpha satellite DNA probes (CEP 3, CEP 7, CEP 11, CEP 18; Vysis, Downers Grove, IL, USA) were used. The technique was performed as described in the directions supplied by the manufacturer. The slides were counterstained with DAPI II and analyzed in a NIKON Eclipse 600 fluorescence microscope.

Cut-off levels for the diagnosis of monosomy and trisomy were defined by adding two standard deviations to the mean of the frequency of blood cells with one and three FISH signals for each DNA probe in normal specimens. We have considered a true monosomy when the number of cells with one FISH signal was greater than or equal to 10% and a true trisomy when the number of cells with three FISH signals was greater than or equal to 4%. We evaluated 500 nuclei per probe and case.

### 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was used to detect differences between clinical features in MGUS patients who presented aneuploidies and MGUS patients without aneuploidies. The Chi-square test was used.

## 3. Results

### 3.1. Cytogenetic studies

All 54 patients studied presented a normal karyotype by conventional cytogenetics. We detected a constitutional inversion of chromosome 9 in three patients.

### 3.2. MAC method

Twelve patients with a normal karyotype by conventional cytogenetics were positive for anti-MOP7 or anti-CD3; two of them presented a numerical abnormality detected only by FISH (case 2 and case 8). Results are summarized in Table 3.

Table 3  
Morphology, antibody, chromosome method results in 12 MGUS patients

Case no.	Culture type	Karyotype	MAC method		FISH (#3,#7,#11,#18)
			Metaphases MOP7+ (%)	Metaphases CD3+(%)	
1	B	46,XY,inv(9)(p11q12)c	30	70	Normal
2	B	46,XY	0	100	Monosomy 18
3	B	46,XX	50	50	Normal
4	B	46,XX	50	50	Normal
5	A	46,XY	100	—	Normal
6	B	46,XY	66	34	Normal
7	C	46,XX	100	—	Normal
8	C	46,XY	100	—	Monosomy 11
9	B	46,XX	25	75	Normal
10	C	46,XY	100	—	Normal
11	C	46,XX	100	—	Normal
12	B	46,XX	100	—	Normal

Culture type: A, 24 h culture; B, 72-h culture stimulated with TPA; C, 72-h culture without mitogen.  
Abbreviations: MAC, morphology-antibody-chromosome; FISH, fluorescence in situ hybridization.

### 3.3. FISH

Eight of 35 patients (23%) with a normal karyotype by conventional cytogenetics presented a numerical abnormality detected by FISH: monosomy for chromosome 11 was detected in one patient (3%), monosomy for chromosome 18 in four patients (11%), trisomy for chromosome 3 in one patient (3%), trisomy for chromosome 11 in one patient (3%), and the coexistence of monosomy 3 and 18 in one patient (3%).

### 3.4. Statistical analysis

Among the different variables analyzed we only detected statistical differences in immunoglobulin type versus the presence of monosomy 18 (Table 4). Thus, 80% of MGUS patients with IgA type had a monosomy 18 ( $P<0.05$ ). No differences were observed between the other variables analyzed versus the presence of other aneuploidies.

## 4. Discussion

Metaphase cytogenetic studies in MGUS are scarce and difficult due to the low number and the low proliferation index of clonal plasma cells in the bone marrow. However, the presence of aneuploid cells in MGUS was first suggested when cells with an abnormal DNA content were detected by flow cytometry [21] and later using an interphase FISH technique [13–15]. These findings indicated that cytogenetic abnormalities are an early event in the spectrum of monoclonal gammopathies.

The presence of numerical abnormalities detected in MGUS patients using FISH indicates that the diploid karyotype found by conventional cytogenetics probably does not represent the neoplastic cell. Several studies have been reported in MM patients at diagnosis, using different culture types, in order to improve the detection of chromosomal abnormalities. Controversial results have been reported [22–25]. Smadja et al. [23] and Brigadeau et al. [24] found that the best technique to detect clonal chromosomal abnormalities in

Table 4  
Comparison of immunoglobulin type versus the presence of monosomy 18

	Frequency	<i>P</i>
IgA vs. monosomy 18	80%	0.031 <sup>a</sup>
IgG vs. monosomy 18	20%	0.128
IgM vs. monosomy 18	20%	0.433

<sup>a</sup>Statistical significant correlation ( $P < 0.05$ ).

MM is a 72-h unstimulated culture. We performed three different cultures (24-h unstimulated culture, a 72-h unstimulated culture and a 72-h stimulated culture with TPA) without differences among them in the yield of mitoses.

The cytogenetic results revealed an inversion of chromosome 9 in three cases (5%). The incidence of this polymorphism in the general population [26] is estimated to be 1%. It seems desirable to carry out a detailed investigation of heterochromatin polymorphism in individuals with hematologic diseases versus the general population in order to know if an association between heterochromatin polymorphisms and hematological diseases does exist.

In order to clarify the cell lineage analyzed by conventional cytogenetics, we have used the MAC technique. This method permits a simultaneous analysis of immunologic phenotype and the karyotype in mitotic cells [20]. All metaphases were positive for anti-MOP7 or anti-CD3 in the patients studied, demonstrating their myeloid and T-cell lineage involvement (Table 3). We detected numerical abnormalities by FISH in two of them (cases 2 and 8).

Interphase FISH technique, which allows the assessment of chromosomal abnormalities in cells independent of their proliferative capacity, has greatly improved the detection of chromosomal abnormalities in plasma cell dyscrasias [13–18]. By using this technique, we provide evidence that chromosomal aneuploidy is present in 25% of MGUS patients. Nevertheless, two different groups detected aneuploidy in 52.8% and 61% of MGUS patients using the same chromosome probes [13,14]. The difference in the results could be explained by technical differences. We performed FISH analysis after the cytogenetic studies. In our studies the percentages of hybridization signals are related to the totality of the bone marrow cells, whereas the reports mentioned previously selected bone marrow plasma cells to analyze the hybridization signals. For this reason, and probably in some of our cases, the aneuploid plasma cells cannot be detected because of their low percentage, and are included in background levels of hybridization. In order to determine if we were analyzing real aneuploidies of plasma cells we utilized the MGG-FISH technique [27] in patient 8 and confirmed the monosomy 11 in plasma cells detected by FISH (data not shown).

When different clinical-biological features were compared in aneuploid cells versus those with a normal karyotype in our series of MGUS patients, significant differences were detected in the immunoglobulin type. Eighty percent of patients with IgA type presented monosomy 18 ( $P < 0.05$ ).

Bladé et al. [2] analyzed the probability of malignant transformation in a series of 128 MGUS patients over a 20-year period. They concluded that the IgA type was the only variable associated with a higher probability of such an event. These observations suggest that our patients with monosomy 18 and IgA immunoglobulin type might have a higher probability to develop malignant transformation than the others. Further observations of this group of patients (IgA positive with monosomy 18) regarding malignant transformation is warranted.

### Acknowledgments

This work has been supported by the grants FIS 97/0655 and FIS 99/0574 from the “Ministerio de Sanidad y Consumo”, Spain. We want to thank Rosa Ma Vilà and Rosa Navarro for their excellent technical assistance.

### References

- [1] Kyle RA. “Benign” monoclonal gammopathy: after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc* 1993;68:26–36.
- [2] Bladé J, López-Guillermo A, Rozman C, Cervantes F, Salgado C, Aguilar JL, Vives-Corrons JL, Montserrat E. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 1992;81:391–4.
- [3] Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998;91:3–21.
- [4] Gernone A, Dammacco F. Molecular alterations of IL6R, lck, and c-myc genes in transforming monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Br J Haematol* 1996;93:623–31.
- [5] Davies FE, Jack AS, Morgan GJ. The use of biological variables to predict outcome in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997;99:719–25.
- [6] Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood* 1999;94:2583–9.
- [7] Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, Grange MJ, Monconduit M, Bastard C. Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 1998;12:960.
- [8] Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Cancer Res* 1999;59:4546–50.
- [9] Van de Poel MHW, Coebergh JWW, Hillen HFP. Malignant transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance among out-patients of a community hospital in Southeastern Netherlands. *Br J Haematol* 1995;91:121–5.
- [10] Baldini L, Guffanti A, Cesana BM, Colombi M, Chiorboli M, Damilano I, Maiolo AT. Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood* 1996;87:912–8.
- [11] Vuckovic J, Ilic A, Knezevic N, Marinkovic M, Zemunik T, Dubravcic M. Prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 1997;97:649–51.
- [12] Greco C, Amegio F, Alvino F, Mosiello A, Cianciulli AM, Ventura I, del Monte G, Giampaolo M, Tong AW, Gandolfo GM. Phenotypic and genotypic alterations characterize patients bearing plasma cell dyscrasias with a high M-component. *Cell Prolif* 1999;32:231–8.
- [13] Drach J, Angerler J, Schuster J, Rothermundt C, Thalhammer R, Haas OA, Jäger U, Fiegl M, Geissler K, Ludwig H, Huber H. Inter-

- phase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1995;86:3915–21.
- [14] Zandecki M, Obein V, Bernardi F, Soenen V, Flactif M, Luc Lai JL, François M, Facon T. Monoclonal gammopathy of undetermined significance: chromosome changes are a common finding within bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 1995;90:693–6.
- [15] Zandecki M, Luc Lai JL, Geneviève F, Bernardi F, Volle-Rémy H, Blanchet O, François M, Cosson A, Bauters F, Facon T. Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood* 1997;90:3682–90.
- [16] Drach J, Schuster J, Nowortny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995;55:3854–9.
- [17] Zandecki M, Luc Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 1996;94:217–27.
- [18] Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Taberero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91:3366–71.
- [19] Mitelman F. Guidelines for cancer cytogenetics, supplement to an international system for human cytogenetic nomenclature (ISCN). Basel: S. Karger, 1995.
- [20] Teerenhovi L, Knuutila S, Ekblom M, Rossi L, Borgström GH, Tallman JK, Andersson L, de la Chapelle A. A method for simultaneous study of the karyotype, morphology and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. *Blood* 1984;64:1116–22.
- [21] Latreille J, Barlogie B, Johnston D, Drewinko B, Alexanian R. Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood* 1982;59:43–51.
- [22] Facon T, Lai JL, Nataf E, Preudhomme C, Hammad M, Wattel E, Jouet JP, Bauters F. Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report on 46 patients. *Br J Haematol* 1993;84:743–5.
- [23] Smadja NV, Louvet C, Isnard F, Dutel JL, Grangr MJ, Varette C, Krulik M. Cytogenetic study in multiple myeloma at diagnosis: comparison of two techniques. *Br J Haematol* 1995;90:619–24.
- [24] Brigaudeau C, Trimoreau F, Gachard N, Rouzier E, Jaccard A, Bordesoule D, Praloran V. Cytogenetic study of 30 patients with multiple myeloma: comparison of 3 and 6 day bone marrow cultures stimulated or not with cytokines by using a miniturized karyotypic method. *Br J Haematol* 1997;96:594–600.
- [25] Hernández JM, Gutiérrez NC, Almeida J, García JL, Sánchez MA, Mateo G, Ríos A, San Miguel JF. IL-4 improves the detection of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and increases the proportion of clonally abnormal metaphases. *Br J Haematol* 1998;103:163–7.
- [26] Pérez MM, Solé F, Grao P, Preciado C, Jimenez J, Barrera JC. Chromosome analysis in 2000 peripheral blood samples. *European Society of Human Genetics. 25<sup>th</sup> Annual Meeting* 1993;112.
- [27] Lloveras E, Solé F, Espinet B, Florensa L, Vazquez A, Woessner S. May-Grünwald-Giemsa fluorescence in situ hybridization technique applied to a plasma cell leukemia. *Haematologica* 1999;84:568–9.



**3.2. ARTICLE 2:** “Cytogenetic and FISH studies in 60 patients with multiple myeloma and plasma cell leukemia”. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 148: 71-76, 2004.



ELSEVIER

Cancer Genetics and Cytogenetics 148 (2004) 71–76

CANCER GENETICS  
AND  
CYTOGENETICS

## Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization studies in 60 patients with multiple myeloma and plasma cell leukemia

Elisabet Lloveras<sup>a,b,\*</sup>, Isabel Granada<sup>c</sup>, Lurdes Zamora<sup>a</sup>, Blanca Espinet<sup>a,d</sup>,  
Lourdes Florensa<sup>d,e</sup>, Carles Besses<sup>f</sup>, Marisol Xandri<sup>c</sup>, Maria Encarnación Pérez-Vila<sup>d,e</sup>,  
Fuensanta Millà<sup>c</sup>, Soledad Woessner<sup>d</sup>, Francesc Solé<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup>Laboratori de Citogenètica i Biologia Molecular, Servei de Patologia, Hospital del Mar–IMAS, Passeig marítim, 25–29, Barcelona 08003, Spain

<sup>b</sup>Departament de Biologia Animal, Biologia Vegetal i Ecologia, Unitat d'Antropologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

<sup>c</sup>Fundació de Recerca Biomèdica Germans Trias i Pujol, Barcelona, Spain

<sup>d</sup>Escola de Citologia Hematològica Soledad Woessner–IMAS, Barcelona, Spain

<sup>e</sup>Laboratori de Citologia Hematològica, Servei de Patologia, Hospital del Mar–IMAS, Barcelona, Spain

<sup>f</sup>Servei d'Hematologia Clínica, Hospital del Mar–IMAS, Barcelona, Spain

Received 2 February 2003; received in revised form 6 May 2003; accepted 19 May 2003

### Abstract

We report cytogenetic results in a series of 60 patients affected with multiple myeloma (MM) and plasma cell leukemia (PCL) and compare the results with those previously reported. In our series, a total of 41% of MM patients and 71% of PCL patients displayed chromosome abnormalities. To evaluate the clinical value of monosomy 18, we obtained fluorescence in situ hybridization results (using centromeric probe for chromosome 18) of 22 MM patients who displayed a normal karyotype. Monosomy 18 was present in 3 of 22 patients (14%). Using conventional cytogenetics, we detected monosomy 18 in one patient affected with PCL. Two of four cases with monosomy 18 followed an aggressive course, with overall survival of 1 and 9 months. The remaining two are in follow-up and remain stable. The association of monosomy 18 with IgA subtype predominance and poor prognosis was not observed in this series of MMs and PCLs. Although these results do not confirm our previous hypothesis, further observations of this group of patients (with monosomy 18) regarding malignant transformation is warranted. © 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Multiple myeloma (MM) is a clonal B-cell malignancy characterized by the accumulation of plasma cells in the bone marrow [1]. Conventional cytogenetics studies have found abnormal karyotypes in 29%–66% of MM patients [2–8]. One of the most frequent structural abnormalities involves the immunoglobulin heavy-chain (IgH) locus on 14q32, which is usually part of a translocation [9]. In ~30% of these translocations, the partner chromosomal locus is 11q13 (*CCND1*, previously *BCL1*; cyclin D1) [10]. A subset of MM patients with t(11;14) have been defined by Fonseca et al. [11–13] as characterized by cyclin D1 upregulation, a lymphoplasmacytic morphology, small serum monoclonal

proteins, and small likelihood of hyperdiploidy. Chromosome 8 at 8q24 band (*MYC*; alias *c-MYC*) is another chromosome partner of 14q32 described in less than 5% of MM patients [10]. Rearrangements involving all or part of the long arm of chromosome 1 are also common structural abnormalities and have been associated with tumor progression [14,15].

In contrast with the incidence of abnormal karyotypes detected in MM with conventional cytogenetics, studies using fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques have identified numerical chromosome changes in bone marrow plasma cells in at least 67 to 90% of patients [16,17] and these changes have become a powerful prognostic factor [6,8,18]. Calasanz et al. [6] correlated hypodiploid karyotype with a poor prognosis. Smadja et al. [8] identified two different groups based on the number of chromosomes in abnormal mitoses: one defined by the presence of a hyperdiploid clone with trisomies 3, 5, 7, 9, 11, 15, and 19 (with or without

\* Corresponding author. Tel.: +34-93-248-3035; fax: +34-93-248-3131.

E-mail address: e0037@imas.imim.es (E. Lloveras).

associated structural abnormalities) and a second group characterized by a hypodiploid, pseudodiploid, or hypotetraploid karyotypes (always associated with structural abnormalities). Pérez-Simón et al. [18] correlated the existence of trisomy for chromosomes 6, 9, and 17 with a better outcome, whereas the presence of monosomy 13 was associated with poor prognostic features and a shorter survival. The predictive value of partial or whole deletions of chromosome 13 has been described by several authors [19–24].

Although the origin of MM is largely unknown, several studies suggest that monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) may be an intermediate condition between normality and malignant myelomatous disease [10,25–27]. We previously found a correlation of MGUS patients with monosomy 18 with the presence of an immunoglobulin peak of the IgA type [28]. From the literature [29], patients who presented with an IgA peak of immunoglobulin type appear to have a higher risk to evolve to a malignant condition, so we suggested the hypothesis that MGUS patients who presented with monosomy 18 may also have a higher risk of evolving to a malignant condition.

To evaluate the clinical value of monosomy 18 in plasma cell dyscrasias, we performed cytogenetic and FISH (centromeric probe for chromosome 18) analyses in a series of 60 patients: 53 affected with MM and 7 with plasma cell leukemia (PCL). A FISH analysis for 13q deletion and trisomy 12 was also performed.

## 2. Patients, materials, and methods

### 2.1. Patients

Fifty-three MM and seven PCL patients, all previously untreated, were included in this study. The monoclonal component was IgG in 43% of cases, IgA in 36% and Bence Jones protein in the remaining 21% of patients. All patients were treated according to the protocols of the PETHEMA (Spanish Cooperative Group for the treatment of Malignant Hemopathies) group. Clinical characteristics are given in Table 1.

### 2.2. Cytogenetic studies

Cytogenetic studies were performed on 24-hour bone marrow (BM) cultures. The culture medium was RPMI 1640 (Biological Industries, Kibbutz Beit HaEmek, Israel), supplemented with 20% fetal calf serum and 2% L-glutamine (Biological Industries). After incubation, cultures were exposed to deacetyl methylcolchicine (0.1 µg/mL) (Biological Industries) for 2 hours; a hypotonic (0.075 mol/L) treatment was done during 30 minutes at 37°C, followed by two to five washes in Carnoy's fixative (methanol–acetic acid, 3:1). G-banding was performed after treating the slides in a slide warmer at 100°C for 1 hour, whereupon the slides were stained with Wright's solution. A minimum of 20 metaphases per case were analyzed. Karyotypes were described according to

Table 1  
Clinical characteristics of MM patients

Clinical data	Proportion of patients (%)
Age	
>60 yr	72
<60 yr	28
Hemoglobin	
>10 g/dL	60
<10 g/dL	40
β <sub>2</sub> -Microglobulin	
>2 mg/L	70
<2 mg/L	30
LDH	
>230 UI/L	43
<230 UI/L	57
CRP	
>2.5 mg/L	37
<2.5 mg/L	63
Albumin	
>35 g/L	38
<35 g/L	62
Creatinine	
>10 mg/L	24
<10 mg/L	76
Isotype	
IgA	36
IgG	43
BJ	21
Plasma cells, BM	
>25%	85
<25%	15

Abbreviations: BM, bone marrow; CRP, C-reactive protein; LDH, lactate dehydrogenase.

International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 1995) [30]. Abnormal karyotypes are listed in Tables 2 and 3.

### 2.3. FISH

FISH was applied in 22 patients from whom fixed material was available. A mixture consisting of SpectrumGreen direct-labeled chromosome 18-specific α-satellite DNA probe and SpectrumOrange LSI cyclin D1 probe (Vysis, Downers Grove, IL) or SpectrumGreen direct-labeled chromosome 18-specific α-satellite DNA probe and SpectrumOrange direct-labeled chromosome 12-specific α-satellite DNA probe (Vysis) were used. The technique was performed according to the manufacturer's directions. Slides were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI II) and analyzed in a Nikon Eclipse 600 fluorescence microscope.

Cutoff levels for the diagnosis of monosomy and trisomy were defined by adding two standard deviations to the mean of the frequency of blood cells with one and three FISH signals, respectively, for each DNA probe in normal specimens. We have considered a true monosomy when the number of cells with one FISH signal was greater than or equal to 10% and a true trisomy when the number of cells

with three FISH signals was greater than or equal to 4% for each DNA probe. We evaluated 500 nuclei per probe.

### 3. Results

Fifty-three MM and seven PCL patients were tested with routine G-banding. A total of 22 out of 53 (41%) MMs displayed chromosomal abnormalities with conventional cytogenetics (Table 2). Of the remaining 31, 4 failed and 27 displayed a normal karyotype. In three hyperdiploid patients (cases 30, 33, and 35), it was not possible to establish the karyotype due to inadequate quality of the metaphases studied. Involvement of chromosome 1 was the most common structural abnormality, found in 13 of the 22 MM patients (59%). Rearrangements involving 14q32 region were detected in 4 of 22 (18%) MM patients, with translocations of different chromosomes regions leading to t(8;14)(q24;q32) (case 10), t(14;16)(q32;q22) (cases 6 and 13), and t(11;14)(q13;q32) (case 17). In case 47, the partner chromosome could not be identified. A Burkitt-type translocation was detected in case 10, with t(8;14), and in case 18, with t(8;22). Abnormalities affecting the 17p13 region were detected in two patients as add(17p), and the 16q23 region was rearranged in t(14;16). The 22q11 region was lost in only one case. Numerical abnormalities of MM patients resulting in trisomies were, in decreasing order, trisomies 15, 19, 7, 9, 11, 3, 5, and 14. Monosomy 13 was detected in 5 of 22 (23%) cases.

A total of five out of seven (71%) PCL cases displayed chromosomal abnormalities using conventional cytogenetics. Results are summarized in Table 3. Hypodiploidy was

observed in four of seven (57%) cases. Monosomy 13 was detected using conventional cytogenetics in five cases and by deletion of the *RBI* gene, detected with FISH, in one case. In the remaining case, a normal karyotype was detected; FISH could not be performed. Rearrangements of chromosome 1 were present in three of three cases with structural abnormalities.

Table 4 gives the survival and chromosome number pattern in MM and PCL patients with monosomy 13. The PCL patients with monosomy 13 had an overall survival (OS) of 1 to 12 months. Hypodiploidy was detected in four of five cases, and hypertriploidy in the remaining case. Monosomy 13 was detected in five MM patients. Overall survival was known for two patients. Case 34 displayed a hypodiploid karyotype and an OS of three months, and case 19 displayed hyperdiploid karyotype and an OS of 7 years. At the time of this report, the remaining three patients were in follow-up of a few months.

Six of 22 MM patients (27%) with a normal karyotype from conventional cytogenetics displayed a numerical abnormality for chromosome 18 as detected with FISH: monosomy for chromosome 18 was detected in three patients and trisomy/tetrasomy in three.

Amplification of cyclin D1 was tested in nine MM patients. Three of the nine cases displayed three hybridization signals (assessed as trisomy 11); the rest were normal. The FISH results are summarized in Table 5.

### 4. Discussion

Of the 60 patients with a plasma cell process, 33 patients displayed a normal karyotype. In 10 of the 33 patients, FISH analysis detected numerical abnormalities.

Table 2  
Conventional cytogenetics results of abnormal karyotypes of 22 patients with MM

Patient no.	Conventional cytogenetics
1	51,Xc,del(1)(p21),add(4)(q35),+5,+9,+add(11)(p15),+14,+15,+19,+21,-21[2]/45,Xc[9]/46,XX[8]
6	45,XY,add(1)(q44),-8,der(10;15)(q10;q10),t(14;16)(q32;q22),-17,+mar1,+mar2[5]/46,XY[45]
10	198,XXXXXXXXXX,+1,der(1),der(1),+2,+2,+3,+3,+4,+4,+5,del(5)(q13q21),+6,add(6)(p25),+7,del(7)(q21),+8,t(8;14)(q24;q32),+9,+9,+10,+10,+11,+11,+12,+13,+13,+14,+14,+15,+15,+16,+17,+18,add(18)(q23),+19,+19,+20,+20,+21,+21,+22,+22[39]
11	50,XY,del(1)(p11),+5,+9,del(10)(p11),+mar1,+mar2[6]/46,XY[5]
13	46,XX,t(14;16)(q32;q23)[10]/46,XX[10]
15	47,X,-X,del(1)(q11),+i(1q),+5,+7,+9,-15,-16,-17,+mar[3]/46,XX[17]
16	48,XY,+3,+4,+5,-6,+add(11)(p15),+add(11)(p13),-13,-13,-14,-15,+17,+18,+19,-22,+mar1,+mar2,+2ac[2]/46,XY[18]
17	46,XY,del(1)(p22p32),+11,t(11;14)(q13;q32),-14[20]/46,XY[37]
18	49,XY,+5,t(8;22)(q24;q11),+11,+19[20]
19	55,XY,t(1;18)(q11;q23),+2,+3,+4,del(6)(q23),+7,+7,+7,+12,-13,+15,+15,+add(17)(p13)[10]/46,XY[10]
21	46,XX,del(6)(q23)[20]
30	Hyperdiploid
33	Hypertriploid
34	45,XY,-5,-7,-13,+16,+mar[12]/45,XY,-5,-7,add(12)(p13),-13,+16,+mar[12]
35	Hyperdiploid
41	57,XY,+Y,inv(2)(p13q11),+3,der(4)t(1;4)(q11;q35),+7,+9,+11,+13,+14,+15,+15,+19,+21[5]/46,XY[30]
42	42,-X,-X,der(1)t(1;16;?)(p11;p11;?),-5,add(6)(q26),-7,-8,del(8)(p11),-12,-13,-4,+4mar[11]/46,XX[14]
44	49,XX,del(1)(q21q32),+del(1)(q21q32),add(2)(p25),+add(3)(q29),del(8)(q13q22),-10,+11,+14,+15,add(16)(p13)[10]/46,XX[14]
47	42,XY,del(1)(p22p32),der(3)t(3;?)(q2;?),-6,-13,add(14)(q32),-14,-22[2]/46,XY[30]
49	Hyperdiploid
50	47,XY,der(1)inv(1)(p32q21),del(1)(p32),del(9)(q12q21),add(12)(p13),der(14;22)(q10;q10),add(17)(p13),+18,+19[17]/46,XY[6]
51	50,XY,der(1)t(1;?)(q32;?),+inv(1)(p36q?2),+3,del(6)(q21q25),+7,-8,+15,del(22)(q11),+del(22)(q11)[15]/46,XY[22]

Table 3  
Conventional cytogenetics and chromosome 18 specific FISH results for seven patients with PCL

Patient no.	Conventional cytogenetics	FISH
1	40,X-X,-13,-14,t(1;14),-15,-17,-18[20]	ND
2	42,XX,del(1)(p31p36),-8,-11,-13,-15,-22,+mar[20]	ND
3	74,X,-X,-X,del(1)(p31),+del(1)(p31),+3,+7,+8,+9,-13,-14,+15,+19,+20,+21,+22[14]/74,X,-X,-X,del(1)(p31),+del(1)(p31),+3,+7,+8,+9,-13,-14,+15,16p+,+19,+20,+21,+22,+mar[6]	ND
4	<sup>a</sup> 46,XX[20]	Normal
5	43,XY,-8,-13,-22[3]/46,XX[6]	ND
6	45,XY,-13[7]/46,XY[10]	ND
7	46,XX[20]	Trisomy

Abbreviation: ND, not done.

<sup>a</sup> Monosomy *RBI* gene from FISH analysis.

In our series, a total of 41% of MM patients and 71% of PCL patients displayed chromosome abnormalities. The frequency of chromosomally abnormal clones identified by routine chromosome analysis was greatest among patients with PCL (71%) and decreased among patients with advanced MM (50%) and decreased further to 0% in patients with a MGUS [28].

MM cells are characterized by high genetic instability, resulting in a complex set of numerical and structural chromosomal abnormalities. Avet-Loiseau et al. [25,26] have proposed a theoretical model of plasma cell oncogenesis. In this model, whereas 14q32 abnormalities appear as an early event, deletion 13q14 would be involved in the transition of MGUS to MM. Recently, the same group [27] proposed a genetic stratification that is highly correlated with immunologic status, clinical presentation and with some major prognostic factors and supports different models for MM oncogenesis.

Rearrangement of chromosome 1 is the most common structural abnormality [14,15]. It was detected in three of five (60%) PCL patients and in 13 of 22 (59%) MM patients

Table 4  
Survival and chromosome number pattern in MM and PCL patients with monosomy 13

Case	Diagnosis	Chromosome number pattern	Overall survival
16 <sub>MM</sub>	MM IgA K III <sub>A</sub>	Hyperdiploid	In follow-up
19 <sub>MM</sub>	MM IgG K I <sub>A</sub>	Hyperdiploid	7 years
34 <sub>MM</sub>	MM IgA K III <sub>A</sub>	Hypodiploid	3 months
42 <sub>MM</sub>	MM IgG L III <sub>A</sub>	Hypodiploid	In follow-up
47 <sub>MM</sub>	MM L III <sub>A</sub>	Hypodiploid	In follow-up
1 <sub>PCL</sub>	PCL	Hypodiploid	1 month
2 <sub>PCL</sub>	PCL	Hypodiploid	3 months
3 <sub>PCL</sub>	PCL	Hypertriploid	1 month
5 <sub>PCL</sub>	PCL	Hypodiploid	12 months
6 <sub>PCL</sub>	PCL	Hypodiploid	6 weeks

Table 5  
FISH results of 22 MM patients with a normal karyotype from conventional cytogenetics

Case no.	Chromosome 18-specific	LSI cyclin	Karyotype
	$\alpha$ -satellite DNA probe	D1 probe	
3	Trisomy/tetrasomy	ND	46,XY[20]
4	Trisomy	3 hybridization signals	46,XX[20]
7	Normal	3 hybridization signals	46,XX[20]
8	Monosomy	Normal	46,XY[20]
12	Normal	3 hybridization signals	46,XX[20]
14	Monosomy	Normal	46,XX[20]
27	Trisomy/tetrasomy	ND	45,X,-Y[18]/46,XY[2]
52	Monosomy	ND	46,XX[20]

Abbreviation: ND, not determined.

with abnormal karyotypes in our series. Jumping translocations of 1q and abnormalities of 1p and 1q without apparent locus specificity have been described by Sawyer et al. [14], who concluded that clonal evolution of cells with extra copies of 1q suggests that this aberration provides a proliferative advantage. Chromosomal abnormalities of 14q32 have been observed in 75% of patients with a plasma cell malignancy and have been associated in the oncogenesis of MM [26,27]. In our series, a 14q32 anomaly was found in 4 of 22 (18%) MM patients with different partner chromosomes: 11q13 (*CCND1*) (case 17), 8q24 (*MYC*) (case 10), and 16q23 (*MAF*; also known as *c-MAF*) (cases 6 and 13). The remaining case (47) had an add(14)(q32).

The FISH studies revealed three hybridization signals of *CCND1* in three of nine (33%) MM patients. We interpreted the results as a gain of chromosome 11. Hoechtlen-Vollmar et al. [31] reported that only amplification of cyclin D1 and not trisomy 11 was associated with a shorter survival.

Burkitt-type translocations affecting the *MYC* oncogene were detected in 2 of 22 MM patients (9%). Avet-Loiseau et al. [32] identified rearrangements of *MYC* oncogene in 15% of patients with MM. They correlated *MYC* rearrangements with several other patient characteristics: illegitimate IgH recombinations, chromosome 13 deletions, and serum  $\beta_2$ -microglobulin levels.

Aneuploidy appears frequently in MM karyotypes [2–8]. Pérez-Simón et al. [18] analyzed the prognostic value of numerical chromosome abnormalities for 15 different chromosomes assessed with FISH. They concluded that trisomies of chromosomes 6, 9, and 17 were associated with prolonged survival and, by contrast, overall survival was lower in cases with monosomy 13. The adverse prognostic impact of the loss of partial deletion of chromosome 13 was reported by several groups [19–21], but was not confirmed by others [6]. Recently, Smadja et al. [8] found that chromosome 13 did not appear to be an independent prognostic factor, whereas a hypodiploid karyotype was the most powerful prognostic factor. In our series, monosomy 13 was detected in 5 of 22 (23%) MM patients and five of seven (71%) PCL patients.

We analyzed the effect impact of chromosome number pattern in patients with monosomy 13 (Table 4). The results show that the OS in MM patients with monosomy 13 (cases 19 and 34) appears different (7 years vs. 3 months) for hyper- and hypodiploid karyotypes. In PCL patients, OS ranges between 6 weeks to 12 months, independent of chromosome number pattern.

With FISH and using chromosome 18-specific  $\alpha$ -satellite DNA probe, we detected monosomy 18 in 3 of 22 (14%) and trisomy/tetrasomy in 3 of 22 (14%) MM patients. These results have not, to our knowledge, been reported before. Previously, we suggested that MGUS with monosomy 18 detected with FISH may be associated with an increased risk to evolve to a malignant condition [28]. In the present series, monosomy 18 was detected in three cases. Two cases are in follow-up and remain stable. The remaining case followed an aggressive course, with OS of 9 months, and presented as Bence Jones positive. One PCL patient displayed monosomy 18 and an OS of 1 month.

In conclusion, the association of monosomy 18 with IgA subtype predominance and poor prognosis was not observed in this series of MMs and PCLs. Although these results do not confirm our previous hypothesis, further observations of this group of patients (with monosomy 18) regarding malignant transformation is warranted.

## Acknowledgments

This work has been supported by the grants FIS 97/0655, FIS 99/0574, and FIS 02/0002 from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain. We want to thank Rosa Maria Vilà and Carme Melero for their excellent technical assistance.

## References

- [1] Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, Huber H. The biology of multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000;126:441–7.
- [2] Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR. The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 1985;66:380–90.
- [3] Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, Morel P, Jouet JP, Bauters F, Facon T. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 1995;85:2490–7.
- [4] Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer J. Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 1995;86:4250–6.
- [5] Weh HJ, Gutensohn K, Selbach J, Kruse R, Wacker-Backhaus G, Seeger B, Fiedler W, Fett W, Hossfeld DK. Karyotype in multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Eur J Cancer* 1993;29:1269–73.
- [6] Calasanz MJ, Cigudosa JC, Otero MD, García-Foncillas J, Marin J, Ardanaz MT, Rocha E, Gullon A. Hypodiploidy and 22q11 rearrangements at diagnosis are associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 1997;98:418–25.
- [7] Seong C, Delasalle K, Hayes K, Weber D, Dimopoulos M, Swankowski J, Huh Y, Glassman A, Champlin R, Alexanian R. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1998;101:189–194.
- [8] Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart C. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 2001;98:2229–38.
- [9] Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL, Swanson CM, Goosen LS, Sammartino G, Gilliland JC, Munshi NC, Tricot G, Shaughnessy JD Jr., Barlogie B. Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *Br J Haematol* 2001;112:167–74.
- [10] Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998;91:3–21.
- [11] Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Kyle RA, Hoyer JD, Jalal SM, Greipp PR. Multiple myeloma and the translocation t(11; 14)(q13;q32): a report on 13 cases. *Br J Haematol* 1998;101:296–301.
- [12] Fonseca R, Hoyer JD, Aguayo P, Jalal SM, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Witzig TE, Lacy MQ, Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle RA, Greipp PR. Clinical significance of the translocation (11;14) in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 1999;35:599–605.
- [13] Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR. Myeloma and the t(11; 14)(q13;q32): evidence for a biologically defined unique subset of patients. *Blood* 2002;99:3735–41.
- [14] Sawyer JR, Tricot G, Mattox S, Jagannath S, Barlogie B. Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterochromatin. *Blood* 1998;91:1732–41.
- [15] Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Takashima T. Non-random chromosomal rearrangements and their implications in clinical features and outcome of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 1996;21:25–30.
- [16] Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995;55:3854–9.
- [17] Taberero D, San Miguel JF, García-Sanz R, Nájera L, García-Isidoro M, Pérez-Simon JA, González M, Wiegant J, Raap AK, Orfao A. Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 1996;149:153–61.
- [18] Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Taberero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A. Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 1998;91:3366–71.
- [19] Facon T, Avet-Loiseau H, Guillemin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, Lai JL, Leleu X, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Bataille R, Mary JY. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum  $\beta_2$ -microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 2001;97:1566–71.
- [20] Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B. High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 2000;96:1505–11.
- [21] Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedl L, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 2000;95:1925–30.
- [22] Avet-Loiseau H, Daviet A, Saunier S, Bataille R. Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 2000;111:1116–7.

- [23] Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR, Dewald GW. Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia* 2001;15:981–6.
- [24] Nomdedeu JF, Lasa A, Ubeda J, Saglio G, Bellido M, Casas S, Carnicer MJ, Aventin A, Sureda A, Sierra J, Baiget M. Interstitial deletions at the long arm of chromosome 13 may be as common as monosomies in multiple myeloma: a genotypic study. *Haematologica* 2002;87:828–35.
- [25] Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood* 1999;94:2583–9.
- [26] Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R. 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Cancer Res* 1999;59:4546–50.
- [27] Avet-Loiseau H, Facon T, Grosbois B, Magrangeas F, Rapp MJ, Harousseau JL, Minvielle S, Bataille R, Intergroupe Francophone du Myeloma. Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlated with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood* 2002;99:2185–91.
- [28] Lloveras E, Solé F, Florensa L, Besses C, Espinet B, Gil M, Pérez-Vila ME, Pedro C, Abella E, Sans-Sabrafen J, Woessner S. Contribution of cytogenetics and in situ hybridization to the study of monoclonal gammopathies of undetermined significance. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;132:25–9.
- [29] Bladé J, López-Guillermo A, Rozman C, Cervantes F, Salgado C, Aguilar JL, Vives-Corrons JL, Montserrat E. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 1992;81:391–4.
- [30] Mitelman F, editor. An international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: S. Karger, 1995.
- [31] Hoechtlen-Vollmar W, Menzel G, Bartl R, Lamerz R, Wick M, Seidel D. Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br J Haematol* 2000;109:30–8.
- [32] Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R. Intergroupe Francophone du Myeloma. Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 2001;98:3082–6.

**3.3. ARTICLE 3:** “Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) studies in four cases of plasma cell leukemia”. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 121: 163-166, 2000.





# Cytogenetic and Fluorescence In Situ Hybridization Studies in Four Cases of Plasma Cell Leukemia

Elisabet Lloveras, Francesc Solé, Blanca Espinet, Carles Besses, Antoni Asensio, Eugènia Abella, Soledad Woessner, and Lourdes Florensa

**ABSTRACT:** We present a cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) study, using centromeric probes for chromosomes 3, 7, 11, and 18, *TP53* gene (17p13), and *RB-1* locus (13q14) DNA probes, in four cases of plasma cell leukemia (PCL). Among the four cases, three presented monosomy of the *RB-1* locus and one monoallelic deletion of the *TP53* gene. The present report shows the usefulness of the FISH technique to detect abnormalities not previously observed by conventional cytogenetics. © 2000 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

## INTRODUCTION

Plasma cell leukemia (PCL) is a rare malignant plasma cell disorder first reported in 1904 by Foa [1], which may develop during the course of multiple myeloma (MM)—secondary PCL—or without any prior signs of plasma cell dyscrasia (and is then referred to as a primary PCL). The criteria proposed by Kyle et al. [2] for the diagnosis of PCL included an absolute plasma cell count greater than  $2 \times 10^9/L$ , comprising  $>20\%$  of plasma cells in the peripheral blood smear. The prognosis in PCL is poor, with a median survival range of 2–7 months [3–8]. Cytogenetic studies performed on plasma cell dyscrasias are scarce and difficult because of the low proliferation rate of plasma cells. The proportion of abnormal karyotypes is about 40%, although it ranges from 20% to 60% in different series [9–15]. Numerical abnormalities appear to be hypo- and hyperdiploidy. Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis is an attractive alternative for evaluation of numerical and structural chromosomal changes. It is possible to detect aneuploidies directly on interphase cells. Whereas an abnormal karyotype is found in 40% of MM

patients, recent reports demonstrate the presence of numerical abnormalities in nearly 90% of patients by FISH [16, 17].

We present the cytogenetic findings and FISH results, with chromosome 3, 7, 11, and 18-specific  $\alpha$ -satellite DNA probes, *TP53* gene (17p13), and *RB-1* locus (13q14) DNA probes, in four cases of PCL.

## PATIENTS AND METHODS

### Patients

The clinical data of the four patients with PCL are shown in Table 1.

*Case 1.* A 68-year-old woman was hospitalized because of bone lesions. On admission, hemoglobin was  $104 \times 10^9/g/dL$ , platelets  $523 \times 10^9/L$ , and leukocytes  $19.9 \times 10^9/L$ , with 15% atypical plasma cells. The monoclonal component was Bence-Jones kappa. The bone marrow aspirate presented an atypical plasmocytosis of 80–90%. The patient died 18 days later.

*Case 2.* A 44-year-old woman was hospitalized because of anemia with: hemoglobin  $86 \times 10^9/g/dL$ , platelets  $199 \times 10^9/L$ , and leukocytes  $15 \times 10^9/L$ , with 34% atypical plasma cells. Serum protein electrophoresis showed a monoclonal component IgG Lambda. The bone marrow aspirate presented an atypical plasmocytosis of 95%. The patient died 12 months later.

*Case 3.* A 83-year-old male was hospitalized with multiple adenopathies and hepatomegaly of 5 cm below the

From the Laboratori de Citologia Hematològica/Laboratori de Referència de Catalunya (E. L., F. S., B. E., L. F.), Servei d'Hematologia Clínica (C. B., E. A.), Escola de Citologia Hematològica S. Woessner-IMAS (S. W.), Servei d'Hematologia, Hospital Sant Camil, Sant Pere de Ribes (A. A.), Unitat d'Hematologia, Hospital del Mar, Barcelona, Spain.

Address reprint requests to: Elisabet Lloveras Caballé, Laboratori de Citologia Hematològica, Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital del Mar, Passeig Marítim, 25-29, Barcelona 08003, Spain.

Received January 6, 2000; accepted February 25, 2000.

**Table 1** Clinical and biological data in four patients with PCL

Patient no.	Sex/Age	Hb (g/dL)	WBC ( $\times 10^9/L$ )	PC (PB) (%)	PC (BM) (%)	Monoclonal component	$\beta_2$ -micro mg/dL	Survival
1	F/68	$104 \times 10^9$	19.9	15	80–90	Bence-Jones Kappa	2.7	18 days
2	F/44	$86 \times 10^9$	15.0	34	95	IgG Lambda	9.58	12 months
3	M/83	$120 \times 10^9$	10.7	24	54	IgG Lambda	—	6 weeks
4	F/75	$103 \times 10^9$	10.7	26	80	IgG Lambda	—	15 days

*Abbreviations:* Hb, hemoglobin; WBC, white blood cells; PC, plasma cells; PB, peripheral blood; BM, bone marrow;  $\beta_2$ -micro,  $\beta_2$ -microglobulin; F, female; M, male.

costal margin. On admission, hemoglobin was  $120 \times 10^9/g/dL$ , platelets  $83 \times 10^9/L$ , and leukocytes  $10.7 \times 10^9/L$ , with 24% atypical plasma cells. Serum protein electrophoresis showed a monoclonal component IgG Lambda. The bone marrow aspirate presented an atypical plasmocytosis of 54%. The patient died 6 weeks later without any treatment.

*Case 4.* A 75-year-old woman was hospitalized because of a duodenal ulcer. On admission, hemoglobin was  $103 \times 10^9/g/dL$ , platelets  $83 \times 10^9/L$ , and leukocytes  $10.7 \times 10^9/L$ , with 26% atypical plasma cells. The monoclonal component was IgG Lambda. The bone marrow aspirate presented an atypical plasmocytosis of 80%. The patient died 15 days later.

### Conventional Cytogenetics

Chromosome analyses were performed using standard procedures on peripheral blood. Metaphase cells were examined from a 72-hour culture with phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM), and lipopolisaccharide from *E. coli* (LPS). To describe the karyotype, the International System for Chromosome Nomenclature (ISCN) was used [18].

### Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

For FISH studies, air-dried slides from conventional chromosome cultures were used. SpectrumOrange direct-labeled chromosomes 3 and 7-specific  $\alpha$ -satellite DNA probes, SpectrumGreen direct-labeled chromosomes 11 and 18-specific  $\alpha$ -satellite DNA probes, SpectrumOrange direct-labeled *TP53* gene and SpectrumOrange direct-labeled *RB-1* locus (band 13q14) (CEP 3, CEP 7, CEP 11, CEP 18, LSI p53, and LSI 13; Vysis, Downers Grove, IL, USA) were used. The technique was performed as described in the proceedings supplied by the manufacturer. Slides were counterstained with DAPI II and analyzed in a

Nikon Eclipse 600 fluorescence microscope. Cutoff levels for the diagnosis of monosomy and trisomy were defined by adding two standard deviations to the mean of the frequency of blood cells with one and three FISH signals for each DNA probe in ten normal specimens tested. We have considered monosomy or monoallelic deletion when the number of cells with one FISH signal was greater than or equal to 10% and trisomy when the number of cells with three FISH signals was greater than or equal to 4%. For centromeric probes, a minimum of 500 nuclei were analyzed and for locus-specific probes, a minimum of 100 nuclei were analyzed in normal specimens and patient samples.

### RESULTS

Table 2 shows the cytogenetic and FISH findings.

#### Conventional Cytogenetics

On stimulated peripheral blood samples, we detected a normal karyotype in two patients (cases 1 and 4) and an abnormal karyotype in the remaining two (cases 2 and 3). Case 2 was previously reported [12].

#### FISH Studies

Monosomy 13 (as assessed by deletion of the *RB* gene) was detected in three patients (cases 1, 2, and 3). In case 3, we confirmed the monosomy 13 detected by conventional cytogenetics using the probe for the *RB* gene; in case 2, we observed a monoallelic deletion of the *TP53* gene, an anomaly not previously suspected by conventional cytogenetics. In case 4, we detected trisomy for chromosomes 3 and 18.

### DISCUSSION

Cytogenetic aberrations in PCL range from 20% to 60% in different series [2, 4, 8, 10, 11, 13, 15]. Several reasons for the low rate of clonal karyotype abnormalities have been

**Table 2** Cytogenetic and FISH results in four patients with PCL

Patient no.	Cytogenetic results	FISH CEP 3	FISH CEP 7	FISH CEP 11	FISH CEP 18	FISH LSI p53	FISH LSI RB
1	46,XX[20]	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	M (40%)
2	43,XX,-8,-13,-22[3]/46,XX[6]	ND	ND	ND	ND	M (18%)	M (42%)
3	45,XY,-13[7]/46,XY[10]	ND	ND	ND	ND	Normal	M (16%)
4	46,XX[20]	T (35%)	Normal	Normal	T (28%)	ND	ND

*Abbreviations:* CEP 3 and 7, SpectrumOrange direct-labeled chromosome 3 and 7-specific  $\alpha$ -satellite DNA probes; CEP 11 and 18, SpectrumGreen direct-labeled chromosome 11 and 18-specific  $\alpha$ -satellite DNA probes, LSI RB, SpectrumOrange direct-labeled *RB-1* locus (13q14 region); LSI p53, SpectrumOrange direct-labeled *TP53* locus (17p13.1 region); M, monosomy; T, trisomy; ND, not done.

discussed; one of the most important aspects seems to be the low proliferative activity of the involved B-cell clone. Thus, one may assume that the cells examined cytogenetically are not plasma cells and the metaphases studied have been derived from other cell lineages. Chromosome studies have revealed that most common nonrandom chromosomal abnormalities involved in PCL are rearrangements of 14q32, 19p13, and chromosome 1 [5–7, 9–14, 19]. In addition, the presence of aneuploid cells was described for the first time when cells with an abnormal DNA content were detected by flow cytometry [20] and later using interphase FISH techniques [16, 17, 21]. In PCL patients, the presence of numerical abnormalities detected by FISH confirms that the diploid karyotypes detected using conventional cytogenetics probably did not represent those of plasma cells.

Pérez-Simón et al. [21] studied the prognostic value of numerical chromosome aberrations in MM by FISH with 15 different chromosome probes. They concluded that trisomies for chromosomes 6, 9, and 17 were associated with prolonged survival and loss of chromosome 13 was related to a poor performance status. In addition, some reports observed that loss of chromosome 13 and *TP53* mutations/deletions were associated with aggressive plasma cell dyscrasias, suggesting a role for these lesions in tumor progression rather than initiation [22–24]. Recently, Avet-Loiseau et al. [25], detected an incidence of chromosome 13 monosomy of 70% in a group of 20 patients with MM and a previous monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) history versus 31% in de novo MM. They concluded that monosomy 13 seems to be rather infrequent in MGUS, whereas it is found in 40% of MM and in 70% of post-MGUS MM and thus is a good candidate for the malignant transformation of myeloma cells.

Plasma cell leukemia displays a wide range of clinical and biologic differences compared with MM, as reported by García-Sanz et al. [8]. One of these aspects is a very high incidence of chromosome 13 monosomies in PCL (85%) in contrast to the lower incidence detected in MM (26%). This abnormality has been associated with a short survival in MM patients [18, 26]. We detected monosomy 13 (as assessed by deletion by the *RB* gene) in three of four patients (75%) with PCL. All cases studied showed a short survival. However, because most chromosome 13 abnormalities are monosomies or large deletions, many genes may be implicated in this oncogenic process.

In MM patients, deletions of the *TP53* gene have been associated with a shorter survival time compared with those without this deletion [24]. We detected a monoallelic deletion of the *TP53* gene only in one patient, suggesting that the poor outcome was not related to involvement of the above-mentioned gene.

We detected an abnormal karyotype in all patients combining both methodologies. In two patients who presented a normal karyotype on stimulated peripheral blood, we performed FISH technique using  $\alpha$ -satellite DNA probes for chromosomes 3, 7, 11, and 18, *TP53* gene, and *RB-1* locus (13q14) because aneuploidies of such chromosomes and regions are frequently involved in plasma cell dyscrasias [16, 17, 24].

The present report shows that abnormal karyotypes are frequent in PCL. Due to the low proliferative activity of the involved clone in PCL and other plasma cell dyscrasias, FISH techniques demonstrate their usefulness to detect numerical abnormalities not observed with conventional cytogenetics. The application of the *RB-1* probe could be considered mandatory in patients with plasma cell dyscrasias because it would help to define the prognosis.

This work has been supported by the grant FIS 97/0655 and 99/0574 from the “Ministerio de Sanidad y Consumo”, Spain. We want to thank Rosa Ma. Vilà and Rosa Navarro for their excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Foa P (1904): Sulla produzione cellulare nell'inflamazione ed in altri processi analoghi specialmente in ciò che si riferisce alle plasmacellule. *Folia Haematol* 1:166–167.
2. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED (1974): Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 133:813–818.
3. Kosmo MA, Gale RP (1987): Plasma cell leukemia. *Semin Hematol* 24:202–208.
4. Bernasconi C, Castelli G, Pagnucco G, Brusamolino E (1989): Plasma cell leukemia: a report on 15 patients. *Eur J Haematol* 43:76–83.
5. Dimopoulos MA, Palumbo A, Delasalle KB, Alexanian R (1994): Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* 88:754–759.
6. Richter J, Swedin A, Olofsson T, Johansson B, Akerman M, Winqvist I (1995): Aggressive course of primary plasma cell leukemia with unusual morphological and cytogenetic features. *Ann Hematol* 71:307–310.
7. Panizo C, Cuesta B, Rocha E (1998): Primary plasma cell leukemia with unusual morphology and complex karyotype. *Haematologica* 83:849–850.
8. García-Sanz R, Orfao A, González M, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simón JA, Rasillo A, San Miguel JF (1999): Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 93:1032–1037.
9. Ueshima Y, Fukuhara S, Nagai K, Takatsuki K, Uchino H (1983): Cytogenetic studies and clinical aspects of patients with plasma cell leukemia and leukemic macroglobulinemia. *Cancer Res* 43:905–912.
10. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR (1985): The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amyloidosis. *Blood* 66:380–390.
11. Gutensohn K, Weh HJ, Walter TA, Hossfeld DK (1992): Cytogenetics in multiple myeloma and plasma cell leukemia: simultaneous cytogenetic and cytologic studies in 51 patients. *Ann Hematol* 65:88–90.
12. Pérez Losada A, Woessner S, Solé F, Florensa L, Bonet C (1994): Chromosomal and in vitro culture studies in a case of primary plasma cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 76:36–38.
13. Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Takashima T (1996): Non-random chromosomal rearrangements and their implications in clinical features and outcome of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 21:25–30.
14. Azar GM, Gogineni SK, Hyde P, Verma RS (1997): Highly complex chromosomal abnormalities in plasma cell leukemia as detected by FISH technique. *Leukemia* 11:772–774.

15. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, Ferreira C, Ardanaz MT, Fraile A, Carrasco JL, Solé F, Cuesta B, Gullón A (1997): Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Gene Chromosom Cancer* 18:84–93.
16. Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R, Lechner K, Ludwig H, Huber H (1995): Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55:3854–3859.
17. Zandecki M, Lai JL, Facon T (1996): Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 94:217–227.
18. Milelman F (1995): Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). S. Karger, Basel.
19. Maynadie M, Mugneret F, Guy H, Turc-Carel C (1990): Translocations involving 5q35 may also be associated with plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* 76:156.
20. Latreille J, Barlogie B, Johnston D, Drewinko B, Alexanian R (1982): Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood* 59:43–51.
21. Pérez-Simón JA, Garcia-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A (1998): Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 91:3366–3371.
22. Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, Gu W, Nilsson K, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A, Dalla-Favera R (1994): Inactivation of tumor suppressor genes, p53, and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 8:758–767.
23. Schoch C, Rieder H, Stollmann-Gibbels B, Freund M, Tischler HJ, Silling-Engelhardt G, Fonatsch C (1995): 17p anomalies in lymphoid malignancies: diagnostic and prognostic implications. *Leuk Lymphoma* 17:271–279.
24. Drach J, Ackermann J, Fritz E, Krömer E, Schuster R, Gisslinger H, DeSantis M, Zojer N, Fiegl M, Roka S, Schuster J, Heinz R, Ludwig H, Huber H (1998): Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 92:802–809.
25. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, Grosbois B and Régis Bataille on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome (1999): Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood* 94:2583–2589.
26. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer J (1995): Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 86:4250–4256.

## **ANNEX 1**

**Article 1-annex 1:** “May-Grünwald Giemsa-Fluorescence in situ hybridization (MGG-FISH) technique applied to a plasma cell leukemia”. *Haematologica* 84: 568-569, 1999.

## References

1. Carlo Stella C, Cazzola M, De Fabritiis P. CD34 positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica* 1995; 80:367-87.
2. Pui CH, Hancock ML, Head DR, et al. Clinical significance of CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1993; 82:889-94.
3. Borowitz MJ, Shuster JJ, Civin CI, et al. Prognostic significance of CD 34 expression in childhood B-precursor acute lymphocytic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 1990; 8:1389-98.
4. Cascavilla N, Musto P, D'Arena G, Ladogana S, Matera R, Carotenuto M. Adult and childhood acute lymphoblastic leukemia: clinico-biological differences based on CD34 antigen expression. *Haematologica* 1997; 82:31-7.
5. Vanhaeke DR, Benè MC, Garand G, Faure GC, Geil T. Expression and long-term prognostic value of CD34 in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1995; 20:137-42.
6. Selleri C, Notaro R, Catalano L, Fontana R, Del Vecchio L, Rotoli B. Prognostic irrelevance of CD34 in acute myeloid leukemia. *Br J Haematol* 1992; 82:479-81.
7. Ciolli S, Leoni F, Caporale R, Pascarella A, Salti F, Rossi-Ferrini P. CD34 expression fails to predict the outcome in adult acute myeloid leukemia. *Haematologica* 1993; 78:151-5.
8. Del Poeta G, Stasi R, Venditti A, et al. Prognostic value of cell marker analysis in de novo acute myeloid leukemia. *Leukemia* 1994; 8:388-94.
9. Sperling C, Buchner T, Creutzig U, et al. Clinical, morphologic, cytogenetic and prognostic implications of CD34 expression in childhood and adults de novo AML. *Leuk Lymphoma* 1995; 17:417-26.

### May-Grünwald Giemsa-fluorescence *in situ* hybridization technique applied to a plasma cell leukemia

Sir,

Plasma cell leukemia (PCL) is a rare malignant plasma cell disorder which is characterized by the presence of more than  $2 \times 10^9$  plasma cells/L in the peripheral blood.<sup>1,2</sup> Cytogenetic studies performed on plasma cell dyscrasias are scarce and difficult because of the low proliferation rate of plasma cells. Whereas an abnormal karyotype is found in 40% of multiple myeloma (MM) patients, recent reports demonstrate the presence of numerical abnormalities in nearly 90% of patients analyzing interphase nuclei by the fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique.<sup>3,4</sup> Interphase cytogenetic analysis is also possible, on previously stained slides, using the May-Grünwald-Giemsa-FISH (MGG-FISH) technique.<sup>5</sup>

We recently cared for a 75-year-old woman because of a duodenal ulcer. On admission her hemoglobin was  $10.3 \times 10^9$  gr/L, platelet count  $83 \times 10^9$ /L and leukocyte count  $10.7 \times 10^9$ /L with 26% atypical plasma cells. Serum protein electrophoresis showed a type IgG $\lambda$  monoclonal component. The bone marrow aspirate revealed an 80% atypical plasmacytosis.

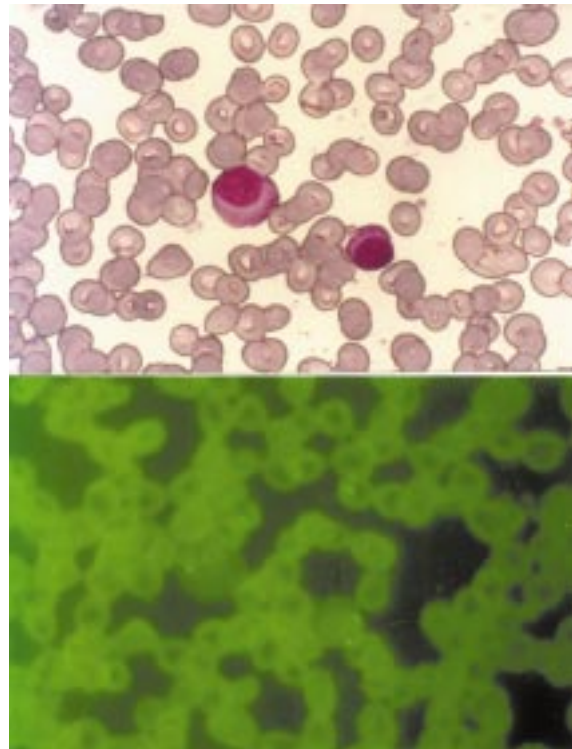


Figure 1. Cytomorphology and interphase FISH of circulating plasma cells from a patient with plasma cell leukemia. In (A), May-Grünwald Giemsa stained plasma cells were identified. In (B), plasma cells were relocated after FISH with spectrum green direct labeled chromosome 18 specific  $\alpha$ -satellite DNA probe. Two hybridization signals are present for chromosome 18.

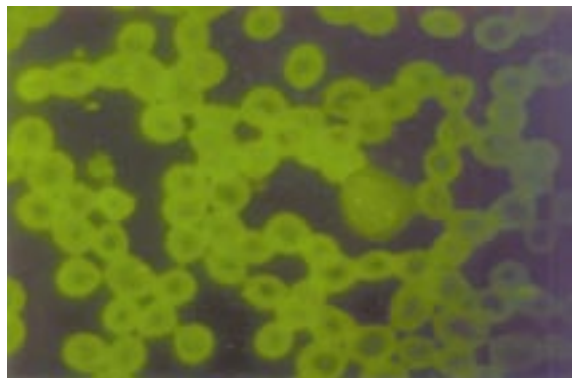


Figure 2. A May-Grünwald Giemsa stained plasma cell was identified and relocated after FISH with a spectrum green direct labeled chromosome 18 specific  $\alpha$ -satellite DNA probe. Three hybridization signals are present for chromosome 18.

The patient was diagnosed as having plasma cell leukemia and died 15 days later without receiving any treatment.

Chromosome analysis was performed on a 72-hour culture of peripheral blood with phytohemagglutinin (PHA) and revealed a normal karyotype in 40 mitoses, probably due to stimulation of non-malignant cells.

We performed FISH using specific centromeric probes for chromosomes 3, 7, 11 and 18 on cultured peripheral blood cells, because these are frequently involved in plasma cell dyscrasias.<sup>3,4,6</sup> We evaluated 500 nuclei per probe. Trisomy 3 was detected in 34.8% of the cells and trisomy 18 in 27.2%. Disomy for chromosomes 7 and 11 (94.2% and 91.2% of the cells respectively) was observed.

The combination of MGG staining and FISH with a centromeric probe for chromosome 18 was performed as described by Anastasi *et al.*<sup>5</sup> Previously photographed cells were relocated for evaluation of FISH signals on peripheral blood lymphocytes and plasma cells. One hundred and fifty-two cells were studied: 82/116 plasma cells and 10/36 lymphocytes could be tested for FISH signals. Trisomy 18 was found in 65% of the plasma cells (52/82) and in 1 out of 10 lymphocytes (Figures 1 and 2). We observed that not all but a large proportion of plasma cells had trisomy 18, suggesting that the numerical cytogenetic abnormality could be a secondary change. In addition, we detected trisomy 18 in only one out of ten circulating lymphocytes. Although clonotypic rearrangements as defined by the bone marrow plasma cells in myeloma have been reported among blood lymphocytes, the precise nature of the peripheral blood B cells in MM remains unclear.<sup>7-10</sup> Our results suggest that peripheral blood lymphocytes probably belong to the malignant clone but we can not exclude a false FISH signal.

The present report shows the usefulness of the FISH technique in detecting numerical abnormalities not observed by conventional cytogenetic studies and that the combined MGG-FISH technique is a sensitive test for identifying the cell-lineage of cytogenetic abnormalities.

Elisabet Lloveras, Francesc Solé, Blanca Espinet,  
Lourdes Florensa, Antonia Vázquez, \* Soledad Woessner

Laboratori de Citologia Hematològica, Unitat d'Hematologia 1973,  
Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital de l'Esperança;  
Servei d'Hematologia, Unitat d'Hematologia 1973; \*Servei de  
Medicina Intensiva. Hospital del Mar (IMAS), Institut Municipal  
d'Investigació Mèdica (IMIM), Barcelona, Spain

### Keywords

MGG-FISH, cytogenetics, plasma cell leukemia, PCL, FISH

### Acknowledgments

This work was supported by grant FIS 97/0655 from the "Ministerio de Sanidad y Consumo", Spain.

### Correspondence

Elisabet Lloveras Caballé, Laboratori de Citologia Hematològica, Unitat d'Hematologia 1973, Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital de l'Esperança, Av. St Josep de la Muntanya, 12, Barcelona 08024, Spain. Phone: international + 34-93-285-02-00 ext. 2189-2243 – Fax: international + 34-93-210-84-06 – E-mail: e0037@imas.imim.es

### References

- Bernasconi C, Castelli G, Pagnucco G, Brusamolino E. Plasma cell leukemia: a report on 15 patients. *Eur J Haematol* 1989; 43(Suppl 51):76-83.
- Dimopoulos DA, Palumbo A, Delasalle KB, Alexanian R. Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* 1994; 88:754-9.
- Drach J, Schuster J, Nowotny H, et al. Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 1995; 55(17):3854-9.
- Zandecki M, Lai JL, Facon T. Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 1996; 94:217-27.
- Anastasi J, Vardiman JW, Rudinski R, et al. Direct correlation of cytogenetics findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1991; 77:2456-62.
- Drach J, Angerler J, Schuster J, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 1995; 86:3915-21.
- Kay N, Leong T, Van Ness B, et al. Circulating CD19+ blood cells in multiple myeloma: phenotypic and molecular analysis of ECOG trial E9486/9487. *Blood* 1995; 86(suppl.1):275a.
- Pilarski L, Masellis-Smith A, Szczepek A, Mant MJ, Belch AR. Circulating clonotypic B cells in the biology of multiple myeloma: speculations on the origin of myeloma. *Leuk Lymphoma* 1996; 22:375-83.
- Billadeau D, Van Ness B, Kimlinger T, et al. Clonal circulating cells are common in plasma cell proliferative disorders: a comparison of monoclonal gammopathy of undetermined significance, smoldering multiple myeloma and active myeloma. *Blood* 1996; 88:289-96.
- Zandecki M, Bernardi F, Genevieve F, et al. Involvement of peripheral blood cells in multiple myeloma: chromosome changes are the rule within circulating plasma cells but not within B lymphocytes. *Leukemia* 1997; 11:1034-9.

### Cytogenetic and in situ hybridization findings in 27 patients with atypical B-cell chronic lymphocytic leukaemia

Sir,

Atypical B-CLL (aCLL) is a cytologically differentiated form of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) first described by the FAB group.<sup>1</sup> aCLL is the variant that has 10-55% of large lymphocytes, prolymphocytes and/or centrocytes.<sup>1</sup> The most common cytogenetic abnormality associated with aCLL is trisomy 12.<sup>2-7</sup> Other chromosomal abnormalities involve 4q, 6q21-q23, 11q, t(11;14)(q13;q32), 13q14, 17p and 17q.<sup>4-6,8</sup> The aim of the present study is to describe the cytogenetic findings in a series of 27 aCLL, focusing our interest on the detection of trisomy 12, del(13)(q14) and del(17)(p13) combining conventional cytogenetics (CC) with *in situ* hybridiza-



**Article 2-annex 1:** "A new case of Turner syndrome associated with multiple myeloma". *Cancer Genetics and Cytogenetics* 117 (1): 80-81,2000.



## SHORT COMMUNICATIONS

# A New Case of Turner Syndrome Associated with Multiple Myeloma

Elisabet Lloveras Caballé, Francesc Solé, Carles Besses, Blanca Espinet, and Lourdes Florensa

**ABSTRACT:** A 62-year-old woman with phenotypic stigmata of Turner syndrome and a mosaic cytogenetic pattern, 45,X/45,XX, developed multiple myeloma. The affected cells had a number of karyotypic changes in addition to the loss of the X chromosome. © Elsevier Science, Inc., 2000. All rights reserved.

### INTRODUCTION

Turner syndrome is a female chromosomal disorder due to a complete or partial absence of an X chromosome. According to the study of Kleczkowska et al. [1] with 478 Turner syndrome patients, seven groups can be established: classic, 45,X (52.1%); mosaic 45,X/46,XX (10.9%); mosaic 45,X/47,XXX and other "superfemale" cell lines (4.6%); i(Xq) and i(Xp) (16.1%); r(X) (4.4%); other structural aberrations of the X chromosome (7.7%); and mosaic 45,X/46,XY (4%).

Certain constitutional chromosomal abnormalities are known to increase the risk of malignancy or decrease treatment tolerance or both [2]. For example, 11p- syndrome is associated with a marked risk for Wilms tumor, a congenital neoplasm of the kidney; 13q- syndrome is associated with a markedly elevated risk for retinoblastoma, a congenital neoplasm of the eye; and trisomy 21 is associated with a strikingly elevated risk of leukemia [3].

The association of Turner syndrome and cancer was documented by Hasle et al. [4] in a cohort of 597 women. They observed a total of 21 neoplasms corresponding to a relative risk of cancer of 1.1.

Herein, we report a patient with Turner syndrome diagnosed with multiple myeloma (MM).

---

*From the Laboratori de Citologia Hematològica, Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital de l'Esperança, Servei d'Hematologia Clínica, Unitat d'Hematologia 1973, Hospital del Mar, IMIM, Barcelona, Spain.*

*Address reprint requests to: Elisabet Lloveras Caballé, Laboratori de Citologia Hematològica, Unitat d'Hematologia 1973, Laboratori de Referència de Catalunya, Hospital del Mar., Paseig Marítim, 15-17, Barcelona 08003, Spain.*

*Received April 8, 1999; accepted June 17, 1999.*

### CASE REPORT

A 62-year-old woman was referred to our hospital in July 1998 for microcytic anemia and increased erythrocyte sedimentation rate (ESR). On physical examination, a phenotype compatible with Turner syndrome was observed.

The patient had a thyroid gland carcinoma 6.5 years earlier and received iodine 131, achieving a complete response. In December 1995, she had a breast cancer (stage I infiltrating ductal carcinoma) treated by a modified radical mastectomy and subsequently tamoxifen. In July 1998, laboratory studies performed because of asthenia revealed a hemoglobin of 74 g/L, a mean corpuscular volume of 95.5 fL, a platelet count of  $170 \times 10^9/L$ , and a leukocyte count of  $5.2 \times 10^9/L$  with a normal differential count. ESR was 130 mm/first hour. Creatinine and calcium serum levels were normal.  $\beta_2$ -Microglobulin level was 14.2 mg/L. An M protein of 94.7 g/L was detected on protein electrophoresis, and immunofixation revealed an immunoglobulin G (IgG) of 14.300 mg/dL and a kappa light chain. Urine immunofixation demonstrated elimination of IgG and kappa light chains (24-hour proteinuria: 200 mg). A radiological survey showed generalized osteoporosis, but no lytic bone lesions were seen. Bone marrow aspirate showed 70–80% atypical plasma cell infiltration with prominent nucleoli and a plasmablastic morphology.

Cytogenetic analysis was carried out on peripheral blood and on bone marrow. A 72-hour peripheral blood culture stimulated with phytohemagglutinin by standard procedures was performed to identify the constitutional karyotype. Fresh heparinized bone marrow aspirate was set up for short-term culture. Metaphase cells were karyotyped according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature [5].

Cytogenetic findings were as follows: in the peripheral blood culture, a mosaicism was observed: 45,X[6]/46,XX[14]; in the bone marrow culture, the cytogenetic study revealed three clones: 51,Xc,del(1)(p21),add(4)(q35),+5,+9,+add(11)(p15),+14,+15,+19,+20,-21[2]/45,Xc[9]/46,XX[8].

Therefore, the patient presented a Turner syndrome associated with multiple myeloma IgG-kappa stage IIIA of Durie and Salmon. She has received three courses of melphalan and prednisone, with moderate anemia persisting.

## DISCUSSION

Several hematopoietic abnormalities have been described in association with Turner syndrome: acute nonlymphoblastic leukemia [1, 2], acute lymphoid leukemia [2], and myelodysplastic syndromes [6, 7]. However, reviewing the literature, we only found one case of MM associated with sideroblastic anemia in a Turner syndrome patient [8].

In our case, the suspected diagnosis of Turner syndrome was confirmed on the peripheral blood karyotype (mosaic 45,X/46,XX). The cytogenetic study of the bone marrow revealed a 46,XX karyotype without any changes, a 45,XO karyotype and a 51,XO karyotype with gain of chromosomes 5, 9, 14, 15, 19, and 20, loss of 21, and structural changes in chromosomes 1, 4, and 11. These results suggest that the abnormal clone was restricted to the monosomic cell line. Numerical abnormalities such as hypo- and hyperdiploid cells are common changes in multiple myeloma patients [9–12]. Pérez-Simón et al. [12], using the interphase fluorescence in situ hybridization technique with 15 different chromosome probes, detected an incidence of numerical chromosome abnormalities of 81%. In addition, they found a correlation between trisomies 6, 9, and 17 with a prolonged survival, and, in contrast, overall survival was lower in cases with monosomy 13. Our patient presented +9, a chromosome gain related to a better survival, although her follow-up is still too short to draw any conclusions about this fact.

There are few available studies of the risk of cancer in Turner syndrome, and there is no proof of an increased risk of multiple myeloma. Hasle et al. [4], in a Danish study of 597 females with Turner syndrome, detected a total of 21 neoplasms corresponding to a relative risk of cancer of 1.1. However, in this cohort, no case of MM was reported. Hasle [7] emphasized that the routine use of cytogenetic investigations in leukemia may lead to the recognition of constitutional abnormalities that may exaggerate the association between congenital abnormalities (such as sex-chromosome abnormalities) and leukemia [7].

In summary, we present a new case of a hematologic malignancy associated with Turner syndrome. To evaluate whether Turner-syndrome patients have an increased risk of hematological neoplasms, cohort studies should be performed.

This work has been supported by the grant FIS 97/0655 from the Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain.

## REFERENCES

1. Kleczkowska A, Dmoch E, Kubien E, Fryns JP, Van den Berghe H (1990): Cytogenetic findings in a consecutive series of 478 patients with Turner syndrome: the Leuven experience 1965–1989. *Genet Couns* 1:227–233.
2. Erzsebet B, Andrea N, Robert S, Eva O (1996): Association of congenital chromosome abnormalities and malignant diseases. *Orv Hetil* 137:227–231.
3. Sandberg AA (1980): *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia*. Elsevier North Holland, New York, pp. 121–123.
4. Hasle H, Olsen JH, Nielsen J, Hansen J, Friedrich U, Tommerup N (1996): Occurrence of cancer in women with Turner syndrome. *Br J Cancer* 73:1156–1159.
5. Mitelman F (1995): *Guidelines for Cancer Cytogenetics: Supplement to an International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)*. S. Karger, Basel.
6. Foster LA, Abboud MR, Ashby B, Taylor AB, Barredo J, Lazarchick J, Laver J (1996): Myelodysplasia associated with Turner syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol* 18:299–301.
7. Hasle H (1997): Turner syndrome and myelodysplastic syndrome: no reason to alert. *J Pediatr Hematol Oncol* 19:179.
8. Itoh K, Igarashi T, Wakita H, Minamihisamatsu M (1992): Sideroblastic anemia associated with multiple myeloma in Turner's syndrome. *Intern Med* 31:483–485.
9. Drach J, Schuster J, Nowortny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R, Lechner K, Ludwig H, Huber H (1995): Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55:3854–3859.
10. Zandecki M, Lai JL, Facon T (1996): Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol* 94:217–227.
11. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Otero MD, Ferreira C, Ardanaz MT, Fraile A, Carrasco JL, Solé F, Cuesta B, Gullon A (1997): Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chromosom Cancer* 18:84–93.
12. Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A (1998): Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 91:3366–3371.

**Article 3-annex 1:** “Técnicas de hibridación *in situ* (HIS). Fundamento y aplicaciones en neoplasias hematológicas”. Sangre 44: 261-267, 1999.

## **4. DISCUSSIÓ**

#### **4.1. Contribució de la citogenètica convencional i la hibridació in situ a l'estudi de les gammopaties de significat incert (article 1).**

Les alteracions citogenètiques de les cèl.lules plasmàtiques dels pacients afectes de GMSI han estat motiu d'estudi aquests últims anys. Fins a l'actualitat, només en el treball publicat per Calasanz i col, 1997a, s'han descrit anomalies cromosòmiques mitjançant la tècnica de citogenètica convencional en la GMSI. Aquests autors troben alteracions en el 25% dels pacients, entre les que es destaquen la implicació de 14q32, del(16)(q22) i del(22)(q11).

Mitjançant les tècniques d'hibridació in situ que poden detectar alteracions en cèl.lules en interfase (article 3-annex 1), es confirma que aquests pacients presenten alteracions citogenètiques (Drach i col, 1995; Zandecki i col, 1995; Konigsberg i col, 1999; Fonseca i col, 2002). El fracàs en la obtenció de cariotips alterats s'ha associat al baix índex de proliferació de la cèl.lula plasmàtica, així com al baix número de cèl.lules plasmàtiques presents en aquest tipus de patologia (Greipp i col, 1983; Boccadoro i col, 1984). Aquestes dades suggereixen que els cariotips estudiats en pacients afectes de GMSI no representen la cèl.lula plasmàtica i que amb gran probabilitat pertanyen a cèl.lules normals.

Per resoldre aquests inconvenients, en el present estudi s'ha aplicat el mètode MAC i la tècnica de FISH en 50 pacients amb GMSI. El mètode MAC (morfologia, anticòs, cromosoma) permet determinar el llinatge cel.lular de la metafase estudiada i les tècniques d'hibridació in situ fluorescent permeten determinar alteracions citogenètiques en pacients amb cariotip normal per citogenètica convencional.

Els resultats obtinguts mitjançant el mètode MAC demostren que les cèl.lules en divisió pertanyen a l'estirp mieloide o limfoide T. En 6/12 casos el 100% de les metafases eren MOP7+ demostrant que pertanyien a l'estirp mieloide, un d'aquests casos presentava una monosomia 11 per FISH. En 1/12 casos el 100% de les metafases eren CD3+ i per tant va ser associat a limfòcits T, aquests cas també presentava una alteració numèrica per FISH (monosomia 18). Els 5 casos restants eren positius tant per MOP7 com per CD3.

La FISH, amb sondes centromèriques pels cromosomes 3, 7, 11 i 18 (que són els cromosomes més implicats en alteracions numèriques en el mieloma múltiple), aplicada sobre extensions provinents dels cultius de citogenètica convencional, ens va permetre determinar aneuploidies en un 23% dels pacients amb GMSI (6 monosomies i 3 trisomies). Aquestes dades es corresponen a les descrites a la literatura però amb una incidència de pacients alterats inferior. El treball realitzat per Drach i col (1995) utilitzant les mateixes sondes que en el nostre cas detecta un 52% d'alteracions i Zandecki i col (1995) amb sondes centromèriques pels cromosomes 3, 7, 9 i 11 detecten alteracions en el 61% dels pacients estudiats. La raó per la qual s'observen aquests percentatges tan dispars l'hem associat a diferències tècniques. El nostre estudi pretenia determinar una tècnica de FISH que ens permetés la detecció d'alteracions però que fos poc costosa, assumible en la rutina. Per aquest motiu la FISH s'aplicava sobre material total de moll d'os després de la realització de les tècniques citogenètiques. Els estudis referits a la literatura amb un percentatge d'alteracions superior al nostre (Drach i col, 1995; Zandecki i col, 1995; Konigsberg i col, 1999; Fonseca i col, 2002; Rasillo i col, 2003) aïllen les cèl.lules plasmàtiques i sobre aquestes apliquen la FISH. Les diferències entre els treballs determina que hem aplicat una tècnica que probablement emmascara alteracions numèriques en alguns casos. Recentment, Saez i col (2003) han presentat un treball aplicant FISH interfàsica sobre la totalitat cel.lular del moll d'os en GMSI amb resultats similars als nostres.

Per altra banda en un dels pacients amb GMSI i monosomia 11 es va aplicar la tècnica MGG-FISH i va permetre assegurar que l'alteració trobada pertanyia a la cèl.lula plasmàtica (dades no publicades).

També en aquest treball vàrem comparar dades clíniques-biològiques dels pacients que presentaven aneuploidies per FISH *versus* aquells que no en presentaven. El 80% dels pacients que presentaven el pic d'immunoglobulina tipus IgA se'ls detectava monosomia 18, relació estadísticament significativa. Curiosament els pacients amb IgA s'han associat a mal pronòstic (Bladé, 1992). Aquesta dada ens va suggerir que aquests tipus de pacients amb IgA i monosomia 18 podrien ser candidats a

evolucionar a un síndrome limfoproliferatiu. Seguint amb aquesta línia de treball es va elaborar l'estudi del següent treball (article 2).



#### **4.2. Contribució de la citogenètica convencional a l'estudi dels mielomes. Valoració de la monosomia 18 mitjançant tècniques de FISH (article 2 i article 2- annex 1 ).**

En la sèrie de pacients afectes de mieloma múltiple estudiats en aquest treball de tesi, el 41% presentaven anomalies en el cariotip. Aquest percentatge d'alteracions es correspondrien amb el que està descrit a la literatura (Laï i col, 1995; Sawyer i col, 1995; Tricot i col, 1995; Weh i col, 1995; Calasanz i col, 1997a; Smadja i col, 2001; Nilsson i col, 2003).

L'alteració estructural més freqüent referida a la literatura i en la nostra experiència es correspon a reordenaments al cromosoma 1 sense una especificitat de locus clara. La segona alteració estructural més detectada implica la banda 14q32 on es troba situat el gen de la cadena pesada de les immunoglobulines. En la nostra sèrie, 5 de 22 pacients amb un cariotip alterat presentaven una alteració a 14q32 (18%), dades similars a les descrites per altres autors. Els "partners" implicats ja havien estat descrits a la literatura: 11q13; 8q24 i 16q23. La incidència d'aquestes alteracions per tècniques de citogenètica convencional es troba entre el 20 i el 40%, encara que per tècniques d'hibridació *in situ* és del 75% (Hallek i col, 1998).

L'alteració numèrica més freqüent és la monosomia 13 que l'hem detectada en el 23% dels pacients. A la literatura està descrit que aquesta alteració es troba entre el 15 i el 20% dels casos mitjançant tècniques de citogenètica convencional i augmenta fins al 50% usant tècniques de FISH. Recentment, Smadja i col (2001), han trobat que la monosomia 13 no seria un factor pronòstic independent mentre que el factor pronòstic més important seria la hipodiploidia. Nosaltres vàrem analitzar el número de cromosomes (ploidia) en els pacients que presentaven monosomia 13 i la supervivència. De 5 pacients amb monosomia 13, tres estaven en seguiment i només se'n varen poder valorar dos. El pacient amb hiperdiploidia i monosomia 13 presentava una supervivència de 7 anys, en comparació del pacient amb hipodiploidia i monosomia 13 que va presentar una supervivència de 3 mesos. Aquestes dades recolzarien la hipòtesis d'Smadja i col (2001) però únicament amb dos pacients no es pot elaborar una conclusió.

Per altra banda, mitjançant tècniques de FISH amb sondes de seqüència única pel gen de la ciclina D1 es van analitzar 9 pacients amb cariotip normal. Es van trobar tres senyals d'hibridació en el 33% dels pacients que probablement correspondrien a trisomies del cromosoma 11 (Hoechtlen-Vollmar i col, 2000).

Basant-nos en les dades referides a la literatura, que relacionen la presència d'IgA i curs clínic agressiu (Bladé i col, 1992), es va realitzar la FISH amb una sonda centromèrica pel cromosoma 18. L'objectiu era seguir el nostre treball previ en malalts amb GMSI que associava de forma estadísticament significativa la presència de monosomia 18 en GMSI de tipus IgA. Indirectament, les dades suggerien que aquests pacients amb GMSI i monosomia 18 podrien representar un grup de mal pronòstic (article 1). Es va aplicar la FISH a 22 pacients: 3/22 (14%) presentaven monosomia 18 i 3/22 (14%) presentaven trisomia/tetrasomia 18. Dels tres casos amb monosomia 18, dos es mantenen estables fins a l'últim control i un va presentar una supervivència de 9 mesos i BJ+. Un pacient amb LCP també va presentar una monosomia 18 detectada per citogenètica convencional i una supervivència d'un mes. Amb aquestes dades la relació monosomia 18 i IgA no va poder ser confirmada encara que dos pacients amb monosomia 18 presentaven un curs agressiu.

Un dels casos amb MM presentava un mosaic 45,X/46,XX constitucional que no s'havia detectat a la pacient fins que no es va fer una citogenètica medul·lar en el curs de l'estudi del seu mieloma (article 2-annex 1). Aquest pacient presentava altres alteracions citogenètiques pròpies del mieloma que únicament es van detectar en la línia 45,X. Hasle i col (1997) van estudiar el risc de desenvolupar algun tipus de càncer en dones amb síndrome de Turner. En aquest estudi no hi havia cap cas de mieloma múltiple. Aquest investigador conclou que l'ús de la citogenètica convencional en neoplàsies hematològiques pot conduir al reconeixement d'alteracions constitucionals que no haurien estat detectades per ser compatibles amb un fenotip normal. Això faria que s'accentuessin les relacions entre alteracions congènites i neoplàsies hematològiques.

#### **4.3. Contribució de la citogenètica convencional i la FISH a l'estudi de la leucèmia de cèl.lules plasmàtiques (article 2, article 3 i article 1-annex 1).**

La leucèmia de cèl.lules plasmàtiques (LCP) és una entitat molt infreqüent. Hi ha poques sèries de pacients afectes de leucèmia de cèl.lules plasmàtiques que s'hagin estudiat per citogenètica convencional. Avet-Loiseau i col (2001b) van publicar una sèrie de 40 LCP amb alteracions en el 68% dels pacients. En la nostra sèrie de 7 pacients amb LCP, el 71% (5/7) presenten alteracions al cariotip detectades per citogenètica convencional. Als dos pacients restants, amb un cariotip normal, se'ls va aplicar la tècnica de FISH i es van evidenciar alteracions. Per tant, tots els pacients en la nostra sèrie presentaven anomalies citogenètiques (100%).

Dels cinc pacients que presentaven un cariotip alterat, quatre van manifestar una hipodiploidia amb pèrdues del cromosoma 13 en tots ells i una curta supervivència (de 15 dies a 12 mesos). En el mieloma múltiple, la hipodiploidia s'ha associat amb una curta supervivència (Calasanz i col, 1997b; Smadja i col, 2001; Fonseca i col, 2003). Les nostres dades estan d'acord amb les publicades per Avet-Loiseau i col (2001b) en que conclouen que els pacients amb leucèmia de cèl.lules plasmàtiques presenten un perfil amb hipodiploidia, pseudodiploidia i monosomia 13 que pot explicar la curta supervivència d'aquests pacients.

Per altra banda, en la nostra experiència i en la referida a la literatura, l'alteració estructural més freqüent és la presència de reordenaments al cromosoma 1 sense locus específic. Les bandes més freqüentment implicades en pacients afectes de mieloma, descrites a la literatura, són les següents: 1q10 (14%), 1p11 (8%), 1q21 (7%), 1q11 (6%) i 1q22 (5%) (Nilsson i col, 2003). Aquestes alteracions acostumen a donar-se en estadis avançats de la malaltia interpretant-se com a translocacions cromosòmiques secundàries.

En un cas es va observar una alteració a 14q32 i en aquest pacient el "partner" implicat era el cromosoma 1.

Mitjançant tècniques d'hibridació in situ es va poder determinar la presència d'alteracions numèriques en un pacient, aquestes van ser: trisomia 3 i

---

trisomia 18. També es van detectar pèrdues monoal·lèliques del gen del RB en un altre pacient.

Per una altra banda, es va realitzar l'estudi d'un cas de leucèmia de cèl·lules plasmàtiques mitjançant la tècnica de MGG-FISH (article 1-annex 1). El 65% de les cèl·lules plasmàtiques presentaven una trisomia 18, prèviament detectada per FISH centromèrica, i curiosament es va trobar la mateixa alteració citogenètica en un únic limfòcit. Zandecki i col (1997) observen que a diferència de les cèl·lules mielomatoses, els limfòcits B, CD20+, no presenten alteracions citogenètiques. Nickenig i col (2001) combinant les tècniques de hibridació in situ fluorescent amb la tinció citomorfològica estàndard de May-Grünwald-Giemsa (MGG-FISH) i amb immunofenotip (FICTION) van determinar que únicament les cèl·lules plasmàtiques eren aberrants en el mieloma múltiple, ni les CD34+, ni les línies cel·lulars mieloides, limfoides o eritroides estarien involucrades en el clon maligne. Tot i així, Zojer i col (2002) evidencien que en el MM i la GMSI les cèl·lules B CD19+ circulants estan altament relacionades amb les cèl·lules plasmàtiques malignes. Les nostres dades podrien suggerir la implicació del limfòcit amb alteracions citogenètiques però el fet de detectar-se en una sola cèl·lula no permet treure conclusions.

## **5. CONCLUSIONS**

## **1. Consideracions generals**

- 1.1. El percentatge de malalts afectes d'una gammapatia monoclonal amb alteracions cromosòmiques detectades per citogenètica convencional varia segons el grau de malignitat de la discrasia plasmocel·lular. En la nostra experiència són del 0% en la GMSI, del 41% en el mieloma múltiple i del 71% en la LCP.
- 1.2. Les tècniques d'hibridació in situ fluorescent permeten determinar alteracions en pacients amb GMSI, MM o LCP citogenèticament normals ja que en aquests casos les metafases estudiades no es corresponen amb la cèl·lula plasmàtica.
- 1.3. La citogenètica aplicada en l'anàlisi de neoplàsies hematològiques pot desvetllar alteracions congènites que haurien passat desapercebudes per tenir un efecte fenotípic no detectable.

## **2. Gammapaties monoclonals de significat incert**

- 2.1. Els estudis citogenètics en les GMSI no són informatius degut a que les cèl·lules en mitosis no corresponen a la cèl·lula plasmàtica sino que pertanyen a la línia mieloide o limfoide T.
- 2.2. La tècnica de FISH ha permès detectar alteracions en el 23% de les GMSI.
- 2.3. L'aplicació de la FISH sobre la cel·lularitat total és una tècnica fiable, tal com s'ha comprovat per MGG-FISH.
- 2.4. L'aplicació de la FISH sobre la cel·lularitat total del moll d'os possiblement emmascara alguns pacients amb aneuploidies comparant els resultats obtinguts de la literatura que apliquen la FISH sobre poblacions pures de cèl·lules plasmàtiques.
- 2.5. Els pacients amb GMSI que presenten el tipus d'immunoglobulina IgA s'associen de forma estadísticament significativa a la presència de una monosomia 18.

### **3. Mieloma múltiple**

- 3.1. La citogenètica convencional només permet la detecció de cariotips alterats en aproximadament la meitat dels pacients afectes de mieloma múltiple.
- 3.2. Les alteracions estructurals més freqüentment observades en cariotips alterats són reordenaments del cromosoma 1 sense especificitat de locus i reordenaments a 14q32.
- 3.3. L'alteració numèrica més freqüent és la monosomia 13.
- 3.4. L'associació entre monosomia 18 i IgA no ha estat confirmada en aquesta sèrie de pacients afectes de mieloma.

### **4. Leucèmia de cèl.lules plasmàtiques**

- 4.1. El 100% dels pacients afectes de leucèmia de cèl.lules plasmàtiques presenten alteracions citogenètiques.
- 4.2. Els pacients amb leucèmia de cèl.lules plasmàtiques presenten alteracions citogenètiques de mal pronòstic com la hipodiploidia i monosomia 13 que podrien explicar la curta supervivència d'aquests pacients.
- 4.3. La tècnica de MGG-FISH permet determinar en quina cèl.lula està l'alteració citogenètica.

## **6. BIBLIOGRAFIA**



1. Ablashi DV, Chatlynne L, Thomas D, Bourboulia D, Rettig MB, Vescio RA, Viza D, Gill P, Kyle RA, Berenson JR, Whitman Jr JE (2000): Lack of serologic association of human herpesvirus-8 (KSHV) in patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance with and without progression to multiple myeloma. *Blood* 96: 2034-2306.
2. Avet-Loiseau H, Facon T, Daviet A, Godon C, Rapp MJ, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R (1999a): 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. *Cancer Res*; 59: 4546-4550.
3. Avet-Loiseau H, Li JY, Godon C, Morineau N, Daviet A, Harousseau JL, Facon T, Bataille R (1999b): p53 deletion is not a frequent event in multiple myeloma. *Br J Haematol* 106: 717-719.
4. Avet-Loiseau H, Li JY, Morineau N, Facon T, Brigaudeau C, Harousseau JL, Grosbois B, Bataille R (1999c): Monosomy 13 is associated with the transition of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma. *Blood*; 94: 2583-2589.
5. Avet-Loiseau H, Daviet A, Sauner S, Bataille R; Intergroupe francophone du myeloma (2000): Chromosome 13 abnormalities in multiple myeloma are mostly monosomy 13. *Br J Haematol* 111: 1116-1117.
6. Avet-Loiseau H, Gerson F, Magrangeas F, Minvielle S, Harousseau JL, Bataille R; Intergroupe francophone du myeloma (2001a): Rearrangements of the c-myc oncogene are present in 15% of primary human multiple myeloma tumors. *Blood* 98: 3082-3086.

7. Avet-Loiseau H, Daviet A, Brigaudeau C, Callet-Bauchu E, Terré C, Lafage-Pochitasloff ML, Désangles F, Ramond S, Talmant P, Bataille R (2001b): Cytogenetic, interphase, and multicolour fluorescence in situ hybridisation analyses in primary plasma cell leukaemia: a study of 40 patients at diagnosis, on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome and the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood* 97: 822-825.
8. Azar GM, Gogineni SK, Hyde P, Verma RS (1997): Highly complex chromosomal abnormalities in plasma cell leukemia as detected by FISH technique. *Leukemia* 11: 772-774.
9. Baldini L, Guffanti A, Cesana BM, Colombi M, Chiorboli M, Damilano I, Maiolo AT (1996): Role of different hematologic variables in defining the risk of malignant transformation in monoclonal gammopathy. *Blood* 87:912-918.
10. Bergsagel PL, , Kuehl WM (2001): Chromosome translocations in multiple myeloma. *Oncogene* 20: 5611-5622.
11. Bergsagel PL, Chesi M, Trudel S, Affer M, Robbiani DF, Ely S, Hurt EM, Staudt LM, Fonseca R, Barlogie B, Shaughnessy J, Kuehl WM (2003): Primary IgH translocations and D-type cyclin expression provide a novel molecular classification of multiple myeloma (plenary session). 9<sup>th</sup> International workshop of Multiple Myeloma. Spain, 2003.
12. Bernasconi C, Castelli G, Pagnucco G, Brusamolino E (1989): Plasma cell leukemia: a report on 15 patients. *Eur J Haematol* 43: 76-83.

13. Besses C, Sans-Sabrafen J (2001): Gammapatías monoclonales. Clasificación. Métodos de detección. Gammapatía monoclonal de significado indeterminado. Amiloidosis primaria. Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives JL (eds.). Hematología clínica. Ediciones Harcourt, S.A.
14. Bladé J (2001): Mieloma múltiple. Sans-Sabrafen J, Besses C, Vives JL (eds.). Hematología clínica. Ediciones Harcourt, S.A.
15. Bladé J, López-Guillermo A, Rozman C, Cervantes F, Salgado C, Aguilar JL, Vives-Corrons JL, Montserrat E (1992): Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 81: 391-394.
16. Boccadoro M, Gavarotti P, Fossati G, Pileri A, Marmont F, Neretto G, Gallamini A, Volta C, Tribalto M, Testa MG (1984): Low 3(H) thymidine incorporation in monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS), smouldering myeloma and remission phase myeloma: A reliable indicator of patients not requiring therapy. *Br J Haematol* 58: 689-696.
17. Bouscary D, Dupin N, Fichelson S, Grandadam M, Fontenay-Roupie M, Marcelin AG, Blanche P, Picard F, Freyssinier JM, Ravaud P, Dreyfus F, Calvez V (1998): Lack of evidence of an association between HHV8 and multiple myeloma. *Leukemia* 12: 1840-1841.
18. Brian J. Taylor, Julie A. Pittman, Karen Seeberger, Michael J. Mant, Tony Reiman, Andrew R. Belch and Linda M. Pilarski (2002): Intraclonal homogeneity of clonotypic immunoglobulin M and diversity of nonclinical

- post-switch isotypes in multiple myeloma. *Clinical Cancer Research* 8: 502-513.
19. Brigaudeau C, Trimoreau F, Gachard N, Rouzier E, Jaccard A, Bordessoule D, Praloran V (1997): Cytogenetic study of 30 patients with multiple myeloma: comparison of 3 and 6 day bone marrow cultures stimulated or not with cytokines by using a miniturized karyotypic method. *Br J Haematol* 96: 594-600.
  20. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, Ferreira C, Ardanaz MT, Fraile A, Carrasco JL, Solé F, Cuesta B, Gullón A (1997a): Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chromosom Cancer* 18: 84-93.
  21. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Odero MD, Garcia-Foncillas J, Marin J, Ardanaz MT, Rocha E, Gullon A (1997b): Hypodiploidy and 22q11 rearrangements at diagnosis are associated with poor prognosis in patients with multiple myeloma. *Br J Haematol* 98: 418-425.
  22. Chesi M, Nardini E, Lim RSC, Smith KD, Kuehl WM, Bergsagel PL (1998): The t(4;14) translocation in myeloma dysregulates both FGFR3 and a novel gene, MMSET, resulting in IgH/MMSET hybrid transcripts. *Blood* 92: 3025-3034.
  23. Chesi M, Bergsagel PL, Shonukan O, Martelli ML, Brents LA, Chen T, Schoröck E, Ried T, Kuehl WM (1998): Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91: 4457-4463.

24. Corradini P, Inghirami G, Astolfi M, Ladetto M, Voena C, Ballerini P, Gu W, Nilsson K, Knowles DM, Boccadoro M, Pileri A, Dalla-Favera R (1994): Inactivation of tumor suppressor genes, p53 and Rb1, in plasma cell dyscrasias. *Leukemia* 8: 758-767.
25. Davies FE, Jack AS, Morgan GJ (1997): The use of biological variables to predict outcome in multiple myeloma. *Br J Haematol* 99: 719-25.
26. Dewald GW, Kyle RA, Hicks GA, Greipp PR (1985): The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukemia, or amiloidosis. *Blood* 66: 380-390.
27. Dimopoulos MA, Palumbo A, Delasalle KB, Alexanian R (1994): Primary plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* 88: 754-759.
28. Drach J, Schuster J, Nowotny H, Angerler J, Rosenthal F, Fiegl M, Rothermundt C, Gsur A, Jäger U, Heinz R, Lechner K, Ludwig H, Huber H (1995): Multiple myeloma: high incidence of chromosomal aneuploidy as detected by interphase fluorescence in situ hybridization. *Cancer Res* 55: 3854-3859.
29. Drach J, Angerler J, Schuster J, Rothermundt C, Thalhammer R, Haas OA, Jäger U, Fiegl M, Geissler K, Ludwig H, Huber H (1995): Interphase fluorescence in situ hybridization identifies chromosomal abnormalities in plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 86: 3915-3921.
30. Drach J, Ackermann, Fritz E, Krömer E, Schuster R, Gisslinger H, DeSantis M, Zojer N, Fiegl M, Roka S, Schuster J, Heinz R, Ludwig H,

- Huber H (1998): Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy. *Blood* 92: 802-809.
31. Drach J, Kaufmann H, Urbauer E, Schreiber S, Ackermann J, Huber H (2000): The biology of multiple myeloma. *J Cancer Res Clin Oncol* 126: 441-447.
  32. Facon T, Laï JL, Nataf E, Preudhomme C, Hammad M, Wattel E, Jouet JP, Bauters F (1993): Improved cytogenetic analysis of bone marrow plasma cells after cytokine stimulation in multiple myeloma: a report on 46 patients. *Br J Haematol* 84: 743-745.
  33. Facon T, Avet-Loiseau H, Guillermin G, Moreau P, Geneviève F, Zandecki M, Laï JL, Leleu JP, Jouet JP, Bauters F, Harousseau JL, Bataille R, Mary JY on behalf of the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM) (2001): Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum  $\beta_2$ -microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97: 1566-1571.
  34. Flactif M, Zandecki M, Laï JL, Bernardi F, Obein V, Bauters F, Facon T (1995): Interphase fluorescence in situ hybridisation (FISH) as a powerful tool for the detection of aneuploidy in multiple myeloma. *Leukemia* 9: 2109-2114.
  35. Fanboin L, Satz L (1994): Introducción a la inmunología humana. Mosby/Doyma. Barcelona.
  36. Foa P (1904): Sulla produzione cellulare nell inflamazione ed in altri

---

processi analoghi specialmente in cio che si riferisce alle plasmacellule.  
Folia Haematol 1: 166-167.

37. Fonseca R, Witzig TE, Gertz MA, Kyle R, Hoyer JD, Jalal SM, Greipp PR (1998): Multiple myeloma and the translocation t(11;14)(q13;q32): a report on 13 cases. Br J Haematol 101: 296-301.
38. Fonseca R, Hoyer JD, Aguayo P, Jalal SM, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Witzig TE, Lacy MQ, Dispenzieri A, Gertz MA, Kyle R, Greipp PR (1999): Clinical significance of the translocation (11;14)(q13;q32) in multiple myeloma. Leukemia Lymphoma 35: 599-605.
39. Fonseca R, Oken MM, Harrington D, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR, Dewald GW (2000): Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. Leukemia 15: 981-986.
40. Fonseca R, Oken MM, Greipp PR, on behalf of the Eastern Cooperative Oncology Group Myeloma Group (2001): The t(4;14)(p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. Blood 98: 1271-1272.
41. Fonseca R, Blood EA, Oken MM, Kyle RA, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Hoyer JD, Harrington D, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR (2002): Myeloma and the t(11;14)(q13;q32); evidence for a biologically defined unique subset of patients. Blood 15: 3735-3741.

42. Fonseca R, Harrington D, Oken MM, Dewald GW, Bailey RJ, Van Wier SA, Henderson KJ, Blood EA, Rajkumar SV, Kay NE, Van Ness B, Greipp PR (2002): Biological and prognostic significance of interphase in situ hybridization detection of chromosome 13 abnormalities (Delta13) in multiple myeloma: an eastern cooperative group study. *Cancer Res* 62: 715-720.
43. Fonseca R, Bailey RJ, Ahmann GJ, Rajkumar SV, Hoyer JD, Lust JA, Kyle RA, Gertz MA, Greipp PR, Dewald GW (2002): Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 100: 1417-1424.
44. Fonseca R, Debes-Marun CS, Picken EB, Dewald GW, Bryant SC, Winkler JM, Blood E, Oken MM, Santana-Dávila R, González-Paz N, Kyle RA, Gertz MA, Dispenzieri A, Lacy MQ, Greipp PR (2003): The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood* 102: 2562-2567.
45. Gadó K, Domján G, Hegyesi H, Falus A (2000): Role of interleukin-6 in the pathogenesis of multiple myeloma. *Cell Biology International* 24: 195-209.
46. Gallart T, Vives J, López-Botet M (2000): Órganos y células del sistema inmunitario. A: Medicina Interna, Farreras y Rozman, eds. 14ª edición. Ed. Hartcourt Brace. Barcelona.
47. García-Sanz R, Orfao A, González M, Tabernero MD, Bladé J, Moro MJ, Fernández-Calvo J, Sanz MA, Pérez-Simón JA, Rasillo A, San Miguel JF (1999): Primary plasma cell leukemia: clinical, immunophenotypic, DNA ploidy, and cytogenetic characteristics. *Blood* 93: 1032-1037.



- 
48. Gernone A, Dammacco F. Molecular alterations of IL6R, lck, and c-myc genes in transforming monoclonal gammopathies of undetermined significance (1996): *Br J Haematol* 93: 623-631.
  49. Greco C, Amegio F, Alvino F, Mosiello A, Cianciulli AM, Venturo I, del Monte G, Giampaolo M, Tong AW, Gandolfo GM (1999): Phenotypic and genotypic alterations characterize patients bearing plasma cell dyscrasias with a high M-component. *Cell Prolif* 32: 231-238.
  50. Greipp PR, Kyle RA (1983): Clinical, morphological, and cell kinetic differences among multiple myeloma, monoclonal gammopathy of undetermined significance, and smoldering multiple myeloma. *Blood* 62: 166-171.
  51. Gutensohn K, Weh HJ, Walter TA, Hossfeld DK (1992): Cytogenetics in multiple myeloma and plasma cell leukemia: simultaneous cytogenetic and cytologic studies in 51 patients. *Ann Hematol* 65: 88-90.
  52. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC (1998): Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91: 3-21.
  53. Hasle H, Olsen JH, Nielsen J, Hansen J, Friedrich U, Tommerup N (1996): Occurrence of cancer in women with Turner syndrome. *Br J Cancer* 73: 1156-1159.
  54. Hernández JM, Gutiérrez NC, Almeida J, García JL, Sánchez MA, Mateo G, Ríos A, San Miguel JF (1998). IL-4 improves the detection of cytogenetic abnormalities in multiple myeloma and increases the

- proportion of clonally abnormal metaphases. *Br J Haematol* 103: 163-167.
55. Hoehler-Vollmar W, Menzel G, Bartl R, Lamerz R, Wick M, Seidel D (2000): Amplification of cyclin D1 gene in multiple myeloma: clinical and prognostic relevance. *Br J Haematol* 109: 30-38.
56. Jonveaux P, Berger R (1992): Chromosome studies in plasma cell leukemia and multiple myeloma in transformation. *Genes Chromosomes Cancer* 4: 321-325.
57. Kastrinakis NG, Gorgoulis VG, Foukas PG, Dimopoulos MA, Kittas C (2000): Molecular aspects of multiple myeloma. *Annals of Oncology* 11: 1217-1228.
58. Kaufmann H, Kromer E, Nosslinger T, Weltermann A, Ackermann J, Reisner R, Bernhart M, Drach J (2003): Both chromosome 13 abnormalities by metaphase cytogenetics and deletion of 13q by interphase FISH only are prognostically relevant in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 71: 179-183.
59. Klein B, Zhang X-G, Lu ZY, Bataille R (1995): Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85: 863-872.
60. Konigsberg R, Ackermann J, Kaufmann H, Zojer N, Urbauer E, Kromer E, Jager U, Gisslinger H, Schreiber S, Heinz R, Ludwig H, Huber H, Drach J (2000): Deletions of chromosome 13q in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Leukemia* 14: 1975-1979.

61. Kosmas C, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Zoi K, Belessi C, Viniou N, Kollia P and Yataganas X (2000): Origin and diversification of the clonogenic cell in multiple myeloma: lessons from the immunoglobulin repertoire. *Leukemia* 14: 1718-1726.
62. Kosmo MA, Gale RP (1987): Plasma cell leukemia. *Sem in Hematol* 24(3): 202-208.
63. Küppers R, Klein U, Hansmann ML, Rajewski K (1999): Cellular origin of human B-cell lymphomas. *N Engl J Med* 341: 1520-1529.
64. Kyle RA (1993): "Benign" monoclonal gammopathy: after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc* 68: 26-36.
65. Kyle RA, Maldonado JE, Bayrd ED (1974): Plasma cell leukemia. Report on 17 cases. *Arch Intern Med* 133: 813-818.
66. Kyle RA (2000): Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *Br J Haematol* 111: 1035-1044.
67. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Offord JR, Larson DR, Plevak MF & Melton III LJ (2002): A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 346: 564-569.
68. Kyle RA, Rajkumar SV (2003): Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review. *Immunol Rev* 194: 112-139.
69. Lai JL, Zandecki M, Mary JY, Bernardi F, Izydorczyk V, Flactif M, Morel

- 
- P, Jouet JP, Bauters F, Facon T (1995): Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 85: 2490-2497.
70. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS (1997): Mutations in the fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90: 4266-4270.
71. Latreille J, Barlogie B, Johnston D, Drewinko B, Alexanian R (1982): Ploidy and proliferative characteristics in monoclonal gammopathies. *Blood* 59:43-51.
72. López-Suárez JC i Martin Villa JM (1994): Anticuerpo. Producción de anticuerpos. Celada A (ed) *Inmunología básica*. Ed Labor, 1994
73. Maynadie M, Mugneret F, Guy H, Turc-Carel C (1990): Translocations involving 5q35 may also be associated with plasma cell leukaemia. *Br J Haematol* 76: 156.
74. Miguel-Garcia A, Orero T, Matutes E, Carbonell F, Miguel-Sosa A, Linares M, Tarin F, Herrera M, Garcia-Talavera J, Carbonell-Ramon F (1998): BCL-2 expression in plasma cells from neoplastic gammopathies and reactive plasmacytosis: A comparative study. *Haematologica* 83: 298-304.
75. Mitelman F (1995): Guidelines for Cancer Cytogenetics, Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN). S. Karger, Basel.

- 
76. Mitelman F, Johansson B & Mertens F (eds)(2003): Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer WWW document. URL. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
  77. Morse D, Dailey RC, Bunn J (1974): Prehistoric multiple myeloma. *Bulletin of the New York Academy of Medicine* 50: 447-458.
  78. Nickenig C, Lang NK, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T (2001): New insights into the biology of multiple myeloma using a combination of May-Grünwald-Giemsa staining and fluorescence in situ hybridization techniques at the single cell level. *Ann Hematol* 80: 662-668.
  79. Ng MHL, Chung YF, Lo KW, Wickham NWR, Lee JCK, Huang DP (1997): Frequent hypermethylation of p16 and p15 genes in multiple myeloma. *Blood* 89: 2500-2506.
  80. Nomdedeu JF, Lasa A, Ubeda J, Saglio G, Bellido M, Casas S, Carnicer MJ, Aventin A, Sureda A, Sierra J, Baiget M (2002): Interstitial deletions at the long arm of chromosome 13 may be as common as monosomies in multiple myeloma. A genotypic study. *Haematologica* 87: 828-835.
  81. Nordgren A, Farnebo F, Bjorkholm M, Sahlen S, Porwit-MacDonald A, Osby E, Kytola S, Larsson C, Nordenskjold M, Blennow E (2000): Detailed characterization of a complex karyotype in a patient with primary plasma cell leukaemia using multicolour spectral karyotyping and micro-FISH. *Hematol J* 1: 95-101.
  82. Ocqueteau M, Orfao A, Almeida J, Blade J, González M, Garcia-Sanz R, López-Berges C, Moro MJ, Hernández J, Escribano L, Caballero D,

- Rozman M, San Miguel JF (1998): Immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 152: 1655-65.
83. Panizo C, Cuesta B, Rocha E (1998): Primary plasma cell leukemia with unusual morphology and complex karyotype. *Haematologica* 83: 849-850.
84. Pérez Losada A, Woessner S, Solé F, Florensa L, Bonet C (1994): Chromosomal and in vitro culture studies in a case of primary plasma cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 76: 36-38.
85. Pérez-Simón JA, García-Sanz R, Tabernero MD, Almeida J, González M, Fernández-Calvo J, Moro MJ, Hernández JM, San Miguel JF, Orfao A (1998): Prognostic value of numerical chromosome aberrations in multiple myeloma: a FISH analysis of 15 different chromosomes. *Blood* 91: 3366-3371.
86. Pérez MM, Solé F, Grao P, Preciado C, Jimenez J, Barrera JC (1993): Chromosome analysis in 2000 peripheral blood samples. *European Society of Human Genetics. 25<sup>th</sup> Annual Meeting*;112.
87. Pilarski LM, Reiman T, Belch AR (2003): The myeloma hierarchy: heterogeneity within the myeloma clone. *The Hematology journal. 9<sup>th</sup> International Workshop of Multiple Myeloma*: P1.3.
88. Rasillo A, Tabernero MD, Sanchez ML, Pérez de Andres M, Martin Ayuso M, Hernández J, Moro ML, Fernández-Calvo J, Sayagues JM,

- Bortoluci A, San Miguel JF, Orfao A (2003): Fluorescence in situ hybridisation analysis of aneuploidization patterns in monoclonal gammopathy of undetermined significance versus multiple myeloma and plasma cell leukaemia. *Cancer* 97: 601-609.
89. Rettig MB, Ma HJ, Vescio RA, Pold M, Schiller G, Belson D, Savage A, Nishikubo C, Wu C, Fraser J, Said JW, Berenson JR (1997): Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science* 276: 1851-1854.
90. Richelda R, Ronchetti D, Baldini L, Cro L, Viggiano L, Marzella R, Rocchi M, Otsuki T, Lombardi L, Maiolo AT, Neri A (1997): A novel chromosomal translocation t(4;14)(p16.3;q32) in multiple myeloma involves the fibroblast growth-factor receptor 3 gene. *Blood* 90: 4062-4070.
91. Richter J, Swedin A, Olofsson T, Johansson B, Akerman M, Winqvist I (1995): Aggressive course of primary plasma cell leukemia with unusual morphological and cytogenetic features. *Ann Hematol* 71: 307-310.
92. Robillard N, Avet-Loiseau H, Garand R, Moreau P, Pineau D, Rapp MJ, Harousseau JL, Bataille R (2003): CD20 is associated with small mature plasma cell morphology and t(11;14) in multiple myeloma. *Blood* 102: 1070-1071.
93. Roitt I, Brostoff J, Male D (1997): *Immunology*. 5<sup>th</sup> Edition, Mosby. Londres.
94. Saez B, Martin-Subero JI, Odero MD, Largo C, Cigudosa JC, Siebert R,

- Calasanz MJ (2003): Citogenética molecular para la detección de translocaciones de los genes IgH, IgL e IgK en MM y MGUS. *Haematologica* 88 (Supl 7): 22.
95. Said JW, Rettig MR, Heppner K, Vescio RA, Schiller G, Ma HJ, Belson D, Savage A, Shintaku P, Koeffler HP, Asou H, Pinkus G, Pinkus J, Schrage M, Green E, Berenson JR (1997): Localization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in bone marrow biopsy samples from patients with multiple myeloma. *Blood* 90: 4278-4282.
96. San Miguel JF, Garcia-Sanz R, González M, Orfao A (1995): Immunophenotype and DNA cell content in multiple myeloma. Mandelli F (Eds): *Clinical Haematology. Multiple myeloma*. Ed. Baillière Tindall.
97. Sawyer JR, Waldron JA, Jagannath S, Barlogie B (1995): Cytogenetic findings in 200 patients with multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 82: 41-49.
98. Sawyer JR, Tricot G, Mattox S, Jagannath S, Barlogie B (1998): Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation of pericentromeric heterocromatin. *Blood* 91: 1732-1741.
99. Sawyer JR, Lukacs JL, Munshi N, Desikan R, Singhal S, Mehta J, Siegel D, Shaughnessy JD, Barlogie B (1998): Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolour spectral karyotyping. *Blood* 92: 4269-4278.
100. Sawyer JR, Lukacs JL, Thomas EL, Swanson CM, Goosen LS,



- 
- Sammartino G, Gilliland NC, Tricot G, Shaughnessy JD, Barlogie B (2001): Multicolour spectral karyotyping identifies new translocations and a recurring pathway for chromosome loss in multiple myeloma. *Br J Haematol* 112: 167-174.
101. Schoch C, Rieder H, Stollmann-Gibbels B, Freund M, Tischler HJ, Silling-Engelhardt G, Fonatsch C (1995): 17p anomalies in lymphoid malignancies: diagnostic and prognostic implications. *Leukemia Lymphoma* 17: 271-279.
102. Shaughnessy J, Tian E, Sawyer J, Bumm K, Landes R, Badros A, Morris C, Tricot G, Epstein J, Barlogie B (2000): High incidence of chromosome 13 deletion in multiple myeloma detected by multiprobe interphase FISH. *Blood* 96: 1505-1511.
103. Shaughnessy J, Gabrea A, Qi Y, Brents L, Zhan F, Tian E, Sawyer J, Barlogie B, Bergsagel PL, Kuehl M (2001): Cyclin D3 at 6p21 is dysregulated by recurrent chromosomal translocations to immunoglobulin loci in multiple myeloma. *Blood* 98: 217-223.
104. Schönrich G, Raftery M, Schnitzler P, Rohr U, Goldschmidt H (1998): Absence of a correlation between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) and multiple myeloma (correspondence). *Blood* 92: 3474-3491.
105. Schultheis B, Krämer A, Willer A, Hegenbart U, Goldschmidt H, Hehlmann R (1999): Analysis of p73 and p53 gene deletions in multiple myeloma. *Leukemia* 13: 2099-2103.

- 
106. Smadja N, Krulik M, Louvet C, de Gramont A, González-Canali G, Mougeot-Martin M (1991): Similar cytogenetic abnormalities in two cases of plasma cell leukaemia. *Cancer Genet Cytogenet* 52: 135-138.
  107. Smadja NV, Louvet C, Isnard F, Dutel JL, Grangr MJ, Varette C, Krulik M (1995): Cytogenetic study in multiple myeloma at diagnosis: comparison of two techniques. *Br J Haematol* 90: 619-24.
  108. Smadja NV, Fruchart C, Isnard F, Louvet C, Dutel JL, Cheron N, Grange MJ, Monconduit M, Bastard C (1998): Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases. *Leukemia* 12: 960-969.
  109. Smadja NV, Bastard C, Brigaudeau C, Leroux D, Fruchart on behalf of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique (2001): Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98: 2229-2238.
  110. Tabernero D, San Miguel JF, Garcia-Sanz R, Najera L, Garcia-Isidoro M, Pérez-Simon JA, González M, Wiegant J, Raap AK, Orfao A (1996): Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am J Pathol* 149: 153-161.
  111. Taniwaki M, Nishida K, Ueda Y, Takashima T (1996): Non-random chromosomal rearrangements and their implications in clinical features and outcome of multiple myeloma and plasma cell leukemia. *Leukemia Lymphoma* 21: 25-30.

- 
112. Tasaka T, Asou H, Munker R, Said JW, Berenson J, Vescio RA, Nagai M, Takahara J, Koeffler P (1998): Methylation of the p16<sup>INK4A</sup> gene in multiple myeloma. *Br J Haematol* 101: 558-564.
113. Tedeschi R, Kvarnung M, Knekt P, Schulz TF, Szekely L, De Paoli PD, Aromaa A, Teppo L, Dillner J (2001): A prospective seroepidemiological study of human herpesvirus-8 infection and the risk of multiple myeloma. *Br J Cancer* 84: 122-125.
114. Teerenhovi L, Knuutila S, Ekblom M, Rossi L, Borgström GH, Tallman JK, Andersson L, de la Chapelle A (1984): A method for simultaneous study of the karyotype, morphology and immunologic phenotype of mitotic cells in hematologic malignancies. *Blood* 64: 1116-1122.
115. The International Myeloma Working Group (2003): Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol* 121: 749-757.
116. Tricot G, Barlogie B, Jagannath S, Bracy D, Mattox S, Vesole DH, Naucke S, Sawyer J (1995): Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood* 86: 4250-4256.
117. Ueshima Y, Fukuhara S, Nagai K, Takatsuki K, Uchino H (1983): Cytogenetic studies and clinical aspects of patients with plasma cell leukemia and leukemic macroglobulinemia. *Cancer Res* 43: 905-912.

- 
118. Van de Poel MHW, Coebergh JWW, Hillen HFP (1995): Malignant transformation of monoclonal gammopathy of undetermined significance among out-patients of a community hospital in Southeastern Netherlands. *Br J Haematol* 91: 121-125.
119. Vuckovic J, Ilic A, Knezevic N, Marinkovic M, Zemunik T, Dubravcic M (1997): Prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 97: 649-651.
120. Woessner S, Florensa L (2000): Discrasias plasmocelulares monoclonales o gammopatías monoclonales. Woessner S, Florensa L (eds). *La citología óptica en el diagnóstico hematológico*. Ed. Acción médica S.A. y Fundación Española de Hematología y Hemoterapia 2000.
121. Worel N, Greinix H, Ackermann J, Kaufmann H, Urbauer E, Hocker P, Gisslinger H, Lechner K, Kalhs P, Drach J (2001): Deletion of chromosome 13q14 detected by fluorescence in situ hybridization has prognostic impact on survival after high-dose therapy in patients with multiple myeloma. *Ann Hematol* 80: 345-348.
122. Yamamoto K, Hamaguchi H, Nagata K, Taniwaki M (1998): A variant Burkitt-type translocation (8;22)(q24;q11) in multiple myeloma. *Cancer Genet Cytogenet* 104: 98-103.
123. Zandecki M, Obein V, Bernardi F, Soenen V, Flactif M, Luc Laï JL, François M, Facon T (1995): Monoclonal gammopathy of undetermined significance: chromosome changes are a common finding within bone marrow plasma cells. *Br J Haematol* 90: 693-696.

- 
124. Zandecki M, Lai JL, Facon T (1996): Multiple myeloma: almost all patients are cytogenetically abnormal. *Br J Haematol*; 94: 217-227.
125. Zandecki M, Luc Lai JL, Geneviève F, Bernardi F, Volle-Rémy H, Blanchet O, François M, Cosson A, Bauters F, Facon T (1997): Several cytogenetic subclones may be identified within plasma cells from patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance, both at diagnosis and during the indolent course of this condition. *Blood*; 90: 3682-3690.
126. Zandecki M, Bernardi F, Geneviève F, Lai JL, Preudhomme C, Flactif M, Cosson A, Bauters F, Facon T (1997): Involvement of peripheral blood cells in multiple myeloma: chromosome changes are the rule within circulating plasma cells but not within B lymphocytes. *Leukemia* 11: 1094-1039.
127. Zojer N, Königsberg R, Ackermann J, Fritz E, Dallinger S, Krömer E, Kaufmann H, Riedi L, Gisslinger H, Scheiber S, Heinz R, Drach J (2000): Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood* 95: 1925-1930.
128. Zojer N, Schuster-Kolbe J, Assmann I, Ackermann J, Strasser K, Hubl W, Drach J, Ludwig H (2002): Chromosomal aberrations are shared by malignant plasma cells and a small fraction of circulating CD19+ cells in patients with myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 117: 852-859.