

Diagnòstic de les neoplàsies limfoides. Del microscopi a la seqüenciació de cèl·lules aïllades

Elias Campo

Les neoplàsies limfoides són un grup molt heterogeni de tumors derivats de cèl·lules del sistema immune, fonamentalment limfòcits B i T, en diverses fases de la seva diferenciació i activació. Estudis epidemiològics internacionals mostren que la freqüència global d'aquests tumors es va incrementar a pràcticament tot el món en les dues últimes dècades del segle passat amb una tendència més recent a l'estabilització. La causa d'aquesta variació no és ben coneguda però una part fonamentalment d'aquest augment es pot relacionar amb la gran pandèmia de la infecció pel virus de la immunodeficiència humana que facilitava el desenvolupament de limfomes agressius. Els estudis epidemiològics també mostren que en les dos últimes dècades s'observa un descens en la mortalitat global per aquest tipus de tumors. Un efecte

que s'atribueix a la millora dels tractaments que per altra banda requereixen un diagnòstic més precís per poder adoptar les mesures més adients amb els malalts.

La conducta biològica i clínica de les neoplàsies limfoides és molt diversa i varia des de tumors molt indolents que poden no necessitar tractament durant molt anys sense comprometre la vida normal del pacient fins a tumors extraordinàriament agressius amb perill de la vida del pacient que requereixen un tractament immediat. L'actual classificació de les neoplàsies limfoides reconeix més d'un centenar d'entitats diferents i les seves variants, cada una d'elles amb peculiaritats morfològiques, fenotípiques, moleculars i clíniques¹. El correcte diagnòstic d'aquestes malalties és clau per poder definir el tractament apropiat per cada malalt.

Aquesta decisió és rellevant donat que amb el tractament adequat es poden curar entre el 60-90% d'alguns dels tumors més agressius però, per altra banda, aquests tractaments no estan exempts de possibles efectes secundaris que cal evitar en els pacients que poden requerir mesures menys intenses o inclús no necessitar un tractament immediat. L'element clau per un correcte tractament és establir amb precisió el diagnòstic anatomopatològic de cada malalt.

Evolució del diagnòstic en neoplàsies limfoides

Clàssicament, el diagnòstic anatomopatològic s'ha basat en el reconeixement microscòpic de les alteracions histopatològiques dels teixits neoplàsics. El diagnòstic de les neoplàsies limfoides abans dels anys 1980 es basava en conceptes

molt simples com la mida cel·lular (cèl·lules grans o petites) i el seu patró de creixement en forma de nòduls o destruint difusament l'estructura dels ganglis limfàtics. El descobriment de la complexitat del sistema immunitari amb limfòcits B i T, el seus canvis en la morfologia durant l'activació, la seva diferent distribució en regions específiques dels òrgans limfoides i la seva fisiologia particular van fer necessari aplicar aquests conceptes a la interpretació de tumors derivats d'aquestes cèl·lules. És sorprenent com utilitzant el humil microscopi òptic i unes poques tincions histoquímiques, patòlegs com Karl Lennert a Alemanya i el Robert Lukes als Estats Units van relacionar la variable histopatologia de les neoplàsies limfoides amb les diverses fases de la diferenciació dels limfòcits i inclús van reconèixer limfomes derivats de limfòcits B i T aplicant tècniques de la immunologia en els teixits². Tanmateix, la simple morfologia té limitacions rellevants, ja que tumors amb característiques similars al microscopi poden tenir evolucions clíniques molt diferents. Un exemple és el del limfoma fol·licular o el limfoma de cèl·lules del mantell. Els dos tenen cèl·lules petites amb nuclis irregulars i poden créixer formant nòduls però la seva conducta clínica és extraordinàriament diferent amb una mitjana de supervivència dels malats amb els tractaments actuals de més de 9 anys en el primer cas

i de 4-5 anys en el segon. L'aproximació terapèutica ha de ser molt diferent.

El desenvolupament en la dècada dels anys 1980 de tècniques que permetien identificar en els teixits o en cèl·lules en suspensió proteïnes específiques per mitjà d'anticossos marcats amb elements fluorescents o colorimètrics va ampliar extraordinàriament la capacitat diagnòstica. Aquestes tècniques immunohistoquímiques o de citometria de flux podien identificar desenes d'elements que caracteritzen el fenotip d'aquests tumors i proteïnes oncogèniques que defineixen amb precisió el tipus tumoral. També permeten caracteritzar activitats biològiques com la capacitat proliferativa que es relacionen més precisament amb la conducta clínica dels mateixos.

El descobriment del càncer com una malaltia genètica i la presència d'alteracions cromosòmiques específiques en determinats tumors va suposar un estímul per incloure l'anàlisi citogenètica de forma rutinària en el diagnòstic de les neoplàsies hematològiques en general³. En aquesta línia es van desenvolupar sondes d'ADN marcades amb fluorocroms que faciliten la visualització en els teixits i cèl·lules neoplàsiques d'alteracions com translocacions, delecions i amplificacions per mitjà de la hibridació in situ fluorescent. D'aquesta manera, el microscopi va permetre establir el diagnòstic

integrant la morfologia del tumors, canvis moleculars a través de la seva expressió proteica i pertorbacions genètiques.

El desenvolupament de les tècniques de la reacció en cadena de la polimerasa juntament amb la seqüenciació de l'ADN van introduir el diagnòstic molecular en l'anatomia patològica en els anys 1990. Aquestes tècniques permeten determinar si una població cel·lular de limfòcits B o T és clonal o policlonal, una informació que, si bé no és determinant, és de gran ajuda en el diagnòstic diferencial dels limfomes i processos inflamatoris molt exuberants que poden imitar neoplàsies.

El coneixement genòmic, nous reptes i perspectives

El desenvolupament del Projecte del Genoma Humà i la seva primera publicació el 2003 va possibilitar el disseny de noves tecnologies per analitzar globalment alteracions en l'estructura i expressió del conjunt dels gens d'un organisme⁴. Aquestes metodologies basades fonamentalment en els denominats *microarrays*, petites plataformes en les quals s'imprimeixen tots els gens humans a estudiar, han permès descobrir nous tipus tumorals, crear nous models pronòstics i han identificat noves vies i possibles dianes terapèutiques. Tanmateix, no han trobat una manera d'incorporar-se a la pràctica clínica.

La nova generació de tecnologies de seqüenciació del DNA ha revolucionat la identificació d'alteracions genòmiques en les malalties, particularment en càncer, al poder llegir de forma complerta un genoma en un temps relativament curt i a preus assequibles. Per altra banda, l'adaptació d'aquestes tecnologies per la lectura de regions més o menys extenses del genoma ha facilitat la seva incorporació a la rutina de la practica clínica en àmbits del diagnòstic i la identificació de possibles dianes terapèutiques. L'any 2008 es va publicar el genoma complet d'una malaltia neoplàsica, una leucèmia aguda mieloblàstica, descobrint noves mutacions oncogèniques i obrint així aquestes tecnologies a l'estudi del càncer⁵. La possibilitat d'elucidar de forma exhaustiva les alteracions genòmiques del càncer era un projecte ingent que es va desenvolupar a través de la creació del Consorci Internacional del Genoma del Càncer, un model paradigmàtic de treball col·laborador per abordar les noves perspectives i desafiaments que plantejava la seqüenciació de

genomes complets i la seva aplicació a un problema de salut (<https://icgc.org/>)⁶.

El Ministeri de Ciència espanyol va obrir una convocatòria per participar en aquest consorci que finalment va resoldre a favor del Consorci del Genoma de la Leucèmia Limfàtica Crònica que vam dirigir amb el professor Carlos López-Otín de la Universitat d'Oviedo. El projecte era un desafiament logístic i conceptual d'una immensa envergadura i sense experiència prèvia al nostre país (www.cllgenome.es). Vam iniciar els treballs el març de 2009 amb la participació d'investigadors de 17 institucions espanyoles. Aquest projecte ens va obrir també les portes a participar en el projecte de l'Epigenoma Humà, particularment en l'estudi de l'epigenoma de les cèl·lules hematopoètiques i tumors limfoides⁷. Després de vuit anys d'intens treball vam poder seqüenciar el genoma de més de 500 pacients i identificar més de 60 nous gens mutats implicats en la malaltia i descoberts per primera vegada en algun tipus de càncer^{8,9}. Es van desenvolupar noves eines bioinformàtiques per a l'anàlisi dels

genomes i es van definir noves directrius bioètiques per a la generació i utilització de la informació genòmica. També vam poder definir els primers epigenomes complets de les diferents cèl·lules limfoides B normals en totes les fases maduratives i la seva comparació amb l'epigenoma de la leucèmia limfàtica crònica i altres tipus de neoplàsies limfoides^{10,11}. Gràcies a l'impuls d'aquest projecte vam poder iniciar l'anàlisi genòmic d'altres neoplàsies limfoides i poc a poc traslladar aquesta informació i metodologia a la pràctica clínica. En aquests moments forma part ja de la rutina diagnòstica la seqüenciació de panells entre varies desenes a centenars de gens. La detecció de mutacions específiques permet el diagnòstic diferencial entre tumors amb característiques patològiques similars i identifiquen alteracions que determinen tractaments diferents i que prediuen la resistència a determinats fàrmacs¹². En alguns tipus de neoplàsies hematològiques, com les leucèmies agudes, ja es recomana la seqüenciació complerta del genoma en la rutina clínica ja que permet identificar tot tipus d'alteracions en una mateixa prova

amb implicacions en el tractament dels malalts¹³.

La nova frontera: la seqüenciació del genoma i del transcriptoma de cèl·lules aïllades

En els últims anys s'han desenvolupat tècniques que permeten la seqüenciació del transcriptoma i de zones seleccionades del genoma en cèl·lules aïllades¹⁴. Aquesta possibilitat ha promogut un esforç internacional per la creació d'un atlas complet de totes les cèl·lules de l'organisme humà amb una resolució inèdita (<https://www.humancellatlas.org>)¹⁴. Aquests estudis ja han identificat noves cèl·lules i estats funcionals de múltiples òrgans prèviament desconegudes. Per altra banda, l'aplicació d'aquestes tecnologies en neoplàsies limfoides comença a evidenciar la gran complexitat dels tumors tant en les pròpies cèl·lules neoplàsiques com en les cèl·lules del seu microambient¹⁵. Aquests estudis permeten també refinar l'anàlisi de l'evolució clonal dels tumors i els canvis que ocorren en les cèl·lules després del tractament amb l'emergència de subclons resistents.

La comparació de les cèl·lules neoplàsiques amb les seves contrapartides normals permet identificar canvis específics que poden ajudar en el diagnòstic i tractament.

Recentment hem pogut estudiar l'evolució de la leucèmia limfàtica crònica seqüenciant més de 5000 cèl·lules aïllades en diferents moments de la malaltia des de els seus inicis indolents a la progressió tumoral, la recaiguda després de diversos tractaments i la seva transformació a un limfoma de cèl·lules grans molt agressiu (transformació de Richter)¹⁶. Un dels resultats més sorprenents ha estat el poder identificar, ja en el moment del diagnòstic, les cèl·lules que donen lloc a les recaigudes i a la transformació en l'evolució posterior fins a 19 anys més tard. Aquestes cèl·lules, que podem dir són les llavors d'aquestes complicacions posteriors, ja tenen el perfil d'expressió i les alteracions genòmiques pròpies des de l'inici de la malaltia. Sembla que la cèl·lula mare que ha donat lloc a la leucèmia ha generat múltiples cèl·lules filles amb alteracions genètiques que

aniran manifestant-se en el futur. També hem pogut identificar que aquestes cèl·lules tan agressives depenen d'un increment en el metabolisme de la fosforilació oxidativa. Aquest fenomen és al mateix temps una vulnerabilitat que podem aprofitar pel tractament, ja que les cèl·lules deixen de créixer quan inhibim aquesta via metabòlica. Aquestes observacions permeten preveure que en el futur proper podrem aplicar aquestes tècniques en la pràctica clínica i detectar amb gran sensibilitat cèl·lules amb propietats particulars que facilitaran el diagnòstic, preveure l'evolució de la malaltia i possiblement orientar millor el tractament més adequat.

En conclusió, hem vist com el diagnòstic de les neoplàsies limfoides, i en general de tot tipus de càncer, es beneficia del desenvolupament tecnològic que permet conèixer millor la biologia de les cèl·lules tumorals. D'aquesta manera, el diagnòstic no solament identifica tumors específics i les seves variants sinó que també aporta informació clau per predir la seva evolució i definir els millors tractaments possibles.

Referències

1. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, Quintanilla-Martínez L, Swerdlow SH, Anderson KC, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022;140:1229-53.
2. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Isaacson PG. Classification of lymphoid neoplasms: the microscope as a tool for disease discovery. *Blood*. 2008;112:4384-99.
3. Rowley JD. Genetics. A story of swapped ends. *Science*. 2013;340:1412-3.
4. Campo E. Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms – current contributions and future hopes. *Mod Pathol*. 2013;26(Suppl 1):S97-S110.
5. My genome. So what? *Nature*. 2008;456:1.
6. International Cancer Genome Consortium; Hudson TJ, Anderson W, Artez A, Barker AD, Bell C, Bernabé RR, et al. International network of cancer genome projects. *Nature*. 2010;464:993-8.
7. Adams D, Altucci L, Antonarakis SE, Ballesteros J, Beck S, Bird A, et al. BLUEPRINT to decode the epigenetic signature written in blood. *Nat Biotechnol*. 2012;30:224-6.
8. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, Conde L, Ordóñez GR, Villamor N, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2011;475:101-5.

9. Puente XS, Beà S, Valdés-Mas R, Villamor N, Gutiérrez-Abril J, Martín-Subero JI, et al. Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*. 2015;526:519-24.
10. Kulis M, Heath S, Bibikova M, Queirós AC, Navarro A, Clot G, et al. Epigenomic analysis detects widespread gene-body DNA hypomethylation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet*. 2012;44:1236-42.
11. Kulis M, Merkel A, Heath S, Queirós AC, Schuyler RP, Castellano G, et al. Whole-genome fingerprint of the DNA methylome during human B cell differentiation. *Nat Genet*. 2015;47:746-56.
12. Mansouri L, Thorvaldsdottir B, Laidou S, Stamatopoulos K, Rosenquist R. Precision diagnostics in lymphomas – recent developments and future directions. *Semin Cancer Biol*. 2022;84:170-83.
13. Rosenquist R, Cuppen E, Buettner R, Caldas C, Dreau H, Elemento O, et al. Clinical utility of whole-genome sequencing in precision oncology. *Semin Cancer Biol*. 2022;84:32-9.
14. Rozenblatt-Rosen O, Stubbington MJT, Regev A, Teichmann SA. The Human Cell Atlas: from vision to reality. *Nature*. 2017;550:451-3.
15. Bühler MM, Martín-Subero JI, Pan-Hammarström Q, Campo E, Rosenquist R. Towards precision medicine in lymphoid malignancies. *J Intern Med*. 2022;292:221-42.
16. Nadeu F, Royo R, Massoni-Badosa R, Playa-Albinyana H, García-Torre B, Durán-Ferrer M, et al. Detection of early seeding of Richter transformation in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Med*. 2022;28:1662-71.