Universidad de Costa Rica

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Estudio Citogenético de Algunos Casos de Leucemias Humanas y Trastornos Relacionados Referidos a los Hospitales Nacional de Niños y Calderón Guardia

Trabajo Final de Graduación para optar al grado de Licenciado en Biología con énfasis en Genética Humana

Edward Ruiz Narváez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio

1995

A mis padres, Noel y Maria, ellos son los verdaderos artifices de este logro.

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGIA

ESTUDIO CITOGENETICO DE ALGUNOS CASOS DE LEUCEMIAS HUMANAS Y TRASTORNOS RELACIONADOS REFERIDOS A LOS HOSPITALES NACIONAL DE NIÑOS Y CALDERON GUARDIA

Trabajo Final de Graduacion para optar al grado de Licenciado en Biologia con enfasis en Genetica Humana

Edward Ruiz Narváez

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
1995

Trabajo Final de Graduación, presentado a la Facultad de Ciencias en la Escuela de Biología
Universidad de Costa Rica

APROBADO

Dra. Virginia Solís Alvarado — Directora de Tesis

Dr. Oscar Hoeña — Miembro del Tribunal
Director de la Escuela

Dra. María Eugenia Zaldívar — Miembro del Tribunal

Dra. Patricia Cuenca Berger — Miembro del Tribunal

Dra. María de los Angeles Alvarado — Miembro del Tribunal

Edward Ruiz Narvaez — Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Virginia Solis por todos sus consejos y ayuda a lo largo de la elaboracion de esta tesis.

Al Dr. Juan Manuel Carrillo, del Hospital Nacional de Niños, y al Dr. Germán Sanchez Hidalgo, del Hospital Calderon Guardia, por su valiosa colaboración para la obtención de las muestras.

A la Dra. Maria de los Angeles Alvarado, a la Dra. Patricia Cuenca y a la Dra. Maria Zaldivar por sus oportunas correcciones.

3.2 Hospital Calderón Guardia.....43
3.3 Hospital Nacional de Niños.....43
3.4 Diferentes leucemias.....49
4. DISCUSION.....52
4.1 Bromuro de etidio.....52
4.2 Consideraciones generales.....54
5. REFERENCIAS.....65

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		PAGINA
1	Anormalidades geneticas en las leucemias	2
2	Clasificacion FAB de las leucemias agudas no linfociticas	13
3	Aberraciones cromosomicas primarias en las leucemias agudas no linfociticas	14
4	Clasificación FAB de las leucemias agudas linfociticas	19
5	Clasificacion MIC de la LAL-B	20
6	Clasificación MIC de la LAL-T	20
7	Anormalidades cromosómicas estructurales primarias en las leucemias agudas linfociticas	21
8	Composicion del medio de cultivo de transporte	35
9	Composicion del medio de cultivo 1	35
10	Clasificación de los pacientes del Hospital Calderon Guardia por tipo de leucemia, sexo y edad	44
11	Clasificacion de los pacientes del Hospital Nacional de Niños por tipo de leucemia, sexo y edad	45
12	Resultados del estudio citogenetico en los pacientes con leucemia o algun trastorno relacionado, reclutados en el Hospital Calderon Guardia durante los años 1993-1994	46

13 Resultados del estudio citogenetico en los pacientes con leucemia o algun trastorno relacionado, reclutados en el Hospital Nacional de Niños durante los años 1993-1994.....47
14 Clasificacion de los pacientes de ambos hospitales por tipo de leucemia y por ploidia.....48

RESUMEN

Se estudió el patrón cariotípico de pacientes con leucemias o algun otro trastorno relacionado, reclutados en el Hospital Nacional de Niños y en el Hospital Calderón Guardia, durante los años de 1993 a 1994.

Se obtuvo un total de 34 casos, 16 del Hospital Calderón Guardia y 18 del Hospital Nacional de Niños. Los resultados más sobresalientes de este trabajo son :

a.) Hubo un total de 15 casos de leucemia aguda linfocítica (LAL), 12 de los cuales correspondieron a niños de diez o menos años.

b.) Se obtuvieron 12 casos de leucemia aguda no linfocítica (LANL), seis de los cuales fueron pacientes de 15 o más años.

c.) Los tres casos de leucemia crónica mieloide (LCM) que se obtuvieron, fueron LCM-PH+.

d.) Se informa por primera vez la monosomía 18 en pacientes con leucemia crónica linfocítica (LCL) o con síndromes mielodisplásicos (SMD).

e.) Todos los casos a los que se les realizó el análisis citogenético, excepto un niño con LAL, presentaron cariotipos anormales, principalmente aberraciones numéricas de cromosomas de los grupos F y G.

f.) El 64.7% de los pacientes mostraron un número modal de 46 cromosomas.

g.) El uso del bromuro de etidio permitió una mayor exposición de las células al colcemid, sin disminución en el largo de los cromosomas.

Además, este es el primer estudio que se realiza en Costa Rica que combina el análisis citogenético y citoquímico en pacientes leucémicos o con algun trastorno relacionado.

1 INTRODUCCION

1.1 JUSTIFICACION DEL TEMA

Las leucemias pueden definirse como la proliferación no controlada o la expansión de clones de células hematopoyéticas, que pierden la capacidad de diferenciarse normalmente a células sanguíneas maduras (Sawyers et al., 1991). De acuerdo a esta definición algunas malignidades hematológicas no son estrictamente leucemias, ya que sólo muestran parte del fenotipo leucémico completo. A saber, los síndromes mieloproliferativos solamente presentan expansión del crecimiento y en las mielodisplasias sólo se bloquea la diferenciación (Heim y Mitelman, 1987). Aunque ambas entidades pueden progresar a leucemia aguda.

Como cáncer que es, el fenotipo leucémico es el resultado de una multitud de cambios genéticos (Heim y Mitelman, 1987) y los genes que participan en el proceso patogenético de las leucemias pueden ser agrupados en cinco grandes familias (Cline, 1994) :

a. Aquellos que transmiten señales estimuladoras del crecimiento desde la membrana celular hasta al núcleo (genes *ras*, por ejemplo).
b. Genes que activan la transcripción (oncogén *c-myc*, por ejemplo).
c. Los que participan en la diferenciación celular (receptor α del ácido retinoico, por ejemplo).
d. Genes que participan en la apoptosis o muerte celular programada (gen *p53*, por ejemplo).
e. Antioncogenes : suprimen el crecimiento tumoral (el gen del retinoblastoma, por ejemplo).

Es posible que un gen cualquiera posea más de una función. Un ejemplo es el gen *HOX11*, el cual está involucrado

Cuadro 1. Anormalidades genéticas en las leucemias

Tipo de gen	Función	Alteración molecular	Anormalidad cariotípica	Leucemia
Ras	Transducción de la señal	mutaciones N-ras	Ninguna	LANL LAL LCM
T. quinasas	Transducción de la señal	Fusión c-abl/bcr	t(9;22)	LCM LAL
Elementos de la transcrip.	Transcripción génica	Fusión myc/Ig Fusión SCL/TCR Fusión Ttg1/TCR	t(8;14) t(1;14) t(11;14)	LAL-B LAL-T LAL-T
Homeodominio	Diferenciación y transcrip.	Fusión HOX11/TCR Translocac. HRX	t(10;14) t(11q23)	LAL-T LAL LANL
Receptor	Diferenciación	Fusión RARα/PML	t(15;17)	LAP
Anti-oncogenes	Supresión de tumores y apoptosis	Pérdida de p53 Delección de RB1	del(17) del (13q)	LCM LANL LAL LANL
Otros	Función desconocida	Fusión de MLL Fusión de AML1	t(11q23) t(8;21)	LAL LANL
	Regulación del crecimiento	Fusión de IL-3	t(5;14)	LAL-B

Fuente : Cline (1994).

(a) : LANL : leucemia aguda no linfocítica.
LAL : leucemia aguda linfocítica.
LCM : leucemia crónica mieloide.
LAL-T : leucemia aguda linfocítica de células T.
LAP : leucemia aguda promielocítica.
LAL-B : leucemia aguda linfocítica de células B.

tanto en la diferenciación celular como en la activación de la transcripción. y *p53* es un gen supresor de tumores que también puede participar en la apoptosis y en el control de la transcripción de otros genes. El Cuadro 1 (Cline, 1994) muestra los principales genes alterados en los diferentes tipos de leucemias, así como la función de cada uno de ellos.

La clasificación anterior es útil para explicar las diferencias entre las leucemias agudas y las crónicas, que presentan patrones clínicos muy diferentes. Por ejemplo, las leucemias crónicas tienen usualmente un inicio insidioso, mientras la aparición de las agudas es abrupto. También las leucemias agudas (excepto la mieloide) presentan un pico de la incidencia en la infancia alrededor de los 2 a 3 años de edad; las leucemias crónicas tienden a tener una mayor incidencia en los grupos de mayor edad (Heim y Mitelman, 1987, Bain, 1990, Rabbitts, 1991). Parece ser que los genes alterados en ambos tipos de leucemias tienen funciones diferentes. En las leucemias crónicas los genes activados participan en la proliferación y sobrevivencia celular, mientras que los asociados con las leucemias agudas están en la cima de la cascada reguladora, o sea aquellos que actúan en el control de la transcripción y de la diferenciación (Rabbitts, 1991). Como apoyo a esta hipótesis está el hecho de que la diferenciación es afectada en las leucemias agudas, pero no en las crónicas (Heim y Mitelman, 1987).

Algunas de las anormalidades citadas en el Cuadro 1 están asociadas con cambios cromosómicos visibles, y de hecho estas aberraciones cariotípicas han sido a menudo útiles para clonar los genes involucrados en la patogénesis de las leucemias (Cline, 1994). De ahí, aparte de su importancia en el diagnóstico y pronóstico de los diferentes tipos de leucemias, el análisis cariotípico es importante para detectar nuevos genes que participan en la transformación

maligna tales como el *PML* en la leucemia aguda promielocítica (Kakizuka et al., 1991), el gen *MLL* en las leucemias agudas (Tkachuk et al., 1992, Thirman et al., 1993) y el gen homeótico *HOX-11* en las leucemias agudas de linaje T (Hatano et al., 1991, Kennedy et al., 1991) entre otros, lo cual llevaría a una mejor comprensión de la patogénesis de las leucemias y a la creación de terapias más efectivas. Un ejemplo es el caso de la leucemia aguda promielocítica (LAP), en la cual el descubrimiento de la fusión del gen del receptor α del ácido retinoico con el gen denominado *PML* (Kakizuka et al., 1991), alteró radicalmente el tratamiento para esta enfermedad. La terapia actual para pacientes con LAP consiste en inducir la remisión con ácido retinoico y luego consolidar la misma con quimioterapia convencional. Esto produce porcentajes de remisión de hasta el 94% y de duración mayor que la inducida con sólo quimioterapia (Chen et al., 1991).

1.2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Costa Rica, en los últimos veinte años, disminuyó notablemente la mortalidad por infecciones, de manera que las enfermedades cardiovasculares y el cáncer pasaron a ocupar, respectivamente, la primera y la segunda causa de muerte (Jaramillo, 1983).

Entre las causas de muerte por cáncer, más frecuentes en nuestro país en el período de 1978 a 1982, la leucemia mieloide ocupó el sexto lugar y la linfoide el noveno en hombres, mientras que la leucemia mieloide ocupó el octavo lugar y la linfoide el noveno en mujeres (Sierra y Barrantes, 1986).

En un estudio epidemiológico de las leucemias humanas en

Costa Rica de los años de 1979 a 1984, que comprendió un total de 712 casos registrados se encontró lo siguiente :

- el 48% de los casos correspondieron a leucemia linfocítica aguda y de éstos el 68% fueron niños menores de 15 años,
- el 34% representó casos de leucemia mieloide aguda, de los cuales el 76% fueron individuos de 15 y más años,
- el 12% fueron pacientes con síndromes mieloproliferativos (todos los casos de 15 y más años), y
- el 1% restante correspondió a síndromes mielodisplásicos (todos los casos de 15 y más años) (Solís, en publicación).

En otro estudio más reciente de los años de 1990 a 1992, de 117 casos de pacientes con leucemia que acudieron al Hospital México, el cual incluyó mayoritariamente a individuos mayores de 15 años, se encontró que el diagnóstico más frecuente fue de leucemia crónica mieloide seguido de los síndromes mielodisplásicos. El resto de las demás leucemias u otros trastornos hematológicos comprendieron el 44% de los casos (Castro et al., 1993).

En la actualidad está ampliamente aceptado que los cambios cariotípicos de las células tumorales no están uniformemente distribuídos a lo largo del genoma. Diferentes cromosomas, regiones y bandas están involucrados, de manera preferencial, en diversas neoplasias (Heim y Mitelman, 1987). Además, un número cada vez mayor de anormalidades están asociadas con trastornos específicos.

En las diferentes clases de leucemias, el cariotipo constituye un factor de pronóstico independiente, que predice el logro de remisión completa, duración de la remisión y sobrevida, aún cuando sean considerados otros factores de

riesgo (Pui et al., 1990, List y Jacobs, 1992). Es también útil en el manejo de enfermedad residual o recurrente durante la remisión.

En consecuencia, en los países desarrollados se realiza el análisis cromosómico de los pacientes leucémicos para manejarlos clínicamente de una manera más efectiva.

En Costa Rica, por diversos factores, no se realizan estos tipos de estudios de manera rutinaria en los pacientes con leucemia. Estos proporcionarían información básica muy importante para el conocimiento de la enfermedad en nuestro país y su comparación con los patrones de comportamiento en otros países. Además tendrían una aplicación práctica trascendental en el manejo hospitalario de los pacientes.

1.3 REVISION DE LITERATURA

1.3.1 LEUCEMIA CRONICA MIELOIDE (LCM)

La leucemia crónica mieloide (LCM) es un mal clonal mieloproliferativo de la célula hematopoyética primordial (Golde y Champlin, 1985). Involucra elementos mieloides, eritroides, megacariocíticos, células B y algunas veces células T (Kantarjian et al., 1993), pero no afecta a los fibroblastos de la médula (Greenberg et al., 1978).

La leucemia crónica mieloide se caracteriza por :

1. la heterogeneidad entre los pacientes de la enfermedad.
2. una evolución en tres fases : crónica, acelerada y blástica. Del 20 al 25% de los pacientes mueren por complicaciones en la fase acelerada, mientras que otro 25% desarrolla la crisis blástica sin pasar por la fase acelerada (Kantarjian et al., 1993).
3. la presencia de un marcador cromosómico, el cromosoma

Filadelfia (Ph^1), en las células leucémicas (Golde y Champlin, 1985).

La proliferación es una característica que comparten la LCM y otros desórdenes mieloproliferativos tales como la trombocitosis esencial, la policitemia vera y la mielofibrosis/metaplasia mieloide. Aunque estas entidades son distintas, se observa de manera ocasional un traslape en la presentación clínica, lo que resulta en un diagnóstico confuso. Así, es importante confirmar la diagnosis de LCM, ya sea por estudios citogenéticos o moleculares, porque la historia natural y el tratamiento de los desórdenes mieloproliferativos son diferentes (Kantarjian et al., 1993).

Cerca del 95% de los pacientes poseen el cromosoma Filadelfia (Ph^1) (Nakamura et al., 1993a). En la mayoría de los casos éste se origina por medio de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, t(9;22)(q34;q11) (Rowley, 1973). Del 4 al 8% de los pacientes que presentan el cromosoma Ph^1 tienen translocaciones complejas en las cuales participan tres o más cromosomas, dos de los cuales son los cromosomas 9 y 22 (Hagemeijer et al., 1984, Ishihara et al., 1985). Con la excepción del Y, todos los cromosomas han sido involucrados en estas variantes complejas (Heim y Mitelman, 1987), siendo la banda 17q21 una de las más frecuentemente involucradas en este tipo de translocaciones (MacKeithan et al., 1993).

La presencia de un tercer cromosoma en la formación del Ph^1 no ofrece ninguna ventaja selectiva adicional a las células malignas. No se encuentran diferencias clínicas entre los pacientes con la t(9;22) común y aquellos con translocaciones complejas (MacKeithan et al., 1993).

La translocación anterior mueve el protooncogén *c-abl* de su localización normal en el cromosoma 9, a una nueva

posición en el cromosoma 22, dentro de la región denominada *bcr*, lo que causa la formación del gen híbrido BCR-ABL. Este produce un ARNm anormal de 8.5 kb, en lugar del ARNm-*abl* normal de 6 kb, que codifica una proteína de 210 kD ($p210^{bcr-abl}$) en lugar del producto normal *Abl* de 145 kD (Dreazen et al., 1988). En el nuevo polipéptido, al menos 25 aminoácidos que normalmente se encuentran en el extremo N-terminal son reemplazados por 600 a 700 residuos codificados por bcr (Heim y Mitelman, 1987). Se cree que la proteína híbrida, a través de su actividad tirosina quinasa aumentada con respecto al producto *Abl* normal, transforma las células hematopoyéticas en células leucémicas (Daley et al., 1990). Además, la proteína tirosina quinasa *Abl* normal se encuentra en el núcleo, mientras la proteína híbrida es citoplasmástica (Sawyers y Denny, 1994).

En la gran mayoría de los casos de LCM las rupturas en el gen *BCR* ocurren dentro de la región mayor de los puntos de ruptura (M-bcr) (Nakamura et al., 1993a), que abarca los exones 2 y 3 de dicho gen (van der Plas et al., 1989). El significado clínico de la variabilidad de los diferentes puntos de ruptura dentro de M-bcr es aún controversial (Schaefer-Rego et al., 1987, Mills et al., 1988, Inokuchi et al., 1991, Mills y Birnie, 1991). La ocurrencia de la ruptura dentro de M-bcr lleva a la formación de la $p210^{bcr-abl}$ (Nakamura et al., 1993a). En casos muy raros de pacientes con LCM, la translocación ocurre dentro del primer intrón de *BCR*, lo cual provoca la formación de una proteína de 190 kD ($p190^{bcr-abl}$) (Nakamura et al., 1993a). Si bien la $p190^{bcr-abl}$ presenta una actividad transformante *in vitro* mayor que la $p210^{bcr-abl}$ (Lugo et al., 1990), las diferencias clínicas entre ambos tipos de proteínas son aún controversiales y se ha visto que ambas pueden inducir leucemia aguda o crónica dependiendo de la célula blanco (Suryanarayan et al., 1991)

Aunque de manera ocasional los pacientes con LCM presentan otras anormalidades cromosómicas durante la fase inicial, en los casos típicos la t(9;22) es la única anormalidad citogenética a lo largo de la etapa crónica (Heim y Mitelman, 1987). Sin embargo, cuando la enfermedad progresa, del 75% al 80% de los pacientes desarrollan aberraciones cromosómicas adicionales. Estos cambios secundarios preceden por varios meses a las manifestaciones más malignas de la enfermedad y por lo tanto pueden servir como indicadores pronósticos valiosos.

Los mecanismos por los cuales la LCM progresa de su fase crónica a la acelerada y a la crisis blástica no han sido aún esclarecidos, aunque se han encontrado varios eventos que están asociados y podrían contribuír a la evolución maligna de la leucemia. Así, por ejemplo, ha sido informado que el 30% de los pacientes con LCM-Ph'+ en fase acelerada o en crisis blástica presentan reestructuraciones en el gen p53 (Kelman et al., 1989, Feinstein et al., 1991). La proteína p53 está localizada en el núcleo y presenta actividad anti-oncogénica en células normales (Baker et al.,1989, Finlay et al., 1989). Las mutaciones en este gen llevarían a la pérdida de su capacidad supresora de tumores provocando la evolución de la LCM hacia fases más malignas (Foti et al., 1991). Esto es compatible con la observación de que la progresión de la LCM de la fase crónica a la acelerada involucra aberraciones frecuentes del cromosoma 17, principalmente en forma de i(17q), donde está localizado el gen p53 (Kelman et al., 1989).

Otro evento asociado con la progresión de la LCM hacia crisis blástica es la metilación anormal de varios loci en 11p (Malinen et al., 1991, Nelkin et al., 1991). Se cree que estos cambios en la metilación tienen el potencial de alterar la conformación de la cromatina, lo que provocaría la

represión de la transcripción de genes supresores de tumores y/o creando inestabilidad del genoma (Nelkin et al., 1991).

También ha sido informado que las células leucémicas de algunos pacientes, ya sea en la fase crónica o en la crisis blástica, presentan alelos mutantes de los protooncogenes *ras* (Liu et al., 1988, Ahuja et al., 1989, Ahuja et al., 1990). De esta manera, las mutaciones en los genes *ras* podrían también contribuir a la transición de la fase crónica de la LCM hacia crisis blástica (Liu et al., 1988).

En muchos casos se encuentra más de una aberración secundaria y algunas combinaciones de cambios son más frecuentes que otras (Fig. 1) (Heim y Mitelman, 1987). Los cromosomas 8, 17 y 22 se ven involucrados de manera preferencial en estas alteraciones (una trisomía 8, isocromosoma 17 y un Ph¹ extra).

Cerca del 10% de los pacientes con un cuadro morfológico de LCM no presentan el Ph¹ por simple análisis citogenético (Dreazen et al., 1988). Un tercio de ellos muestran por Southern blot reestructuraciones en *bcr* (LCM Ph¹-negativo BCR-positivo) y tienen cuadro clínico, respuesta a la terapia y sobrevida similares a la LCM Ph¹-positivo (Kantarjian et al., 1990). Además, en varios casos que habían sido clasificados como LCM Ph¹-negativo, se detectaron reestructuraciones citogenéticas microscóspicas de los cromosomas 9 y 22 (Bartram y Carbonell, 1986, Morris et al., 1986). El resto de los pacientes (LCM Ph¹-negativo BCR-negativo) tienen una baja probabilidad de sufrir crisis blástica (25% a 50%), con un pronóstico intermedio entre la leucemia crónica mielomonocítica (LCMM) y la LCM Ph¹-positivo (Kantarjian et al., 1993).

Las anormalidades más comunes entre los casos de LCM Ph¹-negativo son trisomía 8 e i(17q). Arreglos estructurales del cromosoma 3 y monosomía 7 son más comunes que en LCM

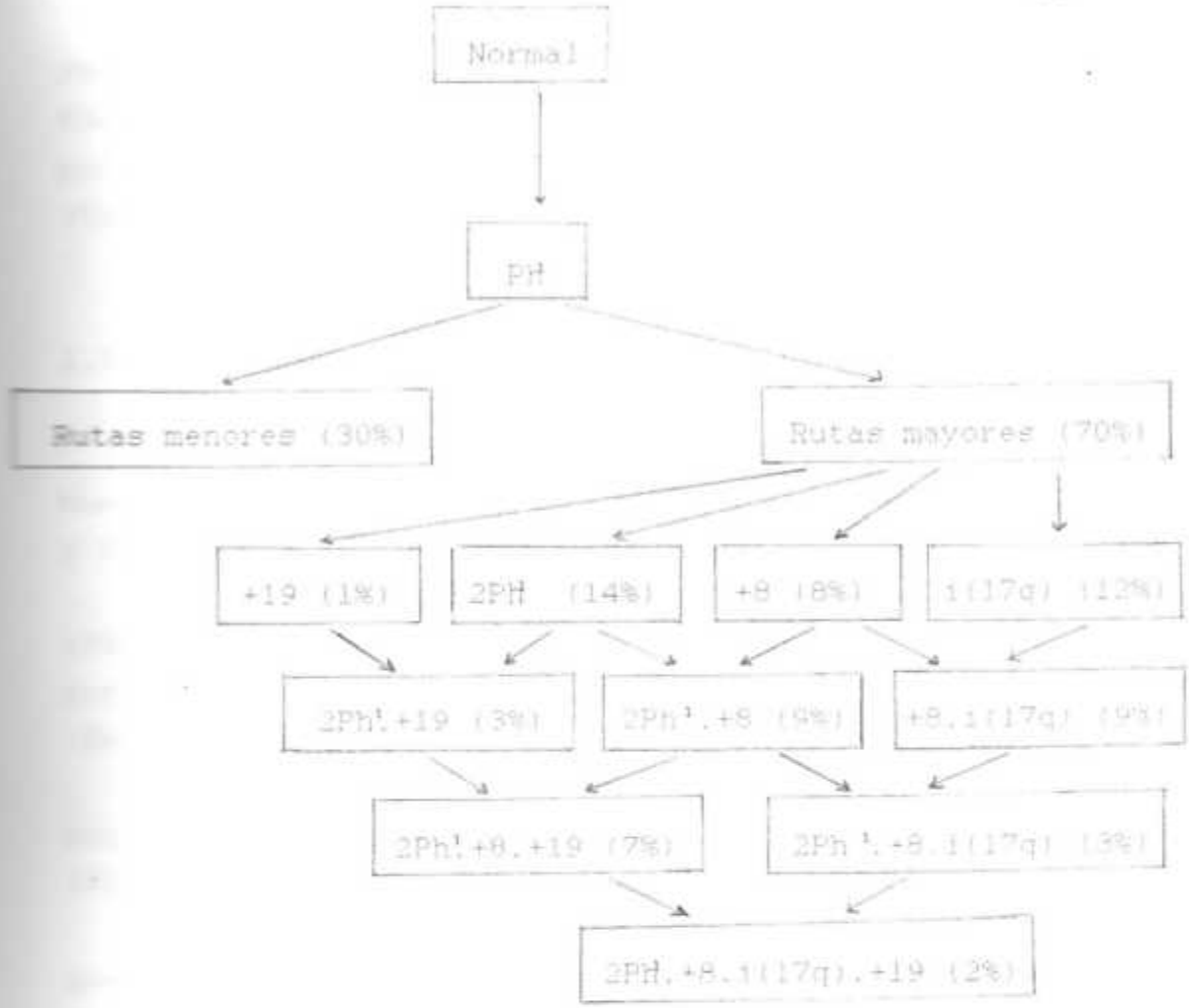


Figura 1. Vías comunes para la evolución de la LCM. Heim y Mitelman (1987).

Ph¹-positiva y trisomía 19 menos común que en LCM Ph¹-positiva. Un pequeño subgrupo de pacientes Ph¹ negativos, portadores de la t(7;11)(p15;p15) fue informado en Japón (Kaneko et al., 1985).

1.3.2 LEUCEMIA AGUDA NO LINFOCITICA (LANL)

Las leucemias agudas son un mal de amplia distribución mundial, alcanzando un pico en personas de 55 a 60 años (Heim y Mitelman, 1987).

En 1976, el Grupo de Estudio Franco-Americano-Británico (FAB), propuso una serie de criterios que posteriormente fueron aceptados en la clasificación de la LANL (Cuadro 2) (Bennet et al., 1985).

En varios estudios, del 70% al 80% de los pacientespresentaron cariotipos anormales (Misawa et al., 1986, Prigogina et al., 1986).

Aunque el perfil cariotípico en diferentes casos puede variar considerablemente, la evidencia disponible muestra que la distribución de las aberraciones no es azarosa. Además, varios de estos cambios están asociados con los subtipos hematológicos definidos por la clasificación FAB (Cuadro 3) (Heim y Mitelman, 1987).

El 80% de los pacientes citogenéticamente anormales tienen uno de los cambios mostrados en el Cuadro 3. Estas aberraciones primarias están frecuentemente acompañadas por anormalidades secundarias adicionales. En promedio, 55% de los pacientes con anormalidades cariotípicas tienen sólo un rearreglo, el 45% tienen dos o más. Solamente los subgrupos FAB M3 y M6 se desvían de estas cifras. En M3 el 90% de los pacientes (Grignani et al., 1993) y en M6 el 25% (Heim y Mitelman, 1987) tienen un solo cambio citogenético.

Cuadro 2. Clasificación FAB de las leucemias agudas no linfocíticas

LEUCEMIAS AGUDAS NO LINFOCITICAS (LANL)

M1 *Leucemia aguda mieloblástica sin maduración celular* (LAM). Predominan los mieloblastos inmaduros; <10% de promielocitos/mielocitos o monocitos. Frecuencia : 20% de todos los casos de LANL.

M2 *Leucemia aguda mieloblástica con maduración celular* (LAM). Predominan los mieloblastos inmaduros, pero hay más maduración que en la M1 (>10% promielocitos/mielocitos); <20% de monocitos; la mayoría de las células son peroxidasa positivo. Frecuencia : 30% de todos los casos de LANL.

M3 y **M3v** *Leucemia aguda promielocítica* (LAP)
Predominan los promielocitos; hay granulación marcada en más del 30% de las células; los gránulos no son visibles por microscopia de luz en la M3v. Frecuencia : 10% de los casos de LANL.

M4 y **M4eo** *Leucemia aguda mielomonocítica* (LAMM)
Mezcla de células monocitoides anormales (>20%) y mieloblastos/promielocitos (>20%); del 1-30% de eosinófilos en la M4eo. Frecuencia : 20% de los casos de LANL.

M5 y **M5a** *Leucemia aguda monocítica* (LAMo)
Predominan las células monocitoides (>80%); en la M5a. >80% de las células no eritroides son monoblastos inmaduros; en la M5b. >20% son células más maduras (monocitos). Frecuencia : 15% de los casos de LANL.

M6 *Eritroleucemia aguda* (ELA)
Predominan los mieloblastos y los eritroblastos (>50%); los eritroblastos multinucleados anormales contienen bloques PAS-positivos. Frecuencia : 5% de los casos de LANL.

M7 *Leucemia aguda megacarioblástica* (LAMeg)
Las células megacariocíticas son detectadas por reactividad de las plaquetas a la peroxidasa en el microscopio electrónico; a menudo se observa mielofibrosis. Frecuencia : <5% de todos los casos de LANL.

Fuente : Bennett et al. (1985).

Cuadro 3. Aberraciones cromosómicas primarias en LANL

Localización cromosómica	Tipo de arreglo	Características hematológicas
1p36	t(1;3)(p36;q21)	Dismegacariocito-poyesis
1p11	t(1;7)(p11;p11)	LANL-s[a] M4
2p21	t(2;11)(p21;q23)	
3q21-25	t(3;5)(q21-25;q31-35)	
3q21 y 3q26	ins(3;3)(q26;q21q26)	Megacariocitos
	inv(3)(q21q26)	anormales y
	t(3;3)(q21;q26)	trombocitosis
4	+4	M2 y M4
5	-5	LANL-s
5q	del(5q)	LANL-s
6p23	t(6;9)(p23;q34)	M2 y M4 con basofilia
6q27	t(6;11)(q27;q23)	M5, principalmente M5a
7	-7	LANL-s
8	+8	
8p11	t(8;16)(p11;p13)	M5 con fagocitosis
8q22	t(8;21)(q22;q22)	M2 con eosinofilia
9p21-22	t(9;11)(p21-22;q23)	M5, principalmente M5a
9q	del(9q)	
9q34	t(6;9)(p23;q34)	
	t(9;22)(q34;q11)	M1 y M2
10p14	t(10;11)(p14;q13-14)	M4 y M5
11q13-14	del/t(11)(q13-14)	M4 y M5
	t(10;11)(p14;q13-14)	
11q23	del/t(11)(q23)	M4 y M5
	t(2;11)(p21;q23)	
	t(6;11)(q27;q23)	
12p11-13	del/t(12p)	LANL-s, M2 o $M4_{Eo}$
15q22	t(15;17)(q22;q11-12)	M3 y M3,
16p13 y 16q22	inv(16)(p13q22)	$M4_{Eo}$
	t(16;16)(p13;q22)	
17p11-q11	i(17q)	
17q25	t(11;17)(q23;q25)	
19p13	t(11;19)(q23;p13)	
20q	del(20q)	M6
21	+21	
Y	-Y	

Fuente : Heim y Mitelman, 1987.
(a) : LANL-s : leucemia aguda no linfocítica secundaria.

Algunas de estas aberraciones están asociadas con determinados subgrupos hematológicos. Por ejemplo, la t(8;21)(q22;q22) ocurre típicamente en el grupo M2, la t(15;17)(q22;q11) en M3, la inv(16)(p13q22) en M4 con eosinofilia y la t(9;11)(p21;q23) en M5 (Hagemeijer et al., 1982, Le Beau et al., 1983, Larson et al., 1984, Swirsky et al., 1984), aunque la frecuencia de estos cambios presenta heterogeneidad geográfica (Mitelman, 1986, Johansson et al., 1991).

Dentro del grupo de las LANL cabe hacer mención aparte de la leucemia aguda promielocítica (LAP) o M3, que representa el 10% de las LANL de adultos (Stone y Mayer, 1990) y cuya principal característica biológica es la expansión clonal de precursores hematopoyéticos en el estadio promielocítico (Bain, 1990).

La anormalidad citogenética característica de la LAP es la t(15;17)(q22;q11) que se encuentra en el 100% de los casos (Grignani et al., 1993), siendo un marcador diagnóstco de LAP. La t(15;17) fusiona el gen *RARα* (receptor α del ácido retinoico), localizado en 17q11, con el gen del factor de transcripción *PML* en 15q22 (de The et al., 1990, Kakizuka et al., 1991). Ambos genes quiméricos, el *PML-RARα* en el der(15) y el *RARα-PML* en el der(17) son transcritos (Goddard et al., 1991), aunque dos hechos señalan que el gen *PML-RARα* es el responsable de la patogénesis de la LAP :

- el ARNm-*RARα/PML* siempre aparece junto con el ARNm-*PML/RARα*; nunca aparece solo y
- los casos ARNm-*RARα/PML* son siempre ARNm'-*PML/RARα* (Alcalay et al., 1992).

La proteína híbrida *PML-RARα* (p*PML-RARα*) tiene un peso aproximado de 90 kD y consiste de 797 aminoácidos (Kakizuka et al., 1991). Esta fusión sustituye los primeros 59 aminoácidos del extremo amino de la proteína *RARα* con los

primeros 394 residuos del factor de transcripción *PML* (Kakizuka et al., 1991). Además, la p*PML-RARα* conserva los dominios de unión al ADN y al ácido retinoico de la proteína *RARα*, junto con los dominios funcionales (incluyendo un dominio rico en cisteína) del factor *PML* (Dyck et al., 1994).

Debido a que la p*PML-RARα* conserva el dominio de union al ácido retinoico, ha sido postulado que la acción patogenética de la p*PML-RARα* sería antagonizar con la proteína *RARα* normal, bloqueando la diferenciación mielocítica (Kakizuka et al., 1991). Sin embargo, esta hipótesis choca con dos hechos importantes :

- la LAP es altamente sensible a la acción diferenciadora del ácido retinoico tanto *in vitro* como *in vivo* (Grignani et al.,1993).
- la p*PML-RARα* presenta tanto un efecto negativo como uno positivo sobre la diferenciación de los mielocitos dependiendo de las concentraciones fisiológicas del ácido retinoico (de Thé et al., 1991, Grignani et al., 1993).

Recientemente se ha informado que la proteína *PML* normal es parte de una nueva organela macromolecular (DOP : Dominios Oncogénicos PML) localizada en el núcleo, que es desorganizada por la expresión de la proteína híbrida p*PML-RARα* (Dyck et al., 1994, Koken et al., 1994). Se cree que la desorganización de los DOP's está asociada con el bloqueo de la diferenciación de los promielocitos, ya que el tratamiento con ácido retinoico induce tanto la reorganización de los DOP's como la diferenciación celular (Dyck et al., 1994, Koken et al., 1994, Weis et al., 1994).

Es importante hacer notar que en la LAP, aparte de la t(15;17), no ocurren otros eventos comunmente asociados con la progresión multifásica de la mayoría de las leucemias o

tumores en general. Así, por ejemplo, no se observan mutaciones en los genes *RAS* o en el gen *p53*, lo que sugiere que la t(15;17) es el único requerimiento para la transformación maligna y la progresión de la LAP (Grignani et al., 1993).

Otra de las anormalidades cariotípicas asociadas con la LANL, principalmente con la leucemia aguda monocítica (LAMo) o M5a, es la reestructuración de la banda 11q23 (Heim y Mitelman, 1987).

Las aberraciones en 11q23 están presentes en el 5% de los pacientes con LANL y se encuentran principalmente en la forma de translocaciones recíprocas, entre las cuales están las siguientes : t(9;11)(p22;q23), t(6;11)(q27;q23) y t(11;19)(q23;p13) (Gu et al., 1992). Se ha informado que en todas estas anormalidades citogenéticas se reestructura un único gen en 11q23 (Tkachuk et al., 1992, Thirman et al., 1993), que ha sido denominado de diversas maneras : *MLL* (van der Poel et al., 1991), *Htrx* (Djabali et al., 1992), *ALL-1* (Gu et al., 1992) o *HRX* (Tkachuk et al., 1992).

El gen *MLL* presenta homología con el gen *tritorax* de Drosophila melanogaster (Tkachuk et al., 1992, Domer et al., 1993, Nakamura et al., 1993b), el cual reprime la expresión de los genes homeóticos durante el desarrollo de la mosca de la fruta (Castelli-Gair y García-Bellido, 1990, Sedkov et al., 1994). Debido a esto se cree que las reestructuraciones del gen *MLL* podrían llevar a la desregulación de genes homeóticos involucrados en la ontogenia hematopoyética, lo que provocaría el fenotipo maligno tanto de linaje mieloide como linfoide (Corral et al., 1993, Parry et al., 1993).

La LANL secundaria tiene mayor cantidad de anormalidades cariotípicas, los cambios cromosómicos más característicos son : -7/7q-, -5/5q- (Le Beau et al., 1986, Pedersen y Philip, 1987). Si bien el marcador 5q- se encuentra también

en la LANL de *novo*, en el 10% de los casos citogenéticamente anormales (Le Beau et al., 1993), es mucho más frecuente en la LANL secundaria, en el 50% de los pacientes (Willman et al., 1993).

1.3.3 LEUCEMIA AGUDA LINFOCITICA (LAL)

La leucemia aguda linfocítica (LAL) es el cáncer más común en la infancia (Bleyer, 1990).

La clasificación de este tipo de leucemias, según el grupo FAB, se muestra en el Cuadro 4 (Bennett et al., 1976).

En 1985, durante un Taller Internacional realizado en Bélgica, se propuso una clasificación morfológica, inmunológica y citogenética (MIC) de las leucemias agudas linfoblásticas, la cual se muestra de manera separada para las leucemias de células B y para las de células T en los Cuadros 5 y 6 (Primer Grupo de Estudio Cooperativo MIC, 1986).

Aproximadamente dos tercios de todos los pacientes con LAL presentan anormalidades citogenéticas (Heim y Mitelman, 1987) y en los niños tales aberraciones pueden ser detectadas en el 60% al 94% de los casos (Michael et al., 1988).

Los cambios cromosómicos más frecuentes, así como los subtipos de LAL con los cuales se asocian se muestran en el Cuadro 7 (Heim y Mitelman, 1987).

Dentro de la LAL de linaje B (LAL-B) las aberraciones estructurales más frecuentes son las siguientes :

Reestructuraciones de la banda 8q24

Las anormalidades cariotípicas que involucran a la banda

Cuadro 4. Clasificación FAB de las leucemias agudas linfocíticas

LEUCEMIAS AGUDAS LINFOCITICAS (LAL)	
L1	predominan las células pequeñas: la forma del núcleo es regular y la cromatina está finamente dispersada: el nucleolo no es visible. el citoplasma es escaso y moderamente basofílico. La homogeneidad de todos estos rasgos es característica.
L2	Grandes linfoblastos y más heterogéneos que en la L1: el núcleo es irregular con hendiduras frecuentes: varios nucleolos está presentes a menudo. Frecuentemente las células tienen citoplasma basofílico oscuro.
L3	Grandes blastos homogéneos e idénticos en apariencia a aquellos en la LAL tipo Burkitt. La cromatina nuclear está finamente punteada y hay uno o más nucleolos. El citoplasma es intensamente basofílico con numerosas vacuolas.

Fuente : Bennett et al. (1976).

Cuadro 5. Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética de la LAL-B

Categoría y cariotipo	Marcador celular						Morfología FAB
	CD19	TdT	Ia	CD10	cIg	sIg	
LAL-B temprana	+	+	+	−	−	−	L1,L2
t(4;11)							
t(9;22)							
LAL común	+	+	+	−	−	−	L1,L2
6q-							
haploide							
t/del(12p)							
t(9;22)							
LAL-pre B	+	+	+	+	+	−	L1
t(1;19)							
t(9;22)							
LAL-células B	+	−	+	+/−	−/+	+	L3
t(8;14)							
t(2;8)							
t(8;22)							
6q-							

Fuente : Primer reporte MIC (1986).

Cuadro 6. Clasificación morfológica, inmunológica y citogenética de las LAL de linaje T

Categoría y cariotipo	Marcador celular			Morfología FAB
	CD7	CD2	TdT	
LAL-T temprana	+	−	+	L1,L2
del(9p)				
LAL de células T	+	+	+	L1,L2
t(11;14)				
6q-				

Fuente : Primer reporte MIC (1986).

Cuadro 7. Anormalidades cromosómicas estructurales primarias en las leucemias agudas linfocíticas (LAL)

Punto de ruptura	Arreglo	Morfología	Inmunofenotipo
1p32	t(1;11)(p32;q23)	L1	LAL-pre-B
1q23	t(1;19)(q23;p13)	L1	LAL-pre-B
2p12	t(2;8)(p12;q24)	L3	LAL-B
4q21	t(4;11)(q21;q23)	L1.L2	LAL-pre-B temprana
6q	del(6q)	L1.L2	LAL-común
8q24	t(2;8)(p12;q24)		
	t(8;14)(q24;q11)		LAL-T
	t(8;14)(q24;q32)	L3	LAL-B
	t(8;22)(q24;q11)	L3	LAL-B
9p	del/t(9p)	L1,L2	LAL-T o LAL-pre-T
9q34	t(9;22)(q34;q11)	L1.L2	LAL-pre-B
10q24	t(10;14)(q24;q11)	L1.L2	LAL-T
11p13	t(11;14)(p13;q11)	L1.L2	LAL-T
11q23	t(1;11)(p32;q23)		
	t(4;11)(q21;q23)		
	t(11;14)(q23;q32)		
	t(11;19)(q23;p13)		
12p	del/t(12p)	L1.L2	LAL-común
14q11	t(8;14)(q24;q11)		
	t(10;14)(q24;q11)		
	t(11;14)(p13;q11)		
	del/t(14)(q11)		LAL-T
14q32	t(8;14)(q24;q32)		
	t(11;14)(q23;q32)		
	otras t(14)(q32)		
19p13	t(1;19)(q23;p13)		
	t(11;19)(q23;p13)		
22q11	t(8;22)(q24;q11)		
	t(9;22)(q34;q11)		

Fuente : Heim y Mitelman (1987).

8q24 se presentan en la forma de translocaciones recíprocas, a saber : t(8;14)(q24;q32), t(2;8)(q12;q24) y t(8;22)(q24;q11) (Heim y Mitelman, 1987). La frecuencia conjunta de estas translocaciones es del 85% al 90% de los casos de LAL-B/Ig⁺ (Raimondi, 1993). El evento crucial en todas estas aberraciones es la yuxtaposición del proto-oncogén *c-myc* localizado en 8q24 con los genes de la cadena *u* de las inmunoglobinas (Ig-*u*) en 14q32, la cadena k (Ig-k) en 2p12 o con el gen de la cadena λ (Ig-λ) en 22q11 (Croce y Nowell, 1985). Todas estas reestructuraciones colocan al gen *c-myc* bajo la secuencia de secuencias estimuladoras de la transcripción en cada uno de los loci activos de Ig, lo que provoca la desregulación de *c-myc*, expresión incrementada del mismo, y probablemente esto causa el crecimiento neoplásico (Rabbitts et al., 1984).

La t(9;22)(q34;q11)

El cromosoma Ph¹ se presenta principalmente en la LAL de precursores de células B (LAL/pre-B) (Raimondi, 1993). Se encuentra aproximadante en el 5% de los casos de LAL de infantes (Ribeiro et al., 1987, Fletcher et al., 1991) y en el 15% al 20% de la LAL de adultos (Suryanarayan et al., 1991).

A diferencia de la LCM, en la LAL las rupturas en el cromosoma 22 no ocurren en la región mayor de los puntos de ruptura (M-bcr), sino de manera preferencial dentro del primer intrón del gen *BCR*, en la región menor de los puntos de ruptura (m-bcr), 50 kb corriente arriba de M-bcr (Rubin et al., 1988, Suryanarayan et al., 1991). Esto lleva a la inclusión de menos secuencias de *BCR* dentro del gen quimérico, por lo que el ARNm y la proteína correspondientes

son más pequeños (Rubin et al., 1988). La proteína que se expresa es la $p190^{bcr-abl}$ (Heisterkamp et al., 1989).

Otra diferencia con respecto a la LCM, es que en ésta el cromosoma Ph' es retenido a lo largo de toda la enfermedad, mientras que en la LAL dicho cromosoma no es detectable por análisis citogenético durante la remisión (Heim y Mitelman, 1987). El significado clínico de la presencia continua del cromosoma Ph' (enfermedad mínima residual) no es aún claro (Raimondi, 1993).

Reestructuraciones de la banda 11q23

Al igual que en la LANL, en la LAL también se observan reestructuraciones de la banda 11q23 que afectan al gen *MLL* (Kobayashi et al., 1993, Thirman et al., 1993) y son más frecuentes en infantes (70% de los casos) que en adultos (Chen et al., 1993). Dichas anormalidades en 11q23 se presentan principalmente en forma de translocaciones recíprocas : t(1;11)(p32;q23), t(4;11)(4q21;q23) y t(11;19)(q23;p13) (Heim y Mitelman, 1987).

Los genes en los cromosomas 4 y 19 (*AF-4* y *ENL* respectivamente), los cuales participan en las translocaciones con 11q23, ya han sido clonados. Es interesante hacer notar que ambos comparten homología de secuencia y se cree que podrían ser activadores de la transcripción (Nakamura et al., 1993b). De esta manera, la fusión del gen *MLL* con un gen activador de la transcripción alteraría la expresión de genes que participan en la ontogenia hematopoyética, produciéndose la leucemia (Corral et al., 1993, Parry et al., 1993).

Los puntos de ruptura en el gen *MLL* en todas estas translocaciones están agrupados en una región de 8.3 kb que

abarca los exones 5 al 10 de dicho gen (Gu et al., 1994). No se ha encontrado correlación entre la posición del punto de ruptura en *MLL* y el tipo celular de la leucemia (Corral et al., 1993).

La reestructuración de 11q23 es la anormalidad citogenética más frecuente de la LAL de infantes (<1 año de edad) (Pui et al., 1987, Kaneko et al., 1987) y presenta las siguientes caracteristicas :

- carga celular masiva (>1x10^{31} glóbulos blancos/litro), con hepatoesplenomegalia e infiltraciones en el sistema nervioso central,
- participación de una celula multipotente, como es sugerido por las características fenotipicas promiscuas de los blastos, frecuentemente con marcadores mieloides y linfoides mezclados y,
- mal pronóstico (Cimino et al., 1993).

Dentro del grupo de la LAL de infantes, las anormalidades moleculares de 11q23 están asociadas significativamente con factores pronósticos adversos, tales como edad de 6 meses o menos, hiperleucocitosis y falla temprana del tratamiento (Chen et al., 1993).

En las leucemias agudas de linaje T (LAL-T) las anormalidades estructurales más frecuentes son las siguientes:

Reestructuraciones de la banda 14q11

Las anormalidades de la banda 14q11 se presentan principalmente de la siguiente forma : t(11;14)(p13;q11), t(11;14)(p15;q11), t(10;14)(q24;q11), t(8;14)(q24;q11), t(1;14)(p32;q11) e inv(14)(q11q32) (Heim y Mitelman, 1987).

La característica común de todas estas aberraciones es la reestructuración de los genes de las cadenas α y δ del receptor de las células T (RcT) localizado en 14q11 (Erikson et al., 1985. Champagne et al., 1989).

De las anormalidades anteriores la más frecuente es la t(10;14)(q24;q11) que se encuentra en el 7% de los casos de LAL de linaje T (LAL-T) (Hatano et al., 1991). Esta translocación causa la fusión del locus de las cadenas α y δ del RcT en 14q11 con el gen homeótico *HOX11* en 10q24, denominado originalmente *TCL3* (Zutter et al., 1990). El gen *HOX11* no se expresa en células T normales, pero sí en aquellas con la t(10;14). Por esa razón se piensa que el gen *HOX11* reestructurado activa en estas células un programa completo de genes específicos de otro linaje celular, lo que contribuiría a la neoplasia de linfocitos T (Hatano et al., 1991).

Otra anormalidad citogenética en la cual la banda 14q11 está involucrada es la t(1;14)(p34;q11), que se encuentra en el 3% de los casos de LAL-T (Carroll et al., 1990). Esta translocación causa la fusión del gen del factor de transcripción *TAL1* con las subunidades α y δ del receptor de células T (Begley et al., 1989. Finger et al., 1989). Esto produce la desregulación de la expresión de los genes regulados por *TAL1* (Xia et al., 1991).

La t(11;14)(p15;q11) se encuentra en el 1% de los casos de neoplasias de células T (Ribeiro et al., 1991). En el cromosoma 11 la ruptura ocurre en el gen denominado *TTG1* (Gen de Translocación 1 de las Células T) o *RBTN1* (Rombotina 1) el cual codifica una proteína nuclear cuya estructura ha sido altamente conservada entre diversas especies, lo que sugiere una función importante durante la ontogenia (Boehm et al., 1991). Asimismo otro gen de la familia de las rombotinas (*RBTN2*) fue encontrado en la banda 11p13 que participa en la

t(11;14)(p13;q11) (Boehm et al., 1991). De esta manera, algunos miembros de la familia génica de las rombotinas pueden ser una clase de factores de transcripción de particular importancia en las leucemias de células T (Raimondi, 1993).

La t(8;14)(q24;q11) se encuentra en el 2% de los casos de LAL-T, pero no está restringida a este linaje (Raimondi, 1993). La consecuencia de esta translocación es la desregulación de la transcripción del proto-oncogén *c-myc* localizado en 8q24 (Erikson et al., 1986).

Reestructuraciones de la región 7q terminal

Las anormalidades de 7q terminal involucran a las bandas 7q34-35, generalmente en alguna de las siguientes formas : t(1;7)(p32;q35), t(1;7)(p34;q34), t(7;9)(q34;q34), t(7;9)(q34;q32), t(7;10)(q35;q24), t(7;11)(q35;p13), t(7;19)(q35;p13) e inv(7)(q35p13) (Raimondi, 1993). En general, las reestructuraciones de 7q34-35 son menos frecuentes que las de la región 14q11 (Kaneko et al., 1988). El evento común de todas estas aberraciones es la reestructuración del gen de la cadena ß del RcT en 7q35(Raimondi, 1993).

La t(7;9)(q34;q34) afecta al gen *TAN1* en 9q34, lo que causa la producción de un ARNm truncado de dicho gen (Ellisen et al., 1991) y la t(7;9)(q34;q32) altera al gen *TAL2* en 9q32 (Xia et al., 1991). Los productos proteicos de los genes *TAN1* y *TAL2* presentan dominios de unión al ADN, por lo que podrían verse involucrados en la regulación génica (Ellisen et al., 1991, Xia et al., 1991).

El gen *LYL1* (19p13) es roto en la t(7;19)(q34;p13) (Cleary et al., 1988) y presenta homología de secuencia con

los genes *TAL1* y *TAL2* que se cree pueden ser factores de la transcripción (Xia et al., 1991, Aplan et al., 1992). De esta manera, la reestructuración del gen *LYL1*, al igual que *TAL1* y *TAL2*, causaría la desregulación de varios genes provocando el proceso leucémico (Mellentin et al., 1989, Xia et al., 1991).

La t(1;7)(p34;q34) interrumpe el gen *LCK* localizado en la banda 1p34 (Tycko et al., 1991). Este codifica una proteína quinasa, que normalmente está restringida a las células linfoides y se cree que juega un papel crucial en la transmisión de las señales mitogénicas (Raimondi, 1993).

Otros genes que son alterados por estas translocaciones, son el gen homeótico *HOX11* (10q24) en la t(7;10)(q35;q24) (Kennedy et al., 1991) y el gen *RBTN2* (11p13) en la t(7;11)(q35;p13) (Sánchez-García et al., 1991). Las funciones de ambos genes y las posibles implicaciones de las reestructuraciones de los mismos ya fueron consideradas anteriormente.

Dentro de las alteraciones numéricas observadas en la LAL, la trisomía 21 es la más frecuente, seguida por las +6, +8 y +18 (Heim y Mitelman, 1987). Todas estas trisomías ocurren con mayor frecuencia de lo esperado por simple azar. Una alteración numérica raramente encontrada en la LAL es la monosomía 18 (Mitelman, 1991) y se sabe que en 18q21 se encuentra el gen supresor de tumores *DCC* (Deletado en el Cáncer-Colorectal) (Fearon et al., 1990). Se ha informado que en los casos de LAL que presentan la monosomía 18, no se detecta el ARNm del gen *DCC* o se encuentra en niveles más bajos de lo normal, lo que sugiere que la inactivación del gen *DCC* puede tener un papel en el desarrollo de malignidades hematológicas (Porfiri et al., 1993).

Al igual que con otros tipos de leucemias, el cariotipo de los pacientes al momento del diagnóstico es un factor de pronóstico independiente. Los mejores resultados del

tratamiento son vistos en el grupo de hiperdiploides (>50 cromosomas/célula) (Michael et al., 1988). La hipodiploidía está asociada con un mal pronóstico, mientras que los grupos normales y pseudodiploides tienen un pronóstico intermedio (Secker-Walker et al., 1989).

El significado de ciertas translocaciones tales como el Ph' y la t(4;11) ha sido claramente establecido y se ha informado que la presencia de cualquier translocación aumenta la probabilidad de que falle el tratamiento (Williams et al., 1986).

1.3.4 LEUCEMIA CRONICA LINFOCITICA (LCL)

La LCL ocurre casi de manera exclusiva en grupos de mediana o de avanzada edad (Catovsky et al., 1989). La gran mayoría de las LCL son de origen B, las LCL-T son menos del 5% de todos los casos (Heim y Mitelman, 1987).

Las alteraciones cariotípicas más frecuentes en la LCL-B son : +12 (Pittman y Catovsky, 1984, Sadamori et al., 1984, Juliusson et al., 1985), 14q+, 6q-, 12p-, 14q- (Heim y Mitelman, 1987) y 13q- (Fitchett et al., 1987).

La trisomía 12 es la anormalidad cromosómica más común en la LCL-B (Knuutila et al., 1986, Escudier et al., 1993). Es observada en el 20% al 60% de los casos de LCL-B con cariotipo anormal (Escudier et al., 1993). Está asociada con un mal pronóstico y una corta sobrevida (Juliusson et al., 1990), aunque no se ha encontrado correlación entre la +12 y otros parámetros clínicos tales como conteo de glóbulos blancos en sangre, nivel de hemoglobina, conteo de plaquetas, esplenomegalia o linfoadenopatía (Que et al., 1993). Esta anormalidad no presenta reestructuraciones a nivel molecular de ningun locus, por lo que no se han podido identificar

genes específicos de importancia patogenética (Juliusson et al., 1990).

El marcador 14q+ se encuentra en el 25% de los casos de LCL-B con cariotipo anormal (Heim y Mitelman, 1987) e involucra reestructuraciones de la banda 14q32. Los pacientes con esta anormalidad representan el grupo de peor pronóstico dentro de la LCL-B, aunque en la mayoría de los casos el marcador 14q+ se presenta acompañado de otras anormalidades (Juliusson et al., 1990).

En el 30% de los pacientes con LCL-B que presentan anormalidades citogenéticas se observa el marcador 13q-, que se forma principalmente por delecciones de la banda 13q14 (Liu et al., 1993). Debido a que el gen del retinoblastoma (*RB1*) está localizado en 13q14 (Cavenee et al., 1983), se pensó en un inicio que dicho gen podría estar involucrado en la patogénesis de las LCL-B que tienen dichas delecciones (Juliusson et al., 1990). Recientemente fue informado que los pacientes con el cromosoma 13q- tienen niveles normales del ARNm y de la proteína del retinoblastoma. Además no se han detectado mutaciones puntuales o delecciones submicroscópicas en el alelo *RB1* remanente, por lo que más bien un locus adyacente a *RB1* sería el relevante para el desarrollo de la LCL-B en estos casos (Liu et al., 1993).

En general, la presencia de cualquier anormalidad cariotípica implica una corta sobrevida en la LCL-B. Así, los pacientes con cariotipo normal presentan una sobrevida promedio de 15 años, comparado con los 7.7 años en pacientes con cambios citogenéticos (Juliusson et al., 1990).

La inv(14)(q11q32) es una aberración cromosómica que se observa de manera consistente en la LCL-T, así como en la leucemia de adultos de células T. La reestructuración del gen de la cadena α del receptor de las células T, que está localizado en 14q11 y de ciertos oncogenes, parece ser un

paso crucial en la patogenésis de estas leucemias (Sadamori et al., 1992).

1.3.5 DESORDENES CRONICOS MIELOPROLIFERATIVOS (DCM)

La principal caracteristica de los desordenes cronicos mieloproliferativos (DCM) es la proliferacion excesiva de uno o mas linajes de la serie mieloide. La maduracion, por lo general, es menos afectada (Heim y Mitelman, 1987).

Los principales trastornos incluidos en los DCM son : policitemia vera (PV), mielofibrosis idiopática/metaplasia mieloide agnogenica (MI/MMA) y la trombocitemia esencial (TE) (Heim y Mitelman, 1987). La leucemia crónica mieloide (LCM), por tradición, es reconocida como una entidad separada.

Aunque ninguna anormalidad cariotipica es especifica de los DCM, ciertos cromosomas están involucrados preferencialmente en cambios numericos y estructurales. Las alteraciones más comunes son rearreglos del cromosoma 1, -7, +8, +9, 13q- y 20q- (Gyger et al., 1982, Sandberg et al., 1985, Miller et al., 1985, Smadja et al., 1985, Morrison-De Lap et al., 1986, Rege-Cambrin et al., 1987, Smadja et al., 1987).

El pronostico para estos pacientes aparentemente no es influenciado por la presencia *per se* de un clon cromosómicamente anormal, pero la presencia de múltiples anormalidades indica un pronóstico desfavorable, incluyendo un riesgo aumentado de progresión a leucemia (Nowell et al., 1986). La unica alteración cariotipica que por si misma implica una corta sobrevida es la monosomia 7 (Wang et al., 1985).

1.3.6 SINDROMES MIELODISPLASICOS (SMD)

Los sindromes mielodisplásicos afectan principalmente a personas de 55 años o más (List y Jacobs, 1992). Comparten muchas caracteristicas con las leucemias agudas no linfociticas y del 20% al 40% de los pacientes desarrollan leucemia aguda mieloide o mielomonocitica (Heim y Mitelman, 1987).

Estudios de polimorfismos de loci ligados al cromosoma X (Clemson et al., 1989, Tefferi et al., 1990) y análisis citogenéticos de precursores de las células hematopoyéticas presentes en la médula ósea (Lawrence et al., 1987, Amenomori et al., 1987) han confirmado que estos desórdenes resultan de la expansión clonal de un progenitor hematopoyético multipotente o pluripotente.

La clasificación FAB reconoce cinco diferentes subgrupos mielodisplásicos : anemia refractaria sin exceso de blastos (ARSEB), anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA), leucemia crónica mielomonocitica (LCMM), anemia refractaria con exceso de blastos (AREB), y la anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREBT) (Bain, 1990).

Las aberraciones más frecuentes en los SMD son la 5q-, -7, +8, aunque la distribución de los subtipos FAB y las anormalidades cariotipicas difieren significativamente entre los diversos grupos de edad (List y Jacobs, 1992).

La del(5q) se encuentra en el 15% de los casos de SMD de novo y es más frecuente en la ARSEB (70% de los pacientes) (Heim y Mitelman, 1987).

La región 5q distal contiene varios genes que se sospechan son genes supresores de tumores, así como genes que codifican factores hematopoyéticos de crecimiento como la interleucina 3 (*IL-3*), la *IL-4*, la *IL-5* y la *IL-9* (Le Beau et

al., 1993). Ha sido informado que la región mínima deletada tiene un tamaño de 2.8 Mb (1000 kb = 1 Mb), que incluye a los genes *EGR1* e *IRF1* (Le Beau et al., 1993, Willman et al., 1993).

El gen *IRF1* (Factor 1 Regulador del Interferón) actúa como activador de la transcripción del interferón α (*IFN-α*), *IFN-β* y de otros genes inducibles por los interferones, además es inhibidor del crecimiento celular y muestra actividades antioncogénicas (Willman et al., 1993). Por su parte el gen *EGR1* codifica una proteína que también actúa como un regulador de la transcripción (Le Beau et al., 1993). La proteína *EGR1* es sobre-regulada en la diferenciación mieloide terminal y es esencial para restringir la diferenciación de los mieloblastos al linaje macrofago (Le Beau et al., 1993). Ya que *EGR1* y/o *IRF1* están involucrados tanto en los SMD como en la LANL, es posible que la región 5q distal contenga más de un gen involucrado en la patogénesis de las leucemias y desordenes mieloides (Le Beau et al., 1993).

Si bien el análisis citogenético de los SMD está caracterizado por la pérdida de material genético, que frecuentemente incluye grandes delecciones de 5q y 7q, un subtipo de SMD, la leucemia crónica mielomonocítica (LCMM) ha sido asociada con una translocación cromosómica adquirida: la t(5;12)(q33;p13) (Golub et al., 1994). La consecuencia de esta translocación es la fusión del dominio tirosina quinasa del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFR-β*), localizado en el cromosoma 5, con el gen *tel*, que es un factor de transcripción del cromosoma 12 (Golub et al., 1994). Posiblemente esta fusión génica resulta en una actividad tirosina quinasa constitutiva ectópica (en un sitio incorrecto) de la proteína *PDGFR-β*, o alternativamente el promotor del gen *tel* permitiría la

expresión no regulada del *PDGFR-β* (Golub et al., 1994. Sawyers y Denny, 1994). Debido a que la t(5;12) involucra bandas cromosomicas frecuentemente deletadas en otros subtipos de SMD, los genes *tel* y *PDGFR-β* podrian estar involucrados en la patogenésis de los SMD y de otras malignidades hematológicas (p. ejemp. LANL) asociadas con anormalidades citogenéticas de 5q y 12p (Golub et al., 1994).

En general, los cambios cromosómicos anteriores tambien han sido encontrados en la LANL (Heim y Mitelman, 1987). De esta manera, la ocurrencia no aleatoria de las mismas anormalidades en los SMD y en las LANL, muestran una similitud patobiológica básica entre los dos tipos de desórdenes.

Se ha demostrado que el patrón cariotipico en el momento del diagnóstico es un factor de pronóstico independiente en el desarrollo de la enfermedad. Pacientes con anormalidades cromosómicas múltiples en un clon de la médula tienen una alta probabilidad de muerte temprana, progresión a leucemia o hacia otras disfunciones hematopoyéticas (Nowell et al., 1986). Otros factores que predisponen hacia el desarrollo de leucemia aguda son : mieloblastos incrementados en médula ósea, presencia de mieloblastos en sangre periférica y mutaciones en el gen *N-ras* (Paquette et al., 1993).

2 MATERIALES Y METODOS

Los pacientes fueron reclutados en los hospitales Nacional de Niños y Calderon Guardia, con ayuda del personal médico de Hematologia. Para esto los coordinadores respectivos informaron vía telefónica de los casos y se envio a alguien del laboratorio a recoger las muestras.

En el Hospital Nacional de Niños el coordinador del proyecto fue el Dr. Juan Manuel Carrillo, en el Hospital Calderon Guardia fue el Dr. Germán Sánchez Hidalgo.

De cada paciente se obtuvieron las siguientes muestras:

- 3 ml de sangre periférica en un tubo heparinizado (20 U/ml).
- 0.5-1.0 ml de médula ósea en un tubo con heparina (20 U/ml).
- 0.2-0.5 ml de medula osea en un tubo con medio de cultivo de transporte[1] (10 ml).
- 1 ml de sangre periferica en medio de cultivo de transporte (10 ml). Esta última muestra sólo se obtuvo de los pacientes del Hospital Nacional de Niños.

En todos los tipos de leucemia con excepcion de la leucemia crónica linfocitica se hicieron cultivos con las siguientes cinco técnicas, para cada paciente :

2.1 CULTIVO DIRECTO DE MEDULA OSEA

Esta técnica es una variación de la descrita por

---

[1]La composicion del medio de cultivo de transporte se muestra en el Cuadro 8

Cuadro 8. Composición del medio de cultivo de transporte

Componentes	Cantidad
Medio RPMI-1640	100 ml
Suero Bovino Fetal	20 ml
Penicilina	10000 U/ml
Estreptomicina	10 mg/ml
L-glutamina 100X	1 ml
$NaHCO_3$	0.2 g
Bromuro de Etidio	10 µg/ml
Colcemid	0.01 µg/ml
Heparina	20 U/ml

Modificado de Williams et al. (1984).

Cuadro 9. Composición del medio de cultivo 1

Componentes	Cantidad
Medio RPMI-1640	100 ml
Suero Bovino Fetal	20 ml
Penicilina	10000 U/ml
Estreptomicina	10 mg/ml
L-glutamina 100X	1 ml
NaHCQ	0.2 g

Modificado de Williams et al. (1984)

Williams et al. (1984). El método original consiste de los siguientes pasos :

a. Se recoge la medula ósea en medio RPMI-1640 suplementado con 30% de suero bovino fetal.
b. Se procesa solo 0.1 ml de células sedimentadas por tubo.
c. Inmediatamente despues las células son expuestas a Colcemid (0.06 µg/ml) y luego a una solucion de KCl 0.075 M por un tiempo total de 32 minutos, incluyendo el tiempo de mezclar, tiempo de reposo y de centrifugacion.
d. 4 a 6 fijaciones en metanol : acido acetico (3:1).

Para esta técnica se utilizó la medula osea colectada en el medio de cultivo de transporte.

A diferencia del metodo de Williams et al. (1984), el medio en el cual se recolectó la medula ya contenia el Colcemid y a una concentracion menor (0.01 µg/ml) (Cuadro 8).

Dado que se necesitaban aproximadamente 50 min. para el traslado de las muestras desde el hospital hasta la universidad, el medio de transporte contenia bromuro de etidio a una concentracion final de 10 µg/ml. Esto evita la condensación excesiva de los cromosomas debido a la exposición prolongada al Colcemid. El bromuro de etidio se intercala entre la doble hélice del ADN (Macgregor et al., 1985, Walker et al., 1985) y como se comprobó en este trabajo permite una mayor exposicion de las celulas al Colcemid sin reducción apreciable del tamaño de los cromosomas.

Al llegar las muestras al laboratorio se siguió el siguiente procedimiento :

a. El contenido del tubo se dividió en dos partes y a cada una se le realizaron dos lavados con medio RPMI-1640 puro.
b. Despues de los lavados se les hizo un choque hipotonico

con una solución de KCl 0.075 M a 37 °C por 40 min. de tiempo total (30 min. de reposo + 10 min. de centrifugación a 800 rpm).

c. Luego se realizaron 4 a 6 fijaciones de 30 min., cada una con metanol : ácido acético, 3 : 1. La primera fijación fue a temperatura ambiente, las demás a 4 °C.

2.2 CULTIVO CORTO DE MEDULA OSEA

Se inoculó 0.1 a 0.2 ml de medula osea, a cada uno de 3 tubos de cultivo con 10 ml del medio 1 mostrado en el Cuadro 9.

Los tubos fueron incubados por 24 horas a 37 °C. Hora y media antes del cumplimiento de dicho tiempo se expuso las células a un tratamiento con Colcemid (0.01 µg/ml) y Bromuro de Etidio (10 µg/ml). La finalidad de este tiempo prolongado de exposición al Colcemid fue obtener mayor número de metafases para el análisis y el Bromuro de Etidio impide la condensación excesiva de los cromosomas.

Luego se centrifugaron los tubos por 8 min. a 900 rpm. El choque hipotónico y las fijaciones fueron semejantes a las realizadas en el cultivo directo de médula ósea.

2.3 CULTIVO DIRECTO DE SANGRE PERIFERCA

Para esto se usó la muestra de sangre periférica que fue depositada en el tubo con el medio de cultivo de transporte. Se siguió el mismo tratamiento que el usado en el cultivo directo de médula ósea.

Esta técnica sólo se utilizó en los casos del Hospital

Nacional de Niños.

2.4 CULTIVO CORTO DE SANGRE PERIFERICA

Se inoculó 1 ml de sangre en cada uno de 2 tubos con 10 ml del medio 1. Los tubos se cultivaron por 24 horas a 37 °C.

Despues de dicho tiempo se realizó el mismo procedimiento que el efectuado en el cultivo corto de medula osea.

2.5 CULTIVO POR 72 HORAS DE SANGRE PERIFERICA

Se agregó 0.5 ml de sangre periferica a cada uno de 2 tubos que contenian 10 ml del medio 1 de cultivo mas fitohemaglutinina (0.01 ml/ml de medio). Los tubos se incubaron por 72 horas a 37 °C.

Hora y media antes de finalizar las 72 horas se expuso las celulas a bromuro de etidio (10 ug/ml) y Colcemid (0.01 ug/ml). Luego se les realizó el mismo tratamiento que se utilizó en los cultivos anteriores, con la diferencia que el choque hipotónico fue de 25 min. tiempo total (15 min. de reposo + 10 min. de centrifugacion a 800 rpm).

El proposito de este cultivo es determinar el cariotipo constitucional del individuo y usarlo asi como control.

2.6 LEUCEMIA CRONICA LINFOCITICA

Dado que en el 90-95% de los casos de este tipo de

leucemia, se trata de una malignidad de las células B y de que el índice mitótico es sumamente bajo, es necesario estimular los cultivos con un mitógeno apropiado.

Se utilizo el medio de cultivo 1. Se prepararon 3 tubos de cultivo con 10 ml de medio y 0.5 ml de sangre periferica. Se les agrego lipopolisacárido de E. coli, a una concentracion de 20 ug/ml y se cultivaron por 72 horas a 37°C. Hora y media antes de finalizar dicho tiempo se expuso las células a bromuro de etidio (10 ug/ml) y Colcemid (0.01 ug/ml). Luego se les hizo el tratamiento ya descrito (choque hipotónico + fijaciones).

En todos los pacientes, se hizo también un cultivo de sangre periférica estimulada con fitohemaglutinina, cuyo procedimiento ya fue explicado, para usarlo como control.

2.7 CONFECCION DE LAMINAS, BANDEO Y ESTUDIO CROMOSOMICO

En todos los procedimientos descritos, despues de realizar la ultima fijación, se suspendió el boton celular en una pequeña cantidad de fijador y se prepararon las laminas por goteo pasándolas ligeramente por una llama. Cinco de ellas fueron teñidas con Giemsa (2%) para realizar el conteo cromosomico de 30 a 50 células, por microscopia directa, para determinar el número modal de cromosomas. El numero a contar dependió de la disponibilidad de celulas. Despues de una semana se bandearon el resto de las laminas con tripsina (0.02%) y se tiñeron con Giemsa (1%). La tecnica que se utilizó se basa en la descubierta por Seabright (1971), modificada por Solis (resultados no publicados). Primero se bandearon los cromosomas en tripsina al 0.02% en medio minimo esencial, a un pH de 7.2 a 7.4 corregido con $NaHCO_3$ al 5.5%.

El tiempo de bandeo dependió de la vejez de las láminas. así por ejemplo las láminas de una semana tardaron de 5 a 20 seg. en ser bandeadas, aunque se observó una gran variabilidad aun dentro de una misma lamina: los cromosomas más condensados se bandearon más rápido que los menos condensados. Después del bandeo, los portaobjetos fueron transferidos a un recipiente con etanol de 95° para inactivar la tripsina. Se dejaron secar y luego se tiñeron con Giemsa a pH 6.8, por 6 min.

Dado que no contamos con un microscopio equipado con cámara fotográfica, se localizaron las metafases presentes en cada lámina por medio de puntos, utilizando tinta china y un manguillo. Luego se procedió a seleccionar las mejores para fotografía y esta se realizó con un microscopio perteneciente a otro laboratorio.

El revelado e impresión de las fotografías (aproximadamente 30 fotos por caso) se realizo en el cuarto oscuro de la Escuela de Biología. El análisis de las aberraciones estructurales y/o numéricas presentes en cada caso se hizo a partir de los cariotipos.

Un caso se consideró anormal si tenía un clon anormal, indiferente de la proporción de metafases normales (Williams et al., 1982). La observación de al menos dos células seudodiploides o hiperdiploides, o de tres hipodiploides, con la misma anormalidad, fue el criterio utilizado para definir un clon anormal (Rowley y Testa, 1983). Los pacientes cuyas células no mostraron alteraciones o en las cuales las anormalidades involucraron cromosomas diferentes en células diferentes, se consideraron que tenían cariotipo normal (Rowley y Testa, 1983).

Junto con este estudio se realizó un análisis hematológico y citoquímico, que no formó parte del trabajo de tesis, pero cuyos resultados fueron esenciales para tener una clasificación exacta de los diferentes tipos de leucemia y

demas trastornos relacionados.

3 RESULTADOS

3.1 ANALISIS METODOLOGICO

Para la realización de este estudio, se hicieron algunas modificaciones a las técnicas de citogenética descritas para el estudio de las leucemias. En primer lugar se utilizó un medio de transporte con bromuro de etidio. Esto permitió efectuar el análisis directo del cariotipo en menor tiempo, ya que la muestra de médula fue puesta en ese medio de cultivo después de tomada y ser procesada inmediatamente al llegar al laboratorio. Por otra parte, el uso del bromuro de etidio nos permitió exponer las células al Colcemid a un tiempo mucho mayor, con lo cual se obtuvieron mayor número de mitosis sin reducción apreciable en el tamaño de los cromosomas.

El tiempo durante el cual se sometió las células al tratamiento con Colcemid junto con el bromuro de etidio, fue de 1.5 horas, mucho mayor en comparación con los tiempos usados tradicionalmente.

La concentración de bromuro de etidio a la cual se obtuvieron los mejores resultados, fue de 10 μg/ml. Concentraciones mayores a ésta, no proporcionaron alguna mejoría adicional en el tamaño de los cromosomas.

Es interesante hacer notar que los cromosomas obtenidos por cultivo de sangre periférica estimulados con fitohemaglutinina, tratados por 1.5 horas con bromuro de etidio y Colcemid, siempre fueron mucho más largos que los de las células leucémicas.

Durante la realización de este estudio se recolectó un total de 34 casos, 16 del Hospital Calderón Guardia y 18 del Hospital Nacional de Niños.

3.2 HOSPITAL CALDERON GUARDIA

De los 16 pacientes, 9 fueron varones y 7 mujeres (Cuadro 10). La edad de este grupo osciló entre los 14 y 89 años.

La leucemia aguda mieloblástica sin maduración (LANL-M1) fue el diagnóstico más frecuente (37.5%), seguida por la leucemia crónica mieloide (18.8%). Diez casos correspondieron a leucemias agudas, cinco a leucemias crónicas y hubo un caso de policitemia vera (Cuadro 10).

De 13 pacientes a los cuales se les contaron los cromosomas, 8 presentaron un número modal de 46 cromosomas. En el Cuadro 12 se muestra el cariotipo del tumor para cada paciente, así como su diagnóstico. Es importante resaltar que todos los pacientes a los cuales se les pudo realizar el análisis citogenético, mostraron anormalidades cromosómicas consistentes, la mayoría de las cuales corresponden a cambios numéricos.

3.3 HOSPITAL NACIONAL DE NIÑOS

Este grupo abarcó 18 pacientes, con edades entre los 11 meses hasta los nueve años y once meses, 8 mujeres y 10 varones (Cuadro 11).

Al igual que en los pacientes del Hospital Calderón Guardia, las leucemias agudas representaron la mayoría de los casos (17), 12 linfoblásticas y 5 mieloblásticas (Cuadro 11). El paciente restante fue un caso de síndrome mielodisplásico (SMD).

De 17 pacientes a los que se les contaron los cromosomas, 12 presentaron un número modal de 46 cromosomas. En el Cuadro 13 se muestra el cariotipo de cada niño, así

Cuadro 10. Clasificación de los pacientes del Hospital Calderón Guardia por tipo de leucemia, sexo y edad

Número de caso	Sexo	Edad (años)	Tipo de leucemia
HCG-1	Varón	79	PV
HCG-2	Varón	15	LANL-M1
HCG-3	Mujer	18	LCM
HCG-4	Mujer	71	LAL
HCG-5	Mujer	15	LCL-B
HCG-6	Mujer	40	LCM
HCG-7	Varón	68	LCL-B
HCG-8	Varón	18	LCM
HCG-9	Mujer	25	LANL-M1
HCG-10	Mujer	69	LANL-M1
HCG-11	Varón	–	LANL-M5
HCG-12	Varón	14	LANL
HCG-13	Varón	72	LANL-M1
HCG-14	Mujer	33	LANL-M1
HCG-15	Varón	89	LANL-M1
HCG-16	Varón	40	LAL

Cuadro 11. Clasificación de los pacientes del Hospital Nacional de Niños por tipo de leucemia, sexo y edad

Número de caso	Sexo	Edad (años)	Tipo de leucemia
HNN-1	Varón	5 y 10 meses	LAL
HNN-2	Mujer	11 meses	LANL-M4
HNN-3	Mujer	9	LAL
HNN-4	Mujer	2 y 7 meses	LAL
HNN-5	Varón	2 y 8 meses	LAL
HNN-6	Mujer	5 y 3 meses	LANL-M3
HNN-7	Varón	6 y 2 meses	LAL
HNN-8	Varón	5	LAL
HNN-9	Varón	3	LAL
HNN-10	Varón	4	LANL-M1
HNN-11	Varón	1 y 6 meses	LAL
HNN-12	Varón	2	SMD
HNN-13	Varón	5 y 5 meses	LAL
HNN-14	Mujer	1 y 3 meses	LAL
HNN-15	Mujer	2 y 3 meses	LANL
HNN-16	Varón	3	LAL
HNN-17	Mujer	9 y 11 meses	LAL
HNN-18	Mujer	5	LANL

Cuadro 12. Resultados del estudio citogenético en los pacientes con leucemia o algún trastorno relacionado reclutados en el Hospital Calderón Guardia durante los años de 1993–1994

Número de caso	Tipo de leucemia	Cariotipo (cp)
HCG-1	PV	41–46,X,–Y
HCG-2	LANL-M1	46 [a]
HCG-3	LCM	40–47,XX,Ph[1]
HCG-4	LAL	49 [a]
HCG-5	LCL-B	42–46,X,–X,–9,–13,–14,–18,+21,+22
HCG-6	LCM	42–47,XX,+15,+16,+17,–18,+19,+20,Ph[1],+Ph[1]
HCG-7	LCL-B	44–46,XY,1q–,del(6)(q21),+12,+22
HCG-8	LCM	45–46,XY,+19,Ph[1]
HCG-9	LANL-M1	46,XX,+21,+22,Ph[1]
HCG-10	LANL-M1	42–47,X,–X,+6,+20
HCG-11	LANL-M5	45–46,XY,del(11)(q23)
HCG-12	LAL	Muestras contaminadas
HCG-13	LANL-M1	Muestras contaminadas
HCG-14	LANL-M1	44–49,XX,+8,+10,–13,–15,+19,+20,+21
HCG-15	LANL-M1	Muestras contaminadas
HCG-16	LAL	44–47,XY,del(6)(q21),–14,–17

(a) : a estos casos sólo se les determinó el número modal de cromosomas.

(cp) : cariotipo compuesto según ISCN (1991).

Cuadro 13. Resultado del estudio citogenético en los pacientes con leucemia o algún trastorno relacionado reclutados en el Hospital Nacional de Niños durante los años de 1993–1994

Número de caso	Tipo de leucemia	Cariotipo (cp)
HNN-1	LAL	46–47,XY,+8
HNN-2	LANL-M4	42–46,XY,+12,+14,–17,+19
HNN-3	LAL	45–46,X,–X,5q–,+20
HNN-4	LAL	46,XX
HNN-5	LAL	57,XY,6q–
HNN-6	LANL-M3	46–47,XX,+17,+18,+19,+21
HNN-7	LAL	50 [a]
HNN-8	LAL	Muestras contaminadas
HNN-9	LAL	44–47,XY,t(8;14)(q24;q11),–3,+8
HNN-10	LANL-M1	41–47,XY,del(11)(q23)
HNN-11	LAL	44–55,XY,+16,+21
HNN-12	SMD	44–46,XY,–18,+19,+20,+22
HNN-13	LAL	45–54,XY,+20,+21,+22
HNN-14	LAL	60 [a]
HNN-15	LANL	39–46,XX,–5,+8,–9,–12,–14,–15,–16,+19 +20,+21,+22
HNN-16	LAL	47–50,XY,+11,+19
HNN-17	LAL	42–49,XX,+13,i(17q),+19,+20 +21,+22
HNN-18	LANL	34–47,XX,–6,–9,–10,+13,–15,+19,–22

(a) : A estos casos sólo se les determinó el número modal de cromosomas.
(cp) : Cariotipo compuesto según ISCN (1991).

Cuadro 14. Clasificación de los pacientes de ambos hospitales por tipo de leucemia y por ploidía

Tipo de leucemia	Número de casos	N° de cromosomas <46	46	>46
LANL-M1[a]	7	0	5	0
LANL-M3	1	0	1	0
LANL-M4	1	0	1	0
LANL-M5	1	0	1	0
LANL[b]	2	0	2	0
LAL[a]	15	2	7	4
LCM	3	0	2	1
LCL-B	2	0	2	0
SMD	2	0	2	0
PV	1	1	0	0
Total	34	3	22	5

(a) : a dos de estos casos no se les determinó el número modal de cromosomas.
(b) : estos dos casos de LANL no fueron subclasificados.

como su diagnóstico.

De todos los casos a los cuales se les realizó el análisis citogenético, sólo un caso (N° 4) tuvo el cariotipo normal. La mayoría de las aberraciones fueron cambios numéricos (Cuadro 13).

3.4 DIFERENTES LEUCEMIAS

En el Cuadro 14 se presenta un resumen del total de pacientes analizados. En el mismo podemos observar que hubo 12 casos de LANL. Después de las leucemias agudas linfocíticas, representaron el segundo grupo de mayor frecuencia. De estos 12 pacientes, seis correspondieron a personas de 15 o más años. No se contó con la edad de un paciente (caso N° 11 del Hospital Calderón Guardia, Cuadro 10).

Diez casos mostraron un número modal de 46 cromosomas. Hubo 7 mujeres y 5 varones.

Si se consideran los diversos subtipos de LANL observados (M1, M3, M4 y M5), las aberraciones cromosómicas observadas en más de un caso fueron las siguientes :

+8
del (11)(q23)
-15
+19
+20
+21

Las leucemias agudas linfocíticas fueron el tipo de leucemias de mayor frecuencia (15/34). De todos los casos de LAL que se obtuvieron, 12 correspondieron a personas de menos de 10 años de edad.

Al igual que para la LANL, se observó una alta proporción de casos con 46 cromosomas como número modal (7/15). El número de varones fue el doble que el de mujeres (10:5).

Las alteraciones citogenéticas que se observaron de manera consistente en más de un paciente fueron:

del(6)(q21)
+8
+19
+20
+21
+22

Aparte de la trisomía 8, el cromosoma 8 apareció involucrado también en la t(8;14)(q24;q11).

El cromosoma 14 estuvo también involucrado en la translocación anterior y en una monosomía.

El cromosoma 17 se vió tanto en una monosomía como en un i(17q).

Se obtuvieron tres casos de LCM que correspondieron a personas de más de 18 años de edad, dos de las cuales mostraron un número modal de 46 cromosomas.

La t(9;22)(q34;q11) que origina el cromosomas Filadelfia (Ph^1), se detectó en los tres casos. Además en dos de los pacientes se detectó una trisomía 19.

Se detectaron dos casos de leucemias crónicas linfocíticas que fueron LCL-B. Las dos personas tenían más de 15 años de edad, que correspondieron a un varón y a una mujer.

Los dos pacientes mostraron un cariotipo hipodiploide (<46 cromosomas). La única anormalidad citogenética que se

presentó en los dos casos fue +22. En un paciente se observó la del(6)(q21), que es una aberración cromosómica característica de las malignidades hematológicas linfoides.

El único caso de síndrome mielodisplásico correspondió a un niño. Presentó un cariotipo seudodiploide.

Los cambios que se observaron en este paciente fueron:

-18

+19

+20

+22

Se obtuvo un único caso de policitemia vera, que fue un varón de 79 años.

La única anomalía consistente que se observó en este paciente fue la pérdida del cromosoma Y.

4 DISCUSION

4.1 BROMURO DE ETIDIO

Uno de los problemas con el que nos encontramos durante la realización de este estudio, fue obtener un número suficiente de metafases para el análisis citogenético, principalmente en niños, en los cuales en la mayoría de casos la muestra de médula ósea fue muy pequeña para la realización de los cultivos. Debido a esto, a los pacientes del Hospital Nacional de Niños también se les realizaron cultivos directos de sangre periférica.

Para detener la división de las células en metafase se exponen a colquicina, o a su derivado di-acetil-metil-colquicina (Colcemid) por un tiempo promedio de 25 a 30 min. (Yunis, 1981, Dewald et al., 1985, Williams et al., 1986), pero los cultivos directos de médula ósea a menudo poseen un bajo índice mitótico (0.01 a 0.2%), con cromosomas contraídos y pobremente bandeados (150 a 320 bandas por complemento haploide) (Bottura y Ferrari, 1960). La sincronización celular con ametopterina permite obtener preparaciones de alta calidad con un índice mitótico incrementado (0.1 a 1%), así como cromosomas elongados y finamente bandeados (320 a 850 bandas por complemento haploide) (Yunis, 1976). Sin embargo este último método es sumamente tedioso, además de demandar mucho tiempo.

Una manera de obtener mayor cantidad de metafases es exponer las células al Colcemid por más de 30 min., pero estos tiempos de exposición producen cromosomas muy condensados, que no son útiles para el análisis citogenético. Por lo tanto fue necesario encontrar una manera de lograr un tiempo mayor de exposición al Colcemid e impedir la

condensación excesiva de los cromosomas.

El uso del bromuro de etidio (5-etil-3,8-diamino-6-fenilfenantridiniobromuro) nos permitió un tiempo de exposición al Colcemid de hasta 1.5 horas, con una buena longitud de los cromosomas, obteniéndose los mejores resultados a una concentración final de 10 µg/ml. Si bien el bromuro de etidio ya había sido utilizado en cultivos de linfocitos (Ikeuchi y Sasaki, 1979) y en la leucemia aguda promielocítica (Sheer et al., 1985), esta es la primera vez que se utiliza para tratar cultivos de otros tipos de leucemias. Además lo utilizamos en la composición de un medio de transporte para el cultivo directo.

El bromuro de etidio (EtBr) es un tinte aromático policíclico, que se une al ADN intercalándose entre los pares de bases (Macgregor et al., 1985), aunque también es capaz de unirse al ARN, principalmente ARNt (Lambert y Le Pecq, 1984, Ferguson y Yang, 1986). La unión del EtBr al ADN libre casi no muestra especificidad de bases, aunque prefiere los sitios de secuencia (5'-3') purina-pirimidina (McMurray y van Holde, 1991). Además Hardin et al., (1988) mencionan un amplio rango de actividades biológicas del EtBr : inhibición de la duplicación del ADN, de la transcripción, de la recombinación, del editaje del ARN y altera la función de los ribosomas.

La mayoría de los estudios de la acción del EtBr sobre el ADN no muestran la manera de cómo la cromatina afecta la unión EtBr-ADN, o de cómo dicha unión altera la estructura de la cromatina. Sin embargo, McMurray y van Holde (1991) han informado que el EtBr induce la disociación de los nucleosomas, causando la liberación de las histonas constituyentes y del ADN. Debido a que los nucleosomas constituyen el nivel más simple de empaquetamiento del ADN (Avers, 1991), la desorganización de éstos interferiría en la

condensación de los cromosomas. Todavía se desconoce si el EtBr afecta niveles superiores de organización de la cromatina.

En resumen, el uso del EtBr permitió una mayor exposición de las células al Colcemid, obteniéndose mayor cantidad de metafases con cromosomas de longitud apreciable. Además, su uso en el medio de transporte facilitó la realización de los cultivos directos, ya que éstos fueron procesados inmediatamente después de llegar las muestras al laboratorio.

4.2 CONSIDERACIONES GENERALES

El presente estudio no tuvo carácter epidemiológico y debido al bajo número de casos estudiados, la frecuencia obtenida de cada tipo de leucemia y demás trastornos relacionados quizás no refleje la incidencia real de estos desórdenes hematológicos en nuestro país. A pesar de esto creemos que vale la pena hacer algunas consideraciones.

Las leucemias agudas representaron la gran mayoría de los casos estudiados (79.4%). Esto concuerda con el estudio epidemiológico de Solís (en publicación). En dicho trabajo se encontró que las leucemias agudas (linfocíticas y mieloides) sumaban el 82% de los casos de leucemias y demás trastornos relacionados registrados en Costa Rica durante los años de 1979 a 1984.

Como es de esperar, las leucemias agudas linfocíticas fueron más frecuentes en personas de menos de 15 años de edad (Cuadros 10 y 11), y ha sido informado que la incidencia de LAL alcanza el máximo en las edades de 3 a 5 años (Heim y Mitelman, 1987).

Dos estudios anteriores realizados en Costa Rica

revelaron esta misma tendencia. Arroyo et al. (1982) informaron que el 71.8% de los casos de LAL registrados en los hospitales de la capital durante los años de 1978 a 1981 correspondieron a pacientes de menos de 15 años de edad. Además, el trabajo de Solís informa un porcentaje similar (68%) de casos de LAL de menos de 15 años de edad.

En las leucemias agudas no linfocíticas el 50% de los casos correspondieron a personas mayores de 15 años de edad. En Costa Rica, este porcentaje puede ir desde un 66.2% (Arroyo et al., 1982) hasta un 76% (Solís, en publicación). Las diferencias entre estos porcentajes puede deberse a la muestra pequeña (12) de casos de LANL que obtuvimos.

Es importante hacer notar que Costa Rica posee la tasa de incidencia de leucemia aguda linfocítica más alta del mundo, para ambos sexos, en niños menores de 15 años (Sierra et al., 1988).

De acuerdo a la hipótesis de Rabbitts (1991) la diferencia principal entre las leucemias crónicas y las agudas serían los genes involucrados en la patogénesis de la malignidad. En las leucemias crónicas los genes participantes son aquellos que tienen funciones en la proliferación y sobrevivencia celular, mientras los genes asociados con las leucemias agudas participan en la transcripción génica y en la diferenciación celular. En otras palabras, los genes mutados en este último tipo de leucemia estarían en la cima de la cascada reguladora de la expresión génica (Rabbitts, 1991).

Siguiendo la idea de Rabbitts, podrían existir en nuestro medio agentes que afectarían de manera preferencial los genes involucrados en el desarrollo de las leucemias agudas, principalmente la LAL-infantil.

Se postuló la teoría de que la leucemia infantil, al igual que las leucemias de felinos, resulta de la exposición

de individuos susceptibles a un agente infeccioso no identificado (Balter, 1992). Este autor propone que la leucemia infantil podría ser causada por al menos dos mutaciones espontáneas :

- La primera ocurriría en el útero, cuando las células inmaduras del sistema inmune están en división rápida, una situación en la cual los errores de copia del ADN podrían causar altas tasas de mutaciones.
- La segunda mutación ocurre posteriormente, durante la infancia, cuando las mismas células del sistema inmune están en rápida división, pero esta vez como resultado de la exposición a virus comunes.

El corolario de esta teoría, es que el nivel de *"estrés proliferativo"* o magnitud de la respuesta inmune ayudaría a la aparición del fenotipo leucémico en niños susceptibles.

Un hecho que parece apoyar a esta teoría es la observación de que la incidencia de la LAL-infantil es mayor en países desarrollados en comparación con aquellos en vías de desarrollo. Debido a que en los países con altos estándares de salud los niños se exponen más tardíamente en su vida a agentes infecciosos (p. ejemp. virus), su sistema inmune estará más maduro y será capaz de montar una respuesta inmune vigorosa con un alto *"estrés proliferativo"*. Al contrario, los niños expuestos tempranamente a virus, no desarrollarían una respuesta inmune tan fuerte. De ser así, debería de observarse una más alta incidencia de LAL-infantil en familias de alto nivel socioeconómico en comparación con las clases menos privilegiadas, como se observa en los países desarrollados (Balter, 1992).

Esta hipótesis también concuerda con el incremento observado en la incidencia de las leucemias infantiles en Gran Bretaña entre los años de 1920-1945 y poco después en

los Estados Unidos, un período en el cual los niveles de salud e higiene aumentaron grandemente en estos dos países (Balter, 1992).

Un fenómeno semejante podría estar operando en Costa Rica, debido al ascenso de los estándares de vida durante los últimos veinte años. Paradójicamente la leucemia infantil podría ser el precio del progreso.

En muchos casos de LAL-infantil ésta se presenta antes del primer año de vida, y en varias ocasiones se diagnostica clínicamente leucemia congénita al nacimiento (Ford et al., 1993). De hecho, la LAL en niños de menos de un año de edad tiene características clínicas y biológicas inusuales que difieren grandemente de los casos de LAL en niños de mayor edad (Chen et al., 1993). Debido a esto, la LAL que se desarrolla antes del primer año de edad se reconoce actualmente como una entidad específica, conocida como LAL de infantes (Cimino et al., 1993).

La característica sobresaliente de la LAL de infantes es la reestructuración de la banda 11q23 en aproximadamente el 80% de los casos (Chen et al., 1993, Cimino et al., 1993, Ford et al., 1993). Además, Ford et al. (1993) informaron tres casos de gemelos idénticos en los cuales el gen *ALL-1*, localizado en 11q23, es reestructurado *in útero*. Esto provee la primera evidencia de que algunas mutaciones leucemogénicas adquiridas ocurren durante el desarrollo embrionario. Este hallazgo sugiere que eventos iniciales en otros cánceres de la infancia pueden ocurrir prenatalmente, lo que está muy de acuerdo con la teoría del *"estrés proliferativo"* (Balter, 1992).

Las anormalidades de la banda 11q23 no son exclusivas de la LAL de infantes. El gen *ALL-1* se ve involucrado en las LAL y LANL tanto de niños como de adultos (Cleary, 1993, Thirman et al., 1993). En este trabajo se detectaron aberraciones de

la banda 11q23 en dos casos de LANL; un niño con LANL-M1 (paciente N° 10 del Hospital Nacional de Niños, Cuadro 13) y un adulto con LANL-M5 (paciente N° 11 del Hospital Calderón Guardia, Cuadro 12). En ambos casos la anormalidad de dicha banda era la del(11)(q23). Además, en los dos pacientes citados, la del(11)(q23) fue la única anomalía citogenética consistente.

Es importante hacer notar que las translocaciones cromosómicas que involucran la banda 11q23, son muy comunes en las LANL secundarias que se originan en pacientes con cáncer, tratados previamente con agentes quimioterapeúticos que inhiben a la ADN-topoisomerasa II, tales como las epidofilotoxinas y el tenipósido (Cleary, 1993). Estos químicos inducen y/o estabilizan rupturas del ADN a través de un mecanismo dependiente de la topoisomerasa II (Ford et al., 1993).

La mayor parte de los cambios numéricos encontrados en la LAL corresponden a trisomía de los cromosomas de los grupos F y G (Cuadros 12 y 13). Si bien ha sido informada la ganancia de cualquier cromosoma en los casos de LAL, la +21 es el cambio numérico más frecuente en este tipo de leucemias (Heim y Mitelman, 1987, Raimondi, 1993).

Una del(6)(q21) se encontró en dos de los casos de LAL, aunque los puntos de ruptura informados en la literatura pueden abarcar la región 6q15-21 (Raimondi, 1993). Hasta el momento no se han encontrado diferencias entre los pacientes con la anormalidad 6q- y aquellos que no la tienen, ni está asociada con un inmunofenotipo específico, aunque es un marcador confiable de malignidades linfoides (Heim y Mitelman, 1987). La manera como esta aberración contribuye al proceso leucemogénico es aún incierta (Barletta et al., 1987).

Otra aberración estructural que se encontró en la LAL fue la t(8;14)(q24;q11) (caso N° 9 del Hospital Nacional de Niños, Cuadro 13). Como consecuencia de esta translocación el proto-oncogén *c-myc* en 8q24 es yuxtapuesto a regiones promotoras en 14q11, causando su desregulación (Erickson et al., 1986).

El i(17q) sólo se observó en un paciente con LAL (caso N° 17 del Hospital Nacional de Niños, Cuadro 13), siendo observado en casos ocasionales de LAL (Williams et al., 1982, Prigogina et al., 1988). Esta es una anomalía frecuente en la evolución de la LCM hacia fases más agresivas de la enfermedad (Heim y Mitelman, 1987). El evento comun en todos los casos de i(17q) es la pérdida monoalélica del gen *p53*, que es un supresor de tumores y está localizado en 17p13.1. De hecho, se ha informado que la pérdida de 17p13.1 está consistentemente asociada con mutaciones en el alelo *p53* remanente, que inactivarían al gen, colaborando en la progresión de la enfermedad (Feinstein et al., 1991). Sin embargo, el gen *p53* puede diferir del prototipo de los genes supresores de tumores. En algunos casos alelos mutantes de *p53* se comportan como oncogenes dominantes, siendo capaces de transformar células blancos *in vitro* y de causar tumores en ratones transgénicos aún en presencia del alelo normal (Gaidano et al., 1991). Es importante hacer notar que el paciente que mostró el i(17q) tenía también múltiples cambios numéricos, lo que le confiere un mal pronóstico (Raimondi, 1993).

Como se mencionó en los resultados, en los casos de LAL analizados predominaron los cariotipos seudodiploides, los cuales estan asociados con una enfermedad agresiva, alto conteo de glóbulos blancos y niveles elevados de la enzima lactato deshidrogenasa. Actualmente, gracias al desarrollo de la moderna quimioterapia multiagentes, este grupo de

pacientes poseen una sobrevida mayor que en el pasado (Fletcher et al., 1989), excepto para aquellos que portan ciertas translocaciones como la t(9;22), t(4;11) o la t(8;14) (Raimondi, 1993).

Igualmente, en la LANL predominaron los cambios numéricos, principalmente cromosomas de los grupos F y G (Cuadros 12 y 13).

Un caso interesante es el N° 6 del Hospital Nacional de Niños (Cuadro 13) al cual se le diagnosticó LANL-M3 o leucemia aguda promielocítica (LAP). Esta se caracteriza por la presencia de la t(15;17) que es detectada en el 100% de los casos y en el 90% de los pacientes con LAP es la única anomalía citogenética (Grignani et al., 1993). Sin embargo en este paciente no se encontro evidencia de dicha translocación, lo cual puede deberse a la presencia de cambios submicroscópicos en los cromosomas 15 y 17 que no fueron detectados al nivel de resolución empleado. Recientemente se ha informado la presencia del gen quimérico *RARα-PML*, que resulta de la t(15;17), en un caso de LCM en transformación promielocítica con copias normales del cromosoma 15 (Amano et al., 1993). De esta manera, tanto en la LAP como en la crisis blástica promielocítica de la LCM, la presencia del gen híbrido *RARα-PML* sería un evento esencial para el desarrollo de la enfermedad aún en casos donde no se detecten anormalidades morfológicas de los cromosomas 15 y/o 17.

Un paciente con LANL (caso N°15 del Hospital Nacional de Niños, Cuadro 13) presentó monosomía del cromosoma 5, que junto con la delección del brazo largo del mismo (5q-), representan el 10% de los casos de LANL con cariotipo anormal (Le Beau et al., 1993). Entre los genes que pueden tener importancia patogenética en la LANL con -5/5q- están el *IRF-1*

que es un activador de la transcripción de los genes de los interferones α y β (*IFN-α* e *IFN-β*) (Willman et al., 1993), y el gen *EGR-1* que presenta actividad reguladora de la transcripción (Le Beau et al., 1993). Ambos se encuentran en la región distal de 5q y siempre se pierden en los pacientes con 5q- (Le Beau et al., 1993, Willman et al., 1993).

Otro caso de interés es el N° 14 del Hospital Calderón Guardia (Cuadro 12). En el mismo se detectó una trisomía 8, la cual ocurre aproximadamente en el 7% de los casos de LANL citogenéticamente anormales (Heim y Mitelman, 1987). Además, este paciente mostró una monosomía del cromosoma 13, que es donde se encuentra el gen supresor del crecimiento del retinoblastoma (RB) (Sparkes et al., 1983). Se ha informado que el gen RB se expresa de manera anormal en el 55% de los casos de LANL-M4 y M5 (Weide et al., 1993) y en el 27% de las leucemias agudas monocíticas dicho gen muestra anormalidades estructurales (Ahuja et al., 1991), aunque el papel del gen RB en las leucemias agudas no linfocíticas es aun poco conocido.

Las únicas anormalidades estructurales que se encontraron en los pacientes con LANL fueron la del(11)(q23), que ya fue tratada anteriormente, y la presencia del cromosoma Ph' en el caso N° 9 del Hospital Calderón Guardia, al cual se le diagnosticó LANL-M1 (Cuadro 12). Este marcador ha sido encontrado en casos raros de LANL de adultos, principalmente de los subtipos M1 y M2 (Heim y Mitelman, 1987). Si bien a nivel citogenético la t(9;22) de las leucemias agudas es indistinguible de la que se presenta en la LCM, existen diferencias entre ambas. En primer lugar, en la LCM los puntos de ruptura en el cromosoma 22 ocurren mayoritariamnete en la región mayor de los puntos de ruptura (M-bcr), que abarca los exones 2 y 3 del gen *BCR* (van der Plas et al., 1989). En las leucemias agudas los puntos de

ruptura ocurren en el primer intrón de *BCR*, en la región menor de los puntos de ruptura (m-bcr), que se localiza 50 kb corriente arriba de M-bcr (Rubin et al., 1988. Suryanarayan et al., 1991). Además, a diferencia de lo que ocurre en la LCM, en las leucemias agudas el cromosoma Ph' desaparece cuando se alcanza la remisión de la enfermedad (Heim y Mitelman, 1987). El significado clínico de la presencia continua del cromosoma Ph' en la LCM aún no ha sido determinado (Raimondi, 1993).

Los tres casos de LCM obtenidos fueron Ph'+ (Cuadro 12). En uno de estos pacientes (caso N° 6 del Hospital Calderón Guardia) se encontraron dos cromosomas Ph', aparte de múltiples cambios numéricos, lo que sugiere evolución clonal, ya que la presencia de aberraciones cromosómicas secundarias como un cromosoma Ph' y la trisomía 19, usualmente preceden a la aparición de la crisis blástica en 2 a 6 meses (Heim y Mitelman, 1987).

Los pacientes con LCL fueron ambos de linaje B (casos N° 5 y 6 del Hospital Calderón Guardia, Cuadro 12), que representa el 95% de todos los casos de LCL (Heim y Mitelman, 1987).

La pérdida de un cromosoma 18, que se observó en uno de los pacientes con LCL-B, ha sido informada en algunos casos de LANL, en la LCM y raramente en la LAL (Mitelman, 1991), pero aún no en la LCL. La característica común de todas las malignidades hematológicas que muestran la monosomía 18 es la no expresión o en muy bajos niveles del gen *DCC* localizado en 18q21 (Porfiri et al., 1993). Se ha informado que la pérdida de uno de los alelos o la expresión disminuida de *DCC* ocurre en más del 70% de los cánceres colo-rectales (de ahí su nombre, *DCC*=deletado en cáncer colo-rectal) (Fearon et al.,

1990). De esta manera, semejante a lo que ocurre en los cánceres colo-rectales, la pérdida del gen *DCC* puede tener un papel en el desarrollo de malignidades hematológicas que muestran monosomia 18 (Porfiri et al., 1993), incluida la LCL en la cual por primera vez se detecta dicha pérdida.

El otro paciente con LCL-B (caso N°7, Cuadro 12) presentó una trisomia 12, que es la anormalidad cromosómica clonal más común descrita en la LCL (Escudier et al., 1993), siendo específica del linaje B (Knuutila et al., 1986). Este mismo paciente muestró múltiples cambios clonales, que en general confieren una sobrevida promedio de 7.7 años comparado a los 15 años de sobrevida para pacientes con LCL y cariotipo normal (Juliusson et al., 1990).

Otra anormalidad cariotípica que se encontró en este mismo paciente fue la del(6)(q21), que también se detectó en dos casos de LAL (caso N° 16 Cuadro 12, caso N° 5 Cuadro 13) y que es un marcador confiable de malignidades linfoides (Heim y Mitelman, 1987).

Se analizó un único caso de policitemia vera (PV). Esta es un desorden crónico mieloproliferativo relativamente raro, con una incidencia promedio anual de 1/100000 y una edad promedio de 60 años (Heim y Mitelman, 1987). El estudio reciente de Castro et al. (1993) informo un total de 4 pacientes con PV en un total de 117 casos de leucemias u otras hematopatías, recolectados en Costa Rica durante los años de 1990 a 1992. La única anormalidad cariotípica consistente que se encontró en este paciente fue la pérdida del cromosoma Y, que bien puede ser un fenómeno relacionado con la alta edad del paciente (79 años), sin importancia patogenética. El cariotipo constitucional también mostró dicha pérdida, lo que demuestra que dicha anomalía está presente en las células normales del individuo y

probablemente no interviene, en este caso, en el origen y/o desarrollo de la policitemia.

El único paciente con síndrome mielodisplásico presentó sólo aberraciones numéricas (caso N° 12 del Hospital Nacional de Niños, Cuadro 13), principalmente de los grupos F y G.

Este paciente mostró una monosomía 18, que como fue mencionado está asociada con una baja expresión del gen supresor de tumores *DCC* (Porfiri et al., 1993). La monosomía 18 ha sido descrita en la LANL, LCM y LAL (Mitelman, 1991), además de los casos de LCL-B y SMD que se describen en este trabajo, por lo que dicha anomalía y en última instancia el gen *DCC* (¿y otros genes?) afectaría una amplia gama de malignidades hematológicas.

5 Referencias

Ahuja H.G., Bar-Eli M., Advani S.H., Benchimol S. y Cline M.J. (1989). *Alterations in the p53 gene and the clonal evolution of the blast crisis of chronic myelocytic leukemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 6783.

Ahuja H.G., Foti A., Bar-Eli M. y Cline M.J. (1990). *The pattern of mutational involvement of RAS genes in human hematologic malignancies determined by DNA amplification and direct sequencing*. Blood 75 : 1684.

Ahuja H.G., Jat P.S., Foti A., Bar-Eli M. y Cline M.J. (1991). *Abnormalities of the retinoblastoma gene in the pathogenesis of acute leukemia*. Blood 78 : 3259-3268.

Alcalay M., Zangrilli D., Fagioli M., Pandolfi P., Mencarelli A., Lo Coco F., Biondi A., Grignani F. y Pelicci P.G. (1992). *Expression pattern of the RARα-PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 4840-4844.

Amano M., Togawa A., Tsurugano S., Soda Y., Yuo A., Takaku F., Ogawa S., Hirai H. y Yamada K. (1993). *Rearrangement of retinoic acid receptor α and PML in promyelocytic blast crisis of Ph' chromosome positive chronic myelocytic leukemia with normal copies of chromosome 15*. Blood 81 : 2469-2470.

Amenomori T., Tomonaga M. y Jinnai I. (1987). *Cytogenetic and cytochemical studies on progenitor cells*

of primary acquired sideroblastic anemia (PASA): Involvement of multipotent myeloid stem cells in PASA clone and mosaicism with normal clone. Blood 70: 1367-1372.

Aplan P.D., Lombardi D.P., Reaman G.H., Sather H.N., Hammond G.D. y Kirsch I.R. (1992). *Involvement of the putative hematopoeitic transcription factor SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Blood 79 : 1327.

Arroyo G., Saénz G.F., Valenciano E., Jiménez E., Jiménez R., Mora L., Elizondo J., Paéz C.A., Vásquez L.F., Sánchez G. y Castillo M. (1982). *Estudio cooperativo de la leucemia aguda en Costa Rica. Caracterización citoquímica*. Act. Méd. Cost. 25 : 181-189.

Avers C.J. (1991). *Biología celular*. Grupo Editorial Iberoamérica. 2a edición. México D.F.

Bain B.J. (1990). *Leukaemia Diagnosis. A guide to the FAB classification*. Gower Medical Publishing. Londres.

Baker J.S., Fearon E.R., Nigro J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Jessup J.M., van Tuinen P., Ledbetter D.H., Barker D.F., Nakamura Y., White R. y Vogelstein B. (1989). *Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas*. Science 244 : 217.

Balter M. (1992). *Childhood leukemia : Studies set to test competing theories about early infection*. Science 256 : 1633.

Barletta C., Pelicci P.G., Kenyon L.C., Smith S.D. y Dalla-Favera R. (1987). *Relationship between the c-myb locus and the 6q- chromosomal aberration in leukemias and lymphomas*. Science 235 : 1064.

Bartram C.R. y Carbonell F. (1986). *bcr rearrangement in Ph¹-negative CML*. Cancer Genet. Cytogenet. 21 : 183-184.

Begley C.G., Aplan P.D., Davey M.P., Nakahara K., Tchorz K., Kurtzberg J., Hershfield M., Haynes B.F., Cohen D.I., Waldman T.A. y Kirsch I.R. (1989). *Chromosomal translocation in a human leukemic stem cell line disrupts the T-cell antigen receptor δ-chain diversity region and results in a previously unreported fusion transcript*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2031.

Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R. y Sultan C. (1976). *Proposals for the classification of the acute leukaemias*. Br. J. Haematol. 33 : 451-458.

Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T., Flandrin G., Galton D.A., Gralnick H.R. y Sultan C. (1985). *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia*. Ann. Intern. Med. 103 : 626-629.

Bleyer M.A. (1990). *Acute lymphoblastic leukemia in children*. Cancer 65 : 689-695.

Boehm T., Foroni L., Kaneko Y., Perutz M.F. y Rabbitts T.H. (1991). *The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes : Distinct members are involved in T-*

cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 4367.

Bottura C. y Ferrari I. (1960). *A simplified method for the study of chromosomes in man*. Nature 186 : 904-905.

Carroll A.J., Crist W.M., Link M.P., Amylon M.D., Pullen J.P., Ragab A.H., Buchanan G.R., Wimmer R.S. y Vietti T.J. (1990). *The t (1;14)(p34;q11) is non-random and restricted to T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Blood 76 : 1220.

Castelli-Gair J. y Garcia-Bellido A. (1990). *Interactions of Polycomb and trithorax with cis regulatory regions of Ultrabithorax during the development of Drosophila melanogaster*. The EMBO J. 9: 4267-4275.

Castro I., Montero C. y Jimenez G. (1993). *Caracteristicas cromosómicas asociadas con leucemias y otras hematopatias en Costa Rica*. Rev. Biol. Trop. 41: 385-392.

Catovsky D., Fooks J. y Richards S. (1989). *Prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia : the importance of age, sex and response to treatment in survival*. Bri. J. Haematol. 72 : 141-149.

Cavenee W.K., Dryja T.P., Phillips R.A., Benedict W.F., Godbout R., Gallie B.L., Murphree A.L., Strong L.C. y White R.L. (1983). *Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma*. Nature 305 : 779-784.

Champagne E., Takihara Y., Sagman U., de Sousa J., Burrow S., Lewis W.H., Mak T.W. y Minden M.D. (1989). *The T-cell receptor delta chain locus is disrupted in the T-ALL associated t(11;14)(p13;q11) translocation.* Blood 73 : 1672.

Chen Z.X., Xue Y.Q. y Zhang R.I. (1991). *A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients.* Blood 78 : 1413-1419.

Chen C.S., Sorensen P.H., Domer P.H., Reaman G.H., Korsmeyer S.J., Heerema N.A., Hammond G.D. y Kersey J.H. (1993). *Molecular rearrangements on chromsome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome.* Blood 81 : 2386-2393.

Cimino G., Lo Coco F., Biondi A., Elia L., Luciano A., Croce C.M., Masera G., Mandelli F. y Canaani E. (1993). *ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy.* Blood 82 : 544-546.

Cleary M.L., Mellentin J.D., Spies J. y Smith S.D. (1988). *Chromosomal translocation involving the B T cell receptor gene in acute leukemia.* J. Exp. Med. 167: 682.

Cleary M.L. (1993). *A promiscuous oncogene in acute leukemia.* N. Engl. J. Med. 329 : 958-959.

Cline M.J. (1994). *The molecular basis of leukemia.* N. Engl. J. Med. 330 : 328-336.

Corral J., Forster A., Thompson S., Lampert F., Kaneko Y., Slater R., Kroes W.G., van der Schoot C.E., Ludwig W.D., Karpas A., Pocock C., Cotter F. y Rabbitts T.H. (1993). *Acute leukemias of different lineages have similar MLL gene fusions encoding related chimeric proteins*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 8538-8542.

Croce C.M. y Nowell P.C. (1985). *Molecular basis of human B cell neoplasia*. Blood 65 : 1.

Daley G.Q., Van Etten R.A. y Baltimore D. (1990). *Induction of chronic myelogenous leukemia by the P210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome*. Science 247 : 824-830.

De Thé H., Chomienne C., Lanotte M., Degos L. y Dejean A. (1990). *The t(15;17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor α gene to a new locus*. Nature 347 : 558-561.

De Thé H., Lavau C., Marchio A., Chomienne C., Degos L. y Dejean A. (1991). *The PML-RARα fusion RNAm generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia codifies a altered RARα*. Cell 66 : 675-684.

Dewald G.W., Broderick D.J., Tom W.W., Hagstrom J.E. y Pierre R.V. (1985). *The efficacy of direct, 24-hour culture, and mitotic synchronization methods for cytogenetic analysis of bone marrow in neoplastic hematologic disorders*. Cancer Genet. Cytogenet. 18 : 1-10.

Djabali M., Selleri L., Parry P., Bower M., Young B.D. y

Evans G.A. (1992). *A trithorax-like gene is interrupted by chromosome 11q23 translocations in acute leukemias.* Nat. Genet. 2 : 113-118.

Domer P.H., Fakharzadeh S.S., Chen C.S., Jockel J., Johansen L., Silverman G.A., Kersey J.H. y Korsmeyer S.J. (1993). *Acute mixed-lineage leukemia t(4:11)(q21:q23) generates an MLL-AF4 fusion product.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 7884-7888.

Dreazen O., Canaani E. y Gale R.P. (1988). *Molecular biology of chronic myelogenous leukemia.* Seminars in Hematology 25 : 35-49.

Dyck J.A., Maul G.G., Miller W.H., Chen J.D., Kakizuka A. y Evans R.M. (1994). *A novel macromolecular structure is a target of the promyelocyte-retinoic acid receptor oncoprotein.* Cell 76 : 333-343.

Ellisen L.W., Bird J., West D.C., Soreng A.L., Reynolds T.C., Smith S.D. y Sklar J. (1991). *TAN-1, the human homolog of the Drosophila Notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms.* Cell 66 : 649.

Erikson J., Williams D.L., Finan J., Nowell P.C. y Croce C.M. (1985). *Locus of the α-chain of the T-cell receptor is split by chromosome translocation in T-cell leukemias.* Science 229 : 784.

Erikson J., Finger L., Sun L., Ar-Rushdi A., Nishikura K., Minowada J., Finan J., Emanuel B.S., Nowell P.C. y Croce C.M. (1986). *Deregulation of c-myc by*

translocation of the α-locus of T-cell receptor in T-cell leukemias. Science 232 : 884.

Escudier S.M., Pereira-Leahy J.M., Drach J.W., Weier H.U., Goodacre A.M., Cork M.A., Trujillo J.M., Keating M.J. y Andreeff M. (1993). *Fluorescent in situ hybridization and citogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia.* Blood 81 : 2702-2707.

Fearon E.R., Cho K.R., Nigro J.M., Kern S.E., Simons J.W., Ruppert J.M., Hamilton S.R., Presinger A.C., Thomas G., Kinzler K.W. y Vogelstein B. (1990). *Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancer.* Science 247 : 49.

Feinstein E., Cimino G., Gale R.P., Alimena G., Berthier R., Kishi K., Goldman J., Zaccaria A., Berrebi A. y Canaani E. (1991). *p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 6293-6297.

Ferguson B.Q. y Yang D.C. (1986). *Localization of noncovalently bound ethidium in free and methionyl-tRNA synthetase bound $tRNA^{fMet}$ by singlet-singlet energy transfer.* Biochemistry 25 : 5298-5304.

Finger L.R., Kagan J., Christopher G., Kurtzberg J., Hershfield M.S., Nowell P.C. y Croce C.M. (1989). *Involvement of the Tcl5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 5039.

Finlay C.A., Hinds P.W. y Levine A.J. (1989). *The p53*

proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. Cell 57 : 1083.

Fletcher J.A., Kimball V.M., Lynch E., Donnelly M., Pavelka K., Gelber R.D., Tantravahi R. y Sallan S.E. (1989). *Prognostic implications of cytogenetic studies in an intensively treated group of children with acute lymphoblastic leukemia*. Blood 74 : 2130-2135.

Fletcher J.A., Lynch E.A., Kimball V.M., Donnelly M., Tantravahi R. y Sallan S.E. (1991). *Translocation (9;22) is associated with extremely poor prognosis in intensively treated children with acute lymphoblastic leukemia*. Blood 77 : 435.

Ford A.M., Ridge S.A., Cabrera M.E., Mahmoud H., Steel C.M., Chan L.C. y Greaves M. (1993). *In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias*. Nature 363 : 358-360.

Foti A., Ahuja H.G., Allen S.L., Koduru P., Schuster M.W., Schulman P., Bar-Eli M. y Cline M.J. (1991). *Correlation between molecular and clinical events in the evolution of chronic myelocytic leukemia to blast crisis*. Blood 77 : 2441-2444.

Goddard A.D., Borrow J., Freemont P.S. y Solomon E. (1991). *Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukemia*. Science 254 : 1371-1374.

Golde D.W. y Champlin R.E. (1985). *Chronic myelogenous leukemia : Recent advances*. Blood 65 : 1039.

Golub T.R., Barker G.F., Lovett M. y Gilliland D.G. (1994). *Fusion of PDGF receptor β to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12).* Cell 77 : 307-316.

Greenberg B.R., Wilson F.D., Woo L. y Jenks H.M. (1978). *Cytogenetic of fibroblastic colonies in Ph'-positive chronic myelogenous leukemia.* Blood 51 : 1039.

Grignani F., Ferrucci P.F., Testa U., Talamo G., Fagioli M., Alcalay M., Mencarelli A., Peschle C., Nicoletti I. y Pelicci P.G. (1993). *The acute promyelocytic leukemia-specific PML-RARα fusion protein inhibits differentiation and promotes survival of myeloid precursor cells.* Cell 74 : 423-431.

Gu Y., Nakamura T., Alder H., Prasad R., Canaani O., Cimino G., Croce C.M. y 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.

Gu Y., Alder H., Nakamura T., Schichman S.A., Prasad R., Canaani O., Saito H., Croce C.M. y Canaani E. (1994). *Sequence analysis of the breakpoint cluster region in the ALL-1 gene involved in acute leukemia.* Cancer Research 54 : 2327-2330.

Gyger M., Bonny Y. y Forest L. (1982). *Childhood monosomy 7 syndrome.* Am. J. Hematol. 13 : 329-334.

Hagemeijer A., Hählen K., Sizoo W. y Abels J. (1982). *Translocation (9;11)(p21;q23) in three cases of acute*

monoblastic leukemia. Cancer Genet. Cytogenet. 5 : 95-105.

Hagemeijer A., Bartram C.R., Smit E.M., Van Agthoven A.J. y Bootsma D. (1984). *Is the chromosomal region 9q34 always involved in variants of the Ph' translocation?*. Cancer Genet. Cytogenet. 13 : 1-16.

Hardin C.C., Walker T. y Tinoco I. (1988). *Binding of ethidium ion to left-handed Z-RNA induces a cooperative transition to right-handed RNA at the intercalation site*. Biochemistry 27 : 4178-4184.

Hatano M., Roberts C.W., Minden M., Crist W.M. y Korsmeyer S.J. (1991). *Deregulation of a homeobox gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia*. Science 253 : 79-82.

Heim S. y Mitelman F. (1987). *Cancer Cytogenetics*. Alan R. Liss Inc., U.S.A.

Heisterkamp N., Jenkins R., Thibodeau S. y Testa J.R. (1989). *The bcr gene in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia*. Blood 73 : 1307.

Ikeuchi T. y Sasaki M. (1979). *Accumulation of early mitotic cells in ethidium bromide-treated human lymphocyte cultures*. Proc. Jpn. Acad. 55 : 15.

Inokuchi K., Inoue T. y Tojo A. (1991). *A possible correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet count in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia*. Blood 78 : 3125.

Ishihara T., Minamihisamatsu M. y Tosuji H. (1985). *Chromosome 9 in variant Ph' translocations.* Cancer Genet. Cytogenet. 14 : 183-184.

ISCN (1991). *Guidelines for Cancer Cytogenetics. Supplement to An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* F. Mitelman (ed): S. Karger. Basel.

Janssen J.W., Buschel M. y Layton M. (1989). *Clonal analisys of myelodysplastic syndromes : Evidence of multipotent stemm cell origin.* Blood 73 : 248-254.

Jaramillo J. (1983). *Los problemas de la salud en Costa Rica. Politicas y estrategias.* Ministerio de Salud. San José. Costa Rica.

Johansson B., Mertens F. y Mitelman F. (1991). *Geographic heterogeneity of neoplasia-associated chromosomes aberrations.* Genes. Chromosomes & Cancer. 3 : 1-7.

Juliusson G., Robert K.H., Ost A., Friberg K., Biberfeld P., Nilsson B., Zech L. y Gahrton G. (1985). *Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma.* Blood 65 : 134-141.

Juliusson G., Oscier D.G., Fitchett M., Ross F.M., Phil D., Stockdill G., Mackie M.J., Parker A.C., Castoldi G.L., Cuneo A., Knuutila S., Elonen E. y Gahrton G. (1990). *Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal*

abnormalities. N. Engl. J. Med. 323 : 720-724.

Kakizuka A., Miller W.H., Umesono K., Warrell R.P., Frankel S.R., Murty V., Dmitrovsky E. y Evans R.M. (1991). *Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARα with a novel putative transcription factor PML*. Cell 66 : 663-674.

Kaneko Y., Maseky N., Takasaki N., Sakurai M. y Kawai K. (1985). *Possible association of a new translocation, t(7;11)(p15;p15), with Ph' chromosome-negative chronic myelogenous leukemia*. Int. J. Cancer 36 : 657-659.

Kaneko Y., Maseki N., Takasaki N., Sakurai M., Hayashi Y., Nakazawa S., Mori T., Takeda T., Shikani T. y Hiyoshi Y. (1987). *Clinical and hematological characteristics in acute leukemia with 11q23 translocations*. Blood 67 : 484.

Kaneko Y., Maseki N., Homma C., Sakurai M., Mizutani S., Takeda T., Shikano T., Fujimoto T., Yaoi K. y Shimokawa T. (1988). *Chromosome translocations involving band 7q35 or 7p15 in childhood T-cell leukemia/lymphoma*. Blood 72 : 534.

Kantarjian H.M., Kurzrock R. y Talpaz M. (1990). *Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia and chronic myelomonocytic leukemia*. Hemtol. Oncol. Clin. North Am. 4 : 405.

Kantarjian H.M., Deisseroth A., Kurzrock R., Estrov Z. y Talpaz M. (1993). *Chronic Myelogenous leukemia : A concise update*. Blood 82 : 691-703.

Kelman Z., Prokocimer M., Peller S., Kahn Y., Rechavi G., Manor Y., Cohen A. y Rotter V. (1989). *Rearrangements in the p53 gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia*. Blood 74 : 2318-2324.

Kennedy M.A., Gonzalez-Sarmiento R., Kees U.R., Lampert F., Dear N., Boehm T. y Rabbitts T.H. (1991). *HOX11, a homeobox-containing T-cell oncogene on human chromosome 10q24*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 8900.

Knuutila S., Elonen E., Teerenhovi L., Rossi L., Leskinen R., Bloomfield C.D. y de la Chapelle A. (1986). *Trisomy 12 in B cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia*. N. Engl. J. Med. 314 : 865-869.

Kobayashi H., Espinosa III R., Gill H.J., Fernald A.A., Diaz M.O., Le Beau M.M. y Rowley J.D. (1993). *Heterogeneity of breakpoints of 11q23 rearrangements in hematologic malignancies identified with fluorescence in situ hybridization*. Blood 82 : 547-551.

Koken H.M., Puvion-Dutilleul F., Guillemin M.C., Viron A., Linares-Cruz G., Stuurman N., de Jong L., Szostecki C., Calvo F., Chomienne C., Degos L., Puvion E. y de The H. (1994). *The t(15;17) translocation alters a nuclear body in a retinoic acid-reversible fashion*. The EMBO J. 13 : 1073-1083.

Lambert B. y Le Pecq J.B. (1984). *Effect of mutation, electric membrane potential, and metabolic inhibitors on the accessibility of nucleic acids to ethidium bromide in Escherichia coli cells*. Biochemistry 23 : 166-176.

Larson R.A., Kondo K., Vardiman J.W., Butler A.E., Golomb H.M. y Rowley J.D. (1984). *Evidence for a 15;17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia.* Am. J. Med. 76 : 827-841.

Lawrence H.J., Brudy V.C. y Magenis R.E. (1987). *Cytogenetic evidence for involvement of B-lymphocytes in acquired idiophatic sideroblastic anemias.* Blood 70: 1003- 1005.

Le Beau M.M., Larson R.A., Bitter M.A., Vardiman J.W., Golomb H.M. y Rowley J.D. (1983). *Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia.* N. Engl. J. Med. 309 : 630-636.

Le Beau M.M., Albain K.S., Larson R.A., Vardiman J.W., Davis E.M., Blough R.R., Golomb H.M. y Rowley J.D. (1986). *Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia : Further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes N° 5 and 7.* J. Clin. Oncol. 4 : 325-345.

Le Beau M.M., Espinosa III R., Newman W.L., Stock W., Roulston D., Larson R.A., Keinanen M. y Westbrook C.A. (1993). *Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 5484-5488.

List A.F. y Jacobs A. (1992). *Biology and pathogenesis of the myelodysplastic syndromes.* Seminars in Oncology

19 : 14-24.

Liu Y., Szekely L., Grander D., Soderhall S., Juliusson G., Gahrton G., Linder S. y Einhorn S. (1993). *Chronic lymphocytic leukemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 8697-8701.

Liu E., Hielle B. y Bishop J.M. (1988). *Transforming genes in chronic myelogenous leukemia.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 1952-1956.

Lugo T.G., Pendergast A.M., Muller A.J. y Witte O.N. (1990). *Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.* Science 247 : 1079-1082.

Macgregor R.B., Clegg R.M. y Jovin T.M. (1985). *Pressure-jump study of the kinetics of ethidium bromide to DNA.* Biochemistry 24 : 5503-5510.

MacKeithan T.W., Warshawsky L., Espinosa III R. y Le Beau M.M. (1993). *Molecular cloning of the breakpoints of a complex Philadelpia chromosome translocation.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 4923-4927.

Malinen T., Palotie A., Pakkala S., Peltonen L., Ruutu T. y Jansson S.E. (1991). *Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation.* Blood 77 : 2435-2440.

McMurray C.T. y van Holde K.E. (1991). *Binding of ethidium to the nucleosome core particle. 1. Binding and*

dissociation reactions. Biochemistry 30 : 5631-5643.

Mellentin J.D., Smith S.D. y Cleary M.L. (1989). *Lyl-1. a novel gene altered by chromosomal translocation in T cell leukemia. codes for a protein with a helix-loop-helix DNA binding motif*. Cell 58 : 77.

Michael P.M., Garson O.M., Ekert H., Tauro G., Kennie G.C. y Pilkington G.R. (1988). *A prospective study of childhood acute lymphoblastic leukaemia : Hematologic, immunological and cytogenetic correlations*. Medical and Pediatric Oncology 16 : 153-161.

Miller J.B., Testa J.R., Lindgren V. y Rowley J.D. (1985). *The pattern and clinical significance of karyotypic abnormalities in patients with idiophatic and postpolycythemic myelofibrosis*. Cancer 55 : 582-591.

Mills K.I., MacKenzie E.D. y Birnie G.D. (1988). *The site of breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients*. Blood 72: 1237.

Mills K.I. y Birnie G.D. (1991). *Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia?. An analytical comparison of current literature*. Blood 78 : 1155.

Misawa S., Hogge D.E., Oguma N., Wiernik P.H. y Testa J.R. (1986). *Detection of clonal karyotypic abnormalities in most patients with acute nonlymphocytic leukemia examined using short-term culture techniques*. Cancer Genet. Cytogenet. 22 : 239-251.

Mitelman F. (1986). *Geographic heterogeneity of chromosome aberrations in hematologic disorders.* Cancer Genet. Cytogenet. 20 : 203-208.

Mitelman F. (1991). *Catalog of chromosome aberrations in cancer.* Liss. 4a edicion. New York.

Morris C.M., Reeve A.E., Fitzgerald P.H., Hollings P.E., Beard M.E. y Heaton D.C. (1986). *Genomic diversity correlates with clinical variation in Ph¹-negative chronic myeloid leukaemia.* Nature 320 : 281-283.

Morrison-De Lap S.J., Kuttel D.G., Dewald G.W. y Letendre L. (1986). *Unbalanced 1;7 translocation and therapy-induced hematologic disorders : A possible relationship.* Am. J. Hematol. 21 : 39-47.

Nakamura Y., Hirosawa S. y Aoki N. (1993a). *Consistent involvement of the 3' half part of the first BCR intron in adult Phildelphia-positive leukaemia without M-bcr rearrangement.* Br. J. Haematol. 83 : 53-57.

Nakamura T., Alder H., Gu Y., Prasad R., Canaani O., Kamada N., Gale R.P., Lange B., Crist W.M., Nowell P.C., Croce C.M. y Canaani E. (1993b). *Genes on chromosomes 4, 9, and 19 involved in 11q23 abnormalities in acute leukemia share sequence homology.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 4631-4635.

Nelkin B.D., Przepiorka D., Burke P.J., Thomas E.D. y Baylin S.B. (1991). *Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia.* Blood 77 : 2431-2434.

Nowell P.C., Besa E.C., Stelmach T. y Finan J.B. (1986). *Chromosomes studies in preleukemic states. Prognostic significance of single versus multiple abnormalities.* Cancer 58 : 2571-2575.

Paquette R.L., Landaw E.M., Pierre R.V., Kanan J., Lubbert M., Lazcano O., Isaac G., McCormick F. y Koeffler H.P. (1993). *N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome.* Blood 82 : 590-599.

Parry P., Djabali M., Bower M., Khristich J., Waterman M., Gibbons B., Young B.D. y Evans G. (1993). *Structure and expression of the human trithorax-like gene Htrx-1 involved in acute leukemias.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 : 4738-4742.

Pedersen-Bjergaard J. y Philip P. (1987). *Cytogenetic characteristics of therapy-related acute nonlymphocytic leukaemia, preleukaemia and acute myeloproliferative syndrome : Correlation with clinical data for 61 consecutive cases.* Bri. J. Haematol. 66 : 199-208.

Pittman S. y Catovsky D. (1984). *Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia.* Bri. J. Haematol. 58 : 649-660.

Porfiri E., Secker-Walker L.M., Hoffbrand A.V. y Hancock J.F. (1993). *DCC tumor suppressor gene is inactived in hematologic malignancies showing monosomy 18.* Blood 81 : 2696-2701.

Prigogina E.L., Fleischman E.W., Puchkova G.P., Mayakova

S.A., Volkova M.A., Protasova A.K. y Frenkel M.A. (1986). *Chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia.* Hum. Genet. 73 : 137-146.

Prigogina E.L., Puchkova G.P. y Mayakova S.A. (1988). *Nonrandom chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia of childhood.* Cancer Genet. Cytogenet. 32 : 183.

Primer Grupo de Estudio Cooperativo MIC (1986). *Morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukaemias.* Cancer Genet. Cytogenet. 23 : 189-197.

Pui C.H., Raimondi S., Murphy S.B., Ribeiro R., Kalwinsky D.K., Dahl G.V., Crist W.M. t Williams D.L. (1987). *An analysis of leukemic cell chromosomal features in infants.* Blood 69 : 1289.

Pui C.H., Carroll A.J., Raimondi S.C., Land V.J., Crist W.M.,Shuster J.J., Williams D.L., Pullen D.J., Borowitz M.J., Behm F.G. y Look A.T. (1990). *Clinical presentation, karyiotypic characterization, and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid <45 line.* Blood 75 : 1170-1177.

Que T.H., Marco J.G., Ellis J., Matutes E., Babapulle V.B., Boyle S. y Catovsky D. (1993). *Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia detected by fucrescence in situ hybridization : Analysis by stage, immunophenotype, and morphology.* Blood 82 : 571-575.

Rabbitts T.H., Forster A., Hamlyn P. y Baer R. (1984). *Effect of somatic mutation within translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma*. Nature 309 : 592.

Rabbitts T.H. (1991). *Translocations, master genes and differences between the origins of acute and chronic leukemias*. Cell 67 : 641-644.

Raimondi S.C., Behm F.G., Roberson P.K., Pui C.H., Rivera G.K., Murphy S.B. y Williams D.L. (1988). *Cytogenetics of childhood T-cell leukemia*. Blood 72 : 1560.

Raimondi S.C. (1993). *Current status of cytogenetic research in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 89 : 2237-2251.

Rege-Cambrin G., Mecucci C., Tricot G., Michaux J.L., Louwagie A., Van Hove W., Francart H. y Van Den Berghe H. (1987). *A chromosomal profile of polycythemia vera*. Cancer Genet. Cytogenet. 25 : 233-245.

Ribeiro R.C., Abromowitch M., Raimondi S.C., Murphy S.B., Behm F. y Williams D.L. (1987). *Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 70 : 948.

Ribeiro R.C., Raimondi S.C., Behm F.G., Cherrie J., Crist W.M. y Pui C.H. (1991). *Clinical and biologic features of childhood T-cell leukemia with the t(11;14)*. Blood 78 : 466.

Rowley J.D. (1973). *A new consistent chromosomal*

abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature 243 : 290-293.

Rowley J.D. y Testa J.R. (1983). *Chromsome abnormalities in malignant hematologic diseases.* Adv. Cancer Res. 36 : 103-148.

Rubin C.M., Carrino J.J., Dickler M.N., Leibowitz D., Smith S.D. y Westbrook C.A. (1988). *Heterogeneity of genomic fusion of BCR and ABL in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 2795-2799.

Sadamori N., Han T., Minowada J. y Sandberg A.A. (1984). *Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. LII. Chromosome findings in treated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia.* Cancer Genet. Cytogenet. 11 : 161-168.

Sadamori N., Nishino K., Moriuchi Y., Itoyama T., Nakamura H., Sasagawa I., Tokunaga S., Kawachi T. e Ikeda S. (1992). *Karyotypic evolution in a patient with a preleukemic state of adult T-cell leukemia (pre-ATL) progressing to overt ATL.* Leukemia and Lymphoma 6 : 177-181.

Sanchez-Garcia I., Kaneko Y., Gonzalez-Sarmiento R., Campbell K., White L., Boehm T. y Rabbitts T.H. (1991). *A study of chromosome 11p13 translocations involving TCR-B and TCR-S in human T cell leukemia.* Oncogene 6 : 577.

Sandberg A.A., Morgan R., Hecht B.K. y Hecht F. (1985). *Translocation (1;17)(p11;p11) : A new myeloproliferative hematologic entity.* Cancer Genet. Cytogenet. 18 : 199-206.

Sawyers C.L., Denny C.T. y Witte O.N. (1991). *Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis.* Cell 64 : 337-350.

Sawyers C.L. y Denny C. (1994). *Chronic myelomonocytic leukemia : Tel-a-kinase what Ets all about.* Cell 77 : 171-173.

Schaefer-Rego K., Dudek H., Popenoe D., Arlin Z., Mears J.G., Bank A. y Leibowitz D. (1987). *CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specif region of the BCR.* Blood 70 : 448.

Seabright M. (1971). *A rapid banding technique for human chromosomes.* Lancet 2 : 971-972.

Secker-Walker L.M., Chessells J.M., Stewart E.L., Swansbury G.J., Richards S. y Lawler S. (1989). *Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukaemia : A long-term follow-up.* Bri. J. Haematol. 72 : 336-342.

Sedkov Y., Tillib S., Mizrokhi L. y Mazo A. (1994). *The bithorax complex is regulated by trithorax earlier during Drosophila embryogenesis than is the Antennapedia cpmplex, correlating with a bithorax-like expression pattern of distinct early trithorax transcripts.* Development 120 : 1907-1917.

Sheer D., Lister T.A., Amess J. y Solomon E. (1985). *Incidence of the 15q+; 17q- chromosome translocation in acute promyelocytic leukemia (APL).* Br. J. Cancer 52 : 55-58.

Sierra R. y Barrantes R. (1986). *Cancer, mortalidad e incidencia en Costa Rica.* Bol. Of. Sanit. Panam. 101 : 124-133.

Sierra R., Barrantes R., Muñoz-Leiva G., Parkin D.M., Bieber C.A. y Muñoz-Calero N. (1988). *Cancer in Costa Rica.* International Agency for Research on Cancer. Lyon. Francia.

Smadja N., Krulik M., De Gramont A., Audebert A.A. y Debray J. (1985). *Translocation 1;7 in preleukemic states.* Cancer Genet. Cytogenet. 18 : 189-192.

Smadja N., Krulik M., De Gramont A., Sirinelli A., Brissaud P., Dray C., Audebert A.A. y Debray J. (1987). *Cytogenetic studies in twelve patients with primary myelofibrosis and myeloid metaplasia.* Cancer Genet. Cytogenet. 24 : 151-158.

Sparkes R.S., Murphree A.L., Lingua R.W., Sparkes M.C., Field L.L., Funderburk S.J. y Benedict W.F. (1983). *Gene for hereditary retinoblastoma assigned to human chromosome 13 by linkage to esterase D.* Science 219 : 971-973.

Stone R.M. y Mayer R.J. (1990). *The unique aspects of acute promyelocytic leukemia.* J. Clin. Oncol. 8 : 1913-1921.

Suryanarayan K., Hunger S.P., Kohler S., Carroll A.J., Crist W., Link M.P. y Cleary M.L. (1991). *Consistent involvement of the BCR gene by 9:22 breakpoints in pediatric acute leukemias.* Blood 77 : 324-330.

Swirsky D.M., Li Y.S., Matthews J.G., Flemans R.J., Rees J.K. y Hayhoe F.G. (1984). *8:21 translocation in acute granulocytic leukaemia : Cytological, cytochemical and clinical features.* Bri. J. Haematol. 56 : 199-213.

Tefferi A., Thibodeau S.N. y Solberg L.A. (1990). *Clonal studies usin X-linked restriction fragment length polymorphisms.* Blood 75 : 1770-1773.

Thirman M.J., Gill H.J., Burnett R.C., Mbangkollo D., McCabe N.R., Kobayashi H., van der Poel S.Z., Kaneko Y., Morgan R., Sandberg A.A., Chaganti R.S., Larson R.A., Le Beau M.M., Díaz M.O. y Rowley J.D. (1993). *Rearrangement of the MLL gene in acute lymphocytic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations.* N. Engl. J. Med. 329 : 909-914.

Tkachuk D.C., Kohler S. y Cleary M.L. (1992). *Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias.* Cell 71 : 691-700.

Tycko B., Smith S.D. y Sklar J. (1991). *Chromosomal translocations joining LCK and TCR-B loci in human T cell leukemia.* J. Exp. Med. 174 : 867.

van der Plas D.C., Hermans A.B., Soekarman D., Smit E.M., de Klein A., Smadja N., Alimena G., Goudsmit R.,

Grosveld G. y Hagemeijer A. (1989). *Cytogenetic and molecular analysis in Philadelphia negative CML.* Blood 73 : 1038-1044.

van der Poel Z., McCabe N.R. y Gill H.J. (1991). *Identification of a gene, MLL, that spans the breakpoint in 11q23 translocations associated with human leukemias.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 10735-10739.

Walker G.T., Stone M.P. y Krugh T.R. (1985). *Ethidium binding to left-handed (Z) DNAs results in regions of right-handed DNA at the intercalation site.* Biochemistry 24 : 7462-7471.

Wang W.C., Dow L.W., Presbury G.J., Sato Y., Wu J., Williams D.L., Harris A. y Nash M. (1985). *Serial cell culture and cytogenetic studies of marrow cells from a patient with monosomy 7 syndrome.* The American Journal of Pediatric Hematology/Oncology 7 : 321-326.

Weide R., Parviz B., Peluger K.H. y Havemann K. (1993). *Altered expression of the human retinoblastoma gene in monocytic leukaemias.* Br. J. Haematol. 83 : 428-432.

Weis K., Rambaud S., Lavau C., Janssen J., Carvalho T., Carmo-Fonseca M., Lamond A. y Dejean A. (1994). *Retinoic acid regulates aberrant nuclear localization of PML-RARα in acute promyelocytic leukemia cells.* Cell 76 : 345-356.

Williams D.L., Tsiatis A., Brodeur G.M., Look A.T. y Melvin S.L. (1982). *Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute*

lymphoblastic leukemia. Blood 60 : 865-871.

Williams D.L., Harris A., Williams K.J., Brosius M.J. y Lemonds W. (1984). *A direct bone marrow chromosome technique for acute lymphoblastic leukemia*. Cancer Genet. Cytogenet. 13 : 239.

Williams D.L., Harber J., Murphy S.B., Look A.T., Kalwinsky D.K., Rivera G., Melvin S.L., Stass S. y Dahl G.V. (1986). *Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia*. Blood 68 : 205-212.

Willman (1993). *Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia*. Science 259 : 968-971.

Xia Y., Brown L., Ying-Chuan C., Tsan J.T., Siciliano M.J., Espinosa III R., Le Beau M.M. y Baer R.J. (1991). *TAL2, a helix-loop-helix gene activated by the (7;9)(q34;q32) translocation in human T-cell leukemia*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 11416-11420

Yunis J.J. (1976). *High resolution of human chromosomes*. Science 191 : 1268-1270.

Yunis J.J. (1981). *New chromosome techniques in the study of human neoplasia*. Human Pathology 12 : 540-549.

Zutter M., Hockett R.D., Roberts C.W., McGuire E.A., Bloomstone J., Morton C.C., Deaven L.L., Crist W.M., Carroll A.J. y Korsmeyer S.J. (1990). *The t(10;14)(q24;q11) of T-cell acute lymphoblastic leukemia*

juxtaposes the δ T-cell receptor with TCL3. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 3161-3165.