

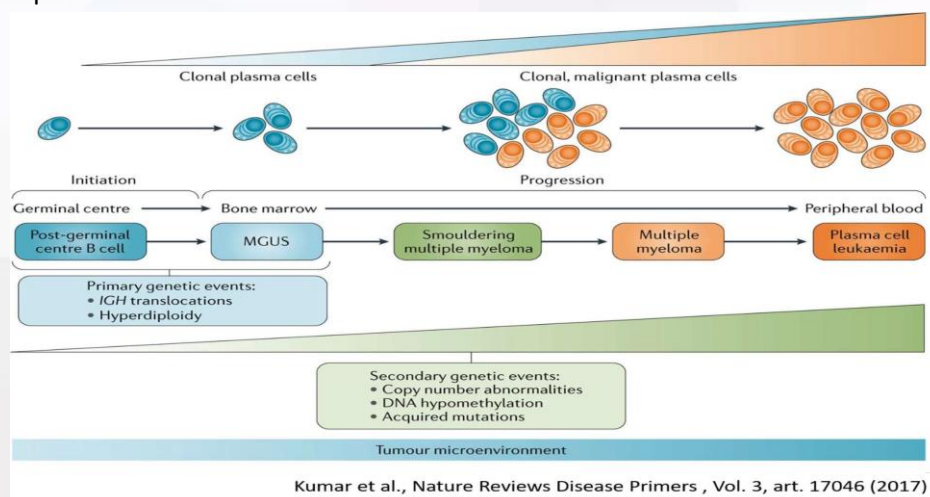
Estudi Genètic Mieloma Múltiple

El mieloma múltiple (MM) és un tipus de neoplàsia que implica l'expansió clonal de les cèl·lules plasmàtiques, un tipus de cèl·lula que prové del limfòcit B i és responsable de la producció d'anticossos. Aquestes cèl·lules, quan es desenvolupen de manera anormal i incontrolada en la medul·la òssia, causen un conjunt de símptomes que inclouen dolor ossi, fatiga, infeccions recurrents i nivells elevats de calci a la sang.

Es tracta de la tercera malaltia hematològica maligna en ordre de freqüència, i cada any es diagnostiquen a Espanya al voltant de 3000-3500 nous casos. Representa un 2% de les morts per càncer i un 20% de les morts per malalties hematològiques malignes[1].

Hi ha quatre categories principals de mieloma:

- Mieloma Asintomàtic: Pacients amb símptomes inespecífics que poden ser atribuïts a altres malalties.
- Mieloma quiescent: es caracteritza per presentar només un pic de proteïna monoclonal estable.
- Mieloma indolent: Acumulació lenta de cèl·lules plasmàtiques aberrants a moll d'os però sense dany immediat o greu.
- Mieloma Múltiple: El diagnòstic es basa en la detecció de cèl·lules plasmàtiques aberrants ($\geq 10\%$ moll d'os) que interfereixen amb la formació normal de cèl·lules sanguínies al moll d'os, donant lloc a l'aparició d'anèmia i leucopènia; la presència de paraproteïnes i les complicacions associades com lesions òssies, insuficiència renal i hipercalcèmia.



Normalment el Mieloma ve precedit per una Gammapatia Monoclonal de Significat Incert (GMSI). Durant la progressió, es van acumulant alteracions genètiques.

Catlab Informa

Importància clínica de les alteracions cromosòmiques en Mieloma Múltiple

Les alteracions cromosòmiques tenen una gran importància clínica, ja que influeixen en el diagnòstic, pronòstic, estratificació de risc i resposta al tractament[2]. A continuació es descriuen els punts clau de la seva rellevància:

Diagnòstic i patogènesi:

Les alteracions cromosòmiques són fonamentals en el desenvolupament del MM. Es divideixen en esdeveniments primaris i secundaris. Els esdeveniments primaris contribueixen a la immortalització de les cèl·lules plasmàtiques, i els esdeveniments secundaris a la progressió de la malaltia.

Anomalies genètiques primàries:

A la fase primària de la malaltia, les anomalies genètiques es poden dividir en dos grans grups:

- Mieloma no hiperdiploide: implica reordenaments del gen *IGH* (14q34) amb diversos oncogens, incloent *FGFR3*, *CCND3*, *CCND1*, *MAF* i *MAFB* en els cromosomes 4, 6, 11, 16 i 20, respectivament. Aquests reordenaments primaris juxtaposen aquests oncogens a la regió potenciadora de *IGH*.
- Mieloma hiperdiploide: implica trisomies dels cromosomes 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 i 21, junt amb una baixa prevalença de reordenaments *IGH*.

En una minoria de pacients, es troben reordenaments de *IGH* i trisomies múltiples.

Anomalies genètiques secundàries:

Les cèl·lules plasmàtiques aberrants experimenten diferents etapes d'evolució al llarg del temps. Les anomalies genètiques que reflecteixen aquesta progressió són:

- Deleció de *TP53* (17p13): Es el factor citogenètic més important pel pronòstic, amb efecte molt negatiu en la supervivència, malaltia més agressiva, major prevalença de malaltia extramedul·lar.
- Anomalies del cromosoma 1 (Pèrdua de 1p i/o guany de 1q). Les anomalies en ambdós braços del cromosoma 1 s'associen amb supervivència més curta.
- Alteracions gen *MYC* (8q24). Alteració tardana o secundària en la gènesi del MM, associada a pronòstic advers.

Estratificació del risc:

L'Estratificació de risc citogenètic mSMART desenvolupada per la Clínica Mayo (www.msmart.org)[3], classifica per grup de risc les diferents anomalies cromosòmiques.

Mayo Clinic Risk Stratification for Multiple Myeloma (mSMART)

Risk Group	Percentage of newly diagnosed patients with the abnormality
Standard Risk	60%
Trisomies	
t(11;14)	
t(6;14)	
High Risk	40%
t(4;14)	
t(14;16)	
t(14;20)	
del(17p)	
gain(1q)	
Double-Hit myeloma: Any 2 high risk factors	
Triple-Hit myeloma: Any 3 or more high risk factors	

Catlab Informa

Pronòstic:

Els pacients amb alteracions d'alt risc solen tenir una supervivència més curta i una progressió més ràpida de la malaltia.

Les alteracions d'estàndard o baix risc tenen una millor resposta als tractaments estàndard, com els inhibidors del proteasoma o els agents immunomoduladors.

Per calcular el pronòstic es consideren diversos factors com les **característiques del pacient** (comorbiditats), la **càrrega tumoral** (estadi), la **biologia de la malaltia** (alteracions citogenètiques, augment de la lactat deshidrogenasa(LDH) i presència de cèl·lules plasmàtiques a la sang).i la **resposta al tractament**.

La càrrega tumoral es valora mitjançant l'estadiatge Durie-Salmon (DSS) i el Sistema Internacional d'estadiatge (ISS), basats en els valors de β_2 -microglobulina i albúmina sèriques.

La biologia de la malaltia s'avalua segons la presència o absència de les anomalies citogenètiques considerades d'alt risc: t(4;14),t(14;16) i del(17p), l'augment de la lactat deshidrogenasa(LDH) i la presència de cèl·lules plasmàtiques a la sang.

Al 2015, el Grup de Treball Internacional sobre Mieloma (IMWG), va publicar una revisió del ISS (R-ISS)[4], combinant la càrrega tumoral i la biologia de la malaltia, per tal d'aconseguir un valor pronòstic personalitzat per pacient.

Table 1. Standard Risk Factors for MM and the R-ISS	
Prognostic Factor	Criteria
ISS stage	
I	Serum β_2 -microglobulin < 3.5 mg/L, serum albumin $\geq$ 3.5 g/dL
II	Not ISS stage I or III
III	Serum β_2 -microglobulin $\geq$ 5.5 mg/L
CA by iFISH	
High risk	Presence of del(17p) and/or translocation t(4;14) and/or translocation t(14;16)
Standard risk	No high-risk CA
LDH	
Normal	Serum LDH < the upper limit of normal
High	Serum LDH > the upper limit of normal
A new model for risk stratification for MM	
R-ISS stage	
I	ISS stage I and standard-risk CA by iFISH and normal LDH
II	Not R-ISS stage I or III
III	ISS stage III and either high-risk CA by iFISH or high LDH
Abbreviations: CA, chromosomal abnormalities; iFISH, interphase fluorescent in situ hybridization; ISS, International Staging System; LDH, lactate dehydrogenase; MM, multiple myeloma; R-ISS, revised International Staging System.	

Palumbo et al.(2015)

Al 2022, la xarxa Europea de Mieloma (European Myeloma Network) va realitzar una segona revisió de l'ISS (R2-ISS)[5] on es va crear i validar un sistema de puntuació de risc basat en els diferents factors d'estratificació ja establerts en el R-ISS i va afegir com a anomalia d'alt risc el guany de 1q.

Per garantir una harmonització de criteris uniforme en l'estadiatge, en el R2-ISS només s'utilitzen 4 marcadors citogenètics àmpliament disponibles i considerats d' alt risc [t(4;14),t(14;16), del(17p), i guany de 1q].

Les guies internacionals, però, recomanen l'estudi d'altres anomalies citogenètiques per contribuir a un pronòstic i estratègia terapèutica personalitzada[1,2,6,7].

Catlab Informa

Planificació del tractament:

L'estratificació basada en les alteracions cromosòmiques ajuda a seleccionar tractaments personalitzats[7]:

- *Els pacients d'alt risc poden beneficiar-se de teràpies més intensives o combinades.
- *L'ús d'inhibidors del proteasoma com el Bortezomib és especialment beneficiós per als pacients amb del(17p) o t(4;14).
- *Els pacients amb t(11;14) responen millor a Venetoclax, un inhibidor de BCL-2.

Seguiment de la malaltia mínima residual (MRD):

La monitorització d'alteracions cromosòmiques amb tècniques com la FISH (hibridació in situ fluorescent) és crucial per valorar la persistència de cèl·lules tumorals després del tractament, en combinació amb l'estudi per citometria de flux.

Impacte en investigació i desenvolupament de noves teràpies:

L'estudi de les alteracions cromosòmiques condueix al desenvolupament de nous fàrmacs dirigits a alteracions moleculars específiques.

Hibridació in situ fluorescent (FISH) en l'estudi citogenètic de mieloma múltiple

L'anàlisi citogenètica convencional (cariotip), degut, tant a un grau variable d'infiltració de les cèl·lules plasmàtiques al moll d'os, com al baix índex de proliferació de les cèl·lules plasmàtiques aberrants, subestima enormement les potencials anomalies cromosòmiques que es poden trobar en MM.

En aquestes condicions, les guies internacionals recomanen un mètode d'enriquiment de la mostra en cèl·lules plasmàtiques (CD138+), seguit de la tècnica d'hibridació in situ fluorescent (FISH), per l'anàlisi d'alteracions cromosòmiques en nuclis en interfase.

A Catlab, seguint aquestes recomanacions, realitzem el següent procediment:

Mostres i Purificació:

- Es treballa a partir de mostres d'aspirat de medul·la òssia amb comptatge per citologia de més del 10% de cèl·lules plasmàtiques.
- Les cèl·lules plasmàtiques (CD138+) es purifiquen per **selecció negativa** utilitzant anticossos monoclonals que s'uneixen a les cèl·lules no desitjades.
- Les cèl·lules CD138+, lliures i viables es recullen mitjançant centrifugació en gradient de densitat.

Cultiu i extracció:

- Les CP es cultiven durant 72 hores i es realitza extracció per procediment citogenètic, obtenint cèl·lules en suspensió.

Catlab Informa

Hibridació:

- Els nuclis en suspensió s'estenen sobre un portaobjectes i es realitza la tècnica de FISH: es marca el material amb sondes fluorescentes específiques que emeten llum quan s'uneixen a les regions del genoma d'interès.
- S'utilitza un panell **MultiFISH**, que permet analitzar, en un únic portaobjectes, les alteracions cromosòmiques més rellevants pel diagnòstic i pronòstic de MM:

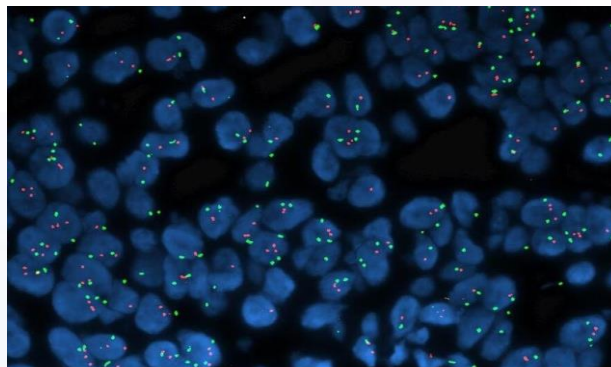
Hiperdiploidia (cromosomes 5, 9 i 15)
Reordenament gen <i>MYC</i>
Deleció de <i>TP53</i> .
t(14;20) reordenament <i>IGH::MAFB</i>
t(4;14) reordenament <i>IGH::FGFR3</i>
t(11;14) reordenament <i>IGH::CCND1</i>
(14;16) reordenament <i>IGH::MAF</i>
t(6;14) reordenament <i>IGH::CCND3</i>
Guany 1q/ pèrdua 1p.



Portaobjectes MultiFISH (CytoCell)

Anàlisi i interpretació:

Amb microscopi de fluorescència es visualitzen les senyals de fluorescència i s'interpreten els patrons d'hibridació obtinguts.



Imatges de senyals fluorescents en nuclis interfàsics

Conclusió

En resum, el mieloma múltiple és una malaltia hematològica complexa amb una gran varietat d'alteracions genètiques implicades en el seu desenvolupament. La tècnica de FISH és una eina crucial per identificar aquestes alteracions, i la realització de la tècnica MultiFISH de manera rutinària contribueix a un diagnòstic més precís i a una millor estratègia terapèutica. Gràcies a l'avenç en les tècniques genètiques, com la FISH, els clínics poden oferir tractaments més personalitzats i millorar els resultats per als pacients amb Mieloma Múltiple

Catlab Informa

Bibliografia

- [1] Kumar S, Rajkumar V, Kyle RA. *Multiple myeloma*. Nat Rev Dis Primers 3, 17046(2017). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.46>
- [2] Rajkumar SV. *Multiple myeloma: 2024 update on diagnosis, risk-stratification, and management*. Am J Hematol. 2024;99(9):1802-1824. doi:10.1002/ajh.27422
- [3] Mikhael JR, Dingli D, Roy V et al. Mayo Clinic. *Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013*. Mayo Clin Proc. 2013 Apr;88(4):360-76. doi:10.1016/j.mayocp.2013.01.019
- [4] Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S et al. *Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group*. J Clin Oncol. 2015 Sep 10;33(26):2863-9. doi:10.1200/JCO.2015.61.2267
- [5] D'Agostino M, Cairns DA, Lahuerta JJ et al. *Second Revision of the International Staging System (R2-ISS) for Overall Survival in Multiple Myeloma: A European Myeloma Network (EMN) Report Within the HARMONY Project*. J Clin Oncol. 2022 Oct 10; 40(29):3406-3418. doi:10.1200/JCO.21.02614.
- [6] Rack KA, van den Berg E, Haferlach C, et al. *European recommendations and quality assurance for cytogenomic analysis of haematological neoplasms*. Leukemia. 2019;33(8):1851-1867. doi:10.1038/s41375-019-0378-z
- [7] Kumar, Shaji K et al. "Multiple Myeloma, Version 2.2024, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN vol. 21,12 (2023): 1281-1301. doi:10.6004/jnccn.2023.0061

Maria Jiménez

Facultativa de la secció de Genètica

CATLAB

Mòbil: 630649820

Tel: 629610655

mjimenezn@catlab.cat

www.catlab.cat