



**Universidad Nacional Autónoma
de México**

FACULTAD DE QUIMICA

FACULTAD DE QUIMICA



**“IMPORTANCIA DEL SEGUIMIENTO CITOGENETICO
EN LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA”**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
CAROLINA SANCHEZ ENRIQUEZ**

MEXICO, D. F.

1994



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

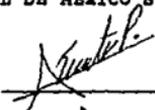
Jurado asignado:

Presidente: Prof. GERARDO KONO YAICO
V o c a l: Prof. GUILLERMO GONZALEZ VARGAS
Secretario: Prof. ALICIA CERVANTES PEREDO
1er. suplente: Prof. MARIA ESTELA CEVALLOS FERRIZ
2do. suplente: Prof. EVA DELIA CALDERON GARCIDUEÑAS.

Sitio donde se desarrollo el tema: SERVICIO DE GENETICA

HOSPITAL GENERAL DE MEXICO S.Sa.

Asesor del tema:

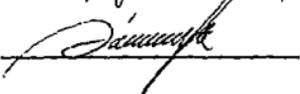
Q.F.B. ALICIA CERVANTES PEREDO 

Co-Asesores:

Q.F.B ROSA MARIA ARANA TREJO 

DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO 

Sustentante:

CAROLINA SANCHEZ ENRIQUEZ 

AGRADECIMIENTOS

A mi Madre

Como atributo a su enorme esfuerzo,
apoyo y cariño que me ha brindado siempre
para alcanzar esta meta.

A mis hermanos que con su ejemplo me han
impulsado a seguir adelante.

A Arturo Ortiz por su cariño y motivación a
mi realización profesional.

A la QFB Alicia Cervantes por su dirección,
asesoría y apoyo para la realización
de esta tesis.

A todas mis amigas, compañeros y personal
del Servicio de Genética del Hospital
General de México, que siempre me brindaron
apoyo y entusiasmo para seguir adelante.

A la Dra. Susana Kofman por haberme
permitido desarrollar mi trabajo en el
Servicio.

A los QFB's Rosa Ma. Arana y Adrián Pérez
por su tiempo y asesoría profesional
prestadas al presente trabajo.

A los Profesores de la Facultad de Química
que con sus enseñanzas ayudaron a mi
formación profesional.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INDICE

Capitulos	Págs
1.- INTRODUCCION	1
2.- CLASIFICACION DE LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.....	3
2.1 Clasificación del FAB.....	4
2.2 Clasificación Inmunológica.....	7
2.3 Clasificación del MIC.....	12
3.- ANORMALIDADES CROMOSOMICAS CARACTERISTICAS DE LA LLA	
3.1 Metodología Citogenética.....	14
3.2 Nomenclatura.....	18
3.3 Anormalidades cromosómicas primarias en LLA.....	20
3.3.1 Alteraciones Numéricas.....	20
A. Hiperdiploidía.....	21
B. Hipodiploidía y casi Haploidía.....	22
3.3.2 Alteraciones estructurales.....	23
A. t(1;19) (q23;p13).....	24
B. t(4;11) (q21;q23).....	25
C. t(9;22) (q34;q11).....	28
D. del (6q) (q15-21).....	33
E. t(9;v) (p21;v) o del (9) (p21).....	34
F. del 12 (p12) o t(12;v) (p12;v).....	35
G. t(8;14) (q24;q32), t(8;22) (q24;q11) y t(2;8) (p12;q24).....	36
H. t(8;14) (q24;q11), t(10;14) (q24;q11) y t(11;14) (p13;q11).....	38
I. t(7;v) o del (7q).....	40
J. Cariotipo normal.....	40
4.- CORRELACION CLINICA.....	42
5.- TRATAMIENTO.	
5.1 Quimioterapia	
5.1.1 Inducción a la remisión.....	49
5.1.2 Profilaxis al SNC.....	50
5.1.3 Mantenimiento de la remisión.....	51
5.1.4 Duración del tratamiento.....	52
5.2 Transplante de Médula Osea.....	52
5.3 Mecanismos de acción.....	53

6.- MATERIAL Y METODOS	
6.1 Material Biológico.....	57
6.2 Cariotipo en Médula Osea.....	57
6.3 Cariotipo en Linfocitos de Sangre Periférica.....	59
6.4 Bandas G	
A. Técnica.....	60
B. Solución de Tripsina al 1%.....	61
C. Solución amortiguadora de fosfatos.....	61
7.- RESULTADOS.....	62
8.- DISCUSION.Y.CONCLUSIONES.....	71
9.- BIBLIOGRAFIA.....	76

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Los estudios citogenéticos en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), han demostrado que aproximadamente 70 a 94% de los casos presentan rearrreglos cromosómicos clonales demostrables. Estas alteraciones son importantes en la evolución de la enfermedad, ya que se correlacionan con remisión completa, duración de ésta y sobrevida de los pacientes, permitiendo evaluar enfermedad residual en estado asintomático.

La correlación de estas alteraciones con la evolución clínica y el pronóstico han permitido establecer que en general las anomalías estructurales son un signo de mal pronóstico y corta sobrevida. Por otra parte los pacientes con hiperdiploidía con >50 cromosomas adquieren remisión completa más larga cursando con un pronóstico favorable; mientras que aquéllos que presentan cariotipos de 47-50 cromosomas se consideran de pronóstico intermedio.

Además los rearrreglos estructurales han permitido conocer los mecanismos implicados en el proceso neoplásico, ya que en los puntos de ruptura se encuentran oncogenes celulares, que al ser desplazados de sus loci específicos sufren un proceso de desregulación ó alteraciones en su estructura escapando a los mecanismos de control normal.

Tomando en cuenta el cariotipo junto con otros factores como edad, sexo, cuenta leucocitaria inicial, y fenotipo inmunológico se puede

obtener un diagnóstico más certero y por lo tanto dar el tratamiento más adecuado a los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.

En este trabajo se presenta el seguimiento citogenético realizado en 20 pacientes adultos con LLA, estudiados antes de iniciar el tratamiento y en etapas subsecuentes del mismo. En el cuál se discute la importancia del cariotipo inicial como factor de riesgo, que al asociarlo con otros criterios clínicos nos permite establecer un mejor diagnóstico y pronóstico. Así mismo el estudio se complementa evaluando la evolución del cariotipo permitiéndonos detectar enfermedad residual, así como comparar los resultados con diferentes esquemas de tratamiento y correlacionarlo con la sobrevida de los pacientes.

El propósito de esta tesis es dar a conocer la importancia del seguimiento citogenético en los pacientes con LLA, ya que lleva a un mejor diagnóstico y pronóstico, permitiendo dar el tratamiento más adecuado, para obtener una mejor calidad de vida y sobrevida más larga en estos pacientes.

CAPITULO 2.

CLASIFICACION DE LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.

Considerando a las leucemias como un "padecimiento proliferativo maligno de la médula ósea hematopoyética", cualquiera de las células que normalmente se originan en ella pueden, en un momento dado, dar un cuadro leucémico. Es decir la aparición de formas inmaduras que normalmente no están en la sangre circulante, como consecuencia de un aumento en la médula ósea(1).

Clásicamente se diferencian dos grupos evolutivos clínicos:

- 1.-Leucemias agudas, de curso rápido y fatal.
- 2.-Leucemias crónicas, de curso más lento y evolución prolongada (1,2).

Sin embargo este panorama ha cambiado dramáticamente en los últimos 20 años, como resultado del advenimiento de agentes antileucémicos efectivos, por lo que de hecho, en el momento actual, la supervivencia en algunas formas de leucemia aguda es mucho mayor que en la crónica. El término más adecuado para la leucemia aguda sería el de "leucemia de blastos", dado que en estas leucemias el tipo predominante de células proliferantes es una célula inmadura poco diferenciada. Las manifestaciones clínicas y la respuesta al tratamiento anti-leucémico dependen del tipo de "blastos" implicados en el proceso leucémico (2).

Las leucemias agudas se clasifican en dos grandes grupos: linfoblásticas (LLA) y mieloblásticas (LMA), dependiendo de la morfología de las células (3,4). En este trabajo sólo nos referiremos a la LLA.

La Leucemia Linfoblástica Aguda se caracteriza por la infiltración progresiva y sustitutiva de la médula ósea normal, así como de los órganos linfoides por células inmaduras de la serie linfoide (5). Para su clasificación se toman en cuenta criterios morfológicos, citoquímicos, bioquímicos, inmunológicos y citogenéticos.

2.1 CLASIFICACION DEL GRUPO FRANCO - AMERICANO - BRITANICO (FAB).

En cuanto a los criterios morfológicos en 1976, el grupo cooperativo FAB estableció un sistema de clasificación para las Leucemias Linfoblásticas Agudas, dependiendo de su morfología en sangre y médula ósea, con tinciones de Romanowsky usualmente con May - Grünwald y Giemsa; complementando con reacciones citoquímicas (6). Las células leucémicas son clasificadas de acuerdo a: a) tamaño, b) cromatina nuclear, c) forma del núcleo, d) nucleolo, e) cantidad de citoplasma, e) basofilia del citoplasma y f) vacuolización citoplasmática (4-6)(tabla I).

Las características de los tres subgrupos de LLA reconocidos por la clasificación del FAB (4,6) son:

Leucemia Prolinfoblástica Aguda (L1): Se caracteriza por tener células pequeñas con cromatina nuclear homogénea , forma del núcleo regular, citoplasma escaso, con poca o nula basofilia, nucleolos no visibles.

Leucemia Prolinfocítica Aguda (L2): Las células son grandes y de tamaño heterogéneo, la cromatina nuclear también heterogénea en la mayoría de los casos, forma del núcleo irregular , aparecen uno o más nucleolos, la cantidad de citoplasma es variable a veces abundante.

Leucemia de Burkitt (L3): Tamaño de las células grandes y homogéneas, cromatina nuclear con moteado fino y homogéneo, forma del núcleo oval o redondo, citoplasma abundante, basofilia y vacuolización citoplasmática notable.

La clasificación citoquímica ha sido establecida como auxiliar en la identificación de los diversos tipos celulares. Las técnicas empleadas están basadas en la demostración de ciertas enzimas y constituyentes químicos de las células, lo que caracteriza tipo y grado de diferenciación celular (1,4).

Dentro de las tinciones se pueden mencionar a la de Sudán Negro, mieloperoxidasa, y esterasa que son positivas para LMA y negativas para LLA. Las tinciones con ácido periódico (Shiff) y fosfatasa ácida son positivas para LLA, aún cuando no son específicas para ésta ya que se observa positiva para los subtipos de LMA-M5-M7, por lo que

TABLA I: CLASIFICACION DEL FAB EN LA LLA (5)

CARACTERISTICAS CITOLOGICAS	L1	L2	L3
Tamaño de las células	Predominan pequeñas	Grandes y heterogéneas	Grandes y homogéneas
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable: Heterogénea	moteado fino y homogéneo
Forma del núcleo	Regular con indentaciones ó fisuras	Irregular con indentaciones y fisuras	Regular: oval ó redondo
Nucléolo	No visible, pequeño	Uno ó más y son grandes	Importantes: uno ó más vesiculares
Cantidad de citoplasma	Escaso	Variable, a veces moderadamente abundante	Abundante
Basofilia del citoplasma	Mínima, ó moderada	Variable, a veces abundante	Intensísima
Vacuolación citoplasmática	Variable	Variable	Notable

es importante hacer las de peroxidasa y esterasa para descartarlas (4,5) tabla II.

En relación a la caracterización bioquímica de la LLA se ha descrito la deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt), que es una enzima que permite diferenciar la LLA de la LMA ya que es una enzima presente en los linfoblastos pero no en los linfocitos normales, ni en la serie mielóide (1,4).

Desde el punto de vista pronóstico, esta clasificación morfológica tiene cierta utilidad, así es bien conocido el hecho de que los pacientes con LLA-L3 tienen en términos generales un pronóstico más desfavorable que aquellos pacientes con LLA-L1 (4).

El conocimiento cada vez más claro de la diferenciación de las células linfoides humanas y el empleo de marcadores y reactivos específicos como anticuerpos monoclonales para identificar a las células, han hecho que la clasificación morfológica de las LLA resulte incompleta. Por ésto es muy importante tomar en cuenta otros criterios como los inmunológicos y citogenéticos para su clasificación (7,8).

2.2 CLASIFICACION INMUNOLOGICA

Se han identificado 5 subtipos principales en la LLA que dependen de la expresión selectiva de varios marcadores (7,8). Estos se muestran en la figura 1 y son:

TABLA II: CITOQUIMICA EN LA LLA (5).

	PAS	Mielo- peroxidasa	S.Negro	Esterasa
Leucemia linfoblástica	+++	+-	-	+-
Leucemia mieloblástica	+-	+++	++++	+
L. mielomonoblástica	+-	++	++	++
L. monoblástica	+-	-	-	+++
Leucemia promielocítica	+-	+++	+++	-
Eritroleucemia	+++	-	-	+

LLA de células T (LLA-T). Expresan antígeno específico para células T en la membrana celular y forman rosetas eritrocíticas (comprenden 20-25% de los casos) (7,8).

LLA de células B (LLA-B). Las células exhiben inmunoglobulinas monoclonales de superficie (sIg), siendo poco frecuente (2% de los casos) (7,8).

LLA "no T- no B". No expresan sIg o marcadores de células T en su superficie. Dentro de este subtipo se incluyen la variante LLA común que expresa en su superficie el antígeno CALLA (Antígeno linfocitario común de la leucemia linfoblástica aguda) (representa 50-75% de los casos) (7,8).

LLA pre-B. Se caracteriza por la presencia citoplasmática de una cadena μ de inmunoglobulinas (15-25% de los casos) (7,8).

LLA de células nulas. También pertenece al subtipo "no T- no B", expresan el antígeno Ia-libre pero son CALLA negativas (7,8).

Sin embargo se han presentado evidencias que sugieren que la mayoría de las LLA no T-no B corresponden a células de estirpe B en un estadio temprano tal como se muestra en el análisis molecular (8).

Normalmente el cambio principal que ocurre en la maduración de linfocitos B es el rearreglo de los genes de inmunoglobulinas en la línea germinal. Estos loci se localizan en tres cromosomas

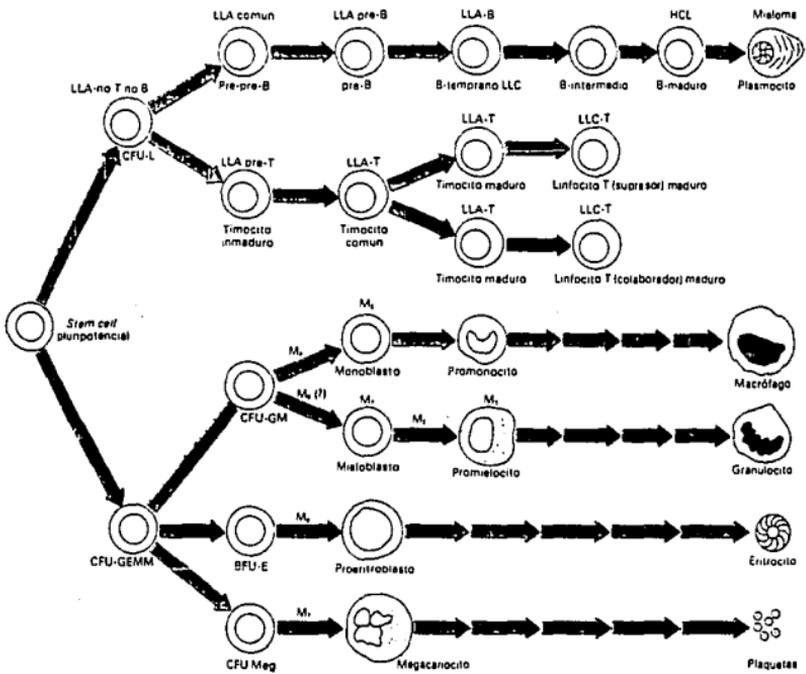
diferentes: el locus de cadenas pesadas en 14q32; el locus de cadenas ligeras Kappa en 2p12 y el locus de cadenas ligeras lambda en 22q11 (9,10). Los genes de cadena pesada incluyen los de las regiones variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes (C) (9-11). El evento primario en la expresión de estos genes es la recombinación somática de los elementos de la línea germinal como inicio en la diferenciación hacia células B. Cuando las moléculas son ensambladas se presentan primero en el citoplasma. Después en la maduración de las células B, las moléculas de Ig se expresan en la superficie celular y son detectadas por reacciones inmunológicas (10,11).

El receptor de células T (TCR), es un receptor tan característico de la célula T, como la inmunoglobulina de superficie de la célula B. Se han clonado 4 clases de DNA específico para TCR: alfa, beta, gama y delta. Los genes que codifican para las cadenas alfa y delta de TCR han sido mapeados en el cromosoma 14q11-q12. El locus del gen beta de TCR ha sido asignado a la región 7q32-q36 y el gen para la cadena gamma de TCR se encuentra situado en 7p15 (9,12). Los rearrreglos que afectan a las diferentes cadenas de TCR, tienden a seguir una secuencia similar a la de los genes de inmunoglobulinas, así que rearrreglos de T-gama y T-beta se han detectado durante fases tempranas de diferenciación T, mientras que la aparición de T-alfa y T-delta reflejan una etapa de maduración más tardía (12).

El conocimiento de estos loci ha sido motivo de gran estudio sobre todo por la asociación a diferentes rearrreglos cromosómicos en estas

FIGURA 1

ESQUEMA DE DIFERENCIACION LINFOIDE PRESENTANDO FENOTIPOS CELULARES Y SU RELACION A LEUCEMIAS LINFOIDES (8).



regiones, lo cual significa que están implicados directamente en la leucemogénesis (9).

2.3 CLASIFICACION MORFOLOGICA; INMUNOLOGICA Y CITOGÉNÉTICA (MIC)

Los estudios citogénéticos realizados en neoplasias demuestran, sin lugar a duda, que las alteraciones cromosómicas se distribuyen en el genoma de un modo no aleatorio . En los desórdenes hematológicos es donde mayores evidencias se han acumulado, demostrando el papel tan importante de los cambios cromosómicos en el desarrollo de la enfermedad (13). El MIC asocia estas alteraciones citogénéticas con los subtipos morfológicos e inmunológicos, reflejando las características patobiológicas de la LLA (14). Esta clasificación reconoce más de 15 subtipos, implicando una alteración cromosómica específica, y características clínicas bien definidas para cada grupo. Por lo que se ha considerado por algunos autores la más completa por proveer de gran ayuda al diagnóstico y pronóstico de estos pacientes (13,14).

La tabla III muestra estas nuevas subentidades de la LLA reconocidas por el MIC.

TABLA III
 CLASIFICACION DEL MIC
 ANORMALIDADES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES PRIMARIAS EN LLA (15)

PUNTO DE RUPTURA	REARREGLO	MORFOLOGIA MAS FRECUENTE	INMUNOFENOTIPO ASOCIADO
1p32	t(1;11) (p32;q23)	L1	LLA pre-B
1q23	t(1;19) (q23;p13)	L1	LLA pre-B
2p12	t(2;8) (p12;q24)	L3	LLA-B
4q21	t(4;11) (q21;q23)	L1, L2	LLA precursor-B temprano Fenotipo mixto
6q	del(6q) (qvariable)	L1, L2	LLA-común
8q24	t(8;14) (q24;q11)	L1, L2	LLA-T
	t(8;14) (q24;q32)	L3	LLA-B
	t(8;22) (q24;q11)	L3	LLA-B
9p	t/del(9p)	L1, L2	LLA precursor-T temprano LLA-T
9q34	t(9;22) (q34;q11)	L1, L2	LLA precursor-B temprano LLA común LLA-pre-B
10q24	t(10;14) (q24;q11)	L1, L2	LLA-T
11p13	t(11;14) (p13;q11)	L1, L2	LLA-T
11q23	t(11;14) (q23;q32)	L1, L2	LLA-T
12p	t/del(12p)	L1, L2	LLA común
14q11	t/del(14) (q11)	L1, L2	LLA-T
14q32	t/del(14) (q32)	L1, L2	LLA-T
17q11	t(17;19) (q11;p13)	L1	LLA-B

CAPITULO 3

ANORMALIDADES CROMOSOMICAS CARACTERISTICAS DE LLA

Al establecerse la relación entre malignidad y cambios cromosómicos, los estudios citogenéticos han resultado de gran significancia en un gran número de desórdenes hematológicos. Así con el gran avance de las técnicas citogenéticas y de biología molecular se ha podido elucidar en muchos casos los mecanismos que con llevan a la neoplasia (15).

3.1 Metodología Citogenética.

La investigación de las anomalías cromosómicas adquiridas en las células leucémicas, depende de la habilidad para intervenir en el ciclo mitótico y aislar células en metafase, y de esta manera poder obtener la extensión cromosómica adecuada (15). Para asegurar que los resultados corresponden a lo que sucede in vivo, se prefieren preparaciones directas a partir de un aspirado de médula ósea, ó cultivos sin estimulación de 48-72 horas. Las preparaciones directas tienen la desventaja de que el índice mitótico es muy bajo, los cromosomas aparecen más condensados resultando pequeños y con morfología difusa. Mientras que en cultivos sin estimulación, aunque la división celular se efectúa in vitro, tienen la ventaja de que la morfología de los cromosomas se mejora, además de que es más probable tener un resultado positivo (16,17). Por ello es importante realizar

ambos métodos para comparar las anomalías cromosómicas encontradas .

Si el número de células circulantes en división es alto, las muestras de sangre periférica pueden ser suficientes, si se cultiva de 48-72 horas, sin adicionar fitohemaglutinina. Sin embargo si se estimula pueden observarse clonas normales desarrolladas in vitro, por lo que hay que tener mucho cuidado y no considerar la presencia de células normales ya que puede corresponder a linfocitos maduros y no a parte de las clonas leucémicas, lo que daría lugar a dar un resultado falso (15-17).

Los cromosomas obtenidos ya sea de médula ósea o de sangre periférica se identifican por medio de técnicas de tinción que producen una serie de bandas características a lo largo de los cromosomas, las más comúnmente utilizadas son: bandas QFQ, GTG, RFA, TFA, y CBG (18,19).

Bandas QFQ: Se producen por tratamiento de los cromosomas con colorantes fluorescentes del tipo mostaza de quinacrina y otros derivados de la acridina (20). El razonamiento de algunos investigadores es que in vitro la fluorescencia de la quinacrina se incrementa al incorporarse al ADN rico en AT, mientras que el ADN rico en G-C se enmascara (21). Sin embargo este tipo de metodología tiene la desventaja, de que las preparaciones deben ser revisadas inmediatamente después en un microscopio de fluorescencia.

Bandas GTG: Son consideradas como un tipo de bandeo positivo, son estructuras constituidas por heterocromatina intercalar que comprenden cerca de 50% de las cromátidas. El patrón de bandas G es muy similar al de las bandas Q, sólo difieren en que los centrómeros de todos los cromosomas tiñen obscuro con bandas G, mientras que la heterocromatina centromérica no fluoresce (16,17,21). Existen varios métodos capaces de inducir bandas G e incluyen tratamientos con álcalis, detergentes, y enzimas proteolíticas como la tripsina (GTG), entre otros (17,22). Las bandas G se tiñen con Giemsa y se observan con un microscopio de luz convencional.

Bandas RFA : La base principal de las bandas R ó reversas se basa en el tratamiento con altas temperaturas y soluciones salinas concentradas, teñidas con cromomicina, naranja de acridina (RFA) ó Giemsa, dando un patrón inverso al de las bandas QFQ/GTG (23). Una variante de ésta son las bandas TFA, que se usan para delinear los segmentos terminales de los cromosomas (telómeros) para poder identificar los puntos de ruptura en algunas translocaciones (23,24).

Bandas CBG: Esta técnica es utilizada para identificar heterocromatina constitutiva localizada en todos los centrómeros, regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, 16 y región distal de los brazos largos del Y (17,21). Las bandas C de los respectivos cromosomas homólogos pueden variar significativamente, así como también entre individuos (17). Las variaciones son comúnmente

conocidas como polimorfismos ó heteromorfismos. Los heteromorfismos de las bandas C no tienen significancia clínica. El tamaño y posición de las bandas C en cada cromosoma es característico y consistente en diferentes células y tejidos. Sin embargo, translocaciones con al menos un punto de ruptura en la región de bandas C pueden ser investigadas para precisar el punto de ruptura y evaluar el estado de la región centromérica (17,22).

El número de bandas que se obtienen en cromosomas metafásicos, por conjunto haploide, varía entre 150 y 320 bandas. Al utilizar técnicas de bandeado de alta resolución es posible observar hasta 1,200 bandas por conjunto haploide. Si se sincroniza a las células con el empleo de metrotexato, con lo cuál cesa la síntesis de ADN y ésta es renovada con timidina, los cromosomas pueden observarse en profase tardía o en prometafase (16,19). Esto ha permitido incrementar la agudeza de la correlación clínico citogenética, lo cual ha tenido particular aplicación en el estudio de las alteraciones citogenéticas en las leucemias.

Sin embargo, con el advenimiento de las técnicas de genética molecular y su combinación con los progresos en otras áreas de la biología celular y tumoral se ha intentado elucidar, en muchos casos, el mecanismo molecular implicado en la iniciación y progresión neoplásica (13), aunque aún queda mucho por estudiar y descubrir.

3.2 Nomenclatura

El ISCN en el IV Congreso Internacional de Genética Humana, que tuvo lugar en París en 1971, acordó tratar de uniformar el sistema de identificación de los cromosomas humanos. Se estableció que los cromosomas se clasificaban según su tamaño, localización del centrómero, y patrón de bandeo de cada brazo. Los autosomas se enumeran desde el par 1 al 22 en orden decreciente de longitud, el par sexual se denomina X y Y. Cuando los cromosomas son teñidos sin aplicar técnicas de bandeo se pueden identificar siete grupos cromosómicos (A, B, C, D, E, F, G), teniendo en cuenta el tamaño y posición relativa del centrómero. Cuando se realizan técnicas de bandeo, todos los miembros de los grupos A-G pueden caracterizarse por su patrón de bandeo específico, lo que permite individualizar a cada uno de ellos (26,27).

Los brazos cromosómicos se denominan: corto (p) y largo (q); en cada uno de ellos podemos identificar bandas que son enumeradas consecutivamente desde el centrómero hacia el telómero de cada brazo. Para designar cada banda se requieren 4 requisitos: a) el número de cromosoma, b) el símbolo del brazo, d) el número de la región, y d) el número de la banda y subbanda (26,27).

Las alteraciones cromosómicas pueden ser numéricas significando la pérdida ó ganancia de cromosomas completos (escribiéndose un - ó un + antes de los cromosomas en cuestión), ó pueden ser estructurales que se denotan como: (t) translocación, (inv) inversión, (ins) inserción,

(del) deleción, (dup) duplicación, (i) isocromosoma, (r) anillo, (dic) dicéntrico, (marc) marcador (26,27).

Además se estableció que la observación de al menos dos células "pseudodiploides" ó hiperdiploides o de tres células hipodiploides con la misma alteración, pone de manifiesto la presencia de una clona anormal. Los pacientes cuyas células no muestran alteraciones ó en quiénes éstas no son constantes son considerados normales. Los cambios aislados pueden deberse a artefactos técnicos ó errores mitóticos al azar. La presencia de una clona normal se confirma por la observación de al menos una célula sin alteraciones, siempre y cuando no se usen estimuladores in vitro (19).

Heim y Mitelman (28) sugieren que las aberraciones cromosómicas en desórdenes neoplásicos son de tres tipos:

Primarias: Se encuentran frecuentemente como anomalía única y se asocian específicamente al tipo de tumor, estas son el paso esencial en el establecimiento de la neoplasia.

Secundarias: Nunca se encuentran como cambios únicos, a menudo son adicionales a la anomalía primaria y son importantes en la progresión del tumor.

Ruido citogenético: Está constituido por cambios cromosómicos al azar, no ejercen un papel trascendental en la progresión de la enfermedad.

3.3 ANORMALIDADES CROMOSOMICAS PRIMARIAS EN LLA

Actualmente se sabe que las anomalías cromosómicas encontradas en las células malignas no son alteraciones constitucionales del individuo sino adquiridas durante el proceso maligno. Es por ello que el poder demostrar la presencia de alteraciones cromosómicas de tipo clonal resulta sumamente importante para la caracterización de la enfermedad (28). En la LLA se ha encontrado que 50-70% de los casos presentan anomalías cromosómicas clonales con técnicas estándar, mientras que con técnicas de alta resolución hasta 70-95% de los casos (14).

En trabajos recientes se muestran claras evidencias de que en las translocaciones detectadas durante el proceso neoplásico están implicadas zonas del genoma que contiene oncogenes celulares, los que al ser desplazados de sus loci específicos sufren un proceso de desregulación o alteraciones en su estructura, escapando a los mecanismos de control normal (13,14,19).

3.3.1 Alteraciones Numéricas.

Las alteraciones numéricas en la LLA se observan en aproximadamente 50% de los casos con alteraciones clonales y se han considerado de gran influencia en el diagnóstico de estos pacientes (29).

A.- Hiperdiploidía

Esta alteración numérica se ha clasificado en dos grupos dependiendo del número de cromosomas implicados:

Grupo I.- incluye el rango de 47-50 cromosomas, se asocia preferentemente a morfología L2, se consideran con un pronóstico intermedio, y los cromosomas principalmente implicados en este grupo son: +21, +4, +8, +18 (29,30).

Grupo II.- posee más de 50 cromosomas, las ganancias se observan en: +21, +6, +18, +14, +4, +10. Frecuentemente se asocia a morfología del FAB L1, se considera de bajo riesgo con respuesta al tratamiento favorable, presentando remisión completa larga (>40 meses) y una sobrevida mayor después de la quimioterapia (más de 21 meses en adultos) (29,30).

Ambos subgrupos se restringen a inmunofenotipo de línea B y Pre B, tienen características clínicas muy peculiares como: baja cuenta leucocitaria, niveles bajos de deshidrogenasa láctica. Se ha visto muy frecuente en población masculina y sobretodo en niños (20% de los casos con LLA) (14,28,31).

Se desconoce la significancia biológica de la hiperdiploidía en el proceso leucémico (31). Los cromosomas extras pueden ser resultado de una selección de células sometidas a una no-disyunción de cromosomas homólogos, que contienen una mutación que provee a la célula ventaja proliferativa dosis-dependiente. Esta hipótesis implica la presencia

de mutaciones independientes en cada uno de los cromosomas afectados. Sin embargo, la mutación del gen no es crítica en el desarrollo de la hiperdiploidía, sino la ganancia de ciertos cromosomas aumenta la proliferación de células linfoides debido a un cambio de dosis o dosis relativa de un conjunto de genes (30).

B.- Hipodiploidía y casi Haploidía.

La hipodiploidía (40-45 cromosomas) es una alteración poco frecuente en la LLA (3-10% de los casos), y su significado pronóstico es pobre (32). Se asocia preferentemente a subtipo morfológico L2 con inmunofenotipo de LLA común, sin embargo también se han reportado casos con morfología L1. En cuanto a parámetros clínicos se caracteriza por poseer niveles bajos de deshidrogenasa láctica y se ha observado en niños. Generalmente esta alteración se acompaña ó es secundaria a un rearrreglo cromosómico estructural (32,33).

La casi haploidía también es un evento muy raro en las células leucémicas de la LLA, aunque no se ha observado en la LMA por lo que se sugiere que es una alteración no al azar del cariotipo (34). Este subgrupo presenta un número modal de cromosomas entre 26-28 y frecuentemente los cromosomas adicionales a la haploidía son: 21,10,14,18,16 e Y (14,34).

La LLA casi haploide se asocia con un inmunofenotipo de LLA común y morfología L1 ó L2. La sobrevida de estos pacientes es menor de un

año (6 a 9 meses) y actualmente se considera de mal pronóstico por tener una respuesta pobre a la quimioterapia (32-34).

La ganancia ó pérdida de cromosomas como eventos primarios únicos produciendo monosomías o trisomías son más comunes en LLA que en LMA. En el material analizado por el Tercer Taller Internacional de Cromosomas en Leucemias (330 casos). La trisomía 21 fue la más frecuente, seguida de +6, +8, y +18. Las monosomías observadas fueron -7, -5 y -20 (33).

3.3.2 Alteraciones Estructurales.

La alteración más común es la pseudodiploidía (69%), dentro de este grupo se han reportado más de 15 anormalidades estructurales diferentes como eventos primarios en LLA. Algunas de ellas tienen importancia clínica particular, ya que se asocian específicamente con un inmunofenotipo y proveen de un mecanismo molecular para la patogénesis de la LLA (14,28). En general clínicamente es importante la identificación de los pacientes con pseudodiploidía debido a que tienen muy mal pronóstico. Se necesitan tratamientos muy agresivos para preparar a los pacientes para un trasplante de médula ósea durante la primera remisión. En un tercio de los adultos con tales aberraciones el promedio de sobrevida es menor de 12 meses, con más de 5 meses de remisión completa. (33).

A. t(1;19)(q23,p13)

Este rearrreglo fue descrito por distintos grupos de investigación (Carroll, 1984; Michael, 1984; Williams, 1984). Al inicio se reportó como una translocación en 1p21 y 19q13. Subsecuentemente se vió que el punto de ruptura del cromosoma 19 era en 19p13 (35-37). Esta translocación puede ocurrir en dos formas: como una translocación balanceada donde las células tienen un 1q- y el 19p+; y como una translocación no balanceada donde los dos cromosomas 1 son normales y el material cromosómico adicional derivado del 1 se encuentra en 19p+; siendo ésta última la más frecuente (38).

El porcentaje de aparición es variable entre 5-10% en distintas publicaciones (35-37). Esta alteración está asociada a morfología L1 del FAB e inmunofenotipo pre-B (38). El pronóstico para estos pacientes es controversial, sin embargo algunos investigadores lo consideran de alto riesgo (38-40). Otras publicaciones consideran que aquéllos pacientes con t(1;19) no balanceada tienen mejor pronóstico que aquéllos que tienen la t(1;19) balanceada (40). Sin embargo, Raymondí (39) sugiere que la sobrevida de estos pacientes puede mejorar con tratamientos intensivos.

Las anomalías cromosómicas adicionales a la t(1;19), se han reportado en 50-70% de los casos, siendo las más frecuentes copias adicionales de 1q, del 6q, i(9q) y t(14p). Sólo los casos der(19)t(1;19) presentan i(7q) y del(9p) y en los de la t(1;19) presentan rearrreglos en 13q (40). Este último más tarde fué de

particular interés ya que aquí se encuentra localizado el gen de retinoblastoma (Rb) que en estudios recientes se ha visto implicado en leucemias linfoides (41).

No se conoce aún el mecanismo exacto por medio del cual la $t(1;19)(q23;p13)$ participa en la leucemogénesis. Sin embargo se ha visto que implica al gen E2A localizado en 19p13 el cuál incluye dos DNA's copia E12 y E47 que normalmente se unen a la secuencia kappa E2 del DNA, localizada en el "enhancer" de la cadena kappa de las inmunoglobulinas. Las consecuencias genéticas de la $t(1;19)$ son el rearreglo y la juxtaposición del gen E2A en 19p13 con un gen en el cromosoma 1, PBX1 el cual codifica para una proteína con una caja homeótica(41). El rearreglo presenta como resultado la síntesis de un transcrito más largo que el mensajero normal de E2A, del cuál se desconoce su actividad, por lo que se requiere una investigación más exhaustiva. En cuanto a la variante der (19), se desconocen las consecuencias del rearreglo. Observaciones hechas en algunos estudios reportan un mejor pronóstico para aquellos pacientes que pierden la clona der 1q. Esto sugiere que los eventos que ocurren en este locus pueden ser más importantes que la quimera E2A/PBX1 en la resistencia al tratamiento (42-43).

B. $t(4;11)(q21;q23)$

Este rearreglo fue descrito por primera vez por Oshimura en 1977 (44), y posteriormente por Van den Berghe en 1979 (45). Su frecuencia

es de aproximadamente 6% de los casos con LLA, se presenta tanto en niños como en adultos sobre todo en jóvenes (46). Cursa con cuadros clínicos muy agresivos como hiperleucocitosis, alto porcentaje de blastos en sangre periférica, hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatías. Esta translocación está asociada a muy mal pronóstico, pueden lograr una remisión completa con duración menor a 4 meses. La supervivencia es de 7 a 12 meses cuando se presenta como anomalía única; pero cuando se asocia a otros rearrreglos (translocaciones e hiperdiploidias > de 50 cromosomas) el pronóstico mejora (45,47).

Se asocia a morfología L1 ó L2 del FAB e inmunofenotipo de células pre-B. Sin embargo el origen de las células blásticas ha sido muy discutido ya que se han presentado evidencias de que las células presentan características de diferenciación hacia la línea linfocítica y mielocítica (14,46,47). Estos estudios sugieren que existe una transformación de un precursor multipotencial ó bien que la expresión del gen translocado produzca el fenotipo ambiguo, dando características mixtas a las células. Algunos estudios con biología molecular han reportado rearrreglos en el locus de cadenas pesadas de Ig's. Mirro (48) demuestra un patrón de hibridación múltiple en estas regiones, resultado de la gran diversidad de combinaciones de los segmentos V, D, J; presentando todos sus pacientes pérdida de la cadena ligera de Ig ó rearrreglos en el gen TCR, indicando que la malignidad de la clona es derivada de un precursor temprano de células B.

El cromosoma 11 banda q23 es un punto de ruptura frecuente en la LLA. Se ha visto implicado en los siguientes rearrreglos. t(4;11) (q21;q23) en 10% de los casos de LLA, t(11;19)(q23;p13) en 2% y t(1;11)(p32;q23) en <1% (51). En estudios recientes se reportó que el gen LLA-1 se localiza en 11q23 y abarca aproximadamente 100kb, este contiene por lo menos 21 exones y codifica para una proteína de más de 3910 aminoácidos. Contiene 3 regiones homólogas al gen Trithorax de Drosophila, dos de estas regiones contienen dominios de dedos de zinc que presumiblemente interactúan con el DNA. La última región constituida por 220 aminoácidos corresponde a la porción terminal. Por tal homología se ha extrapolado la actividad del producto del gen Trithorax a la del gen LLA-1. Así se ha definido como un factor de transcripción que está implicado en la regulación de genes que controlan el desarrollo y/o diferenciación tisular humana (transformación homeótica) (52).

El mecanismo molecular implicado en la t(4;11), sugiere que el gen LLA-1 se rompe en una región codificante dando como resultado la fusión en fase de un marco de lectura abierta de LLA-1 con un gen en el cromosoma 4 (AF-4). Se predice la presencia de dos proteínas quiméricas producto de la t(4;11). Sin embargo se carece de información sobre la proteína normal AF-4, por lo que no es posible saber si también es factor de transcripción que intercambia dominios funcionales con LLA-1 dando lugar a un factor de transcripción quimérico. Así mismo, tampoco se ha podido establecer cuál de los dos productos es oncogénico, aunque probablemente sea el derivado de LLA-1 el responsable (51,52).

C. t(9;22)(q34;q11).

La presencia del cromosoma Filadelfia (Ph'), en células de médula ósea de pacientes con LLA se describió por primera vez en 1970 antes de la introducción de las técnicas de bandeo (14). El Tercer Taller Internacional de Cromosomas en Leucemias informa que esta alteración es una de las más comunes en L1 y L2 (nunca se observó en L3) (53). Se presenta en 15-25% de los casos adultos y en 5% de los casos pediátricos. Independientemente de la edad, cursan con mal pronóstico ya que responden pobremente a la terapia, y sólo 54% de ellos alcanzan la remisión completa (con duración de 8-12 meses). Por lo que estos pacientes son candidatos a recibir transplante de médula ósea al adquirir la primera remisión, sin embargo aún así la sobrevida de estos pacientes es corta, 12 meses (53,54).

En cuanto a la caracterización inmunológica de los casos Ph+, la gran mayoría presenta fenotipo compatible, con diferenciación B (precursor B, LLA común ó pre B); ocasionalmente exhiben características de células T (14,28,54).

Citogenéticamente el marcador Ph+ en células de LLA, es indistinguible de la t(9;22)(q34;q11) específica de LMC, a partir de aquí surge la interrogante de si la LLA Ph+, verdaderamente representa una leucemia aguda de novo ó es un estado blástico de LGC, no diagnosticado previamente. Ya que ambos padecimientos presentan cambios semejantes tales como un segundo cromosoma Ph', trisomía 8 y monosomía total o parcial del 7 (55,56).

Sin embargo, se han presentado algunas diferencias que han permitido diferenciar a estas dos entidades y son las que a continuación se mencionan:

a) Las metafases normales en médula ósea son muy frecuentes en LLA y no han sido observadas en LMC en crisis blástica. Sin embargo, se ha visto presente el cromosoma Ph', prácticamente en todas las líneas celulares en LMC y en cambio en la LLA se observó que está ausente en colonias no linfoblásticas como las eritroides y mononucleares entre otras (56,57).

b) El cromosoma Ph' usualmente desaparece durante la remisión y en la LMC es raro (57).

c) Citogenéticamente hay otros rearrreglos cromosómicos como del(10q), t(1;4), +4, -20, +19, inv(3), que han sido reportadas tanto en pacientes con LLA Ph+ como Ph- y que están ausentes en crisis blástica de LMC (56,57).

d) En la LMC se presentan translocaciones variantes del cromosoma Ph' que pueden implicar tres ó más cromosomas. Estos rearrreglos frecuentemente implican un segmento de 22q translocado a otro cromosoma diferente del 9, principalmente el 2. En la mayoría de estas translocaciones citogenéticamente no parece participar el cromosoma 9, pero molecularmente si se detecta su presencia en el rearrreglo (56,57).

e) Hay casos de LGC en los que el Ph' no se reconoce en los intercambios complejos, que corresponderían a un Ph' enmascarado, pero por técnicas moleculares se ve que si está implicado el cromosoma 22. Esto no se presenta en LLA Ph+ (33).

El cromosoma Ph', fué la primera anomalía citogenética asociada específicamente con leucemia (53). En 1973, se descubrió que el Ph' resulta de la translocación recíproca balanceada del cromosoma 9 y 22, pero más tarde con el gran avance de las técnicas a nivel molecular se han elucidado las bases moleculares de este rearrreglo (56-58).

Esta se forma por la fusión de los genes *abl* del cromosoma 9 y *bcr* del cromosoma 22 (58).

El proto-oncogén *c-abl* (9q34.1) es el homólogo normal del gen transformante del virus de la leucemia murina de Abelson, que causa leucemia de células pre-B en el ratón (56,57). Tiene una longitud de 230 pb y comprende 11 exones de los cuales el primero en el extremo 5' es alternativo (Ia ó Ib) y los restantes son constantes (53-55). Codifica para una tirosincinasa localizada en el citoplasma ó en el núcleo dependiendo de su primer exón. Las leucemias asociadas con proteínas ABL, presentan tanto in vivo como in vitro autofosforilación de residuos de tirosina mientras que la proteína celular normal no presenta autofosforilación. Esto hace pensar que la alteración de la actividad de la proteína-cinasa es crucial en la leucemogénesis (57,58).

El punto de ruptura en el cromosoma 22 ocurre en la región bcr (breakpoint cluster region), que contiene 13 exones que codifican para una serie de fosfoproteínas ; esta proteína BCR tiene actividad de serin-treonincinasa, su función hasta ahora es desconocida (56). El punto de ruptura es variable, cuando la translocación abarca el primer exón se denomina región menor de BCR (m-BCR), y si es el 2o. y 3er. exón región mayor de BCR (M-BCR). En publicaciones recientes se reportó que la LLA de novo puede presentar los dos tipos de ruptura (m-BCR/M-BCR), mientras que en la LMA sólo se presenta en M-BCR (58).

El transcrito quimérico bcr/abl de 8.5 Kb se traduce a una proteína quimerica de 210 kd en las células de LMC y en algunos casos de LLA (rompimiento en M-BCR). Cuando el rompimiento es en m-BCR se forma un RNAm de 7 kb que se traduce en una proteína de 190 Kd exclusivamente encontrada en LLA. Ambas proteínas tienen una actividad incrementada de tirosincinasa dando lugar a la leucemogénesis (57).

Los mecanismos que llevan a ésta translocación aún no son muy claros. Sin embargo, se han plantado dos hipótesis que podrían explicar la naturaleza del rearrreglo: La primera supone que la t(9;22), resulta de un error en el mantenimiento de la reparación del material genético. La selección somática de un rearrreglo en particular como esta translocación puede ocurrir a causa de su potencial maligno. Ya que puede tener un efecto de "mancha caliente" debido a características propias de las secuencias tipo bcr y abl lo cual promueve su ruptura y unión recurrente (59).

Algunos estudios en células malignas linfocíticas, proponen como posible mecanismo la 2a. hipótesis: Esta supone que el rearrreglo es generado por errores en los mecanismos de la recombinación somática activados en los genes de inmunoglobulinas y receptor de células T (59).

Estos errores implican un segundo locus que citogenéticamente produce la translocación. En 1985 Rogers (60), sugiere que las secuencias Alu son las "manchas calientes" que pueden generar una recombinación ilegítima en la t(9;22), ya que estas secuencias han sido detectadas en las secuencias bcr-abl. Esto fué mas evidenciado al encontrar reportado un caso de LLA Ph+, con un rearrreglo en el primer intrón de bcr observándose invertidas las secuencias Alu en el punto de ruptura tanto del cromosoma 9 como del 22. Este mecanismo propuesto es el resultado del mal apareamiento de 2 horquillas por la inversión de las secuencias Alu. Sin embargo, este hecho no se ha reportado en otros casos y sería intrigante saber si dichas horquillas implican un 3er punto de ruptura común, visto en las translocaciones variantes del Ph+ (57,59).

Sin embargo habría que estudiar más a fondo estos mecanismos para tomarlos como causales de la t(9;22), y con esto permitir dar mejor tratamiento a estos pacientes.

D. del(6q)(q15-q21)

Esta es una alteración bastante frecuente (5-10%) en LLA y en linfomas no-Hodgkin, pero nunca se ha encontrado en LMA. La razón de esta especificidad celular se desconoce (14).

La mayoría de los casos 6q- corresponden a LLA común, la morfología siempre es L1 ó L2 . Se han comunicado muy pocos casos de delección 6q y linaje T. Predomina en niños y adolescentes. Esta alteración se considera de pronóstico intermedio, con buena respuesta al tratamiento. Entran en remisión completa 75% de los casos hasta por 25 meses y tienen una sobrevida de 29 meses (14,28).

Al igual que en la del(5q) en síndromes mielodisplásicos (SMD), el punto de ruptura en el cromosoma 6 es muy variable, y va desde delecciones intersticiales a terminales (33).

Un oncogén celular, c-myb, se ha localizado en 6q21-24. Se ha podido determinar niveles elevados de RNAm de c-myb en células portadoras del marcador 6q-. Estos estudios demuestran que la alteración a nivel del oncogen puede ser de importancia en la patogénesis de las neoplasias linfoides. La principal consecuencia de la delección sería un efecto de posición más que la pérdida en el segmento cromosómico de un gen con actividad de antioncogen ó tumor-supresor.(61).

E.- t(9;v)(p21;v) o del (9)(p21).

Las anomalías en el brazo corto del cromosoma 9, son bien conocidas en la LLA (62). El primero en reportar esta anomalía fue Chilcote en 1985 en un grupo de niños con LLA y anomalías en 9p, en quienes sugirió que la monosomía parcial de 9p está asociada con inmunofenotipo de células T, con marcada leucocitosis, esplenomegalia y nódulos linfáticos agrandados (62,63). Un panorama más heterogéneo fue sugerido por otros autores, que incluían en sus publicaciones tanto pacientes con translocación balanceada implicando 9p como pacientes con monosomía de esta región. Ellos describían pacientes con diferentes tipos de LLA de células B; y sugirieron que aunque el porcentaje de esta alteración era frecuente (7-10%), no estaba relacionado con el inmunofenotipo (63). Más tarde en 1989, Murphy (64) comentó que esta anomalía presenta un cariotipo complejo, pero que es notable que estos pacientes tengan características bien definidas por lo que se trataba de una nueva translocación específica (64). Aunque en la literatura se menciona como una alteración casi exclusiva en niños, recientemente se ha reportado en pacientes adultos sobre todo jóvenes (62).

El mecanismo por el cual el material cromosómico se pierde es muy variado e incluye deleciones, translocaciones no balanceadas y pérdida completa del cromosoma 9. Los puntos de ruptura más comunes son en la región 9p21-22 (14,62).

Los genes para el interferon alfa y el interferon beta-1 se encuentran localizados en el cromosoma 9p22 (65). Díaz y cols (66), encontraron pérdida de la homocigocidad y heterocigocidad del gen de interferon en 7 de 15 líneas celulares provenientes de pacientes con LLA. Estos investigadores especulan que la pérdida o ganancia de estos genes de interferon podrían estar relacionado con la proliferación maligna en LLA, ya que se conoce que el interferon afecta la proliferación y diferenciación celular. Alternativamente la pérdida de un conjunto de genes tumor-supresores pueden ser defectos genéticos relevantes asociados con leucemogénesis en células con esta delección (66).

F.- del 12 (p12).

Los rearrreglos cromosómicos implicando 12p12 ocurren en 10% de los pacientes con LLA. En un estudio de 23 casos con anomalías en 12p12 hecho por Raimondi (67), 18 tenían LLA común, 3 pre-B, y 2 LLA-T. Sin embargo ninguno de estos casos tenían pronóstico favorable ya que presentaban cuenta leucocitaria alta. En otras publicaciones se reportaron dos translocaciones no al azar, $t(7;12)(q11;p12)$ y $dic(9;12)(p11-p12;p12)$, que tienen puntos de ruptura en esta región. En las cuáles 8 pacientes reportados con $dic(9;12)$, 7 tenían cariotipo hipodiploide como anomalía secundaria, todos eran niños, y se encuentran en remisión. Por lo que el pronóstico y significancia de ésta anomalía es controversial (68).

El oncogén K-ras-2 se localiza en 12p12 y posiblemente esté implicado en la patogénesis de la enfermedad (69).

G.- t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11) y t(2;8)(p12;q24)

Estas tres translocaciones se encuentran en LLA tipo L3 y en linfomas Burkitt. Están específicamente asociadas a células de estirpe B (70). Algunos estudios han demostrado que estos marcadores se encuentran más frecuentemente en varones adultos que en niños ó mujeres. Se asocian a baja respuesta al tratamiento y corta sobrevivida (5 meses en promedio) (33,53).

La translocación (8;14) es la más común (75-85%) de los casos de L3, constituyendo la t(2;8) y t(8;22) el 10-15%. La naturaleza del rearrreglo se estableció por técnicas de alta resolución identificando a las sub-bandas 8q24.13 y 14q32.33 (71). Además de que se han reportado cambios cromosómicos adicionales a estas translocaciones en 70% de estos casos. Los rearrreglos estructurales en el cromosoma 1 son las anormalidades secundarias más frecuentes, en particular la trisomía parcial de 1q presente en 30% de los pacientes (14,33,70).

Las tres translocaciones muestran en común el punto de ruptura en el cromosoma 8, en la banda 8q24, lugar donde se encuentra ubicado c-myc (homólogo humano del oncogen del virus de la mielocitomatosis aviar). El oncogén c-myc consta de tres exones interrumpidos por dos intrones. El primer exón en el extremo 5' tiene un codón de

terminación y por lo tanto no se traduce en proteína. El segundo y tercer exones se transcriben a RNAm y se traducen a una proteína con propiedades de unión a DNA (33).

Los otros tres cromosomas 2, 14 y 22, poseen genes de inmunoglobulinas, localizados precisamente, en los puntos de ruptura que caracterizan a las translocaciones antes mencionadas. En el cromosoma 14 se encuentran los genes para las cadenas pesadas, en el 22 para las cadenas ligeras lambda y en el 2 para las cadenas ligeras Kappa (10,11).

En el cromosoma 14, la región C del gen de cadena pesada de inmunoglobulinas es proximal y la V es distal, a nivel de la banda 14q32. Al producirse la t(8;14) la región V se transloca al brazo largo del cromosoma 8 y el gen c-myc pasa a la región distal del brazo largo del cromosoma 14. Cuando se estudian las t(2;8) y t(8;22) se observa que las regiones C y V de los genes de las cadenas ligeras Kappa y lambda muestran una orientación invertida, siendo la región proximal V y la distal C. Al producirse las translocaciones, en ambos casos, el oncogen c-myc se mantiene en el cromosoma 8 y se le une la región C, mientras que la región V permanece en el cromosoma de origen. Como vemos en las t(2;8) y t(8;22), el c-myc permanece intacto, en tanto que la t(8;14) el c-myc se rompe y solamente una porción de éste es translocada y queda con una orientación invertida con respecto a la región C del gen de las cadenas pesadas en el cromosoma 14 (70).

El resultado de este fenómeno es la yuxtaposición del c-myc con un locus de inmunoglobulinas. Se piensa que este fenómeno conduce a la desregulación del c-myc con su consecuente expresión constitutiva en las células tumorales, lo que podría ser la base de la transformación maligna (70).

H.- t(8;14)(q24;q11), t(10;14)(q24;q11) y t(11;14)(p13;q11).

Estas tres aberraciones fueron asociadas con neoplasias de células T por varios autores (72). Se asocian a morfología L1 ó L2 del FAB y actualmente no hay características clínicas que lo distingan de otros subgrupos de LLA (14,33). De los pacientes con alteraciones cromosómicas de cualquiera de estos tres tipos y sus variantes, 60% alcanza la remisión completa con duración de 4 meses. En general tiene una sobrevida corta (4meses) cuando se presenta como anormalidad primaria única. Pero el pronóstico se modifica alargando la sobrevida cuando el paciente desarrolla como anormalidad secundaria, hiperdiploidía >50 cromosomas (14,33,53).

Existen múltiples reportes acerca del mecanismo por el cual estos rearreglos contribuyen en la leucemogénesis ya que molecularmente estas anormalidades están bien definidas: las tres implican una ruptura proximal en el brazo largo del cromosoma 14 y por técnicas de alta resolución se ha elucidado el punto de ruptura (14q11.2) (33). En este sitio se han mapeado los genes para las cadenas alfa y delta

del receptor de células T (TCR) y cada una de estas variantes implica uno de estos loci en el rearreglo (12,14).

t(8;14)(q24;q11) Esta translocación se ha comparado con el rearreglo que ocurre en las neoplasias de células B con t(8;14)(q24;q32). El mismo sistema enzimático es responsable de la unión V-J que participa en la recombinación entre c-myc y TCR (73).

t(10;14)(q24;q11) Esta alteración se ha observado en las células leucémicas de 5-10% de los casos de LLA de células T (76). Un gran número de análisis moleculares han revelado que este rearreglo es una simple translocación entre el gen de la cadena delta del receptor delta y la región 10q24. Sin embargo, publicaciones recientes han sugerido que se trata de un rearreglo genético muy complejo. Ya que adicionalmente a la translocación entre el receptor delta de TCR y la región 10q24, ocurre una inversión entre las regiones V y J de TCR. El punto de ruptura en el cromosoma 10 implica la existencia de un nuevo gen que se activa confiriendo ventaja selectiva a las células leucémicas (14,74). El sistema de recombinación enzimática que produce los rearreglos en los genes de inmunoglobulinas, podría tener una función importante en el mecanismo de la translocación (74).

t(11;14)(p13;q11) En el punto de ruptura del cromosoma 14(q11) mapea la cadena alfa de TCR por lo que se ha relacionado específicamente esta alteración al linaje T. En este locus se observó que el punto de ruptura ocurre entre las regiones V y C; por lo que las regiones J y C se translocan al derivado 11p+ y la región V permanece en el

marcador 14q-. Estos resultados han permitido determinar la orientación de estas regiones la cual es: centrómero-región V - región J - región C - telómero . El oncogen Hras-1 se ha mapeado en 11q13-14 y parece ser que su expresión se incrementa o se modifica cuando se combina con el locus de cadena alfa de TCR (14,75,76).

I. t(7;v) ó del (7q)

Las anormalidades numéricas y estructurales del cromosoma 7 son comunes en los desórdenes hematológicos (14,28,33).

En caso de presentarse como anomalía estructural los puntos de ruptura son variables, pero específicos para un inmunofenotipo determinado (9,14). En los casos de LLA de células T los puntos de ruptura se restringen a la región terminal de 7q (7q32 y 7q36); cuando es de células B la ruptura ocurre en la región proximal de 7q (7q11 y 7q22) (77).

El mecanismo molecular establecido para estos rearrreglos, implica la activación de genes del locus de TCR (cadena beta del receptor de células T) localizado en 7q31-q36 (78,79).

J.- CARIOTIPO NORMAL.

El hallazgo de cariotipos normales en la LLA es frecuente. Esto se observa en los casos en que las células leucémicas poseen una escasa

división celular y, por lo tanto, es difícil obtener metafases del tejido maligno. En otros pacientes la existencia de cambios submicroscópicos solo detectables a nivel molecular determinan un aspecto citogenético normal, a pesar de los cambios a nivel génico. Por último en otros casos, la clona anómala puede tener muy baja incidencia, por lo tanto prevalecen las células normales. Generalmente en este grupo se incluyen todos los pacientes sin alteraciones aparentes. La presencia de cariotipos normales determina un factor pronóstico favorable (80).

Otro hallazgo frecuente en la LLA es la falta de células en división. En muchos casos los estudios citogenéticos reiterados resultan infructuosos y ello se debe a la escasez de células en división. El pronóstico de estos pacientes es malo puesto que las células en reposo son más resistentes a la acción de los agentes quimioterapéuticos (14).

La presencia o ausencia de células normales en médula ósea es muy importante, ya que si en médula hay presencia de células alteradas, el riesgo de mala evolución es mucho mayor que en los casos en los que se ven células normales y anormales ó totalmente normales. Esta observación se relaciona con el hecho de que al erradicar la clona leucémica por efecto del medicamento, las células normales presentes podrían repoblar la médula ósea, llevando al paciente a remisión de la enfermedad (14,18).

CAPITULO 4

CORRELACION CLINICA.

La relación de las anormalidades cromosómicas con el pronóstico de los pacientes con LLA, ha sido debatida por los investigadores durante muchos años (80,81). Secker-Walker (82) y colaboradores fueron los primeros en presentar evidencias de que el número cromosómico es un indicador pronóstico independiente, para evaluar el tratamiento en la LLA .

Más tarde en el "El Tercer Taller Internacional de Cromosomas en Leucemias" se encuentra que tanto el número como las alteraciones cromosómicas específicas son un factor importante en la evolución de la enfermedad ya que se correlacionan con remisión completa, duración de ésta y sobrevida de los pacientes (83). Tabla IV.

Se estableció que las alteraciones numéricas como la hiperdiploidía >50 cromosomas son de pronóstico favorable y sobrevidas largas (mayores de 1 año), y aquellos pacientes con hiperdiploidía <50 cromosomas son considerados de pronóstico intermedio (81,83). Sin embargo los pacientes con casi haploidía, aunque es poco frecuente se consideran de mal pronóstico (39).

Los pacientes con pseudodiploidía principalmente con t(4;11), t(1;19), t(9;22), t(8;14), y rearrreglos que implican a los cromosomas 14q, 12p, 9p, 7q son de pronóstico desfavorable, sobrevidas menores a

TABLA IV

SIGNIFICADO PRONOSTICO DEL CARIOTIPO EN MEDULA OSEA
AL REALIZAR EL DIAGNOSTICO (14).

CARIOTIPO	REMISION COMPLETA (%)	DURACION DE LA RC (MESES)	SOBREVIDA (MESES)
>50 cromosomas	87	40	57
Normal	92	19	31
6q-	75	25	29
46 anormal	78	16	22
47-50	77	16	18
<46	71	8	12
t(9;22)	54	8	12
14q+	53	24	9
t(4;11)	69	4	7
t(8;14)	60	4	5
incluyendo variantes			

un año y un bajo porcentaje adquiere remisión completa. Sólo la del (6q) se considera de pronóstico intermedio (84,85).

Al establecerse que la citogenética es un indicador pronóstico independiente de otros criterios, se considera de suma importancia el diagnóstico citogenético que fija la pauta para determinar el tratamiento del paciente. Además si se realiza un seguimiento se puede determinar la evolución del padecimiento y respuesta al tratamiento (84-86).

Algunos estudios en LLA especialmente con cromosomas no bandeados reportan como un evento raro la evolución del cariotipo (87). Sin embargo recientemente se han reportado cambios en el cariotipo, durante la evolución de la enfermedad con una alta incidencia (80%). Hay quienes dicen que los cambios numéricos predominan sobre los estructurales; sin embargo Testa (88) reporta lo contrario.

Los cambios cromosómicos adicionales más comúnmente implicados son: deleciones de 6q, 7q y 9p, así como trisomías de los cromosomas 8, 18, y 21 (87).

En los pacientes que se encuentran en remisión, la presencia de alteraciones cromosómicas secundarias será indicativa de recaída aún cuando no se presente sintomatología clínica (87).

El uso combinado de los hallazgos citogenéticos junto con los parámetros clínicos, ha demostrado que se llega a un mejor diagnóstico, lo cual permite dar el tratamiento más adecuado.

En 1986 se llevó a cabo un Taller Internacional sobre factores pronósticos (89) Se aceptaron como los más importantes: la cuenta leucocitaria inicial, morfología del FAB, inmunofenotipo, edad, sexo, y en consecuencia la infiltración al SNC, presencia de hepatoesplenomegalia, y masa mediastinal. Tabla V

La cuenta inicial de leucocitos se consideró una variable independiente y según algunos autores, el indicador predictivo más importante en la respuesta al tratamiento. Estos estudios indican que cuanto mayor es la cifra de leucocitos, más se incrementa el riesgo para la recaída temprana (89). En algunas series se ha enfatizado que cifras de leucocitos mayores de $30,000/\text{mm}^3$ al momento del diagnóstico tienen un pronóstico pobre. La diferencia de la cifra de leucocitos ha sido analizada en un periodo de 10 años, encontrándose que en los pacientes con cifras altas de leucocitos sólo 27% permanecían en remisión completa, en comparación con los pacientes con cifras bajas, en los cuales 65% permanecen en remisión completa. La presencia de esta variable junto otros factores como son: La infiltración inicial al SNC, presencia de hepatoesplenomegalia, así como masa mediastinal empeoran el pronóstico en estos pacientes (86,89).

La edad es otra variable pronóstica independiente. Los niños con un mejor pronóstico son los que se encuentran entre 2 y 9 años de edad, mientras que los adultos con más de 35 años se consideran de mal pronóstico por responder pobremente al tratamiento (86,89).

TABLA V

FACTORES PRONOSTICO EN LLA (3,89)

FACTOR	FAVORABLE	DESFAVORABLE
Cuenta leucocitaria inicial	<30,000/ul	>30,000/ul
Morfología FAB	L1 o L2	L3
Inmunofenotipo	CALLA, pre-B, nula	LLA-B o T
Edad	Niños >2años, Adultos <35años	Niños<2 años, Adultos>35 años
Sexo	Femenino	Masculino
Afección al SNC	Ausente	Presente
Adenopatías	Ausentes	Presentes
Hepatoesplenomegalia	Ausente a moderada	Notable
Niveles de Ig's	Normales	Disminución

Otra variable independiente es la variedad morfológica, la de mejor pronóstico es la L1, siguiendo la L2 y la de peor pronóstico es la L3.

La clasificación inmunológica también tiene implicaciones pronósticas, la variedad CALLA+ con lleva un buen pronóstico, al igual que las variedades inmaduras de células B; sin embargo, aquellas células con inmunofenotipo maduro (LLA-B, LLA-T), se consideran de mal pronóstico (9).

En relación al sexo se acepta que el sexo masculino tiene mejor pronóstico, que el femenino (86,89).

La correlación de las alteraciones cromosómicas con estos parámetros clínicos, ha permitido llevar un mejor manejo de los pacientes con LLA, clasificándolos en alto y bajo riesgo según sus características citogenéticas y clínicas. Gracias a estos avances se ha alargado la sobrevida de estos pacientes dando el tratamiento más adecuado.

Capítulo 5

TRATAMIENTO

El tratamiento en algunas leucemias ha avanzado grandemente y ya no sólo se intentó inducir una remisión completa sino lograr la curación. En la LLA se ha hablado de una posible curación, por tanto, antes de planear el tratamiento, se debe intentar llegar al diagnóstico definitivo usando información clínica, morfología clásica, citoquímica y citogenética. Además puede evaluarse la evolución de la enfermedad por medio de las técnicas citogenéticas y de biología molecular. Posteriormente se debe determinar si es posible tratar de conseguir la curación, dada la naturaleza de la enfermedad, el tratamiento requerido, la edad y condición general del paciente. Si se considera imposible obtener curación por la afectación general, sólo se trata con agentes citotóxicos para reducir la masa tumoral total mejorando la función orgánica y la calidad de vida (90).

5.1 QUIMIOTERAPIA

En la mayoría de los protocolos terapéuticos el tratamiento de la LLA consta de tres fases que son: Inducción a la remisión, profilaxis del SNC, mantenimiento de la remisión.

5.1.1.- INDUCCION DE LA REMISION.

Consiste en la aplicación de una quimioterapia capaz de provocar una destrucción blástica hasta conseguir la ausencia de signos de enfermedad (91). La combinación de prednisona y vincristina induce la remisión completa en 85-95% de los pacientes con LLA. La adición de un tercer fármaco en esta fase , L-asparaginasa o antraciclinas, no mejora la tasa de remisión pero prolonga la permanencia en remisión completa, aunque desafortunadamente, aumenta la toxicidad. Durante esta fase existe un pequeño porcentaje de fallecimientos debido a complicaciones infecciosas, mientras que en aproximadamente 5% de los pacientes se observa una refractariedad al tratamiento, no pudiendo alcanzar con estos fármacos la remisión completa (91,92). Ello constituye un signo de mal pronóstico.

En estos casos se ha conseguido la remisión completa con la combinación de otros fármacos, como VM-26 (epipodofilotoxina) y arabinósido de citosina (92).

En condiciones normales, la duración de esta fase del tratamiento es de 4 semanas aproximadamente. Algunos protocolos incluyen, al finalizar la inducción de la remisión, una fase de consolidación, consistente en una intensificación del tratamiento con el fin de reducir la masa de células tumorales, especialmente las de localización extramedular (bazo, hígado, riñón). Es de corta duración y gran agresividad, por lo que se utiliza usualmente sólo en los pacientes de mal pronóstico (91-93).

5.1.2.- PROFILAXIS DEL SNC.

Durante algún tiempo las recaídas en el sistema nervioso central, fueron una de las causas más importantes del mal pronóstico de las leucemias. El acantonamiento y proliferación de linfoblastos en el SNC, considerado como un "santuario leucémico", era posible debido al difícil paso de la barrera hematoencefálica por los fármacos habitualmente empleados (91).

En los años sesenta se observó que la irradiación craneal protegía a los enfermos contra las recaídas leucémicas meníngeas. La irradiación craneoespinal se mostró más efectiva, pero en ambos casos se producía una toxicidad importante, con niveles altos de inmunodepresión y deterioro intelectual notable (91,94).

La administración de fármacos (metotrexato o arabinósido de citosina) por vía intrarraquídea ha resultado también eficaz en la prevención de la recaída meníngea de las leucemias, por lo que actualmente los protocolos de profilaxis neurológica constan de metotrexato intratecal, combinado con arabinósido de citosina, o solo junto con irradiación craneoespinal a bajas dosis (91).

Para los pacientes de riesgo estándar, parece suficiente la administración de metotrexato intratecal, mientras que los pacientes de riesgo elevado, que presentan una mayor posibilidad de recaída, deben someterse a irradiación o arabinósido de citosina, combinados

con metotrexato. Esta fase del tratamiento se lleva a cabo inmediatamente después de completar la inducción de la remisión (92).

5.1.3.- MANTENIMIENTO DE LA REMISION.

Tras la inducción de la remisión y la profilaxis del SNC, es necesario continuar el tratamiento, puesto que de otro modo, la mayoría de los pacientes sufriría recaída medular. La agresividad terapéutica mostrada durante la primera fase no puede mantenerse a causa de los efectos secundarios (92,93).

Existen diferentes esquemas para continuar el tratamiento durante esta fase:

En pacientes con riesgo estándar, el protocolo más común es la utilización continua de 6-mercaptopurina (6-MP) y metotrexato.

Algunos ensayos terapéuticos han utilizado "pulsos de reinducción" con una quimioterapia más agresiva, semejante a la utilizada en la fase de inducción de la remisión, que se continúa con periodos largos de terapéutica de mantenimiento.

Otros autores han propuesto quimioterapia intermitente con períodos de tratamiento agresivo de 5 días cada tres semanas, permitiendo la recuperación medular durante las fases libres de terapéutica.

En pacientes de riesgo elevado, el tratamiento es más agresivo, utilizándose habitualmente grupos de fármacos en forma alternativa, combinados con profilaxis del SCN (93).

5.1.4 DURACION DEL TRATAMIENTO.

Aunque este problema no ha sido claramente definido, la práctica habitual es la supresión del tratamiento tras 2.5 a 5 años de remisión continua, aunque no parece ofrecer ventajas la prolongación por más de 3 años (91,94).

De cualquier modo, la duración óptima depende de la naturaleza del programa terapéutico. En enfermos de riesgo semejante, los protocolos más agresivos deben tener una duración más corta que los programas menos intensivos (94).

Parece haber acuerdo en cuanto al hecho de que los pacientes que presentan remisión continua de su enfermedad leucémica durante un periodo de 6 años y medio tras el inicio del tratamiento, apenas tienen riesgo de recaída, por lo que pueden ser considerados como curados de su padecimiento (91,94).

5.2 TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA

Ha sido durante los últimos años el gran tema de discusión e investigación en el tratamiento en las leucemias. Aunque teóricamente

incuestionable, las dificultades para encontrar un donante HLA- idéntico y las complicaciones postransplante han hecho disminuir la euforia sobre las posibilidades reales de este tratamiento y su aplicación en la LLA (95).

La finalidad del TMO es la quimerización en el enfermo de la médula ósea de un donante histocompatible (alotransplante), tras haber destruido la médula ósea propia mediante una terapéutica muy agresiva. Se recomienda la realización de TMO, siempre que exista un donante HLA idéntico, en los enfermos con LLA que habiendo recaído durante la quimioterapia logran una segunda remisión completa (91,95).

Actualmente por la dificultad de encontrar donantes, se han comenzado a realizar autotransplantes, cuya estrategia es la infusión de médula ósea del propio paciente, obtenida previamente a la quimioterapia e irradiación corporal total y tratada in vitro, con el fin de dejarla desprovista de células leucémicas.

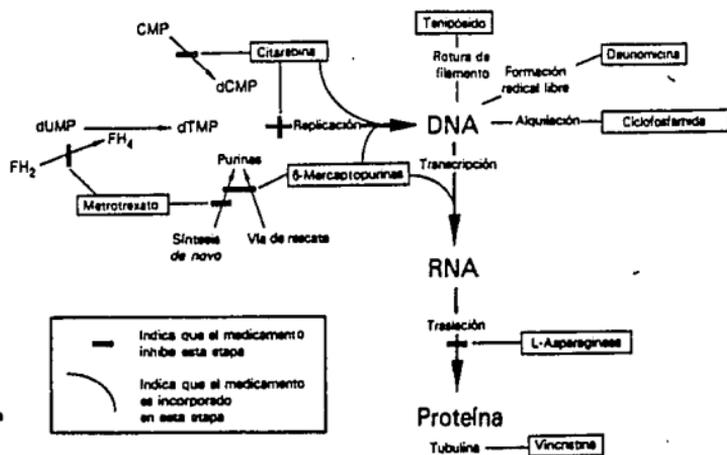
Este tipo de transplante, aunque técnicamente es muy complejo, ofrece la ventaja de no necesitar donante y de evitar la eventual enfermedad de injerto contra huésped, que junto con las infecciones suponen las mayores complicaciones postransplante(95).

5.3 MECANISMOS DE ACCION.

Los sitios de acción conocidos en los medicamentos antileucémicos se indican en la figura 2.

FIGURA 2

RESUMEN DE LOS MECANISMOS Y SITIOS DE ACCION DE AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS UTILES EN LAS NEOPLASIAS (96).



Un buen conocimiento de la cinética del ciclo celular es esencial para utilizar adecuadamente los antineoplásicos de generación actualmente conocidos. Ya que muchos de los agentes citotóxicos más poderosos actúan en fases específicas del ciclo celular; por lo tanto tienen actividad contra las células que están en proceso de división. La mayor parte de los antineoplásicos actúan específicamente sobre procesos como la síntesis de DNA, la transcripción o la función del huso mitótico, por lo que se consideran específicos de ciclo celular. (96). La tabla VI muestra los medicamentos más comunes.

TABLA VI

AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS UTILES EN EL TRATAMIENTO DE LA LLA (96

CLASE	TIPO DE AGENTE	NOMBRE COMUN (OTROS)
ALQUILANTES	MOSTAZA NITROGENADA	CICLOFOSFAMIDA (Citoxan, Endoxan)
	ANALOGO DEL ACIDO FOLICO	METROTEXATO (Ametopterina)
ANTIMETABOLITOS		CITARABINA (Citosina arabinósido, Citosar)
	ANALOGO DE PIRIMIDINA	6 MERCAPTOPURINA (6-MP, Purinetol)
		6 TIOGUANINA (TG)
	ALCALOIDES DE VINCA	VINCRISTINA (VCR: Oncovin)
PRODUCTOS NATURALES	ANTIBIOTICOS	DAUNORRUBICINA (Daunomicina rubidomicina, daunoblastina)
		DOXORRUBICINA (Adriablastin Adriamicina)
	ENZIMAS	L-ASPARAGINASA
HORMONAS	ADRENOCORTI-COSTEROIDES	PREDNISONA (Meticorten)

CAPITULO 6

MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL BIOLOGICO

Se seleccionaron 20 casos de pacientes adultos con LLA, recibidos en el Servicio de Genética del Hospital General de México, entre 1991-1993; previamente clasificados por los criterios morfológicos y citoquímicos del FAB. El estudio citogenético se realizó antes de iniciar el tratamiento y en etapas subsecuentes del mismo. Se utilizaron muestras de médula ósea (MO) y/o sangre periférica (SP). Las primeras se procesaron por técnica directa y/o estándar de cultivo de 48-72 hrs. con y sin estimulación con fitohemaglutinina. El análisis se realizó en todos los casos con bandas GTG en un mínimo de 7 metafases. Las alteraciones cromosómicas se reportan de acuerdo a la nomenclatura del ISCN. Considerando una clona normal cuando se observan al menos dos células pseudodiploides ó hiperdiploides ó tres células hipodiploides con la misma alteración. La presencia de clona normal se establece por la observación de al menos una célula sin alteraciones en MO o en SP sin estimulación.

6.2 Cariotipo en Médula Osea (97).

1.- Agregar 0.5 a 1.0 ml de aspirado de médula ósea heparinizado a un frasco de vidrio ó tubo cónico, el cual lleva 10 ml de la siguiente

solución: 9 partes de KCl 0.075M más una parte de solución de tripsina-EDTA al 0.25% más colchicina a una concentración final de 0.08 g/ml.

2.- Esta suspensión de células se incuba a 37°C durante 60 min. se vacía a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml para centrifugar a 3,000 rpm durante 5min.

3.- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón, fijar en metanol-ácido acético 3:1 fresco. Dejar reposar 30min a temperatura ambiente.

4.- Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min y resuspender de nuevo en fijador. Repetir cuantos cambios sean necesarios (10 aproximadamente).

5.- Las preparaciones se hacen goteando la suspensión de células a una altura de 1.50 m sobre portaobjetos. Obteniéndose mejores resultados a la flama. Se tiñen con Giemsa (3ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) durante 5-8 min.

6.- Se observan al microscópio y se analizan.

7.- Parte de las laminillas se someten a técnicas de bandas G para tener un análisis más preciso.

6.3 Cariotipo en Linfocitos de Sangre Periférica (98).

1.- Las muestras de sangre se toman en condiciones estériles con jeringa heparinizada.

2.- Colocar 0.5 ml de sangre en 4.5 ml de medio de cultivo (McCoy 5a) suplementado con suero fetal de ternera (0.5ml) y antibióticos (penicilina 2,000U/ml + estreptomycinina 275 mg/ml). Las muestras se trabajan por duplicado adicionando sólo a uno de los frascos el mitógeno (fitohemaglutinina PHA).

3.- Incubar a 37°C durante 70.5 hrs. Adicionar 0.5 ml de solución de colchicina al 0.02% (En agua destilada estéril) e incubar a 37°C por 1.5 hrs.

4.- El cultivo se transfiere a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml. para centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min.

5.- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón. Agregar 5ml de solución hipotónica (KCL 0.075M) a 37°C agitando en el vortex. Dejar reposar durante 30min a 37°C.

6.- Centrifugar a 3,000rpm durante 5 min decantar el sobrenadante y agregar gota a gota y agitando con el vortex 5ml de fijador recién preparado (metanol-ácido acético 3:1). Dejar reposar 30min a temperatura ambiente.

7.- Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min. decantar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de fijador. Repetir esta operación cuantas veces sea necesario para obtener un botón blanco y un sobrenadante claro (5 veces aproximadamente).

8.- Para hacer las preparaciones decantar el sobrenadante y adicionar 10 gotas de fijador para resuspender. Tomar con la pipeta Pasteur y dejar caer 2-3 gotas sobre cada laminilla perfectamente limpia y desengrasada desde una altura de 10-15 cm. Dejar secar al aire.

9.- Teñir con Giemsa durante 5 min. (3 ml de Giemsa + 47 ml. de amortiguador de fosfatos pH 6.8). Lavar con agua corriente y dejar secar.

10.- Observar al microscópio. Si las metafases están muy cerradas se pueden abrir haciendo laminillas desde una altura mayor ó dando más cambios en fijador. En ocasiones es necesario hacer las laminillas a la flama (sobre portaobjetos bañados en alcohol al 70% y pasando a la flama para secar). Si por el contrario las metafases están rotas, es posible refrigerar el botón para que se cierren las mitosis durante toda la noche y posteriormente hacer las laminillas.

6.4 Bandas G (22).

1.- Las preparaciones cromosómicas se secan al aire y se dejan envejecer durante una semana. Se colocan las laminillas por

aproximadamente 10 seg o más, según cada caso, en una solución que contiene 3 ml de solución de tripsina al 1% + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH (6.8) a 37°C. Nuevamente se lavan con agua corriente y se secan al aire.

Se analizan al microscopio y se seleccionan metafases bien bandeadas para fotografía.

B. Solución de tripsina al 1%.

Para su preparación se disuelve un gramo de tripsina en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.01M a pH 6.8 libre de calcio y magnesio (con EDTA al 0.02%). Agitar durante 5 a 6 hrs en agitador magnético. Filtrar y fraccionar en alícuotas pequeñas (5-10 ml) para guardar congelada.

C. Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 (Sorensen)

En un matraz aforado de 1000 ml se disuelve en agua destilada 6.63g KH_2PO_4 más 2.56g de Na_2HPO_4 , y se afora ajustando el pH.

CAPITULO 7

RESULTADOS

Se analizaron 20 pacientes con diagnóstico de LLA, 16 de sexo masculino y 4 de sexo femenino; la edad oscila entre 16-47 años, predominando los adultos jóvenes con una media $\bar{X}=19$ años y una mediana de 20.

En cuanto al fenotipo morfológico sólo dos pacientes (casos 3 y 4), fueron diagnosticados como L1 y el resto son L2. El inmunofenotipo se reporta sólo en aquellos pacientes en que se realizó el estudio.

Se reporta la cuenta leucocitaria inicial, para establecer el riesgo clínico considerándose de alto riesgo $>30,000$ leucocitos/mm³.

La remisión completa se establece cuando el paciente está asintomático y presenta características clínicas de riesgo bajo, observándose que sólo 4 pacientes no adquirieron remisión completa durante el tratamiento.

Los pacientes estudiados recibieron dos tipos de tratamiento, dependiendo de la entidad clínica de la que provienen, estos consistieron en lo siguiente:

TRATAMIENTO #1 (Hospital General de México):

Inducción.- VAP (Vincristina, Ara-C, Prednisona)

Consolidación.- Ciclofosfamida, Alexán.

Mantenimiento.- 6 mercaptopurina (6 MP), metrotexate (Mtx).

Pseudo reinducciones.- VM26, Alexán.

TRATAMIENTO #2 (Centro Médico Nacional S.XXI)

Inducción.- OPA, (Oncovin, Prednisona, Ara-C), L-Asparaginasa.

Consolidación.- Ara-C, Mitoxantrona.

Mantenimiento.- 6 MP, Mtx.

Todos recibieron profilaxis al SNC, después de la primera inducción.

La sobrevida de los pacientes se determinó, a partir del momento en que fueron diagnosticados, hasta el último cariotipo realizado. Hubo tres fallecimientos.

Los datos clínicos de los pacientes al realizarse el diagnóstico se presentan en la tabla VII.

Todos los casos presentaron clonas anormales, al cariotipo inicial (75% en MO y 25% en SP). Por lo que fueron candidatos a realizarles cariotipos subsecuentes para evaluar la evolución de la enfermedad. Estos se realizaron por técnica directa y habitual de cultivo de 48-72 hrs. en MO sin estimular, mientras que en SP sólo por técnica habitual, con y sin estimulación.

El riesgo para cada paciente fué determinado en base a la alteración cromosómica primaria en el cariotipo inicial, clasificándose en bajo riesgo aquellos pacientes que presentan anomalías numéricas primarias (casos 1-11) y de alto riesgo con anomalías estructurales (casos 12-20).

Los rearrreglos numéricos predominan como anomalía primaria (55%) sobre los estructurales (45%). En el grupo de bajo riesgo, no se

observaron alteraciones secundarias en el cariotipo inicial, y en 5 pacientes, se presentaron alteraciones secundarias durante el seguimiento.

En el grupo de alto riesgo, 7 de 9 pacientes presentan alteraciones secundarias predominando las numéricas (4 casos) sobre las estructurales (3 casos), durante el seguimiento sólo tres pacientes adquieren alteraciones secundarias de tipo numérico.

Los hallazgos citogenéticos durante la evolución de los pacientes se muestran en las tablas VIII y IX.

En las fotos 1-3 se presenta el seguimiento citogenético de dos de los pacientes estudiados.

TABLA VII

CARACTERISTICAS CLINICAS DE PACIENTES ADULTOS CON LLA

No. CASO	SEXO/ EDAD	DX FAB/ INMUN	LEUCOCITOS INICIAL (mm ³)	TRATA- MIENTO	RESP TRATAM	SOBREVIDA (meses)
1	M/19	L1/CALLA+	4 650	1	RC	>24
2	M/17	L2	3 600	2	RC	>17
3	M/27	L2	7 800	1	RC	>12
4	M/18	L2	10 600	2	RC	>11
5	M/35	L2	15 000	1	RC	>12
6	F/16	L2/LLA-B	30 800	1	RP	15*
7	M/23	L1	96 000	2	RP	9+
8	M/24	L2	35 300	2	RC	>9
9	M/20	L2/CALLA+	8 150	1	RC	>9
10	M/23	L2	57 400	2	RC	>15
11	F/22	L2/LLA-B	15 000	1	RC	>8

12	M/16	L2	2 300	2	RC	>12
13	M/25	L2/BIF	50 000	2	RP	12
14	M/20	L2/CALLA+	68 000	2	RC	>36
15	F/37	L2/CALLA+	2 600	2	RC	>8
16	M/16	L2	280 000	2	RC	>11
17	F/17	L2	2 000	1	RC	16*/++
18	M/22	L2	5 000	2	RP	8
19	M/19	L2/LLA-B	3 500	2	RC	>12
20	M/47	L2	3 300	2	RC	>7

FAB= Clasificación Franco-Americana-Británica.

CALLA+ = Antígeno de la Leucemia Linfocitaria Común.

BIF= Bifenotípica

RP/RC= Remisión parcial/completa.

*= Falleció

++= Recaída al SNC

1 = Esquema de tratamiento #1

2 = Esquema de tratamiento #2

TABLA VIII
ANORMALIDADES CROMOSOMICAS NUMERICAS DE PACIENTES ADULTOS CON LLA
CONSIDERADOS DE BAJO RIESGO

No. Caso	Dx FAB/ INM	Mat. Anal.	Cel. Anal.	CARIOTIPO INICIAL	MESES	EVOLUCION
1	CALLA+	MO	10	46,XY/Hiperd>50		
		MO	15		8	46,XY
		SPE	25		12	46,XY
		SPE	20		15	46,XY
		SPE	15		20	46,XY
2	L2	MO	14	46,XY/ Hiperdip>50		
		SPE	12		15	46,XY
3	L2	MO	16	46,XY/Hiperd>50		
		SPE	12		6	46,XY
4	L2	MO	7	46,XY/ Hiperdip>50		
		SPE	18		6	46,XY
5	L2	MO	10	46,XY/Hiperd>50		
		SPE	8		6	46,XY
6	LLA-B	MO	12	46,XX/Hiperd>50		
		SPNE	12		12	47,XX,+8/48,XX,+8,+10
7	L1	MO	10	46,XY/ Hiperd>60		
		MO	16		8	46,XY/47,XY,+8
8	L2	MO	12	46,XY/ Hiperdip>50		
		MO	12		7	46,XY/45,XY, del(6)(q24),-19 46,XY/Hiperdip>50
9	CALLA+	MO	20	46,XY/48,XY, +17,+mar.		
		MO	10		4	46,XY
		SPE	18		6	47,XY,+mar.
10	L2	MO	16	46,XY/48,XY,+8, +21/47,XY,+8		
		MO	13		12	46,XY
11	LLA-B	MO	10	46,XX/48,XX, +21,+mar.		
		SPE	15		6	46,XX,t(11;21)(q23;q11)

CALLA (+)= Antígeno de la Leucemia Linfoblástica común

FAB= Clasificación Franco-Americana Británica.

MO= Médula Osea SPE/SPNE= sangre periférica estimulada/no estimulada

TABLA IX
ANORMALIDADES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES DE PACIENTES ADULTOS CON LLA
CONSIDERADOS DE ALTO RIESGO

No. Caso	Dx FAB/ INM	Mat. Anal.	Cel Anal.	CARIOTIPO INICIAL	MESES	EVOLUCION
12	L2	SPE/ MO	9	46,XY,t(7;11)		
			14	(q34;q23),t(6;18) (q23;p11)		
			MO 16		12	46,XY,t(7;11)(q34;q23)
13	L2 BIF	SPE	18	46,XY,t(7;11) (q34;q23)/46,XY, t(7;11)(q34;q24), dup(1)(q21q32)		
			MO 23		12	46,XY/46,XY,t(7;11) (q34;q23)
14	L2 CALLA+	MO	26	46,XY/46,XY,t(1;7) (p13;q33)/47,XY, t(9;22)(q34;q11),+22		
			MO 14		6	46,XY
			SPE 10		12	46,XY,t(9;22)(q34;q11)
15	L2 CALLA+	MO SPE	15	46,XX,t(1;19)(q23;p13)		
			15		6	46,XX
16	L2	MO	10	46,XY,t(9;22) (q34;q11)/Hipod		
			SPE 12	(26-45)	9	46,XY,t(9;22)(q34;q11)/ 47,XY,t(9;22)(q34;q11),+8 Hipod>80
			SPNE 16		12	46,XY/47,XY,t(9;22) (q34;q11),+8
17	L2	SPE	10	46,XX,t(4;11) (q21;q23)		
			MO 14		15	46,XX/Hipod(38-45)
18	L2	MO	18	46,XY,t(3;4) (q24;q26)del(7) (q34)/Hipod(40-45)		
			MO 15		6	46,XY,t(3;4)(q24;q26), del(7)(q34)/46,XY,t(3;4) del(7)(q34),+mar/ 49,XY,t(3;4)(q24;q26), +8,+12,+mar.
19	L2 LLA-B	MO		46,XY/ 46,XY,del(6)(q24)		
			MO		7	46,XY
20	L2	SPNE	12	46,XY/45,XY, -16,del(6)(q21)		
			MO 15		4	46,XY



FOTO 1: CARIOTIPO DEL CASO No. 12. A LOS 12 MESES DE EVOLUCION
 46,XY,t(7;11)(q34;q23)

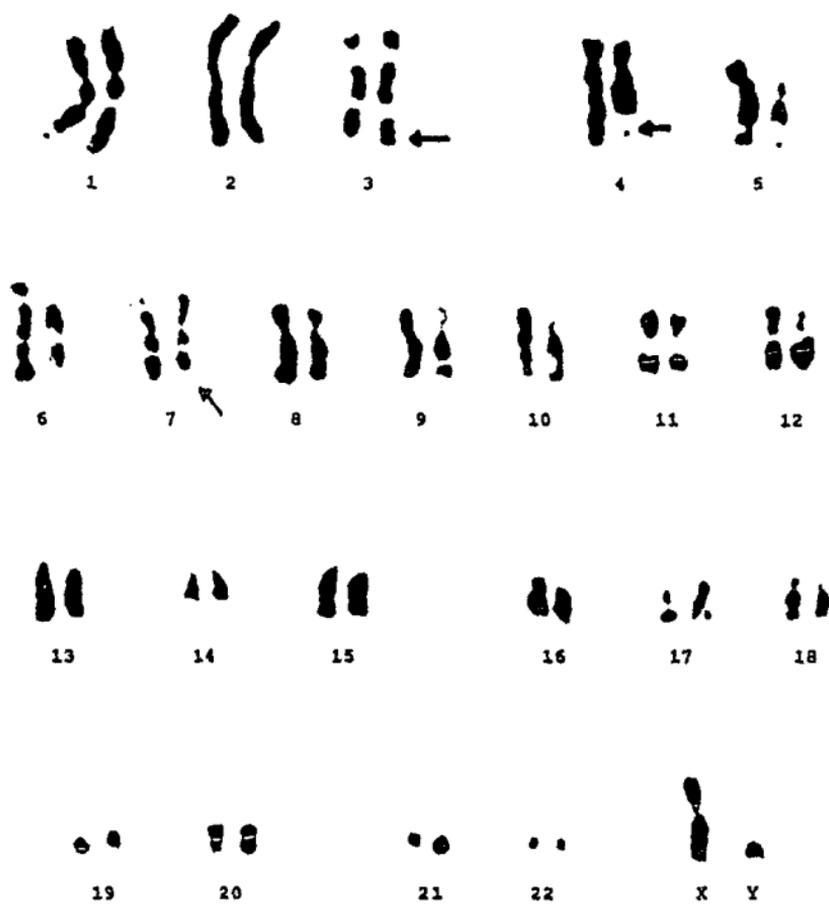


FOTO 2: CARIOTIPO INICIAL DEL CASO No. 18

46,XY,t(3;4)(q24;q26),del(7)(q34)

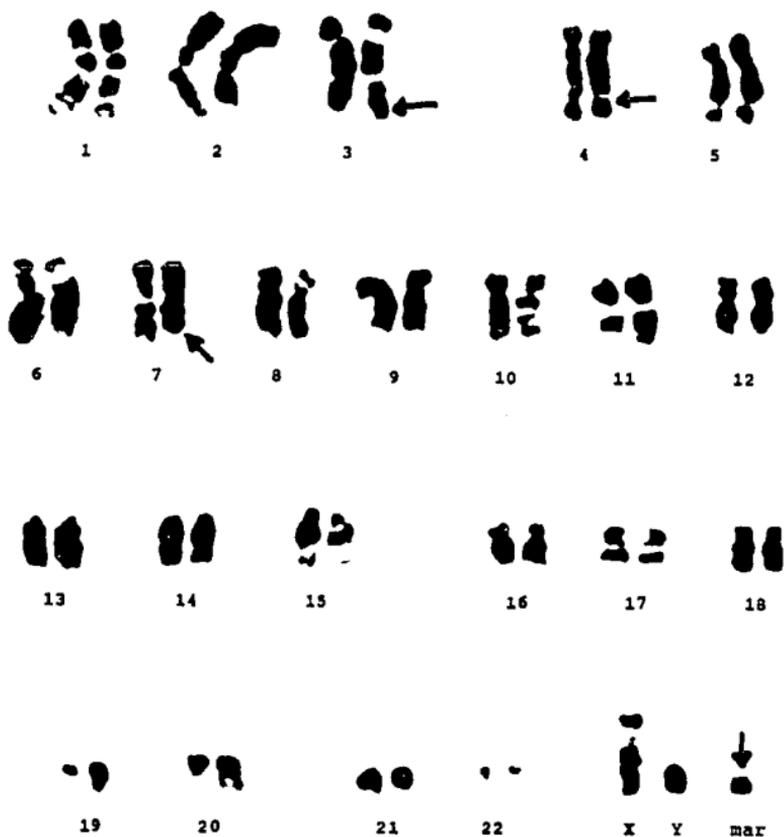


FOTO 3: CARIOTIPO DEL CASO No. 18. A LOS 6 MESES DE EVOLUCION

46,XY,t(3;4)(q24;q26),del(7)(q34),+mar.

CAPITULO 8

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Según lo reportado por varios autores, La hiperdiploidía >50 cromosomas es una anomalía cromosómica de pronóstico favorable que cursa con características clínicas de bajo riesgo. Mientras que aquellos pacientes con 47-50 son considerados de riesgo intermedio (29,81). En nuestro estudio, en el grupo de bajo riesgo, la hiperdiploidía >50 cromosomas fué la alteración más frecuente (8 casos), en todos se observó la anomalía en MO. En 5 de estos pacientes (casos 1-5) desaparece la clona anormal inicial, se encuentran en RC y llevan una SV mayor de 12 meses; además de que presentan características clínicas de bajo riesgo. Actualmente 4 de ellos (casos 1,2,3,5) están en suspensión del tratamiento.

El resto de los pacientes con ésta alteración primaria (casos 6, 7 y 8), adquieren una nueva clona anormal durante su evolución, 2 de ellos presentaron hiperdiploidía 47-50 cromosomas en SP y MO respectivamente, no entran en remisión y mueren sin responder al tratamiento de reinducción, lo cual podría explicarse por la cuenta leucocitaria alta que presentan al inicio estos pacientes (89). Durante el seguimiento el paciente 8 mantiene la clona anormal inicial en MO y además la del(6q) como alteración secundaria, esto pronostica una recaída temprana, por lo que es candidato a recibir nuevas dosis de quimioterapia ó tratamientos alternativos.

El resto de los pacientes de este grupo (casos 9,10,11) considerados de riesgo intermedio, son aquellos que presentan al cariotipo inicial la hiperdiploidía 47-50 cromosomas, estos pacientes se encuentran en remisión completa, no obstante que 2 de ellos (casos 9,11) durante su evolución presentan en SPE alteraciones secundarias con pronóstico desfavorable (84,85). En este grupo aunque se estén dando 2 esquemas de tratamiento no se observaron diferencias.

El grupo de pacientes considerados de alto riesgo, presentan alteraciones estructurales al cariotipo inicial. Según lo reportado por la literatura generalmente estas alteraciones son de mal pronóstico, excepto la del(6q) que es de pronóstico intermedio (84,85).

Las alteraciones más frecuente fueron aquéllas que implican al cromosoma 7 (casos 12,13,14). El punto de ruptura en 7q33-34 coincide en los 3 casos, en éste está localizado el gen TCR, que frecuentemente esta implicado en la LLA y se considera de mal pronóstico (14,28). Todos presentan alteraciones estructurales secundarias durante el seguimiento. En los casos 12 (foto 1) y 13 permanece la clona anormal inicial en MO a los 12 meses de evolución y se observan células normales. Sin embargo este último no adquiere la remisión completa, además que presenta características inmunológicas bifenotípicas, con pronóstico desfavorable. El caso 14, a los 6 meses de evolución responde bien al tratamiento, sin embargo a los 12 meses recae. Aunque los tres pacientes recibieron el mismo tratamiento no respondieron de igual forma. Sin embargo se propone que los pacientes 12 y 13 reciban nuevas dosis de quimioterapia, para

eliminar la clona anormal y permitir que proliferen las células normales.

Las siguientes alteraciones observadas en 3 de los pacientes (casos 15,16,17) se han reportado como frecuentes en la LLA (35,46,53), y son t(1;19), t(4;11) y t(9;22) respectivamente, en el caso 15 hay buena respuesta al tratamiento observándose supresión de la clona anormal, y actualmente se encuentra en remisión completa, contrariamente a lo esperado para el rearreglo cromosómico que presenta (38-40). El caso 16 mantiene la alteración primaria, presenta una cuenta leucocitaria alta, sin embargo se encuentra en remisión completa, que se explicaría por la presencia de la hiperdiploidía >50 cromosomas como alteración secundaria lo que mejora el pronóstico (53,54). El caso 17 presenta recaída en el Sistema Nervioso Central (SNC), y es tratado con reinducciones, sin embargo, su cariotipo continúa siendo anormal (hipodiploidía), y finalmente fallece a los 16 meses.

En estos pacientes hay diferencias en el tratamiento, ya que en los dos primeros son tratados con el protocolo 1, y se mantienen en RC. Mientras que al caso 17, se le aplicó el otro tratamiento y no respondió adecuadamente.

Además de las alteraciones descritas anteriormente se encontró otra anormalidad primaria poco frecuente en la LLA (53), la t(3;4) en el paciente 18 (foto 3 y 4), que además de presentar alteraciones secundarias en el cariotipo inicial, mantiene la clona anormal a los 6 meses de evolución y no integra remisión. Este paciente es tratado con el protocolo convencional (tratamiento 2), por lo que se

considera conveniente utilizar un tratamiento más agresivo ya que su evolución es de mal pronóstico.

Los casos 19 y 20 presentan como anormalidad primaria la del (6q) considerada por algunos autores de pronóstico intermedio por responder adecuadamente al tratamiento (14,28), esto coincide con el pronóstico de estos pacientes ya que actualmente se encuentran en remisión completa y no han adquirido otra alteración. Ambos siguen el mismo esquema de tratamiento.

De todo lo anterior podemos señalar, que las alteraciones cromosómicas en la LLA de Novo deben ser consideradas junto con otros parámetros clínicos como la cuenta leucocitaria inicial y la edad, para definir el diagnóstico, pronóstico y tratamiento. Tal es el caso de los pacientes 6 y 7 que aunque presentaban alteraciones cromosómicas de pronóstico favorable, no lograron la RC, por la cuenta leucocitaria tan alta.

El estudio citogenético fué un factor pronóstico independiente en nuestro estudio, observándose en los pacientes que presentan hiperdiploidía >50 cromosomas sobrevida más larga cursando con pronóstico favorable. Mientras que aquéllos que presentaron alteraciones estructurales son de pronóstico desfavorable, excepto los que presentan la del(6q) que junto con la hiperdiploidía 47-50 cromosomas fueron de pronóstico intermedio.

Esto ha permitido clasificar a los pacientes en alto y bajo riesgo de acuerdo a las alteraciones cromosómicas encontradas, gracias a

esto podemos evitar tratamientos agresivos en pacientes de bajo riesgo y viceversa.

El estudio se complementa al llevar a cabo un seguimiento citogenético, ya que nos permite detectar enfermedad residual cuando el paciente está asintomático, y por lo tanto dar el tratamiento más adecuado. Además de que también nos permite evaluar continuamente al paciente en suspensión selectiva de tratamiento y evitar futuras recaídas.

Capítulo 9

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Gutierrez RM. (1990). "Leucemias". Servicio de Hematología. Hospital General de México. 1-2
- 2.- Ruiz-Arguellez GJ. (1987). "Leucemias Agudas". Clínicas Médicas Mexicanas. 1:24-36.
- 3.- Fernández R, Delgado C, Donat J, Revuelta C. (1988). "Leucemias Agudas Infantiles". Medicine 12: 40-60
- 4.- Hoelzer D, Seipelt G. (1991). "The role of haematopoietic growth factors". Myeloid Malignancies 6:9-24
- 5.- Bolea MV, Martínez MC, Reyes VH, Salomón LE. (1989). "Leucemias Agudas Linfoblásticas". Medicine 8: 80-91
- 6.- Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, Sultan C. (1976). "Proposals for the classification of the acute leukemias". British J Hematology 33: 451-458.
- 7.- Ruiz Arguelles GJ. (1989). " Clasificación inmunológica de las leucemias agudas en la ciudad de Puebla, México: Experiencia de 3 años". Gaceta Médica de México 125: 283-292
- 8.- Foon KA, Schroff RW, Gale RP. (1982). "Surface Markers on Leukemia and Lymphoma Cells : Recent Advances". Blood 60: 1-19
- 9.- Uckun FM, Gajl- Peczalska KJ, Provisor AJ, Heerema NA. (1989). "Immunophenotype- Karyotype Associations in Human Acute Lymphoblastic Leukemia". Blood 73: 271-280.
- 10.- Kirsch IR, Morton CC, Nakahara K, Leder P. (1982). "Human immunoglobulin heavy chain genes map to a region of translocations in malignant B lymphocytes". Science 216: 301
- 11.- Early P, Huang H, Davis M, Calame K, Hood L. (1980). "An Immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA V, D and J. Cell 19: 981
- 12.- Caccia N, Bruns GA, Kirsch IR, Hollis F, Berness V, Mak TW. (1985). "T cell receptor alpha chain genes are located on chromosome 14 at 14q11-14q12 in humans". J Exp Med 161: 1255
- 13.- Solomon E, Borrow JD. (1991). "Chromosome Aberrations and Cancer". Science 254: 1153-1160
- 14.- Heim S, Mitelman F. (1987) "Cáncer Cytogenetics". Alan R. Liss. New York. 140-173.

- 15.-Testa JR, Rowley JD, (1981). "Chromosomes in leukemia and lymphoma with special emphasis in methodology" In: the leukemic cell. Catovsky, D. ed Churchill Livingstons. Edinburg and London: 182-202.
- 16.- Yunis JJ. (1981). "New Chromosome techniques in the study of human neoplasia" Human Pathology 12: 540-549
- 17.- Verma RS, Badu A. (1989). "Human Chromosomas : Manual of basic techniques. Pergamon Press 45-113.
- 18.-Sandberg A. (1980)."The chromosomes in human cancer and leukemia". Elsevier North Holand. New York. 276-293
- 19.- Rowley JD, Testa JR. (1982). "Chromosomes abnormalities in malignant hamatologic diseases". Adv Cancer res 36: 281-283.
- 20.- Caspersson T, Zech L, Johansson C, Modes EJ. (1970). "Identification of chromosomes by DNA- binding flourescent agents". Chromosoma 20: 215-227.
- 21.- Cervantes A. (1983). "Estructura molecular de los cromosomas humanos; su correlación con las técnicas de bandeado y su aplicación clínica" Tesis. UNAM
- 22.- Wang HC, Federoff S. (1972). "Banding in human chromosomes treated with trypsin". Nature New Biol 253: 52-54.
- 23.- Dutrillaux B. (1973)."Aplication to normal karyotype of R band and G band techniques involving prototype dypestan". Nobel Sympostum. 23:48
- 24.- Dutrillaux B. (1973). "New sistem of chromosome banding the T-bands". Chromosoma. 44:395.
- 25.- Kristoffersson V, Berheim A, Berger R, Nilsson B, Heim S, Mandahl N, Mitelman F. (1989)."Constitutional C-band polymorphims in lymphocytes from patiens with chronic myeloid leukemia". Hereditas. 110:145-148.
- 26.- Paris Conf. 1971. (1972). "Standarization in human cytogenetics In: Birth defects". Natl Found March of Dimes, New York 8:1256-1537
- 27.- ISCN (1985). "An internacional system for human cytogenetics nomenclature" In: Birth Defects. Natl Found. March of Dimes, New York.1:21
- 28.- Heim S, Mitelman F. (1992). "Cytogenetic Analysis in the Diagnosis of Acute Leukemia". Cancer suppl. 70: 1701-1709.
- 29.- Heim S, Mitelman F. (1986). "Numerical chromosome aberrations in human neoplasias". Cancer Genet Cytogenet. 22:99-108.
- 30.- Onodera O, McCabe RN, Rubin MC. (1992). "Formation of Hyperdiploid Karyotype in childhood Acute Lymphoblastic leukemia". Blood 80: 203-208.

- 31.- Tsuchiya H, Matsuda I, Kaneko Y. (1991). "Why does childhood acute lymphoblastic leukemia with hyperdiploidy show a favorable prognosis?". *Cancer Genet Cytogenet* 50: 273-279
- 32.- Ching-Hong P, Raymond C, Land J, Crist M, Shuster J, Williams L, Pullen J, Barowitz J, Behm G, Look T. (1990). "Clinical presentation, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near haploid or hypodiploid <45 line". *Blood* 75: 1170-1177.
- 33.- Arana Trejo RM. (1990). "Estudio citogenético en pacientes con leucemia aguda". Tesis. UNAM.
- 34.-Garret M, Williams D, Look T, Bowman P, Kalwinsky D. (1981). "Near-Haploid Acute Lymphoblastic Leukemia: Unique Subgroup with a Poor Prognostic?". *Blood* 58: 14-19.
- 35.- Michael PM, Levin MD, Garson OM. (1984). "Translocation (1;19), a new cytogenetic abnormality in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 12: 333-341
- 36.- Carroll AJ, Crist WM, Parmley RT, Roper M, Cooper MD, Finely WH. (1984). "Pre-B cell leukemia associated with chromosome translocation 1;19. *Blood* 63: 721-724.
- 37.- Garry MB, Gridley RM. (1984). "Translocation between chromosomes 1 and 19 in acute lymphoblastic leukemia". *Cancer Genet Cytogenet* 13:343-344.
- 38.-Shikano T, Kaneko Y, Takazawa M, Ueno N, Ohkawa M, Fujimoto T. (1986). "Balanced and unbalanced 1;19 translocation associated acute lymphoblastic leukemias". *Cancer* 58: 2239-2243.
- 39.- Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK, Williams DL, Pui ch, Crist WM, Look AT, Rivera GK. (1990). "Cytogenetics of pre-B cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). *J Clin Oncol.* 8:1380-1388.
- 40.- Walker-Secker LM, Berger R, Fenaux P, Lai JL, Nelken B, Garson M, Michael PM, Hagemeljer A, Harrison CJ, Kaneko Y, Rubin CM. (1992). "Prognostic Significance of Balanced t(1;19) and Unbalanced der(19)t(1;19) Translocations in Acute Lymphoblastic Leukemia". *Leukemia* 6: 363-369.
- 41.- Ginsberg AM, Raffeld M, Cossman J, (1991). "Inactivation of the retinoblastoma gene in human lymphoid neoplasms. *Blood* 77: 833-840.
- 42.- Mellentin JD, Murre C, Donlon TA, McCaw PS, Smith SD; Carroll AJ, McDonald ME, Baltimore D, Cleary ML. (1989). "The gene for enhancer-binding proteins E12/E47 is at the t(1;19) translocation breakpointing in acute leukemias". *Science* 246:379-382.
- 43.- Nourse J, Mellentin JD, Galili N, Wilkinson J, Stanbridge E, Smith SD, Cleary ML. (1990). "Chromosomal translocation t(1;19) results

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

synthesis of a homeobox fusion mRNA that codes for a potencial chimeric transcription factor. Cell 60: 535-545.

44.- Oshimura M, Freeman A.I, Sandberg A. (1977). "Chromosome and as causation of human cancer and leukemia XXVI. Banding studies in acute lymphoblastic leukemia". Cancer 40:1161-1172.

45.- Vanden Berghe H, Broeckaert-Van DG, Orshoven A, Louwagie A, Verwilghen R, Casteels-Van DM, Eglermant E, Eckels R. (1979). "A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia". Human Genetic 46:172-180.

46.- Arthur D.C, Bloomfield C.D, Linquist L.L, Nesbit M.T. (1982). "Translocation (4;11) in acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and pronostic significance". Blood 7:165-172.

47.- Schardt C, Ottman GO, Hoelzer D, Ganser A. (1992). "Acute Lymphoblastic leukemia with the (4;11) Translocation: Combined cytogenetic, immunological and molecular genetic analyses. Leukemia 6:370-374.

48.- Mirro J, Kitchingam G, Williams D, Lauzon G.J, Lin C, Callihan T, Zipft T. (1986). "Clinical and laboratory characteristics of acute leukemia with the (4;11) translocation. Blood 67:689-697.

49.-Morgan J, Cotter F, Katz F, Ridge S, Domer P, Korsmeyey, Wiedeman M. (1992). "Breakpoints at 11q23 in infant leukemias with the t(11;19)(q23;p13) are clustered". Blood 80; 2172-2175.

50.- Cherif D, Der- Sarkissian H, Derre J, Tokino T, Nakamura Y, Berger R. (1992). "The 11q23 breakpoint in acute leukemia with t(11;19)(q23;p13) is distal to those of t(4;11), t(6;11) and t(9;11). Genes, Chromosomes & Cancer 4:107-112.

51.-Douglas C, Kholer S, Cleary L. (1992) "Involvement of homolog of Drosophila Trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias". Cell 71: 691-700.

52.- Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce M, Canaani E. (1992) " The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax, to the AF-4 gene". Cell 71: 701-708.

53.- Third International Workshop on Chromosome in leukemia. (1981). "Chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia". Cancer Genet Cytogenet 4:101-110.

54.- Secker-Walker L, Craig J, Hawkins J, Hoffbrannd A. (1991). "Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: age distribution, BCR breakpoint and prognostic significance. Leukemia 5:196-199.

55.-Johanness W, Fonatsch C, Ludwing D, Rieder H, Maurer J,Bartram R. (1992). "Polymerase chain reaction analysis of BCR-ABL sequences in

adult Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia patients". *Leukemia* 6(5): 463-464

56.- Gale R, Buttirini A. (1990). "Ph- chromosome positive acute leukemias and acute phase CML: one or two diseases?" *Leukemia res.* 14:295-297.

57.- Dobrovic A, Peters G, Ford J. (1991). "Molecular analysis of Philadelphia chromosome: Review". *Chromosoma* 100:479-486.

58.- Junia V, Melo D, Tuszynski A, Dhut B, Young D, Golman M. (1993). "Expression of the bcl-bcr fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia". *Blood* 81:2488-2491.

59.- Berger R, Chen S, Chen Z. (1990). "Philadelphia positive acute leukemia". *Cancer Genet Cytogenet.* 44:143-152.

60.- Rogers J. (1985). "Oncogene chromosome breakpoints and Alu sequences. *Nature* 317:559

61.- Barletta C, Pelici P, Kenyon L, Smith S, Dalla F. (1987). "Relationships between the c-myb locus and the 6q- chromosomal aberrations in leukemia and lymphomas" *Science* 235:1064-1067

62.- United Kindom Cancer Cytogenetics Group (UKCCG). (1992). "Translocations involving 9p and/or 12p in acute lymphoblastic leukemia". *Genes, Chromosomes and Cancer* 5:255-259.

63.- Chilcote RR, Brown E, Rowley J. (1985). "Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of short arm of chromosome 9". *New England J Med* 313:286-291.

64.- Murphy S, Raimondi S, Rivera G, Crone M, Dodge R, Behm F, Pui C-H, Williams D. (1991). "Nonrandom abnormalities of chromosome 9p in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 77:2016-2022.

65.- Trent J, Olson S, Lawn R. (1982) "Chromosomal localization of human leukocyte, fibroblast, and immune interferon genes by means of in situ hybridization". *Proc Natl Acad Sci. USA* 79:7809.

66.- Diaz M, Ziemins S, Beau Le, Pitha P, Smith S, Chilcote R, Rowley J. (1988). Homozygous deletion of the alfa and beta interferon genes in human leukemia and derived cell lines". *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5259.

67.- Raimondi S, Williams D, Callihan T, Peiper S, Rivera G, Murphy S. (1986) "Nonrandom involvement of the 12p12 breakpoint in chromosome abnormalities of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 68:69.

68.- Carroll A, Raimondi S, Williams D, Behm F, Borowitz M, Castleberry R. (1987) "dic (9;12): A nonrandom chromosome abnormality in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia". A Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 70:1962-1967

- 69.- Popescu N, Amsbaugh S, Dipaolo J, Tronick S, Aaronson S, Swan D. (1985) "Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization". *Som Cell Mol Genet* 11:149-154.
- 70.- Berger R, Berheim A. (1985) "Cytogenetics of Burkitt's lymphoma: A human cancer model". *Cell* 60: 65-80.
- 71.- Zhang S, Zech L, Klein G. (1985). "High resolution analysis of chromosome markers in Burkitt lymphoma cell lines". *Int J Cancer* 29:153-157.
- 72.-Dubé, J, Greenberg, M. (1986) "Phenotypic heterogeneity in three cases of lymphoid malignancy with chromosomal translocations in 14q11". *Cytogenet Cell Genet.* 41:215-218.
- 73.- Finger L, Harvey R, Moore R, Showe L, Croce C. (1986). "A common mechanism of chromosomal translocation in T and B-cell neoplasia". *Science* 234:982-985.
- 74.-Park K, Le Beau M, Shows B, Rowley D, Diaz O. (1992). "A complex genetic rearrangement in a t(10;14)(q24;q11) associated with T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes and Cancer* 4:32-40.
- 75.- Hetch, F, Morgan R, Kaiser M, Hetch B (1984) "Common region on chromosome 14 in T-cell leukemia and lymphoma". *Science.* 226:1445-1447.
- 76.- Tsujimoto Y, Yunis J, Onaratoshwe, Erickson J, Nowell P, (1984) "Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation" *Science* 224:1403-1406.
- 77.- Raimondi S, Behm F, Roberson P, Pui C-H, Rivera G, Murphy S, Williams D. (1988) "Cytogenetics of childhood T-cell leukemia". *Blood* 72:1560.
- 78.- Kaneko Y, Maseki N, Homma C, Sakurai C, Mizutani S, Takeda T, Shikano T, Fujimoto T, Yaai K, Shomokawa T. (1988) "Chromosome translocation involving band 7q35 o 7p15 in childhood T-cell leukemia/Lymphoma. *Blood* 72:534-540.
- 79.- Linker C, Hetch B, Warnke R, Glader B, Hetch F. (1989) "Clinical and biologic characterization of T-cell neoplasia with rearrangements of chromosome 7 band q34". *Blood* 71:325-334
- 80.- Bloomfield C, Secker W, Goldman A, Chapelle H, Alimena T, Garson O. (1989) "Six-year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 40:171.
- 81.- Williams L, Tsiatis A, Brodeur G, Look T, Melvin L, Bowman P, Kalwinsky K, Rivera G, Dahl V. (1982) "Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukemia". *Blood* 60:864-871.

- 82.- Secker-Walker L, Lewler S, Hardisky R. (1978) "Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia". Br Med J. 2:1529-1530.
- 83.- Swansberry G, Secker-Walker L, Lawler S, Hardisky R, Sallan S, Garson O, Sakurai M. (1981) "Chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia of childhood: An independent prognostic factor". Lancet 2:249-250.
- 84.- Lawder D. (1982) "Significance of chromosome abnormalities in leukemia". Seminars in Hematology 19:252-272.
- 85.- Ching-Hong P, William M, Look T. (1990) "Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 76: 1449-1468.
- 86.- Hoeltzer D, Thiel E, Löefler H, Bückner T, Ganser A, Heil G, Koch P, Freund H y colaboradores. (1988) "Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults". Blood 71: 123-131.
- 87.- Shikano T, Ishikawa Y, Ohkawa M, Hatayama Y, Nakadate H, Hatae Y, Takeda T. (1990) "Karyotype changes from initial diagnosis to relapse in childhood acute leukemia". Leukemia 4:419-422.
- 88.- Testa J, Mintz U, Rowley J, Vardiman J, Golomb H. (1979) "Evolution of karyotypes in acute nonlymphoblastic leukemia. Cancer Res 39: 3619-3627.
- 89.- Blomfield C, Goldman A, Berger R, Borgstrom H, Brant D, Catowysky A et al. (1986) "Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia". Blood 67:415-420.
- 90.- Stanley L.S. (1990) "Leucemias y transtornos mieloproliferativos". Sci Am. 14; 1-31
- 91.- Barnett MJ, Greaves MF, Amess JAL et al. (1986) "Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults". British Journal of Haematology 64;455-468.
- 92.- Vila S, Garay G, Gonalons ML; et al. (1989) "Comparison of an intensive induction-consolidation-intensification regimen versus standard therapy for adult acute lymphoblastic leukemia (LLA)". Proc Am Soc Clin Onco 8;202.
- 93.- Hussein KK, Dahlberg S, Head D et al. (1989) "treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults with intensive induction, consolidacion, and manteitenance chemotherapy". Blood 73;57-63.
- 94.- Fiere D, Extra JM, David B et al. (1987) "treatment of 218 adult acute lymphoblastic leukemias. Seminars in Oncology 14;64-66

95.- Barret Aj, Horowitz MM, Gale RP (1990) "Marrow transplantation for acute lymphoblastic leukemia: factors affecting relapse and survival". Blood 74;862-869

96.- Goodman LS, Gilman A. (1978) "Bases Farmacológicas de Terapéutica". Interamericana. Quinta ed. México D.F. 1047-1053.

97.-Hozier J, Linquist L. (1980) "Banded Kariotypes from bone marrow: a clinical useful aproach" Human Genet. 53:205-209.

98.- Moorhead P, Nowell P, Mellman W, Battips D, Hungerford D. (1960) "Chromosome preparations of leukocytes cultures of normal human peripheral blood" Exp Cell. Res 20:613-616.