



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"CUAUTITLAN"**

**"ESTUDIO CROMOSOMICO EN PACIENTES
CON LEUCEMIA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

LUCIA PATRICIA GOMEZ BASURTO

DIRECTORA: DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO



V. N. A. M.

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	Págs.
ABREVIATURAS	
RESUMEN	1
CAPITULO I INTRODUCCION	2
CAPITULO II ANTECEDENTES	4
2.1 Definición de leucemia	4
2.2 Antecedentes históricos	4
2.3 Hematopoyesis de la célula leucémica	9
2.4 Clasificación de las leucemias	13
2.4.1 Leucemias agudas	13
2.4.2 Leucemias crónicas	21
2.5 Etiología de las leucemias	25
2.5.1 Origen monoclonal de la leucemia	25
2.5.2 Factores físicos	26
2.5.3 Factores químicos	31
2.5.4 Factores biológicos	36
2.5.5 Factores genéticos	44

2.6	Hallazgos citogenéticos en leucemia informados en la literatura	56
2.6.1	Metodología y nomenclatura generales	56
2.6.2	Leucemia granulocítica crónica	58
2.6.3	Leucemia no linfocítica aguda	72
2.6.4	Leucemia linfoblástica aguda	90
2.6.5	Leucemia linfocítica crónica	99
CAPITULO III OBJETIVOS		104
CAPITULO IV MATERIAL Y METODOS		105
4.1	Material biológico	105
4.2	Métodos	105
4.2.1	Método directo para obtención del cariotipo de médula ósea	106
4.2.2	Bandas G	108
4.2.3	Bandas C	109
CAPITULO V RESULTADOS		109
CAPITULO VI DISCUSION		112
CAPITULO VII CONCLUSIONES		122
BIBLIOGRAFIA		123

ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
FAB	Grupo cooperativo Franco-Americano-Britanico
TICL	Taller internacional para el estudio de cromosomas en leucemia
LA	Leucemia aguda
LC	Leucemia cronica
LGC	Leucemia granulocitica cronica
LMC	Leucemia mielocitica cronica
LLC	Leucemia linfocitica cronica
LLA	Leucemia linfoblastica aguda
LNLA	Leucemia no linfocitica aguda
LMA	Leucemia mieloblastica aguda
LMMA	Leucemia mielomonocitica aguda
LMMAc	Leucemia mielomonocitica cronica
LLA-T	Leucemia/linfoma adulta de celulas T
LAT	Leucemia adulta de celulas T
G6PD	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa
LTR	Terminaciones largas terminales
VLHT	Virus linfotropico humano de celulas T
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad
onc-v	oncogen viral
onc-c	oncogen celular
fra-c	Sitio fragil constitutivo
fra-h	Sitio fragil heredable
FdU	Fluordesoxiuridina
TdT	Desoxinucleotidil transferasa terminal
Ig	Inmunoglobulinas

R E S U M E N

En el presente trabajo se discute la importancia de las alteraciones cromosómicas en células de médula ósea de pacientes con leucemia de las que se ha demostrado su naturaleza no aleatoria, su valor diagnóstico, pronóstico y en la elección del tratamiento. Esto permitió revisar los aspectos básicos y clínicos de las leucemias como son: su definición, clasificación, etiología y principales hallazgos citogenéticos. En el aspecto práctico, fué realizado el análisis citogenético en 13 de 30 muestras de médula ósea procesadas, correspondientes a pacientes con posible leucemia, en el Hospital Gral. de Méx. S.Sa. Mediante las técnicas de bandas G y C se observaron anomalías cromosómicas asociadas con el tipo y fase de la leucemia siendo las principales: cromosoma Filadelfia (translocación(9;22)), trisomía 8, isocromosoma (17q) y con menor frecuencia monosomía 7, tetrasomía 8, der(9) t(9;22), trisomías 10, 13, 18, 19, 21, 22 y las translocaciones (5;8) y (15;17). Estos resultados fueron correlacionados con el tiempo de sobrevida, edad y sexo de cada paciente. Se concluye que los resultados obtenidos son susceptibles de mejorar, combinando la técnica empleada con otras de cultivo de 24 a 72 hrs y 15 días así como la metodología de alta resolución. Los resultados citogenéticos ayudan al diagnóstico pero no son definitivos. El tiempo de sobrevida de los pacientes fué inferior al informado probablemente debido a diferencias en las condiciones socio-económicas de los pacientes de este estudio con respecto a los de la literatura, así como la limitación en recursos de la institución para la elección de la terapia adecuada.

CAPITULO I.- I N T R O D U C C I O N

"La humanidad nunca dejará de explorar y al final de esta exploración arribará donde comenzó y reconocerá el lugar de la primera vez".

Eliot, T. S., 1952. The four quarters.

El conocimiento acerca de las causas del cáncer ha avanzado a través de largos y lentos periodos de investigación. A principios de este siglo, el biólogo alemán Boveri sugirió que las alteraciones de los cromosomas eran la clave del cáncer (5) y casi al mismo tiempo se postuló el efecto neoplásico que ejercen los virus al descubrirse el virus del sarcoma de Rous en pollos y el del papiloma de conejo (1). En los años treinta, se demostró la acción carcinogénica de ciertas sustancias químicas y en los cincuentas, nuevamente los virus tumorales se consideraron como los factores responsables del cáncer. La popularidad de los virus declinó abruptamente en pocos tiempo, para ser reemplazada, una vez más, por la acción de los agentes ambientales como causa de los tumores comunes en humanos (6B). Sin embargo, recientemente la atención se ha enfocado otra vez a las aberraciones cromosómicas que implican la manifestación de sitios frágiles y/o activación de proto-oncogenes. A su vez, el material genético puede ser el blanco de los diferentes agentes etiológicos previamente sugeridos (26).

A partir del establecimiento del número correcto de cromosomas en el hombre en el año de 1956, se inicia una etapa de gran trascendencia en la medicina y particularmente en la

genética. Durante este periodo se describen un gran número de enfermedades asociadas con anomalías cromosómicas y se desarrollan técnicas citogenéticas que permiten estudiar diferentes tipos de tumores y leucemias. Actualmente el análisis cromosómico en esta patología constituye una disciplina bien establecida (23).

Se han hecho múltiples investigaciones en leucemias debido a que es relativamente sencillo obtener y procesar muestras de los tejidos que afectan sangre y médula ósea. Además se ha comprobado que los resultados obtenidos, pueden extrapolarse con otros tipos de cáncer. De esta manera, mediante la aplicación de diversas técnicas de bandedo cromosómico, se ha podido confirmar que los cambios en las células tumorales no son aleatorios, ya que las alteraciones citogenéticas en las leucemias tienen importancia pronóstica y diagnóstica y pueden proveer claves en cuanto a sitios específicos significativos en el mecanismo de la leucemogénesis en particular o de la carcinogénesis en general. Para la interpretación de estos resultados ha sido necesario complementar la citogenética con la biología molecular y la ingeniería genética (23,24,26).

Este trabajo tiene la finalidad de revisar los conocimientos que permitan comprender y valorar la importancia de un análisis citogenético en los diferentes tipos de leucemia y principalmente dar a conocer los resultados del estudio que se realizó en muestras de pacientes con probable leucemia leucemia aguda o crónica, en el Hospital General de México SSA durante el periodo septiembre de 1982 a diciembre de 1984.

CAPITULO II.- ANTECEDENTES

2.1 DEFINICION DE LA LEUCEMIA

El término leucemia (sangre blanca) no especifica el sitio básico del proceso patológico, sin embargo se emplea para denominar a un grupo de enfermedades caracterizadas por la proliferación lenta o rápida, generalizada, anormal, neoplásica y autopropagada de uno de los tejidos hematopoyéticos. Estas se asocian con cifras anormales de eritrocitos, granulocitos y plaquetas lo que a su vez conduce a complicaciones severas de la enfermedad como anemia, infección, hemorragia y muerte del paciente (1, 2).

2.2 ANTECEDENTES HISTORICOS

Aunque se ha hecho referencia a los signos y síntomas de la leucemia desde los tiempos de Hipócrates, este padecimiento fué bien definido hasta 1839 en el Hôtel Dieu de Paris al complementarse las observaciones clínicas con exámenes microscópicos de sangre y los estudios post-mortem. La leucemia fué reconocida como una entidad clínica en 1845 por Craigie y Bennett. Simultáneamente Virchow observó que las células involucradas no representaban una supuración de la sangre y propuso el nombre de leucemia ("sangre blanca").

Numerosas investigaciones permitieron paulatinamente identificar diferentes formas de leucemias y ya en la década de los cuarentas el concepto de que las leucemias, al igual que las enfermedades afines, debían separarse de acuerdo a sus bases funcionales, morfológicas y fisiopatológicas, originó una división en dos grandes familias: linfoproliferativas y mieloproliferativas (2). A partir de entonces se incrementaron rápidamente los conocimientos y en la actualidad se continúa intentando identificar y conocer la(s) célula(s) fundamentalmente implicada(s) (célula clonogénica) en los diferentes tipos de leucemia. Esto ha sido mediante el empleo de técnicas histoquímicas, de microscopía electrónica, inmunológicas, citogenéticas y de biología molecular. Se han descrito muchas subcategorías, tanto de leucemia aguda como de leucemia crónica, y se han llevado a cabo numerosos estudios y debates para valorar la importancia de estas distinciones, demostrándose que una buena clasificación es básica para una apropiada comunicación científica. Además, debido a los múltiples avances terapéuticos es fundamental tener índices de pronóstico para una selección más apropiada del tratamiento (1,9).

Por otra parte, desde 1914 Boveri sugirió que las aberraciones cromosómicas podrían ser el evento primario en las neoplasias y anticipó que el cáncer era de origen monoclonal al estudiar mitosis con complementos cromosómicos anormales (3). Sin embargo hasta sesenta años después se fundamentaron dichas

hipótesis. Históricamente el estudio del patrón cromosómico en leucemias humanas se divide en dos periodos.

El primero de 1956 a 1970 iniciado por el establecimiento del número cromosómico en el hombre y por diferentes adelantos técnicos aplicados al estudio citogenético de tumores de animales y posteriormente de células humanas, que permitieron identificar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales (6, 7). En este periodo los patrones cromosómicos variaban grandemente de un paciente a otro y solamente en la leucemia granulocítica crónica (LGC) se encontró un defecto cromosómico constante en un cromosoma del grupo B que se denominó cromosoma Filadelfia (Phi) (1960) (8). Tal anomalía fué encontrada en los precursores de eritrocitos y megacariocitos en médula ósea y en granulocitos en sangre periférica. Estudios subsecuentes de enfermas con LGC Phi-positivo, heterocigotas para el marcador genético glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, ligado al X fundamentaron la hipótesis de que las enfermedades mieloproliferativas, así como muchos otros neoplasmas en el hombre derivan de una sola célula, es decir son de origen clonal o monoclonal (9-13). Otros investigadores han propuesto que la heterogeneidad de tales enfermedades refleja el nivel de diferenciación de las células responsables de los procesos leucémicos (14).

En el segundo periodo de 1970 hasta el presente, se revoluciona la citogenética en cáncer con la introducción de técnicas de bandeado (15-22). Se descubre que aberraciones cromosómicas constantes se asocian con diversos tipos de tumores,

se demuestra que las anomalías cromosómicas se relacionan entre sí en las diferentes células de un tumor y además se comprueba que se presentan cambios cariotípicos durante la progresión tumoral (9,12). Sin embargo, solo en 50% de los enfermos con leucemia no-linfocítica aguda se presentaban alteraciones cromosómicas. Probablemente esto se debe a que las células mitóticas que se analizan con técnicas de bandas estándar están en metafase, es decir, los cromosomas están condensados y solamente exhiben de 150 a 300 bandas por grupo haploide y a menudo la morfología cromosómica es borrosa y pobremente definida. Por esta razón anomalías pequeñas, ya sea por la delección y/o una duplicación de un tercio de banda cromosómica afectando aproximadamente 3×10^8 pares de nucleótidos, serían indetectables (23,24). La aplicación de métodos de cultivo sincronizado para mejorar la producción de células en división y el bandedo de alta resolución de cromosomas elongados (en profase o prometafase, con 320 a 1200 bandas por grupo haploide), han permitido una definición más precisa de los rearrreglos, así como la identificación de aberraciones anteriormente no detectadas. Usando estas técnicas se han demostrado anomalías cromosómicas en aproximadamente el 95% de pacientes con leucemia aguda (9,25-28). La interpretación de estos descubrimientos avanza gracias a la aplicación de otras técnicas como es el caso de la localización de sitios frágiles cromosómicos expresados cuando las células son cultivadas en medios deficientes en ácido fólico y timidina o por exposición a cafeína (26). El empleo de técnicas como las de transducción, mutagénesis insercional y procedimientos de transferencia de genes y ADN recombinante han permitido el

descubrimiento y la localización de oncogenes celulares (9,24).

Sin embargo, aún se desconocen muchos aspectos de la función que tienen las anomalías cromosómicas en la etiología de las enfermedades mielo y linfoproliferativas y otras similares pero el consenso general apoya la hipótesis de que tienen una relación básica con el origen y evolución de la enfermedad (29). Además, la posibilidad de que el daño cromosómico producido por la exposición a radiación, drogas y otros agentes químicos aumente la frecuencia de leucemia, provoca inquietud desde el punto de vista etiológico y epidemiológico (3,30,31).

2.3 HEMATOPOYESIS DE LA CELULA LEUCEMICA

Conocer la estructura del linaje celular normal y el programa de diferenciación de la hematopoyesis normal ha permitido comprender la heterogeneidad de las leucemias además de la probable relación entre cambios moleculares a nivel de ADN y el proceso maligno (1,9). Todas las células blancas y rojas maduras, demarcadas claramente por su morfología y función descienden de la misma población de células madres en la médula ósea en el adulto y del saco vitelino o hígado durante la embriogénesis (9).

Los tejidos formadores de la sangre están ordenados en un linaje jerarquizado con pasos sucesivos de ampliación (en número) y restricción genética (en opciones para diferenciación) (figura 2.1). Se considera a las células fundadoras como células madres por el criterio de que ellas no solamente dan origen a progenie madura sino que pueden mantener su propio número (autorrenovables) casi indefinidamente. Las células madres son heterogéneas en su capacidad para autorrenovarse, sin embargo, existen células maduras que normalmente no se estiman como células madres, pero que pueden tener amplia capacidad para autorrenovarse, habilidad que se manifiesta bajo ciertas circunstancias. Por ejemplo, los linfocitos inunocompetentes maduros pueden sobrevivir (como células mitóticas) por diez años o más y pueden ser mantenidos in vitro por largos periodos de tiempo si se suministra el factor de crecimiento apropiado (interleucina 2) (1,9,32-41).

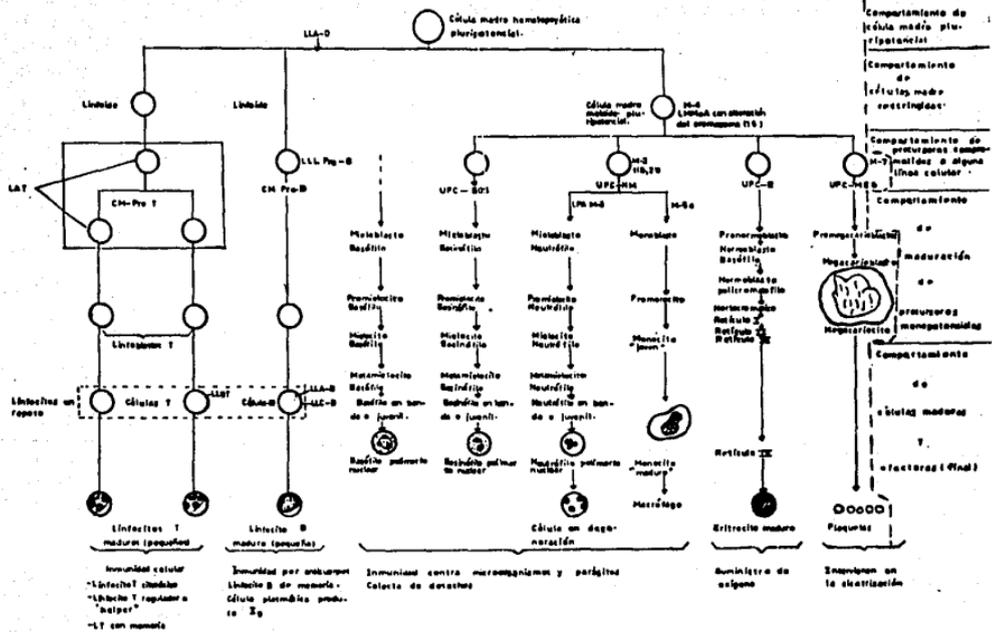


Figura 2.1 Hematopoyesis normal (9,35-37). Linaje y función de las células sanguíneas. CM: Célula madre. UFC: Unidad formadora de colonia. EOS: eosinófilo. NM: Neutrófilo-Monocito. E. eritrocito. MEG: Megacariocito.

La leucemia es una enfermedad en la que las células madre anormales se acumulan en los tejidos hematopoyéticos conduciendo al fracaso de la hematopoyesis normal. Aún cuando se ha sugerido que estas células anormales se replican más rápidamente que las normales, las evidencias experimentales señalan que su replicación es más lenta y que retienen un fenotipo relativamente normal, por ello la hematopoyesis esta significativamente afectada antes de que esté notoriamente aumentado el contenido celular. Se asume que en el surgimiento de la célula anormal o clonogénica más de un evento genético (clonal) está implicado (1,9,32), esta célula madre leucémica debe retener la capacidad para autorrenovarse pero se reduce o pierde la capacidad para diferenciarse. Según el modelo de Sachs (42) el desajuste entre el crecimiento y la diferenciación ocurre por un cambio en la expresión de un gen de crecimiento de inducible a constitutivo, la expresión constitutiva de otros genes (reguladores) puede alterar vías génicas específicas causando un bloqueo en la diferenciación y en consecuencia la progresión de la malignidad.

En otra hipótesis se asume que genes diferentes controlan los programas de autorrenovación y diferenciación de células madre multipotenciales y que en la hematopoyesis normal estos genes probablemente se encuentran acoplados de tal manera que la activación de un gen conduce a la inactivación del otro, mientras que en varias leucemias este mecanismo parecería perderse. De

esta manera se explicaría porque a diferencia del modelo de autorrenovación de las células madres normales, estudios recientes con marcadores de diferenciación distintivos han demostrado que las células leucémicas mantienen su potencial de autorrenovación aún en estadios de madurez avanzada. Además se ha encontrado que células leucémicas simples pueden exhibir expresión de marcadores de diferenciación de diversas líneas (infidelidad de linaje) (46-50).

A la luz de estos conceptos la heterogeneidad de la célula leucémica puede ser atribuida a la población celular blanco, la severidad en la detención de la maduración, y a la expresión de características celulares asociadas con la progresión del padecimiento. La heterogeneidad de la célula leucémica clonogénica es importante en la clínica y para identificar los eventos moleculares que la sustentan (9, 43). La determinación de la célula leucémica predominante puede sugerir pero no necesariamente identificar precisamente la población celular blanco envuelta en los eventos genéticos responsables del inicio de la enfermedad (figura 2.2). Es decir al haber un desajuste parcial entre la proliferación y la maduración ocurre una severa detención en el proceso de maduración de las células clonogénicas y de los compartimientos en donde se acumularán las células que representan la población leucémica dominante. Las células clonogénicas pueden constituir una pequeña proporción de la población leucémica total (0,1-10 por ciento), no obstante son cruciales ya que son responsables del mantenimiento de la enfermedad y de la evolución clonal asociada con la progresión.

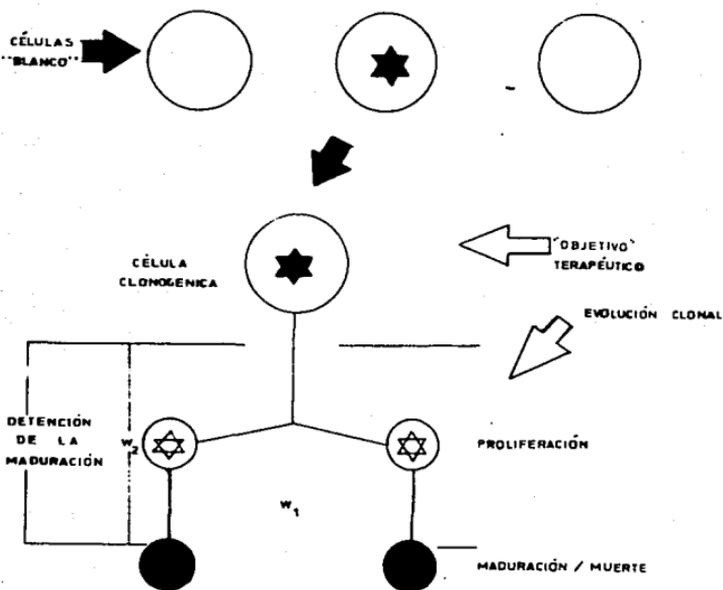
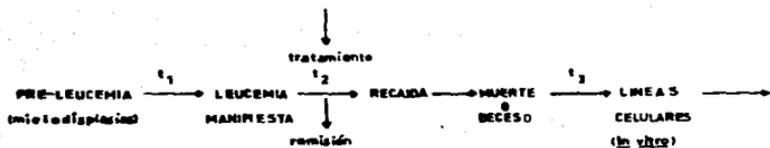


FIGURA 2.2 Modelo simplificado de la leucemogénesis (9). Obsérvese que la célula clave es la célula leucémica clonogénica la cual emerge y asume dominancia a consecuencia de diversos eventos genéticos que afectan a la población "blanco".

Por lo tanto, estas células representan el principal objetivo terapéutico. Dado que la detención de la diferenciación es al azar, la célula leucémica clonogénica puede tener diferentes fenotipos (9,43,51).

Además de la heterogeneidad fenotípica hay que considerar que el mecanismo de la leucemogénesis puede ser en etapas, de esta manera, se considera que una secuencia de eventos genéticos puede ocurrir en un periodo de varios años (figura 2.3) que por ejemplo en la LGC se manifiestan por las diferentes etapas de progresión que presenta la enfermedad, fases crónica y aguda, y sus respectivas características (tabla 2.1). También es importante el grado de desarrollo de las células blanco, situación que probablemente gobierne y restrinja la serie de agentes etiológicos potenciales y las características fenotípicas y clínicas de cualquier leucemia emergente. Así, en LGC, estudios enzimáticos y cromosómicos indican que la célula blanco o clonogénica es una célula madre pluripotencial lo cual justifica que en la fase crónica se encuentren alteradas las líneas celulares linfoides y no linfoides y que en la fase aguda se presente diversidad de fenotipos (9,52).



EVOLUCIÓN CLONAL / SELECCIÓN

FIGURA 2.3 Progresión de la leucemia. t_1 , t_2 , t_3 , intervalos de tiempo variables (9). Ilustra los diferentes eventos que deben ocurrir progresivamente para desacoplar la clona leucémica y esto puede acontecer en un periodo de varios años.

TABLE 2.1 ETAPAS EN LA PATOGENESIS DE LA LDC (9)

Paso	Evento/ marcador	Célula afectada	Consecuencia	Resultado Clínico
1	?	Célula madre pluripotencial	Ventaja clonal y diferen- ciación normal	Proleucemia, displasia mieloide
2	Ph1	Célula madre multipotencial	Predominio clonal + (a) Diferenciación normal (b) Excesiva produc- ción de granulocitos	LDC fase crónica
3	Marcadores cromosómicos adicionales	Célula madre multipotencial o progenio de linaje restringido	Predominio clonal con anomia diferenciación	Crisis o fase blás- tica

2.4 CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS

La primera clasificación de las leucemias probablemente fué la de Virchow en 1957, quien las diferenciaba en: forma esplénica y forma ganglionar (53). Actualmente las leucemias se clasifican según su curso clínico en agudas y crónicas y según el tipo de célula afectada las leucemias agudas se dividen en linfoblásticas y no linfoblásticas (mieloblásticas) y las formas crónicas en linfocíticas y mielocíticas o granulocíticas. Recientemente se ha intentado subdividirlas para tratar de establecer una correlación entre los subgrupos y los hallazgos clínicos, de laboratorio, respuesta al tratamiento y pronóstico (54), los métodos útiles para tal efecto se resumen en la tabla 2.2. De las clasificaciones existentes en este trabajo se emplearán principalmente la del Grupo Cooperativo Franco Americano Británico (FAB) y la inmunológica que son las que más comúnmente se aplican en la actualidad.

2.4.1 Leucemias Agudas

Las leucemias agudas se distinguen por una morfología relativamente indiferenciada de las células blásticas y rápida progresión del padecimiento, sobre todo en la enfermedad no tratada (6,54).

TABLA 2.2 METODOS PARA CARACTERIZAR CELULAS BLASTICAS, UTILES EN LA CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS (9,53-55).

Morfología	Relación núcleo/citoplasma, nucléolos, núcleos, contorno de la membrana nuclear y celular, tamaño de las células, cuerpos de Auer, etc.
Citoquímica	Peroxidasa, sudán negro B, tinción de esterasa acetato naftol-ASD (NASDA), tinción de esterasa con acetato naftol-ASD como sustrato y con inhibición de fluoruro de sodio, fosfatasa ácida, ácido periódico de Schiff (PAS), lisozima, tinción con esterasa cloronaftol acetato-ASD, tinción con esterasa naftil acetato. (FAB).
Citoquímica Ultraestructural	Peroxidasas y fosfatasa ácida.
Inmunológica (marcadores de superficie)	Rosetas-E, inmunoglobulinas de membrana, sueros anti-leucemia linfoblástica aguda de células T y nulas, receptores de Fc y C, anticuerpos monoclonales.
Bioquímica	Enzimas lisosomales, enzimas implicadas en el metabolismo de nucleótidos y Tdt (desoxinucleotidil transferasa terminal).
Marcadores moleculares	Rearreglos genéticos en el locus de inmunoglobulinas y en el locus del receptor de células T.
Citogenética	Aberraciones cromosómicas.

Clasificación del FAB

Entre las clasificaciones más recientes se encuentra la realizada por el Grupo Cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB), (tabla 2.3) que surgió de la necesidad de una clasificación basada en métodos reproducibles y una nomenclatura común que facilite el análisis clínico y la comunicación científica. Se basa en las características morfológicas y citoquímicas (55) (tabla 2.2). Algunas de las pruebas citoquímicas son enunciadas en la tabla 2.4.

Leucemia no-linfocítica aguda

Este tipo de leucemia se caracteriza por blastos "mieloides", que se originan a partir de una célula madre cuya diferenciación se ha "comprometido" a las vías granulocíticas, monocíticas o eritrocíticas, por lo que presentan variaciones morfológicas notables (55).

La FAB describe siete variantes de leucemia no linfocítica aguda (LNLA), definidas en base a la línea celular predominantemente afectada, así como el grado de maduración de las células (tabla 2.3). Las tres primeras, M-1 a M-3, muestran una diferenciación principalmente granulocítica (neutrofílica); M-4 y M-5 incluyen un componente monocítico; M-6 está comprometida hacia la vía eritrocítica y M-7 hacia la vía megacariocítica (56). A continuación se describe cada una de las variantes.

Leucemia mieloblástica indiferenciada (M-1), representa una

TABLA 2.3.- CLASIFICACION DEL FAB DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS (53,55,59)

Linfocíticas	No - Linfocíticas
L-1 Leucemia prolinfocítica	M-1 Leucemia mieloblástica indiferenciada mielógena pura.
L-2 Leucemia prolinfoblástica	M-2 Leucemia promieloblástica o mieloblástica aguda.
L-3 Leucemia de células de Burkhitt	M-3 Leucemia promielocítica -Variante hipergranular -Variante micro o hipogranular
	M-4 Leucemia mielomonocítica
	M-5 Leucemia monoblástica verdadera o tipo Schilling -tipo a ó monoblástica -tipo b ó monocítica bien diferenciada
	M-6 Eritroleucemia
	M-7 Leucemia megacarioblástica

TABLA 2.4 CARACTERISTICAS CITOQUIMICAS DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS (54).

Reacción de tinción	LLA	LNLA-M2	LNLA-M4	LNLA-M6
PAS	Presente como gránulos gruesos o bloques en un número variable de células.	Negativo o difusamente positivo.	Negativo o granulación fina.	Fuertemente granular positivo.
Esterasa cloroacetato naftol-ASD	Negativa.	Positiva.	Negativa.	Negativa.
Esterasa acetato naftol-ASD	Negativa o débilmente positiva.	Positiva (no inhibida por fluoruro.	Fuertemente positiva (inhibida por fluoruro.	Débilmente positiva.
Esterasas alfa-naftil acetato	Negativa.	Negativa.	Fuertemente positiva.	Fuertemente positiva.
Sudán negro	Negativa.	Positiva.	Positiva.	Positiva.
Peroxidasa	Negativa.	Positiva.	Usualmente negativa.	Positiva.

leucemia mieloblástica con la gran mayoría de las células de médula ósea inmaduras y con desaparición de las células maduras. Las células blásticas de la serie granulocítica con alguna evidencia de diferenciación se demuestran por la presencia de granulaciones azurofílicas y/o cuerpos o bastones de Auer y en pocos casos con la ausencia de granulación por la actividad de mieloperoxidasa (56).

Leucemia promieloblástica o mieloblástica aguda (LMA o M-2). Este tipo exhibe clara evidencia de maduración hasta el estado de promielocito o aún más lo que permite diferenciarla de M-1 (56).

Leucemia promielocítica aguda (LPA o M-3), se caracteriza por un alto porcentaje de células blásticas anormales en médula ósea, con gran cantidad de gránulos azurofílicos anormales o numerosos cuerpos de Auer y con alteraciones nucleares. Existe una variante hipergranular y otra hipo o microgranular (con granulación sólo visible por microscopía electrónica y de curso más agudo que la hipergranular) que podría confundirse con M-2 y de la cual puede diferenciarse porque la variante hipergranular de M-3 presenta coagulación intravascular diseminada. Además la translocación (15;17) es específica para ambas variantes de M-3, su presencia indica que se trata de este tipo de leucemia (55,57).

Leucemia mielomonocítica (M-4), en esta forma coexisten componentes granulocíticos y monocíticos en proporciones variables con diferentes grados de maduración en ambas series.

Se caracteriza por monocitos en sangre periférica aunque este componente puede ser mínimo en médula ósea, semejante a lo que se observa en M-1 o M-2, de ahí la importancia de analizar sangre periférica y médula ósea, en los blastos de esta última se observan gránulos eosinofílicos, positivos para estearasa y ácido periódico de Shiff (53,58).

Leucemia monoblástica verdadera (M-5 o tipo Schilling), existen dos formas de M-5: la tipo "a" o leucemia monoblástica en la cual casi todas las células son blastos y la tipo "b" o leucemia monocítica bien diferenciada en la que una alta proporción de las células en sangre periférica han madurado más allá del estado de promonocito. (53).

Eritroleucemia (M-6), se diagnóstica cuando gran parte de las células en médula ósea son eritroblastos y existe diseritropoyesis severa con muchos eritroblastos en sangre periférica (53).

Leucemia megacarioblástica aguda (M-7). En este tipo de leucemia el aspirado de médula ósea muestra un infiltrado de células leucémicas que comprende un 30% o más del total de células. Estas células se identifican como de la línea megacariocítica por la reacción de peroxidasa plaquetaria en microscopio electrónico o por la prueba con anticuerpos mono o policlonales plaqueta específicos. Un aspecto prominente en la mayoría de los pacientes es la mielofibrosis o aumento de retículos en médula ósea (53,59).

Leucemia linfoblástica aguda

Las leucemias de blastos indiferenciados no mieloides que incluyen a la leucemia linfoblástica aguda y a la leucemia nula (no "mieloide" no linfoide) se les ha denominado en forma general como leucemia linfoblástica aguda (LLA), ya que es la forma más frecuente. El FAB a dividido a la LLA en tres subgrupos (53) (tabla 2.3).

Leucemia prolinfocítica aguda (L-1), corresponde a lo que tradicionalmente se conoce como leucemia linfoblástica de la infancia, compuesta de células que tienen dos veces el diámetro de los linfocitos pequeños con núcleos de forma irregular, nucléolos muy pequeños o ausentes y citoplasma escaso con poca o nula basofilia (55).

Leucemia prolinfoblástica (L-2), este grupo se observa principalmente en adultos y se reconoce por grandes células con un diámetro dos veces mayor que los linfocitos pequeños, con nucléolos de tamaño regular generalmente hendidos, uno o más nucléolos prominentes y con cantidades variables de citoplasma a menudo basofílico (55).

Ambas variedades L-1 y L-2 presentan patrones variables de tinción histoquímica, son leucemias de células T y no pueden separarse en base únicamente a las características morfológicas (53,60).

La leucemia de Burkitt (L-3) es el tercer tipo de LLA y parece ser una entidad bien definida en cuanto a su morfología,

aspectos clínicos y marcadores inmunológicos de membrana. Las células son grandes y homogéneas con una cromatina densa, sutilmente punteada, núcleo oval y regular y presentan uno o más nucléolos, el citoplasma es moderadamente abundante, intensamente basofílico y vacuolado. Es común un alto índice mitótico. A estos casos se les considera leucemias de células B, aún cuando no todos los casos de leucemias agudas de células B son leucemias de Burkitt (39,53).

Cuando se propuso esta clasificación no fué posible demostrar marcadores linfoides en aproximadamente tres cuartas partes de los pacientes, por lo que fueron catalogadas como nulas. Sin embargo, el empleo de técnicas bioquímicas (determinación de desoxinucleotidil transferasa terminal) han demostrado que en estos casos las células se originan a partir de una célula madre de la línea linfóide (39,54).

Clasificación Inmunológica de la Leucemia Linfoblástica Aguda

Esta clasificación es en base a los marcadores de membrana y enzimas las las células blásticas leucémicas determinados con métodos inmunológicos y son especialmente útiles en la caracterización de las células de las LLA. Estos han definido cuatro tipos de leucemias, leucemias de células pre-B, nula, T y B. Cada una de ellas esta estrechamente asociada con algunas características clínicas y biológicas que a menudo determinan su

pronóstico (68) (tabla 2.5).

En más de 90 por ciento de los casos los pacientes con LLA de células nulas o células pre-B tienen células con el marcador denominado antígeno de leucemia linfocítica aguda común (LLAc), que es un polipéptido glicosilado (Gp100) y su detección es posible con un heteroantisuero específico o con un anticuerpo monoclonal (J-5) (55,61).

La LLA de células T se estudia con un heteroantisuero para el antígeno de superficie (pT) de células T, con la formación espontánea de rosetas con eritrocitos de carnero y con algunos anticuerpos monoclonales de la serie llamada OKT. Este último estudio ha permitido la demostración de distintos estados de diferenciación intratímica de los linfocitos implicados en dos enfermedades que se consideraban estrechamente relacionadas: leucemia aguda de células T (LAC-T) y linfoma linfoblástico de células T (LLC-T). En LAC-T que se caracteriza por propensión a propagación leucémica rápida, se encontró un fenotipo inmaduro o tímico temprano y en el LLC-T que es una forma localizada principalmente en el mediastino anterior, se halló un fenotipo relativamente más maduro (55,61,68).

Las células B y Pre-B pueden definirse por la presencia de inmunoglobulinas citoplásmicas o inmunoglobulinas de superficie (68).

Existen otros reactivos inmunológicos y algunas enzimas útiles en el diagnóstico diferencial de los tipos de LLA y

TABLA 2.5 MARCADORES DE LA LEUCEMIA LINFOLASTICA AGUDA (LLA)(55,63)

Tipo de LLA	Pre-B ²	M1a	T	B
Antígeno LLA común (suero anti-LLA y anticuerpo monoclonal J-5)	+	+	-	-
Antígenos T (resetas-E, anticuerpos monoclonales series OKT, autorreacti - suero antilinfocito).	-	-	+	-
Antígeno Ia, anticuerpo - monoclonales FMC 4.	+	+	-	+
Desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT)	+	+	+	-
Inmunoglobulinas (Ig)	+	-	-	+
Fosfatasa ácida	-	-	+	-

particularmente de LLA y LNLA. Los anticuerpos monoclonales anti-linfocitos B de la serie FMC, actualmente se investigan en forma activa, uno de ellos, el FMC4 es un excelente reactivo anti-Ia (este antígeno es un producto del complejo mayor de histocompatibilidad clase II de la región HLA-D) y se ha empleado para clasificar LLA (tabla 2.5). Además se ha reportado la identificación de este antígeno con el anticuerpo monoclonal 109d6 y refleja susceptibilidad hereditaria para desarrollar leucemia mielocida aguda (55,62).

La demostración de actividad de la desoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt) en el núcleo de las células linfoides precursoras ha facilitado el análisis celular por doble tinción, y ha ayudado a definir el fenotipo de la célula de LLA-nula. La reacción citoquímica de fosfatasa Ácida ha demostrado ser valiosa para la caracterización de linfoblastos T manifestando una reacción fuerte localizada en la zona del aparato de Golgi, que contrasta con el resultado débil o negativo en LLA-nula (no-B no-T) y en LLA-B (55).

Se ha tratado de correlacionar la clasificación inmunológica con la del FAB, encontrando que en la LLA infantil, la LLA-nula y pre-B que sean L-1 tienen mejor pronóstico que si son L-2, la rara LLA-B es la de peor pronóstico. Existe una firme correlación entre L-3 y leucemia de células B, sin embargo, se han reportado cuatro pacientes que tuvieron claramente enfermedad de células B y sin ninguna duda tipo morfológico L-1, mientras que otro caso tuvo características morfológicas L-3 y presentó

enfermedad no-B (61).

2.4.2 Leucemias Crónicas

Las leucemias crónicas comprenden un grupo variado de malignidades de células mieloides y linfoides. El término crónico implica un desorden indolente, con una historia natural prolongada, que se extiende a varios años. Aunque esta evolución ocurre en la mayoría de los pacientes, otros con algunos subtipos de estos desórdenes tienen un pronóstico más severo y con un curso clínico rápido (55,64).

Leucemia granulocítica crónica (LGC) o leucemia mielocítica crónica (LMC)

La LGC es un desorden clonal de las células madres pluripotenciales. En su fase blástica presenta diversidad de fenotipos, pero aproximadamente dos tercios son granulocíticos y un tercio es linfoblástico y ocasionalmente afecta células eritroides o megacarioblastos. También en la fase blástica puede observarse una mezcla de diferentes tipos celulares o puede cambiar de linfoide a granulocítica o viceversa (9). Así, los linfocitos B y algunas células nulas también son derivadas de la clona maligna. Se considera que al menos en ocasiones el linaje

T es afectado en la LGC Phi-positivo (65), sin embargo, un reporte reciente afirma que las líneas celulares T de la mayoría de los pacientes LGC Phi-positivo, no derivan de las células madres pluripotenciales (37).

Esta enfermedad se caracteriza por un número muy aumentado de células granulocíticas (principalmente de la variedad neutrofílica) en la médula, sangre, bazo y otros órganos, a menudo conduciendo a esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatías. Ocasionalmente puede estar precedida o acompañada por trombocitopenia (65).

La LGC puede ser dividida en dos fases (tabla 2.1.):

1) Fase crónica, en la que la maduración de las células es normal y la enfermedad puede ser controlada con quimioterapia (9,64).

2) Fase aguda o crisis blástica, estado terminal asociado con arresto de la maduración similar al observado en la leucemia aguda, progresión sintomática y desarrollo de resistencia a la quimioterapia (9,64)

(Algunos autores consideran una fase intermedia denominada Fase Acelerada, con características semejantes a las de la fase aguda, pero menos severas (65)).

La sobrevivencia media en LGC es de 3 a 4 años, pero los pacientes viven menos de seis meses cuando se inicia la fase aguda. Se considera que es más frecuente en hombres que en mujeres, aunque en las últimas décadas parece presentarse con la misma frecuencia en ambos sexos. El pronóstico es peor para

pacientes con cuenta leucocitaria alta, marcada hepatoesplenomegalia, gran proporción de células inmaduras y los cambios cromosómicos específicos que se detallarán más adelante (65).

Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

La LLC se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos con apariencia relativamente madura en sangre, médula ósea, nódulos linfáticos, bazo, hígado y otros órganos. Casi todos los casos corresponden a una proliferación clonal de linfocitos B que manifiestan una pequeña cantidad de inmunoglobulinas de superficie y en la mayoría de los casos sólo tienen una clase de cadena pesada, (μ), asociada ocasionalmente con (δ) y con una cadena ligera (κ) o (λ). Además exhiben receptores para eritrocitos de ratón, Fc y receptores del complemento y antígenos HLA-DR, así como otros antígenos asociados con LLC-B. La LLC es la leucemia más común en Estados Unidos, aproximadamente el 40% del total de los casos, con una edad promedio de 50 años y es dos veces más frecuente en hombres que en mujeres (36,66).

Otras variantes de leucemia crónica son las siguientes:

1) Leucemia de células peludas (hairy cells) o reticuloendoteliosis, que se caracteriza por la proliferación de células adherentes fagocíticas con proyecciones prominentes de citoplasma, de donde se origina su nombre. Se manifiesta con

bazo prominente y disminución de las células circulantes. Su origen se desconoce (63).

ii) Leucemia prolinfocítica, se distingue por esplenomegalia, alta cuenta leucocitaria ligera, linfadenopatía y típicos marcadores de membrana. Su curso es muy agresivo, con solo seis meses de sobrevida (67).

La heterogeneidad de las leucemias y el hecho de que las células alteradas son a menudo de aspecto raro o atípico hace que la categorización no sea objetiva ni precisa (9,60). Puesto que esta heterogeneidad puede reflejar diferencias de causa y tiene importancia pronóstica y terapéutica, hace necesaria una clasificación cada vez más compleja que interrelacione diferentes características de la célula leucémica, para de esa manera lograr una mejor comunicación científica. Por ejemplo una correlación entre la clasificación citogenética (44,57), la del FAB (51) y la inmunológica (66).

2.5 ETIOLOGIA DE LA LEUCEMIA

Hasta el momento se desconoce la causa de la leucemia humana. Quizá se le podría considerar como un proceso en múltiples etapas y en cada una de ellas podrían intervenir diferentes factores etiológicos, constituyendo de esa manera mecanismos unitarios en la transformación fenotípica y consolidación neoplásica (68).

2.5.1 Origen monoclonal de la Leucemia

Se considera que la naturaleza de la leucemia, así como la del cáncer en general es monoclonal, ya que la célula original responsable de estas enfermedades es intrínsecamente anormal y en consecuencia toda su progenie será anormal (51,69-71).

Esto se ha demostrado mediante varios estudios en los cuatro tipos de leucemia (LNLA, LLA, LGC, LLC). Tal vez la mejor evidencia derive del estudio de pacientes heterocigotas para la isoenzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PD). El gen de esta enzima se encuentra localizado en el cromosoma X. Durante la embriogénesis temprana, la "lyonización" conduce a la inactivación de un cromosoma X al azar en cada célula y toda su progenie retiene la inactivación del mismo cromosoma. De tal manera que al analizar tejidos no hematopoyéticos de pacientes heterocigotas con alguno de los cuatro tipos de leucemia estos exhiben una mezcla de la G6PD común (GdB) y la isoenzima GdA.

Sin embargo, la población leucémica de médula y sangre manifiesta GdA o GdB, pero no ambas, lo cual apoyaría el origen monoclonal del padecimiento (51,69-71).

También se han desarrollado marcadores moleculares que identifican rearrreglos de los genes alfa, beta y gamma del receptor de células T y otros que identifican rearrreglos de los genes de Ig en células B. Con ellos se ha podido definir mejor el origen monoclonal de las células leucémicas, principalmente las de la línea linfóide (38-41).

Estas determinaciones también han indicado que la célula en la que se origina la LGC (célula clonogénica) probablemente sea una célula madre pluripotencial capaz de dar origen a todas las células hematopoyéticas no linfoides y a los linfocitos B (37,70). En otras enfermedades, como la leucemia mielomonocítica con eosinófilo alterados, una célula madre de potencialidad más restringida puede ser la célula responsable de la enfermedad (45), pero alternativamente, todas pueden surgir de la célula pluripotencial (60). En la figura 2.4 se señala el posible sitio de la célula original o clonogénica de los tipos principales de leucemia.

2.5.2 Factores Físicos

Los factores físicos considerados en la etiología de las leucemias son: las radiaciones ionizantes y las radiaciones no-

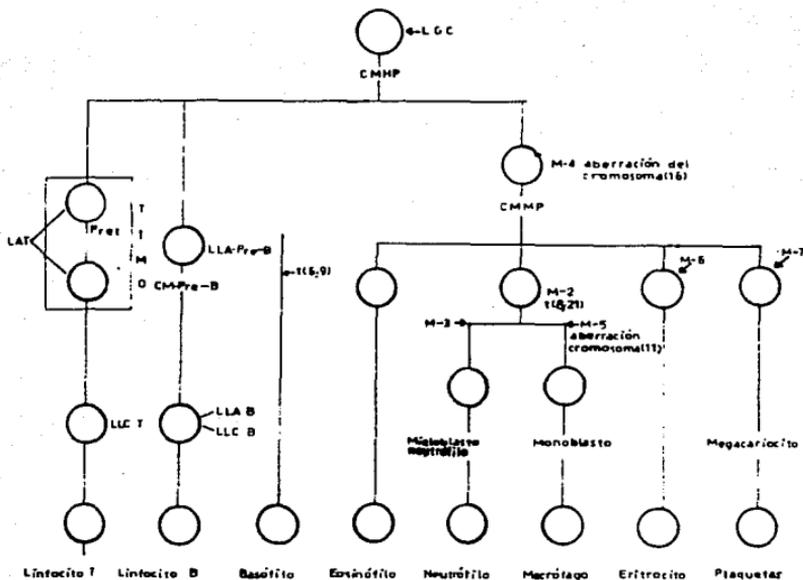


FIGURA 2.4 Probables células clonogénicas de las que se considera surgen los principales tipos de leucemia. (Este cuadro es una síntesis de la figura 2.1). CMHP: célula madre hematopoyética pluripotencial. CM: célula madre multipotencial. CM: célula madre. (44,45,51,63,72-74).

ionizantes de baja energía (59).

Radiaciones ionizantes

El potencial leucemogénico de las radiaciones ionizantes se ha demostrado ampliamente en animales y en humanos. La energía ionizante electromagnética (rayos X y rayos gamma) o de partículas (electrones protones y partículas alfa), aporta al material que la absorbe suficiente energía localizada para ionizar átomos y moléculas que encuentre en su trayecto. En sus diversas formas las radiaciones pueden causar leucemias agudas (LNLA y en menor proporción LLA) y crónicas LGC. También pueden ser un agente etiológico de linfomas no Hodgking, mielomas o neoplasias en general (4).

De esa manera, poco tiempo después de que W.K. von Rontgen descubriera los rayos X en noviembre de 1895, ya se apreciaban y después se comprobaron los efectos inflamatorios agudos de las radiaciones en la conjuntiva, piel y sus efectos más crónicos y destructivos en las células hemáticas y sus precursores. Durante los primeros años de investigación sobre la aplicación médica de los rayos X, los médicos y científicos expuestos a radiaciones excesivas manifestaban una frecuencia de leucemia mayor que la de la población general (médicos 1.7 veces mayor, radiólogos 9 veces mayor), así como mortalidad excesiva dentro de los primeros cinco años de exposición. Ultimamente, la incidencia de leucemia entre los radiólogos ha disminuido, coincidiendo con el uso de aparatos mejor protegidos y el mayor empleo de sistemas de monitorización (1,36,68,72,73).

La exposición a las explosiones atómicas (predominantemente radiaciones gamma y neutrones) de los japoneses en Hiroshima y Nagasaki, en 1945, proporcionó una demostración sin igual de los efectos leucemógenos de una dosis única de irradiación. Tras un período de latencia de aproximadamente tres años, la incidencia anual de leucemia entre los supervivientes aumentó gradualmente hasta 6 a 7 años después de la explosión, la incidencia aún excedía a la media nacional. El riesgo de los más próximos al hipocentro, que recibieron la irradiación máxima, fué cincuenta veces mayor que el de las personas que se hallaban en la periferia no irradiada. La cantidad y calidad de la exposición a la radiación han sido cuidadosamente investigadas, y se ha demostrado una relación lineal entre dosis acumulativas de 100 a 900 rads y la incidencia de leucemia (1,36,68,74-80).

También se ha encontrado una frecuencia de leucemias mayor a la esperada cuando se emplean radiaciones ionizantes como tratamiento en pacientes con neoplasias hematológicas (Hodgkin, LLC, linfomas no Hodgkin) (81,82), tumores sólidos (83,84) y enfermedades no neoplásicas como espondiloartritis anquilopoyética (1). También las radiaciones endógenas por isótopos radiactivos pueden contribuir al desarrollo de leucemia aguda. Uno de los ejemplos más claros es el tratamiento de policitemia vera con P32, que incrementa la posibilidad natural del padecimiento de evolucionar a leucemia aguda (LNLA) o crónica (LGC) (85-87). Otros ejemplos que implican riesgo son la hiperplasia tímica en la infancia, infecciones crónicas,

carcinomas, administración de I131 para el hipertiroidismo y procedimientos de diagnóstico radiológico durante el embarazo (1). El empleo de agentes como Torotrast que pueden producir radiaciones alfa en forma endógena, son capaces de dar lugar a LNLA, mielofibrosis y otras discrasias sanguíneas (36,68,88,89).

Existe una gran controversia sobre la función leucemógena de radiaciones a bajas dosis, empleadas en procedimientos diagnósticos habituales (radiografías o radioscopias) (4,68). Se conoce una asociación de leucemia y exposiciones a bajas dosis en el período prenatal, por estudios recientes en fetos que sugieren que el peligro de radiación intrauterina puede ser mayor que el observado después del nacimiento (90-93).

Se ha observado una incidencia aumentada de leucemia tras la irradiación en muchas especies animales, pero su patogenia se ha estudiado en forma más detallada en el ratón. En ciertas cepas la leucemia se halla aumentada hasta 30% por las radiaciones y se asume que la leucemogénesis debida a irradiación incluye muchos factores modificantes, como efectos celulares directos e indirectos, la cinética de la división celular, especificidad del órgano, influencias hormonales y la activación de infecciones víricas ocultas (1,68).

La radiación corporal total y de campo extendido produce tanto mielosupresión como inmunosupresión (94). Los daños cromosómicos que pueden producir las radiaciones ionizantes son generalmente estructurales (deleciones, rearrreglos, formación de

cromosomas en anillo, dicéntricos, fragmentos acéntricos, etc.) y otras alteraciones como condensación cromosómica que continúan observándose durante muchos meses después de la radioterapia o de los estudios radiológicos (4,95,96). La radiación causa rupturas reversibles en el ADN y al mismo tiempo induce replicación y mutación de la información genética viral de células infectadas in vitro e in vivo. La importancia relativa de estos fenómenos en la leucemogénesis es desconocido, pero no obstante, la radiación sigue siendo el factor leucemógeno más claramente relacionado en los seres humanos (1,4,97-100).

Radiaciones no-ionizantes de baja energía

Los efectos biológicos de áreas electromagnéticas desde hace muchos años han originado controversia, pero a partir de 1960 resurgió el interés en su estudio con el descubrimiento de los fenómenos electromagnéticos intrínsecos del organismo, las evidencias sugieren que fuentes no ionizantes de energía relativamente baja son capaces de alterar estructuras moleculares y tener una función importante en diversos procesos biológicos (101).

Las ondas electromagnéticas podrían ser leucemógenas en sistemas biológicos y se han inducido leucemias por microondas en ratón, no obstante, como los efectos biológicos de este tipo de exposiciones son transitorios, su acción podría ser un cofactor en la iniciación o promoción de leucemia (101).

Se han realizado varios estudios epidemiológicos pero los resultados son diferentes. En algunos se sugiere un riesgo mayor hacia la leucemia si hay exposición a áreas eléctricas y magnéticas (102-104). También se ha reportado mayor frecuencia de leucemias LNLA en los trabajadores electricistas (105-106). En cambio entre los operadores de teléfonos ese riesgo parece no estar aumentado (107). Por otra parte, existen informes que indican que la gente que vive cerca de un equipo de transmisión presenta mayor riesgo de cáncer, mientras que otro reporte considera que no hay tal relación (102-104). La causa precisa de las alteraciones en individuos expuestos a fuentes eléctricas o magnéticas aún no es clara ya que también están en contacto con otros agentes tales como humo metalizado, ceras sintéticas, resinas epóxicas, naftalenos clorados, bifenilos clorados y otros (108). La hipótesis de que la exposición a áreas eléctricas y magnéticas causa leucemia requiere más estudios.

2.5.3 Factores Químicos

La carcinogénesis es un proceso en múltiples etapas, cada una de ellas puede estar influenciada por diferentes factores y uno de ellos pueden ser los agentes químicos. Lo anterior se ha fundamentado en datos epidemiológicos, estudiados en animales y análisis moleculares de tumores. Sin embargo, solamente se ha

demostrado que después de una exposición grave a benceno o tolueno existe aumento en la incidencia de leucemias mieloides y eritroleucemia (1,54,109,110). Estos pacientes pueden presentar anomalías cromosómicas numéricas y en menor proporción estructurales, las cuales son constantes cuando existe neutropenia. La incidencia de leucemia en los trabajadores zapateros expuestos al benceno en Estambul, fué de 13/100,000 lo que es dos o tres veces más que la incidencia de leucemia aguda en la población general (1,23,54,111).

El cloranfenicol (112), el hexaclorociclohexano (Gammexane) (113) y la fenilbutazona (114) han sido incriminados como agentes causales de leucemia aguda (LNLA), sin embargo no existe suficiente número de trabajos que lo demuestren en forma absoluta.

También se han descrito casos de LNLA en trabajadores que manejan óxido de etileno (115). En forma experimental, este producto ha demostrado un alto poder mutagénico en diversos organismos. Induce también numerosas aberraciones cromosómicas en ratas y en linfocitos de personas expuestas accidentalmente. El óxido de etileno se emplea en hospitales e industria alimentaria para esterilización y su efecto parece potenciarse cuando se asocia con metil-formato (54).

Existe evidencia de que la exposición ocupacional a otros agentes puede ser leucemógena. Así se compararon adultos con LNLA cuyos empleos ocasionaban contacto con varios químicos

industriales, insecticidas o derivados del petróleo, con aquellos en cuyos empleos se considera no hubiera tal exposición. En los pacientes "expuestos" se encontró mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas que en quienes no estuvieron expuestos (83% vs. 24%). Además se observó con mayor frecuencia leucemia mieloblástica (M-2) en los pacientes en contacto con estos productos, mientras que la leucemia mielomonocítica (M-4) fué más común en los no expuestos (116). En un estudio subsecuente realizado en 156 pacientes con LNLA, se encontró que la exposición a productos derivados del petróleo parece estar asociada con cromosomas normales en contraste a los expuestos a solventes químicos e insecticidas en donde el 94% presentó cromosomas anormales en su médula ósea (117).

Fármacos antineoplásicos

El empleo intensivo y combinado de fármacos antitumorales en las últimas décadas puede correlacionarse con un incremento en la incidencia de leucemia o segunda neoplasia en los pacientes con tumores sólidos y linfomas. Esta acción leucemógena se observa al emplear agentes quelantes solos o en combinación con otras drogas, aunque en la mayoría de los casos se usan asociados a radioterapia. Estas drogas se aplican en el tratamiento de neoplasias de origen linfoide o en tumores que producen deficiencia inmunológica, por ejemplo mieloma múltiple, linfoma linfocítico, LLC y enfermedad de Hodgkin. Sin embargo en todas

estas entidades se ha observado el desarrollo de leucemia aguda aún en ausencia de radiación o de tratamiento con agentes quelantes por lo que se ha sugerido que el aparente aumento de leucemia aguda es ocasionado por la naturaleza del tumor subyacente y por la creciente longevidad debido a la quimioterapia (1,118-131). Sin embargo, la leucemia aguda ha aparecido en enfermas con carcinoma de ovario, pulmón y mama tras 16 a 91 meses de tratamiento con agentes quelantes. Aproximadamente la mitad de estas enfermas no recibieron radioterapia (1,132,133). A partir de un estudio de cambios en sangre periférica relacionados con terapia citotóxica, realizado en 105 pacientes, 53 con la enfermedad de Hodgkin y 52 con otros cánceres, se informó que anomalías preleucémicas (pancitopenia, dismielopoyesis, mielofibrosis, macrocitosis) se observaron en 75% de los casos y que aparecieron en un intervalo promedio de 68.7 meses después del diagnóstico del cáncer primario, con una duración media de seis meses. Es importante detectar esta fase preleucémica para aplicar una terapéutica apropiada, ya que el tratamiento puede ser más "sencillo" y "efectivo" que el aplicado a la LNLA (132). Por otra parte, también se ha informado que los pacientes tratados con terapia citotóxica presentan cierto grado de aneuploidía y delección del brazo largo del cromosoma 5 (133).

El mecanismo de acción de los carcinógenos o leucemógenos químicos, no está totalmente definido. Existen proposiciones que principalmente lo relacionan con la teoría de la carcinogénesis en múltiples etapas (9).

En general, los carcinógenos pueden ser de dos tipos, completos e incompletos. Los primeros pueden producir tumores por sí mismos, mientras que los segundos requieren además exposición subsecuente de las células tratadas (iniciadoras) a agentes promotores, los cuales por sí mismos no son carcinógenos. Estos agentes promotores también pueden conducir al desarrollo de tumores cuando se aplican a tejidos previamente tratados con dosis bajas de un carcinógeno completo, acción que por sí misma no produciría tumor (9).

Los agentes iniciadores y carcinógenos completos casi siempre dañan al ADN (genotóxicos) y parece muy probable que el evento iniciador implique alguna forma de interacción carcinógeno-ADN y daño subsecuente. Por ejemplo, esto podría ocurrir con los agentes quelantes al formar etil o metil derivados con las bases nitrogenadas del ADN. Las células iniciadoras persisten en el tejido por largo tiempo después que el agente iniciador ha desaparecido y la lesión producida es estable y hereditaria. Se ignora cuales podrían ser sustancias promotoras para la leucemogénesis (9,54,68,134-136).

Muchos agentes necesitan ser activados metabólicamente para ser convertidos en los carcinógenos que finalmente interactúan con el ADN y pueden modificar las bases nitrogenadas dependiendo de la dosis y extensión de la activación metabólica. Así por ejemplo, una serie de productos exógenos que forman parte de la dieta o tóxicos habituales, pueden actuar como activadores del sistema enzimático microsomal y afectar las vías celulares del

ácido fólico-timidina. Esto favorecería la manifestación de sitios frágiles induciendo aberraciones cromosómicas severas o activación o desrepresión de oncogenes (9,54,68).

Se ha reportado también que algunas clonas leucémicas (LMA) muestran sensibilidad hereditaria a ciertos fármacos.

2.5.4 Factores Biológicos

Virus

Se ha postulado que los virus tienen una función importante en la génesis de las neoplasias humanas, ya que son capaces de producir alteraciones cromosómicas incluyendo cambios numéricos y sobre todo alteraciones específicas en ciertos cromosomas (23).

El genoma de los virus está constituido por ADN o ARN, pueden tener desde cinco hasta varios cientos de genes recubiertos por proteínas y su reproducción se asemeja a los procesos de crecimiento y división celular (138).

Virus de ADN

Se ha observado que seis de las siete familias de virus que contienen ADN y que coexisten en los organismos eucariontes, son capaces de inducir cáncer en los animales silvestres y de

laboratorio. La modificación genética que realizan es solamente en las células somáticas y no se han visto implicados en la leucemogénesis (139).

virus de ARN (Retrovirus).

De los nueve grupos de virus que contienen ARN, sólo el Retroviridae tiene elementos oncogénicos y pueden parasitar las células germinales (139). Desde hace tiempo se sabe que los retrovirus (virus tumorales de ARN, virus tipo C, oncornavirus, virus de leucemia) pueden inducir una variedad de neoplasias (leucemia y linfomas, sarcomas u ocasionalmente carcinomas) en diferentes animales (gallinas, ratones silvestres, gatos, ratas, bovinos y monos gibones). Estos virus han sido identificados como el primer factor en la patogénesis de muchas leucemias y linfomas que suceden "naturalmente" en varias especies animales. Sin embargo, la mayoría de los retrovirus no son oncogénicos (36.140).

Los retrovirus parecen no ser la causa principal del cáncer humano, pero a través de su estudio, actualmente se tiene una visión más coherente acerca de los mecanismos de oncogénesis. Las características que los distinguen y han permitido su empleo en el análisis del desarrollo de tumores son las siguientes:

- 1.- La síntesis del ADN dirigida por ARN es un acontecimiento esencial en la replicación de los retrovirus (141). Una enzima viral, la transcriptasa inversa (TI) inicia la

infección copiando en ADN el genoma de ARN del virus (138). Las transcriptasas inversas de los diversos virus leucemógenos del tipo C son notablemente similares en su sustrato y requerimientos primarios y con un alto grado de semejanza molecular (homología). Así, es probable que estos virus sean descendientes de un antecesor común y que sus variaciones individuales se han ido acumulando a través de diferentes huéspedes endémicos (139).

2.- Los genes virales son incorporados al genoma del huésped y allí permanecen unidos a la dotación genética de la célula, habitualmente a perpetuidad (141), utilizando menos del 1% de las fuentes celulares en su replicación (136). Así la producción viral puede convertirse en una propiedad permanente de la célula infectada (71).

3.- Los genomas de los retrovirus han demostrado su paso en las líneas germinales de casi todas las especies durante el curso de la evolución (1,139). Los virus "endógenos" resultantes son transmitidos de una generación a otra del huésped y frecuentemente interaccionan con genes virales introducidos en las células por infección aguda (138).

4.- Algunos retrovirus aportan uno o más genes que directamente median en la transformación neoplásica de la célula huésped (oncogenes). Estos oncogenes son relativamente fáciles de identificar, aislar y encontrar sus productos, por lo que han permitido vislumbrar los procesos químicos responsables del crecimiento cancerígeno. La oncogénesis por retrovirus puede

estar próxima a los procesos que ocurren de una manera controlada durante el crecimiento y diferenciación normales (138).

El genoma de los retrovirus es diploide, dos moléculas idénticas de ARN de una sola hélice, unidas por enlaces tipo puentes de hidrógeno en varios puntos (141). Sin embargo, la unidad haploide es autosuficiente y puede iniciar la infección si se introduce en una célula huésped apropiada (142). Más aún, la expresión del gen viral es organizada alrededor del genoma haploide, la forma diploide solamente se presenta en los viriones maduros (71).

Se ha propuesto que existen tres genes virales que participan en la replicación de los retrovirus (138):

-gen gag: (para el grupo específico de antígenos), codifica para una proteína precursora que es dividida en cuatro proteínas del núcleo del virión.

- gen pol: codifica para la ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa inversa).

-gen env: codifica las glicoproteínas que constituyen la envoltura de virión.

Además, en cada extremo de la molécula existe un pequeño segmento de ARN repetido y secuencias únicas no codificantes (U5 y U3) que contienen elementos reguladores (secuencias promotoras y exaltadoras para transcripción viral) (9).

Algunos retrovirus pueden contener solamente, estos genes son virus de leucemia crónica, o sea, no transforman células in vitro y requieren periodos largos de latencia (virus de leucosis aviar, virus de leucemia felina, virus de leucemia bovina y virus de leucemias del mono gibón) y su acción puede ser por inserción de promotores que lleva a la activación de oncogenes celulares. Estos virus no requieren de un virus "auxiliar" para su replicación (138,140).

Otro retrovirus contienen un determinante genético adicional conocido como "gen transformador", "oncogén" o "secuencia transformante", que codifica para una porción o la totalidad de una proteína requerida para la iniciación y mantenimiento del fenotipo neoplásico de la célula huésped. Los oncogenes virales se derivan de genes celulares normales altamente conservados que pueden ser importantes en el funcionamiento celular básico y/o en la diferenciación (138,140,143-145). Aunque no son necesarios para la replicación viral, la adquisición del oncogén generalmente está asociada con la pérdida de porciones de algún (os) gen (es), conduciendo a un defecto en la replicación del virus, consecuentemente necesitan de un virus "auxiliar" no defectuoso para la replicación. Los retrovirus que llevan un oncogén son transformadores agudos que pueden inducir rápidamente tumores en animales y transformar células en cultivo. Los virus de esta clase incluyen todos los virus de sarcoma aislados y todos los virus de leucemia aguda (71,138,140).

La síntesis e integración del ADN viral se inicia con la

fusión de la membrana viral con la membrana plasmática, liberando el genoma del virus en el citoplasma (36). Después de la infección, el genoma de ARN es transcrito por la transcriptasa inversa a una molécula de ADN lineal de doble cadena, en cuyos extremos quedan estructuras conocidas como "repeticiones largas terminales" (long terminal repeat) (LTR) en las que la región US es duplicada en el extremo 3' y U3 en el extremo 5'. Aunque los LTRs no codifican proteínas, son importantes para la integración de los provirus en el ADN cromosómico, tal vez al favorecer la formación de intermediarios circulares, mecanismo mediante el cual se cree ocurre la integración. Además en el extremo 3' de la molécula se han encontrado elementos reguladores que pueden servir como promotores o exaltadores para genes adyacentes. Probablemente los provirus son integrados al azar, por lo que serían mutagénicos si son integrados adyacentes a algún gen estructural o en general, en algún sitio del genoma que se transcriba (9,146).

No existe evidencia de que el ADN de los retrovirus replique independientemente, sino que el genoma viral se integra en la célula huésped como un "provirus" estable y somete a los genes virales a la expresión y control de los mecanismos celulares. El ADN viral puede integrarse en numerosos sitios sobre el genoma huésped, pero no cambia de una posición a otra y raramente es escindido, excepto por delección de parte o todo el cromosoma sobre el que reside (36,71,138).

La expresión de los genes virales está estrechamente

relacionada con la hospitalidad de la célula. Esto se refiere a la característica de los retrovirus de tener huéspedes "permissivos" que reproducen virus ocasionando que la célula huésped maligne si el virus infectante posee el oncogén adecuado y huéspedes "no permissivos", que pueden ser transformados por la infección, sin permitir la replicación viral a pesar de la entrada del genoma viral en la célula (138).

La transcripción de el provirus retroviral produce una molécula de ARN que contiene el genoma viral completo (71).

Virus Oncogénicos en Leucemias Humanas

En algunas leucemias humanas pueden detectarse información y componentes de virus de ARN tipo C, sin embargo es muy raro hallar una información viral completa, debido quizá a que estos sean defectuosos o suprimidos. Hasta el momento existen muchos informes en los que se asocia virus tipo C y leucemia humana (71). Tal es el caso del retrovirus humano tipo C llamado virus linfotrópico humano de células T-I (VLHT-I) que inicialmente fué aislado en un paciente negro de Estados Unidos con diagnóstico de micosis fungoide y síndrome de Sezary y posteriormente en células de pacientes japoneses con leucemia/linfoma adulta de células T (LLAT) también llamada leucemia adulta de células T (LAT). Esta familia de virus esta constituida por tres miembros: 1) VLHT-I (anteriormente mencionado), 2) VLHT-II aislado en pacientes con leucemia de células peludas de células T y 3) el VLHT-III considerado agente etiológico del síndrome de inmunodeficiencia

adquirida (SIDA). Los tres tipos de virus estan dentro de una superfamilia de retrovirus linfotrópicos (64,138,147).

Las regiones endémicas para VLHT-I son las islas del Caribe, Centro y Sudamérica, Africa y regiones del suroeste de Japón. Existen varios reportes en donde se asocia VLHT-I y LAT (148-151), Tajima y cols. en un estudio en algunas zonas de Japón, observaron que la distribución geográfica de la filariasis era muy similar a la de LAT. Se sabe que la filariasis afecta los niveles linfáticos y origina varias anomalías linforreticulares ya que la microfilaria es transmitida por mosquitos infectados con algunos tipos de virus aún no completamente identificados. La hipótesis de Tajima y cols, sugiere que la repetida exposición a antígenos de la filaria y a algunos virus puede haber tenido una función importante en la etiología de LAT y que la desnutrición pudo también haber contribuido a la progresión de la enfermedad (149).

Algunos datos sugieren que la especificidad relativa hacia células T de estos virus, reside en sus LTR, específicamente en la repetición en tandem de 21 pares de bases. Se ha postulado, que la actividad transformante de VLHT-I resulta de una activación transcripcional trans-activante de genes de proliferación de células T por el producto (px o Plor) en el extremo 3' (147,152,153).

Existen otros reportes que asocian virus con otras leucemias pero los datos no son concluyentes (64,71).

2.5.5 Factores Genéticos

Transmisión hereditaria.

Debido a la observación de agregación familiar en leucemia humana se ha sugerido una transmisión hereditaria. El diagnóstico simultáneo en estos casos ha sido excepcional y en estas familias se ha observado un riesgo aumentado de leucemia. En individuos aparentemente normales que no tenían manifestaciones de la enfermedad en el momento del estudio, se han podido demostrar anomalías definidas en la función inmunológica o susceptibilidad celular a la transformación vírica, similar a la observada en familiares con leucemia (1,36,154,155). La incidencia de la enfermedad en los parientes de primer grado es de 2.5 a 4 veces mayor que en la población general, e incluso en parientes lejanos está aumentada por un factor de 2.3. Esto se ha observado en la leucemia linfocítica crónica y en algunas leucemias agudas, raramente en una leucemia granulocítica crónica (1,36).

En gemelos idénticos cuando uno ha desarrollado leucemia (generalmente LLA) el riesgo es bastante alto para el otro antes de la edad de 8 años y aproximadamente 20 por ciento mostrará síntomas de la enfermedad en un plazo menor de un año (1,156,157). Aunque un evento común postnatal podría explicar esta concordancia, Clarkson y Boyse (158) propusieron una hipótesis más atractiva, en la que se postula que ocurre una sola transformación leucémica en útero que conduce al establecimiento

de una clona maligna en cada gemelo, por el intercambio de células sanguíneas entre gemelos monocigotos. Por otra parte, entre gemelos no idénticos el riesgo también es alto (cinco veces más que la población general), sin embargo, este puede estar determinado por factores medio ambientales como infección intrauterina, radiación o exposición farmacológica. Por lo que los estudios de gemelaridad no han demostrado una base hereditaria convincente. En los estudios familiares la influencia del medio ambiente tampoco ha sido concluyente (1,36).

En cuanto a los antígenos HLA, no se ha demostrado asociación de alguno con un mayor riesgo de leucemia, pero sí con mayor sobrevivencia en pacientes con LLA y HLA-A2 y HLA-B12, en niños el primero y en adultos el segundo (159).

Anomalías cromosómicas congénitas

Se ha observado una frecuencia mayor a la esperada de malignidades hematológicas de novo en padecimientos que presentan anomalías cromosómicas. El mejor ejemplo es el síndrome de Down en el cual se ha calculado un riesgo relativo de 18 a 20 veces en niños y un riesgo un poco menor entre las edades de 20 a 34 años. Dentro de los dos primeros años de vida es más frecuente LNLA (tipo M-2 y M-7), y en niños mayores LLA. Rowley sugiere que este alto riesgo puede atribuirse a la trisomía del cromosoma 21, ya que considera que es el cambio cromosómico más común en LLA (31% en niños y 7% en adultos) y de los más comunes en LNLA (7% en niños y 5% en adultos) en individuos constitucionalmente

diploides. Sin embargo hay desacuerdo de algunos autores con respecto a tales resultados (160-163).

Otro ejemplo son algunos síndromes de inestabilidad cromosómica como la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom y la ataxia telangiectasia. Todos presentan un patrón hereditario autosómico recesivo. En estos individuos los cromosomas son más susceptibles a rearrreglos y rupturas y se ha sugerido que se deban a defectos en los mecanismos implicados en la replicación y reparación del ADN, lo cual aumenta su susceptibilidad a cancerígenos (1,23).

O n c o g e n e s

Hasta el momento, el origen del cáncer se ha asociado con infinidad de causas, las que en su momento pueden actuar en un sustrato genético común en la célula. Los componentes de este sustrato se comenzaron a identificar con el descubrimiento de que los oncogenes de los retrovirus (onc-v, oncogén viral) son copias de los genes celulares, conocidos como "proto-oncogenes" (secuencias con potencial para conversión a oncogenes activos, onc-c). A esta conclusión llegaron a través de las investigaciones realizadas en dos áreas distintas (164-166).

La primera enfocó experimentos de transducción y mutagénesis por inserción para determinar los mecanismos mediante los cuales una variedad de retrovirus animales son capaces de transformar

células infectadas e inducir tumores en su propia especie huésped. El descubrimiento de oncogenes virales se inició con el estudio del virus del sarcoma de Rous. Se cree que los genes transformantes de los retrovirus han sido adquiridos por el proceso de transducción. Aproximadamente 50 retrovirus transformantes se han descrito en asociación con varios tumores animales. En estos virus se han encontrado más de 20 diferentes oncogenes virales transformantes (onc-v). Estos genes son homólogos a los genes celulares normales en virtualmente cada una de las especies en las que se investigaron, desde Neurospora y Drosophila hasta el hombre. Cada oncogén fué denominado con tres letras que definen el virus del cual fué aislado. La mayoría de los proto-oncogenes análogos a onc-v se han mapeado en el genoma humano (tabla 2.6) (figura 2.4) (65,164,166).

La segunda área de investigación indaga los mecanismos moleculares responsables de tumores de diferentes orígenes, mediante experimentos de transferencia de genes, mapeo por mutagénesis insercional de tumores inducidos por virus y análisis de anomalías cromosómicas conocidas. De esta manera, aproximadamente otros 20 oncogenes han sido determinados (tabla 2.7) (9,164-166).

Los oncogenes celulares constituyen un grupo de genes altamente conservados en eucariontes, se considera que en su estado normal favorecen funciones básicas relacionadas con el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, su expresión

TABLA 2.6 ONCOGENES RETROVIRALES (9)

Oncogén	Retrovirus del que se aisló	Cromosoma humano
arc	RSV rASV	20q12-q13
fps	FeSV-ASV PRCII-ASV PRCIV-ASV UR1-ASV I6L-ASV	15q24q25
fes	ST-FeSV GA-FeSV HZ1-FeSV	
yes	Y73-ASV Esh-ASV	18
fgr	GR-FeSV	1p36
ros	UR2-ASV	?
abl	Ab-MLV HZ2-FeSV	9q34-qter
ski	Slh-rASV	1q12-qter
erbA	AEV-ES4 AEV-R	(1): 17p11-q21 (2): 17
erbB	AEV-ES4 AEV-R AEV-H	7pter-q22
fms	SM-FeSV	5q24
fos	FBJ-MSV FBR-MSV	14q21-q31
mos	Mo-MSV Gz-MSV MPV-MSV	8q22
sis	SSV PI-FeSV FT-FeSV TP2-FeSV	22q11qter

TABLA 2.6 (CONTINUACION)

Cncogén	Retrovirus del que se aisló	Cromosoma humano
myc	MC29 MH2 CMI1 OK10 FeLV-myc	8q24
myb	AMV-BA1/A AMV-E26	6q22-q24
rel	REV-T	?
kit	HZ4-FeSV	?
raf	3611-MSV	(1): 3p25 (2): 4
mil	MH2	
Ha-ras	Ha-MSV RasSV	(1): 11p13 (2): X
Ki-ras	BALB-MSV Ki-MSV NY-FeSV	(1): 6p32-q13 (2): 12p12-pter
ets	AMV-E26	11q23-q24
?	AEV	?

RSV: virus del sarcoma de Rous, ASV: virus del sarcoma aviar,
 FeSV: virus del sarcoma felino, FeLV: virus de leucemia felina,
 MLV: virus de leucemia murina, AEV: virus de eritroblastosis aviar,
 SSV: virus de sarcoma de simio, AMV: virus de mieloblastosis aviar,
 REV: virus de reticuloendoteliosis, MSV: virus de sarcoma murino,
 Las otras anotaciones indican la cepa viral específica.

FIGURA 2.4.- El mapa cromosómico humano representa 670 bandas Giemsa, 16 sitios frágiles constitutivos (asteriscos negros), 17 sitios frágiles heredables (asteriscos blancos), 21 proto-oncogenes (círculos negros), genes activos de células diferenciadas (triángulos), y dos puntos de ruptura para cada uno de los rearrreglos cromosómicos específicos encontrados en leucemias (flechas). Las bandas correspondientes están marcadas a la izquierda de cada cromosoma y los proto-oncogenes y genes de diferenciación celular a la derecha. Cuando un proto-oncogén está mapeado en una pequeña región cromosómica más bien que en una banda, se emplea un círculo negro cruzado por una barra. Cuando hay incertidumbre con respecto al punto de ruptura cromosómico preciso de alguna leucemia, una flecha es precedida por un corchete. Debido a que las leucemias son las interesantes en este trabajo, solo se anotan los números correspondientes a ellas: 4: t(1;19)(q21;q23.3) en leucemia linfocítica aguda-pre B (LLA-preB), 6: t(2;8)(p11.2;q24.1), t(8;14)(q24.1;q32.3), o t(8;22)(q24.1;q11.21) en LLA-L3, 10: inv(3)(q21q26-27) en LNLA, 11: t(4;11)(q21;q23.3) en LLA, 12: del(5)(q13.3q31.1) en LNLA, 17-21: LNLA con t(6;11)(q25.3;q23.3), del(7)(p11.2p22), del(7)(q31.2q36.3), t(8;21)(q22.1;q22.3) y t(9;11)(p22;q23.3), respectivamente, 23: t(9;22)(q34;q11.21) en LGC, 24: t(10;11)(p15;q23.3) en LNLA, 26: t(11;14)(p13-14;q13) en LLA-T, 29: del(11)(q14.2q23.3) en LLC, 34: inv(14)(q11.2q32.3) en LLC-T, 35: t(15;17)(q22;q11-21) en LNLA-M3, 36: inv(16)(p13;q22.1) en LNLA, 37: t(11;17)(q23.3;q25.3) en LNLA, 39: t(11;19)(q23.3;p13) en LNLA.

varía en relación al tiempo y tejido. Así, ciertos proto-oncogenes participan en la proliferación o diferenciación de tejidos embrionarios y adultos normales y son relativamente quiescentes en células diferenciadas terminales. Aún no se identifican la mayor parte de las funciones regulares de los proto-oncogenes. En circunstancias diferentes, algunos oncogenes inducen de una u otra manera la génesis de tumores, varios colaboran en la producción del fenotipo final, y otros tienen ambos efectos (65,164,167). Es claro que los proto-oncogenes no son tumorigénicos, sino que deben ser activados. Su activación puede ser el resultado de exposición a agentes carcinógenos tales como las radiaciones, agentes químicos, virus u otros. Se han

TABLA 2.7 ONCOGENES QUE NO SON DE RETROVIRUS (9).

Nombre	Tumor de origen	Método de detección	Cromosoma humano
N-myc*	Neuroblastoma	Amplificación	2p23-p24
L-myc*	Carcinoma de pulmón		
N-ras*	Neuroblastoma	Transfección	1cen-p21 1p32
Blym	Linfoma de Burkitt		
dil	Linfoma de célula B		
mcf2	Carcinoma mamario		
mcf3	Carcinoma mamario		
mot	Celulas de osteosarcoma transformadas químicamente		
neu	Neuroblastoma		
onc-D	Carcinoma de colon		
relacionado con ras	Melanoma		
Tlym-1	Linfoma de célula T		
Tlym-2	Linfoma de célula T		
trk	Carcinoma de colon		
tr:-1	Carcinoma mamario		
tr:-2	Leucemia de célula pre-B		
tr:-3	Plasmacitoma		
tr:-4	Linfoma de célula T		
bcl-1	Leucemia de célula B	Translocación	
bcl-2	Linfoma de célula B		
bcr	Leucemia granulocítica crónica		
tcl	Linfoma de célula T	Translocación	
TkNS-1	Plasmacitoma		
int-1	Carcinoma mamario		
int-2	Carcinoma mamario		
Mlvi-1	Linfoma de célula T		
Mlvi-2	Linfoma de célula T		
Mlvi-3	Linfoma de célula T		
Pim-1	Linfoma de célula T		
Pvt-2	Plasmacitoma		
Rmo-int-1	Leucemia de células T		

* Relacionado con oncogenes anteriormente conocidos como de retrovirus (tabla 3.1).

propuesto diversos mecanismos de activación de proto-oncogenes (9, 138, 140, 153, 164, 167, 172).

a) Mecanismo cualitativo:

i) Por mutación puntual, ya sea por acción de radiaciones o agentes químicos o por transducción a un retrovirus, lo que provoca la sustitución de un aminoácido por otro en la proteína producida. Esta proteína alterada puede inducir uno o más cambios asociados con el crecimiento canceroso.

b) Mecanismo cuantitativo:

i) La región de un proto-oncogén que codifica una proteína se recombina, en el curso de reorganizaciones cromosómicas (como translocaciones), con una región de transcripción activa (como genes de una región reguladora de inmunoglobulinas), haciendo que la información genética del proto-oncogén se exprese a un nivel desacostumbrado. Esto también puede ocurrir por asociación del proto-oncogén con una región reguladora de un genoma vírico (transregulación).

ii) Por amplificación génica: debido a una alta tasa de replicación o por recombinación mitótica dentro de una célula puede llegar a haber muchas copias de un proto-oncogén, ocasionando como en el caso anterior, mayor producción de la proteína oncogénica. Esta amplificación se puede presentar como proto-oncogenes secuencialmente repetidos a lo largo de un

cromosoma o como partículas extracromosómicas dispersas, como sería el caso de los cromosomas doble minuto, puesto que carecen de centrómero es muy probable que se segreguen durante la división celular. La amplificación génica también podría suceder en el caso de trisomías en donde se tienen tres copias de cada gen, por ejemplo se ha sugerido una asociación entre la presencia de un doble minuto y resistencia a la quimioterapia en un paciente con LMA.

Ninguno de estos mecanismos ha sido establecido como fundamental, habiéndose aceptado que para engendrar un tumor maligno deben ocurrir dos o más eventos distintos. Para ello se han sugerido varios mecanismos: a) La activación de al menos un oncogén; (b) la activación de varios oncogenes celulares o virales; (c) la activación en cascada de varios oncogenes; d) alteraciones cooperantes de la célula, como desactivación de la inhibición de un oncogén (164,165,173).

Cualquiera que sea el mecanismo específico que convierte un proto-oncogén en oncogén, este ejerce su efecto a través de la proteína que determina. Una clasificación provisional del mecanismo de acción de tales proteínas es la siguiente: (i) con actividad asociada a tirosina cinasa (los productos de src-c, abl-c, yes-c, fgr-c, fes-c, fms-c, ros-c); (ii) con propiedades de enlace a GTP (la familia ras); (iii) con homología a los factores de crecimiento o a sus receptores (sis-c, erbB-c); (iv) con una localización nuclear (myc-c, myb-c, fos-c) (9,168-171,173).

Sitios Frágiles

Hasta hace algún tiempo, poco se sabía acerca de porque se presentan defectos cromosómicos específicos en el cáncer. Actualmente se sugiere que los oncogenes y algunos genes muy activos de células diferenciadas estén localizados en o cerca de sitios frágiles en donde agentes carcinógenos podrían actuar y en donde factiblemente los cromosomas se rompen y rearreglan en el cáncer. Algunos de estos rearreglos cromosómicos pueden proveer a la célula de una ventaja proliferativa. Otros pueden repetirse preferencialmente y caracterizar una enfermedad determinada (26).

Recientemente Yunis encontró 96 sitios frágiles constitutivos (fra-c) localizados en cromosomas homólogos en puntos precisos del genoma humano y primate (figura 3.3). Estos sitios son expresados como un cromosoma roto o abierto cuando las células son cultivadas en medios deficientes en ácido fólico (vitamina B) y timidina o cuando las células cultivadas en medio estandar son expuestas a un inhibidor de la enzima timidilato sintetasa, como la fluorodesoxiuridina (FdU). Su manifestación es dramáticamente exaltada cuando las células son expuestas a 2.5 mM de cafeína (un inhibidor de la reparación del ADN y mutágeno exaltador) durante las últimas 6 horas de cultivo. Los fra-c son expresados homocigotamente en todos los individuos en al menos 3% de las células expuestas a FdU y cafeína. Treinta y tres de los fra-c mapean en o cerca de los puntos de ruptura encontrados en 38 de 41 defectos cromosómicos estructurales específicos conocidos hasta ahora en cáncer incluyendo 6 en tumores sólidos

(figura 2.4) (26,27,67). Además es posible una asociación similar de sitios frágiles con los locus de 9 de 21 proto-oncogenes mapeados y de 4 de 7 genes celulares específicos, de estos 6 están asociados con varias malignidades (figura 2.4) (26).

La mayoría de los fra-c aparentan estar localizados en la unión de las bandas Giemsa positivas y Giemsa negativas o en las bandas Giemsa negativas cerca de la unión. Puesto que previamente se había encontrado que la mayoría de los genes estructurales en humanos y primates están localizados en las bandas Giemsa negativas, y que las bandas Giemsa positivas son ricas en ADN repetitivo (rico en adenina-timina (A-T)), es posible que la mayoría de los sitios frágiles representen una clase de secuencias ricas en timina, evolutivamente conservadas, que son particularmente sensibles a la carencia de timina. También se han puesto de manifiesto sitios frágiles con afidicolina, una sustancia conocida como inhibidora de la alfa-polimerasa (26,174). En este caso, la exposición de los cultivos celulares a timidina puede parcialmente prevenir la expresión de sitios inducidos por afidicolina. Aún más importante es el hecho que se haya encontrado que los carcinógenos como la radiación gamma y varios tipos de mutágenos químicos, tales como el busulfán y la citarabina, rompen los cromosomas en sitios frágiles. Además, cuando a las células expuestas a FdU-cafeína, afidicolina u otros mutágenos, se les ha permitido que lleguen a una segunda división celular se han observado algunos de los defectos estructurales específicos encontrados en cáncer (figura

2.4). De esta manera parece que la vía metabólica de la enzima ácido fólico-timidina representa un punto de convergencia donde ciertos carcinógenos, oncogenes y algunos factores de la dieta pueden interactuar (26).

En un estudio preliminar de pacientes con leucemia y linfoma con una anomalía cromosómica clonal específica en sus células malignas, se encontró (i) una elevada expresión (14% y 14.5%) del fra-c (7q31.2) en las células sanguíneas normales de dos de los pacientes con LNLA y delección (7q31q36.1); (ii) una elevada expresión de fra-c (8q22.1) (10.5%) en las células sanguíneas normales de un paciente con LNLA y t (8;21)(q22.1;q22.3). Si estos resultados se confirman, sugerirán que algunos individuos tienen una expresión mayor a la normal de un fra-c específico que puede servir como factor predisponente a ciertas malignidades (26).

Además de los fra-c, se han identificado sitios frágiles cromosómicos heredables (fra-h) (175). Estos sitios usualmente tienen expresión heterocigota como una abertura (gap), ruptura o desplazamiento de un segmento cromosómico en un sitio específico. Son encontrados con frecuencia menor de 0.2% en la población general y son heredados en forma mendeliana codominante. Excepto para 10q25.2; 16q22.1 y 17p12, la expresión de estos sitios también está relacionada con la inhibición de la timidilato sintetasa como resultado de carencia de timidina. Como los fra-c, son expresados por células en cultivo en medio carente de ácido fólico y timidina o por células expuestas a un inhibidor de la

timidilato sintetasa tal como FdU. Sin embargo, sin cafeina, un fra-h es expresado en 10 a 60% de las células, mientras que la mayoría de los fra-c, sin cafeina, son expresados en menos del 1% de las células. Es notable el hallazgo de cuatro fra-h (9q32,10q25.2,11q23.3 y 16q22.1) en la misma banda o subbanda que un fra-c, lo cual sugiere que una fra-h puede ser una mutación de un fra-c que es altamente expresado heterocigotamente (176).

También se ha observado que tres fra-h (11q13.3,12q13.1 y 16q22.1) coinciden con el punto de ruptura de tres translocaciones específicas, una inversión y una delección presentes en leucemias y linfomas no-Hodgkin. Una observación sugestiva es el descubrimiento de un sitio frágil heredable 16q22 en las células sanguíneas normales de dos pacientes con una inversión 16 (inv(16)(p13.1;q32.3)) y linfoma pequeño de células linfocíticas. Se requieren más estudios en los que se demuestren estables estas relaciones para determinar si los sitios frágiles son un factor predisponente en algunos cánceres y porque algunos individuos y familias tienen una mayor incidencia de la malignidad (26,177).

Con estos primeros estudios se fundamenta la hipótesis de que los sitios frágiles residen en una región única específica rica en timina, la cual puede incluir ciertos proto-oncogenes y genes activos de la diferenciación celular. Pueden representar sitios donde el ADN fácilmente puede ser desenrollado para rápida transcripción y ser susceptibles de agresión por varios agentes carcinógenos y por la carencia de timidina. Debido a esto, los sitios frágiles pueden tener una función directa en la

desregulación de un proto-oncogén, como serían las translocaciones e inversiones específicas en cánceres humanos. Alternativamente, pueden servir como sitios de ruptura para deleciones o recombinación somática (26).

En el caso de una translocación o inversión, un sitio frágil puede ser parte o estar próximo a un proto-oncogén y el segundo sitio frágil puede ser parte o estar próximo a una secuencia reguladora de genes celulares específicos que transforman el proto-oncogén en oncogen. En el caso de una deleción, dos genes no oncogénicos pueden servir de base para la ruptura y reunión de segmentos cromosómicos con pérdida de una secuencia de intervención del ADN, que incluye una secuencia crítica (26).

2.6 HALLAZGOS CITOGENETICOS EN LEUCEMIA INFORMADOS EN LA LITERATURA

2.6.1 Metodología y nomenclatura generales

El estudio citogenético de las leucemias se realiza en un aspirado de médula ósea que se procesa inmediatamente o se cultiva por 24-72 horas (9,178). En pacientes con un conteo de células blancas mayor de 15,500 con aproximadamente 10% de células mieloides inmaduras, puede cultivarse una muestra de sangre periférica durante 24-72 horas sin adicionar fitohemaglutinina (FHA). El cariotipo de las células en división será similar al obtenido de la médula ósea (24).

Los cromosomas obtenidos de células de médula ósea de pacientes con leucemia, frecuentemente no están bien definidos y en ocasiones las bandas son indistinguibles. Estos problemas pueden ser resueltos con las nuevas técnicas de bandeado de alta resolución que proveen células con cromosomas elongados con un mayor número de bandas que permiten detectar anomalías que pasarían desapercibidas por los métodos habituales (25). En pacientes con aberraciones cromosómicas complejas se requieren múltiples técnicas de tinción para la correcta identificación de los cromosomas implicados en los rearrreglos y para una definición más exacta de las bandas cromosómicas afectadas (15-22,179). El material sobrante puede almacenarse congelado y aún doce años después pueden obtenerse preparaciones para bandeado con quinacrina (24).

La observación de al menos dos células "pseudodiploides" o

La observación de al menos dos células "pseudodiploides" o hiperdiploides, o tres células hipodiploides exhibiendo la misma alteración, evidencia la existencia de una clona anormal. Los pacientes cuyas células no muestran alteraciones o en quienes las alteraciones no son constantes son considerados normales. Los cambios aislados pueden deberse a artefactos técnicos o, a errores mitóticos al azar (24).

Comúnmente se utiliza la Nomenclatura de Paris para la anotación de cariotipos (180,181). En primer lugar se indica el número total de cromosomas, seguido por los cromosomas sexuales y después los rearrreglos de los autosomas. Las letras "p" y "q" se refieren a los brazos cortos y largos del cromosoma respectivamente. Un signo más (+) o un signo menos (-) antes de un número indica ganancia o pérdida de un cromosoma completo; un signo más o menos, después de un número indica ganancia o pérdida parcial de un cromosoma. Las translocaciones son identificadas por "t" seguida por los cromosomas implicados en el primer paréntesis; las bandas del cromosoma en las que ocurrieron las rupturas son indicadas en el segundo paréntesis. Se indica brazo, "p" o "q", número de región, banda y subbanda. La incertidumbre respecto al cromosoma o banda implicados es denotada por un signo de interrogación (?). Otras anomalías estructurales se designan con "i": isocromosoma; "r": cromosoma en anillo; "mar": marcador; "del": deleción; "ins": inserción; "inv": inversión; "dup": duplicación; "der": derivado.

2.6.2 Leucemia granulocítica crónica

Generalidades sobre Leucemia Granulocítica Crónica

Los estudios citogenéticos en pacientes con leucemia granulocítica crónica (LGC) han sido la clave para el análisis cariotípico de otras malignidades hematológicas y muchos tumores sólidos (24).

En 1960, Nowell y Hungerford, reportan la primera anomalía cromosómica estable en cáncer humano al observar un cromosoma del grupo B muy pequeño en células leucémicas de dos pacientes con LGC (8). Este cromosoma, que aparentaba haber perdido aproximadamente la mitad de sus brazos largos fue llamado cromosoma Filadelfia-1 (Ph1) aún cuando no se sabía si se trataba de un cromosoma 21 o 22, o si había ocurrido una translocación o una deleción. Esta fué la primera aberración cromosómica asociada con una malignidad humana con importancia pronóstica y diagnóstica (24).

Casperson y cols y O'Riordan y cols reportaron independientemente que el cromosoma Ph1 correspondía a un 22q (15,182) y posteriormente Rowley demostró que en la mayoría de los casos se trataba de una translocación recíproca balanceada entre los cromosomas 9 y 22 (t(9;22)(q34.1;q11.21)) (183) (figura 2.5). Mediciones del contenido de ADN han demostrado que no hay pérdida detectable de ADN en este rearrreglo cromosómico y que la cantidad extra de ADN del 9 es igual a la perdida por el Ph1. La naturaleza recíproca de la translocación fue establecida al

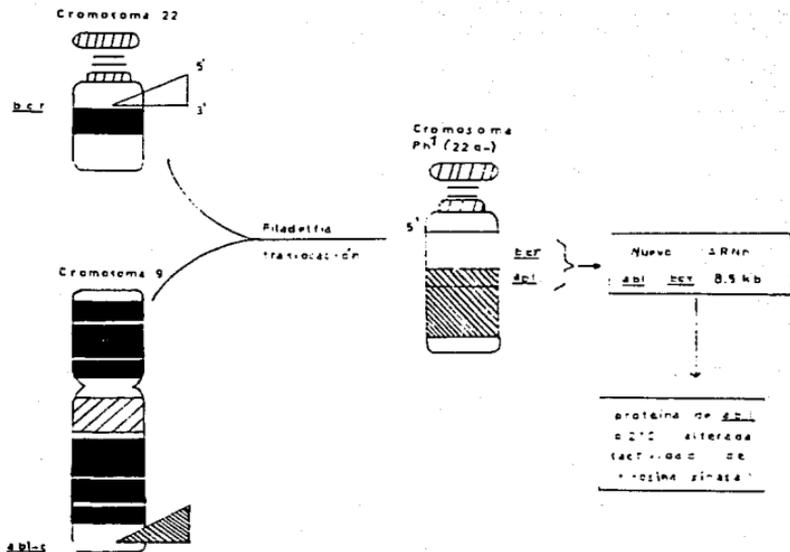


FIGURA 2.5 La translocación Filadelfia en Leucemia Granulocítica Crónica es definida molecularmente por un arreglo de secuencias de la terminación 5' *bcr* y *abl*-c en el cromosoma Ph1. Esta recombinación permite la transcripción de una especie híbrida de 8.5kb *abl*/*bcr* que codifica una proteína de *abl*-c alterada con nuevas propiedades biológicas.

identificar que el oncogén Abelson, *abl-c*, que normalmente se ubica en el cromosoma 9, se encuentra en el cromosoma Phi1, adyacente a la región bcr (breakpoint cluster region) (26,184). Estudios con polimorfismos cromosómicos han demostrado que en un paciente particular, siempre están involucrados los mismos cromosomas 9 y 22 (185). Estas observaciones corroboran el origen monoclonal de las células leucémicas, como se había indicado previamente por los estudios con marcadores enzimáticos (11,24,26,186).

El cromosoma Phi1, se presenta en la línea celular maligna del 94% de pacientes con LGC típica (LGC Phi1 +) y en casi todas las líneas de células progenitoras en división. En estos pacientes sólo la progenie madura de la línea granulocítica está aumentada, por lo que al ser diagnosticados presentan un conteo leucocitario de hasta 100,000 células/mm³, el recuento plaquetario es normal o elevado, presentando ligera anemia y el bazo moderadamente agrandado. La diferenciación es relativamente normal aunque no todos los granulocitos están completamente maduros. La respuesta a la radiación o quimioterapia va de buena a excelente y el tiempo promedio de sobrevivencia al diagnóstico es de aproximadamente 40 meses (23,173).

En una revisión reciente en 1129 pacientes Filadelfia positivo, la translocación(9;22) fue identificada en 1036 (92%) con técnicas de bandeado, sin embargo, 88 casos (8%) mostraron un rearrreglo cromosómico complejo y en 5 de ellos parecería no existir la translocación (9;22). Estas variantes se consideraban

de dos tipos; una translocación simple involucrando un 22 y algún otro cromosoma diferente al 9 (42 pacientes) o bien una translocación compleja implicando tres o más cromosomas diferentes, dos de los cuales eran el 9 y el 22 (46 pacientes) (13). Sin embargo el empleo de bandas de alta resolución y pruebas moleculares indican que este concepto es erróneo y que un cromosoma 9 está invariablemente involucrado en estas translocaciones, haciéndolas a todas equivalentes a translocaciones variantes complejas. Por consiguiente no es sorprendente que los pacientes con translocación variante presenten una sobrevivencia similar a aquellos con t(9;22) (12,24,26,64,187-198). En las translocaciones complejas es el ADN del tercer cromosoma el que generalmente se transloca al 9, la porción terminal del 9 al 22 y el segmento del 22 al tercer cromosoma (199,200). Verma et al reportan cuatro tipos de cromosomas Phi: tipo I muy largo, t(12;22) (p13;q13.3); tipo II largo, t(1;22) (q23;q13.1); tipo III promedio, t(9;22) (q34;q12); tipo IV pequeño, t(9;22) (q34;q11.3) (201). Es muy factible que los tipos I y II sean translocaciones variantes complejas. Todos los cromosomas pueden participar en estas translocaciones variantes, sin embargo, el 17 se afecta con más frecuencia (200).

Previamente se consideraba que 8 a 15% de LGC eran Phi negativo incluso en estos pacientes se establecieron características clínicas: leucocitosis menor de 100,000 cel./mm³, severa trombocitopenia, anemia pronunciada, un menor grado de esplenomegalia y un alto porcentaje de mieloblastos en médula y

sangre periférica. Se observó que la mayoría de estos pacientes respondían pobremente a la terapia, desarrollaban la fase blástica antes que los pacientes Phi positivo y su sobrevivencia promedio era de sólo 10 a 20 meses. La edad promedio a la que se presentaba era más alta, muy rara en niños de 1 a 3 años (tipo juvenil) y con un pronóstico pobre particularmente si se combinaba con otras alteraciones cromosómicas (23,173,202-204). Actualmente se considera que sólo el 6% de los pacientes con LGC son Phi- , puesto que evidencias clínicas, hematológicas y citogenéticas, sugieren que la LGC Phi- es una mezcla heterogénea de desórdenes, y que algunos pacientes probablemente tengan enfermedades mieloproliferativas relacionadas (205). En otros casos se ha sugerido un cromosoma Phi no descubierto o "enmascarado". Una translocación que no compromete al 22 raramente ocurre en LGC. Por ejemplo, el análisis cromosómico de un paciente con LGC reveló una t(9;22) sin un Phi detectable, el estudio molecular de este caso demostró un rearrreglo en la región bcr del cromosoma 22 y la unión de las secuencias bcr y el oncogén abl-c en el cromosoma 12 derivado. En estos casos el uso de una prueba del rearrreglo abl-c/bcr puede ser útil en el diagnóstico y clasificación de la enfermedad. Otros casos de LGC Phi negativo resultaron formas incipientes de LGC Phi positivo o bien presentaron citología atípica, representando casos de LNLA-M2 con t(6;9) (p22.2;q34), la cual, como la LGC, a menudo es acompañada por basofilia e implica un rearrreglo del oncogén abl-c (26,64,65,200,202,203,205-210).

La gran especificidad de la translocación (9;22) sigue

siendo un enigma. Resulta paradójico que la presencia del Filadelfia en enfermos con LGC confiera un pronóstico significativamente más favorable (42 meses de supervivencia media versus 15 meses) con respecto a los enfermos LGC Phi negativo particularmente se considera que: (i) las curvas de supervivencia para pacientes con translocaciones variantes son semejantes a las de aquellos con la translocación (9;22); (ii) que los pacientes con algunas células normales tienen mejor pronóstico que los que presentan el 100% de células Phi positivo; y (iii) que cuando se intenta reducir la proporción de células Phi positivo, los pacientes que responden presentan una supervivencia mayor al promedio (12,24,202,211).

Aproximadamente 30% de los pacientes con LGC presentan además del Phi, otras anomalías cromosómicas (13,212). En la fase crónica, 9% pueden presentar otras alteraciones tales como un B supernumerario, i(17q), un segundo Phi y pérdida del cromosoma Y. Estos cambios son idénticos a los observados en la fase aguda de LGC. La presencia de una segunda translocación dificulta la distinción de la translocación clásica (9;22) de una translocación variante. Un segundo cromosoma Phi resulta de la duplicación del cromosoma 22q- original y no de una segunda translocación. El origen del i(17q) tal vez sea la ruptura de brazos cortos seguida por la unión de dos cromátidas que contienen centrómeros, la supresión precoz de un centrómero ocurre por un mecanismo irreversible, permitiendo la transferencia del isocromosoma de célula a célula en la clona

neoplásica. La presencia de una anomalía adicional detectada al tiempo del diagnóstico de la fase crónica no parece llevar un pronóstico sustancialmente más pobre que el del patrón Phi positivo (24,29,213-215).

La frecuencia de -Y en varones varía considerablemente y no se ha podido establecer una correlación con la supervivencia. Verma et al sugieren que la pérdida del cromosoma Y en los pacientes puede ser un fenómeno de envejecimiento normal (216). Sin embargo existe la posibilidad de que la pérdida del Y sea un defecto básico en hombres de edad madura con un desorden hematológico. Sonta y cols (196), aseveran que la posición del cromosoma Y durante la metafase no influye en su pérdida de las células de médula ósea.

Fase Aguda de la Leucemia Granulocítica Crónica

La mayoría de los pacientes con LGC (80%) al entrar en fase aguda terminal o fase blástica, muestran anomalías cromosómicas adicionales que originan células con números cromosómicos modales de 47 a 50, esto se presenta tanto en células Phi-positivo como en células con translocaciones variantes complejas y en células Phi negativo (24,188,217). Estos cambios cromosómicos pueden preceder en 2 a 4 meses a la aparición de signos clínicos y se presentan diferentes cromosomas anormales en un patrón claramente aleatorio.

Comúnmente se observa un segundo Phi, un isocromosoma de brazos largos del 17 (i(17q) o una trisomía 8, en orden descendente de frecuencia. Cuando se presenta más de un cambio, usualmente son un cromosoma 8 extra e i(17q). Las trisomías 8 y 17 nunca se observaron como únicos cambios. Por otra parte, cuando existe un segundo Phi se ha encontrado acompañado de +8 e i(17q) o de +8 y +17 (2.3%), (24,27).

La pérdida de cromosomas es rara y en general se trata de monosomía 7 en sólo 3% de los enfermos. También pueden haber la pérdida de un cromosoma sexual y puede correlacionarse con síntomas clínicos y hematológicos específicos (24,27). Los cambios cromosómicos secundarios reflejan una evolución intraclonal, por lo que la fase blástica se puede interpretar como una segunda o secuencial alteración genética que implica la selección de una sola célula clonogénica en la que la proliferación está desacoplada de la maduración. Si la célula clonogénica se diferencia hacia la línea de células B, la fase aguda o crisis blástica semeja LLA común o pre B. Alternativamente, si se trata de un progenitor granulocítico, entonces parecerá LMA. Por otra parte, en los pacientes que presentan clínicamente leucemia aguda Phi positivo sin una fase crónica previa, se asume que se saltó el primer evento selectivo o que los dos eventos ocurrieron como una sucesión rápida durante la fase preclínica (9).

Solamente se han publicado tres informes que relacionan

cambios cromosómicos específicos en la fase aguda de la sobrevivencia de los pacientes y los resultados son discordantes. Prigogina y cols., encontraron que los pacientes sin alteraciones cromosómicas adicionales en la fase aguda tuvieron una sobrevivencia mayor que aquellos cuyos cariotipos mostraron tales cambios (218). Sin embargo, Sonta y Sandberg y Alimena et al, no encontraron diferencias entre estos dos grupos (219,220). Alimena y cols, reportan una sobrevivencia considerablemente mayor en pacientes con morfología granular diferenciada o de blastos linfoides y un Phi como única anomalía; la presencia de i(17q) parecería relacionada con basofilia (220). Sadamori y cols (349), han señalado que pacientes con LGC en fase aguda con 48 o más cromosomas en todas sus células de médula ósea tienen una supervivencia marcadamente corta, 25 días (221).

El número limitado de defectos cromosómicos adicionales durante la crisis blástica indica que tales cromosomas pueden llevar genes que confieran ventajas proliferativas y hacer a los pacientes resistentes a tratamientos comunes (26). Tal es el caso de un paciente con LGC Phi positivo que exhibía trisomía 8 e isocromosoma (17q) en las células blásticas y en el que observó amplificación del gen myc-c durante la transformación promielocítica (173). Asimismo el pronóstico puede empeorar por la presencia de dos cromosomas Phi durante la fase aguda, aunque no es un evento determinante(126). Sin embargo cuando sólo hay un Phi los rearrreglos abl/bcr detectados en las fases, crónica y aguda, son idénticos (222).

La discrepancia entre los datos con respecto al significado pronóstico de los cambios cariotípicos particulares en la fase aguda se ha dado porque estos pueden ser modificados por factores genéticos, geográficos y por la quimioterapia aplicada. De ahí la importancia de realizar análisis citogenéticos seriados durante el curso de la enfermedad en combinación con determinación del fenotipo inmunológico y de marcadores enzimáticos, para poder establecer la terapia individual más adecuada en cada una de las fases (24,217).

El Cromosoma Filadelfia como un Marcador Biológico

El cromosoma Phi es una anomalía postcigótica que únicamente se presenta en el sistema hematopoyético. Aunque es más frecuente en la LGC, los pacientes con LMA (5-10%) y con LLA (25% de adultos y 10% de niños) pueden presentar esta anomalía. Se ha encontrado también en casos de leucemia mielógena subaguda, en algunos estados preleucémicos como policitemia vera, en eritroleucemia, en trombocitemia y en osteomielofibrosis (23,64,223,224-230).

Los primeros casos de leucemia aguda con cromosoma Phi+ fueron clasificados como LGC con transformación blastoide pero actualmente se consideran como leucemias agudas Phi positivo. La interrelación entre las diferentes formas de leucemia Phi positivo es compleja. Aunque el cromosoma Phi es usado como el

marcador que define estas leucemias, los estudios citogenéticos a menudo han sido inadecuados y la distinción entre algunas formas generalmente ha sido determinada por el juicio arbitrario del investigador (44), (tabla 2.8). La mayor disponibilidad de marcadores citoquímicos especiales y de anticuerpos monoclonales como determinantes de la superficie celular resultará en una identificación más precisa y objetiva de los tipos celulares que están afectados (12,202).

Oncogenes en la Leucemia Granulocítica Crónica

Debido a la gran concordancia entre la t(9;22) y la LGC, es probable que el intercambio de ADN entre estos cromosomas tenga una función central en la patogénesis de la enfermedad (231). Esta posibilidad fue consolidada al mapear a dos proto-oncogenes celulares, el *abl-c* en 9(q34.1) y el *sis-c* en 22(q11-qter). Estos proto-oncogenes *abl-c* y *sis-c* son genes celulares normales, homólogos a los genes transformantes del virus de leucemia murina de Abelson y del virus del sarcoma de simio respectivamente. Después de mapearlos se demostró su translocación recíproca. El intercambio siempre ocurre en la misma banda (q34.1 en el cromosoma 9 y q11.21 en el cromosoma 22) produciendo el cromosoma 9q+ y el Phi (64,232,233). El oncogén *sis-c* no se altera, sin embargo, se ha establecido un rearrreglo del oncogén *abl-c* en el cromosoma Phi (65,210,233,234).

En la t(9;22) el punto de ruptura en el cromosoma 9 ocurre a

**TABLA 2.B ALGUNOS PUNTOS DE DIFERENCIACION ENTRE LEUCEMIA AGUDA
 FILADELFIA POSITIVO Y LA CRISIS BLASTICA DE LGC
 (23,196,223).**

L G C	L M A
Usualmente 100% Phi (+).	Usualmente una mezcla de células Phi (+) y normales.
No es raro más de un Phi.	Raro más de un Phi
Cuerpos de Auer son muy raros.	Cuerpos de Auer comunes.
Otros cambios cariotípicos en menos del 10% de f. crónica, comunes en f. blástica.	No raros otros cambios cariotípicos.
Raro regreso de la médula ósea a un cuadro cariotípico normal después de la terapia.	No es extraordinario el regreso de la médula ósea a la normalidad citogenética.
Respuesta a la terapia más bien pobre; corta remisión.	Respuesta a la terapia moderadamente buena; remisión relativamente larga.
Común cierta basofilia y/o eosinofilia en médula ósea.	Relativamente rara basofilia y/o eosinofilia en médula ósea.
i(17q) común en fase blástica.	i(17) raro en LMA.
+19 no extraordinario.	+19 muy raro.
Hipodiploidia rara (menos de 5%).	Hipodiploidia común.
-7, 5q- raros.	-7, 5q- comunes.
Común organomegalia.	Rara organomegalia.
Marcadores celulares a menudo indican componentes "linfoides", sin embargo, tales células pueden ser Phi(-).	LMA no presenta componentes linfoides.

una distancia variable hasta de 150 pares de kilobases por arriba del primer exón del extremo 5' de abl-c. En contraste, las rupturas en el cromosoma 22 están restringidas a una región de 5.8 pares de kilobases que se denota como bcr por sus iniciales en inglés "breakpoint cluster region". La región bcr es parte de un gen codificador de proteína (aunque no se sabe su función normal) de aproximadamente 45 pares de kilobases (235). Este gen no muestra homología con los genes de las regiones constantes de las cadenas ligeras lambda de inmunoglobulinas (CL) los cuales se han mapeado en el cromosoma 22 (64,209,232,235-237).

Las células hematopoyéticas y no hematopoyéticas normales contienen transcritos de abl-c de 6 y 7 kilobases, mientras que las células de LBC contienen además un nuevo transcrito de 8.7 kilobases, parece probable que el nuevo ARNm derive de un gen quimérico del cromosoma Ph1 (65,236,238,239). La porción 5' de este gen quimérico se compone de secuencias del gen bcr. El punto de ruptura en el gen bcr ocurre en un intrón adyacente a los exones 2 o 3 de la región bcr. La información genética del cromosoma 9 incluyendo el gen abl-c completo está unida al gen bcr truncado. Raramente el punto de ruptura en el cromosoma 9 ocurre en un intrón después de los exones 1 o 2 de abl-c, en este caso sólo los 9 o 10 exones restantes de abl-c estarán unidos al gen bcr truncado. En la mayoría de los casos, el transcrito primario de esta región del cromosoma Ph1 contiene los exones e intrones restantes del gen bcr, ADN no codificante del cromosoma 9 y los once exones e intrones de abl-c. Por

procesamiento de este ARN el exón 2 o 3 de la región bcr se une al exón 2 de abl-c; el exón 1 de abl-c es excluido del transcrito quimérico debido a que pierde el sitio de empalme (aceptor) que le permitiría combinarse con el sitio de empalme (receptor) del exón 2 o 3 de bcr. Es interesante, que el transcrito quimérico bcr/abl contiene un codón quimérico; el primer nucleótido es dado por bcr y el segundo y tercero por abl-c, esto origina una unión precisa entre los genes bcr y abl por lo que son leídos en fase (173,207,240).

Recientemente se ha descrito una proteína de 210 kilodaltons relacionada con abl-c (P210-abl-c) en células K562 que contienen el cromosoma Phi y en células de pacientes con LGC Phi positivo (65,232,241). Esta proteína (P210-abl-c) es considerablemente mayor que la proteína humana normal de 145 kilodaltons (P145-abl-c). La proteína P210-abl-c tiene actividad de tirosina fosfocinasa la cual es difícil detectar en el homólogo P145-abl-c normal. Las proteínas asociadas con abl-c codificadas normal y viralmente en ratón y las proteínas normales y las relacionadas con LGC en humanos muestran analogías. La proteína P210-abl-c es codificada por el transcrito híbrido bcr/abl de 8.7 kilobases. El polipéptido codificado por el gen del virus de Abelson y el polipéptido codificado por bcr/abl en LGC presentan una sustitución N-terminal, lo que quizá sea el evento crítico que convierte a abl-c en un oncogén activo posiblemente confiriéndole la actividad de tirosina fosfocinasa. Esta actividad parece ser específica, el gen bcr/abl-c es más efectivo en células mieloides

transformante, mientras que abl-v preferencialmente transforma células linfoides B tempranas (64,232,241,242).

En los pacientes LGC Phi negativo los resultados son aún contradictorios, en algunos casos las anomalías moleculares se asemejan a las de la LGC Phi positivo, mientras que en otros no. Drezzen y cols demostraron en 10 pacientes con LGC Phi negativo, rearrreglos genómicos internos en bcr mediante estudios de hibridización in situ con cromosomas marcados radiactivamente, los autores encontraron un alelo del proto-oncogén abl-c translocado del cromosoma 9 al 22, como en la LGC Phi positivo, sin embargo, no hubo evidencia de translocación recíproca involucrando la porción 3' del gen bcr como lo demuestra la presencia de sis-c en el cromosoma 22. En algunos casos de LGC Phi negativo se presenta una inserción intersticial de una secuencia pequeña del cromosoma 9 en la región bcr del cromosoma 22. Las diferencias entre LGC Phi positivo y negativo y su heterogeneidad pueden estar dadas por la expresión anormal de bcr/abl-c (243). Por otra parte, en algunos pacientes con LGC Phi positivo, el punto de ruptura en el cromosoma 22 se encuentra fuera de la región bcr, por lo que se sugieren diferentes eventos moleculares para la formación del cromosoma Phi que originan el mismo fenotipo mielóide (244).

Si bien abl-c puede estar implicado en la patogénesis de LGC, tal vez no sea el evento primario para su desarrollo. Existen datos polémicos que sugieren que la adquisición del

cromosoma Phi no es la alteración inicial, estas observaciones son compatibles con el modelo que señala que la anomalía inicial es el crecimiento clonal de las células madres mieloides con marcada ventaja proliferativa seguida por la adquisición del cromosoma Phi, expansión del compartimiento de células madre mieloides y finalmente por la aparición de las manifestaciones clínicas de leucemia (tabla 2.1.). En contraste, los datos de los sobrevivientes de las explosiones de la bomba atómica que han desarrollado LGC sugieren que el cromosoma Phi puede ser la anomalía inicial de la enfermedad (26,52,227). Se ha sugerido que la evolución de la LGC desde la fase crónica a la fase aguda, esté probablemente regulado vía secuencias bcr/abl (202). Collins, et al (369) señalaron que la amplificación genómica del oncogén abl-c debida al surgimiento de cromosomas Phi extras, tal vez sea importante en algunos casos en la evolución de LGC, sin embargo no es el único evento genético que daría origen a la crisis blástica (245). Esto se confirma con el hallazgo de Shtivelman y cols que la cantidad de ARNm quimérico en las células leucémicas varía considerablemente entre los individuos y no se correlaciona con la fase de la enfermedad (222).

El proto-oncogén sis-c aparentemente no está involucrado en la patogénesis de LGC ya que al translocarse puede hacerlo a otros cromosomas además del 9, no existiendo rearrreglos en su ADN. Por otra parte, generalmente no se detecta en estas células leucémicas ARN relacionado a sis-c. No obstante, se ha observado que una pequeña población de células leucémicas puede expresar sis-c, por lo que algunos investigadores le conceden una función

central ya que el producto de este gen es idéntico a la cadena B del factor de crecimiento plaquetario, una glicoproteína de 28 kilodaltons producida por megacariocitos y células mesenquimatosas. Este factor estimula células madre hematopoyéticas, el microambiente hematopoyético y la producción de colágeno por fibroblastos lo que podría explicar la mielofibrosis en algunos pacientes con LGC (64).

Se ha reportado la activación de otros oncogenes celulares en pacientes con LGC, uno de la familia ras (N-ras) y el myc-c. N-ras se ha encontrado activado en 10 a 15% de casos con LGC, al parecer su activación se debe a una mutación en el codón 13 produciendo un cambio de glicina por valina o asparagina. Este gen produce una proteína de 21 kd (246-249). De esta manera se deduce que en algunos casos serían varios los oncogenes involucrados en la patogénesis de la LGC (64).

2.6.3 Leucemia no linfocítica aguda

Existen varios estudios que demuestran la importancia pronóstica de alteraciones cromosómicas características de subgrupos de Leucemia no Linfocítica Aguda (LNLA), por lo que se consideran indicadores confiables que permiten seleccionar el tipo específico de terapia (12,23,24,26). Según algunos autores, con las técnicas de bandeado estándar 85% de las muestras pueden ser

fácilmente analizadas con una resolución de 150 a 320 bandas por serie haploide. Esto ha permitido detectar anomalías cromosómicas clonales en aproximadamente el 50% de pacientes con LNLA (12,13,23), lo que contrasta con los resultados obtenidos por Yunis y cols, quienes con análisis cromosómico de alta resolución de células sincronizadas con ametopterina (metotrexate) logran analizar adecuadamente un 94% de las muestras. El elongamiento de los cromosomas permite detectar entre 400 a 850 bandas por serie haploide, con lo que este autor determina que el 93% de los pacientes analizados tienen un defecto cromosómico (26,177).

La identificación de clonas citogenéticamente anormales durante el diagnóstico inicial y en su evolución ha permitido una correlación con el curso clínico del padecimiento, respuesta a la quimioterapia y con la sobrevivencia (177,249,250). Los pacientes que sólo tienen metafases normales (NN) presentan un porcentaje más alto de remisión completa y mayor tiempo de vida comparado con pacientes con quienes solamente se observan clonas anormales (AA). Los pacientes con una clona anormal y metafases normales (AN) presentan un curso clínico intermedio. No existen tales diferencias en pacientes con leucemia mielomonocítica o monocítica (M4 o M5). Es probable que en pacientes AA el factor desfavorable sea la pérdida de células citogenéticamente normales y no la presencia de células aneuploides. Golomb sugirió que las células citogenéticamente normales pueden representar células madre normales que son requeridas para repoblar la médula después de que las células leucémicas han sido destruidas por

quimioterapia (251).

Generalmente, en LNLA las alteraciones cariotípicas están presentes al inicio del padecimiento y desaparecen cuando el paciente entra en remisión. La misma aberración reaparece en la recaída, a veces con cambios cariotípicos adicionales a la clona anormal original. Se cree que la aparición de estos cambios cromosómicos secundarios y la inestabilidad cariotípica se incrementa con la edad. Un estudio seriado permitió observar cambios cromosómicos al azar en aproximadamente 28% de los casos, el cambio más frecuente durante la evolución fue la ganancia de uno o más cromosomas (+8 en 59% de los casos y en ocasiones un +18) también pueden ocurrir rearrreglos estructurales. La incidencia, tipo y frecuencia de cambios evolutivos específicos fue similar en pacientes con o sin anomalías iniciales. Una vez que la evolución cariotípica ha ocurrido, la respuesta al tratamiento es pobre y la sobrevivencia media es corta (24,26,178,202,252-254).

En un estudio realizado por Rowley y Testa en 308 pacientes con LNLA cromosómicamente anormales, analizados con técnicas estándar, reportan que 83% (207/248 pacientes) de adultos y 90% (54/60 pacientes) de niños menores de 15 años tuvieron números modales en el rango diploide de 45-47 cromosomas (24). Este predominio en niños, sobre todo varones, también fue demostrado por Bernstein y cols (163). Existen patrones no aleatorios bien definidos principalmente cuando está implicada una única anomalía cromosómica. La trisomía 8 es el cambio numérico más frecuente en LNLA (24.5%), se observa en los subtipos M1, M2, M4, M5, M6 y se

presenta como defecto cromosómico secundario en pacientes después de una recaída. Esta anomalía se origina por no disyunción y la sobre dosis de genes podrían llevar a la expresión aumentada de algún oncogén (24). Los pacientes con LNLA primaria o secundaria y trisomía 8 u otros defectos de este cromosoma frecuentemente tuvieron un estado preleucémico o una intensa exposición a mutágenos; esto es más común en el grupo de edad avanzada, con excepción de eritroleucemia. La trisomía 8 como único defecto indica un pronóstico intermedio con un tiempo de vida promedio de 18 meses (24,116,161,162). Sin embargo, Epstein sugiere que la presencia constitucional de dicha trisomía puede servir como excitador y acelerar la progresión de la malignidad (160).

La pérdida del cromosoma 7 es otro cambio numérico frecuente (11.6%), casi la mitad de estos la manifiestan como única anomalía, la monosomía 7 también se puede presentar durante la evolución del padecimiento. Los pacientes con monosomía 7 son más susceptibles a infecciones y a presentar temperaturas superiores a 39° C, que aquellos con cariotipo normal. Esto se ha relacionado con la observación de que los neutrófilos que han perdido un cromosoma 7 tienen defectos en varias funciones granulocíticas, particularmente en la quimiotaxis. En estos pacientes se observa frecuentemente una fase preleucémica y el pronóstico es malo, pocos de ellos sobreviven a la terapia de inducción y no entran en remisión completa (26,202,216,255-258).

Las ganancias y pérdidas de otros autosomas raramente ocu

rren como única anomalía, dichas anormalidades aparentemente representan eventos secundarios que suceden durante la evolución clonal y no cambios cromosómicos primarios (24).

La pérdida de los cromosomas sexuales, X ó Y, se presenta a menudo asociada con una $t(8;21)$. De los pacientes con monosomía X (3.2%), 62.5% la presentaron asociada a $t(8;21)$ sin que se detectaran otras anomalías. La pérdida del Y se observó en 12%, en 40% de ellos se encontró asociada a la $t(8;21)$ y en 30% la pérdida del Y fue la única anormalidad. Sin embargo el significado de este hallazgo es incierto, ya que la pérdida del Y también se reporta en hombres hematológicamente normales, particularmente en mayores de 60 años. Verma y cols, han sugerido que la pérdida del Y puede representar un fenómeno de envejecimiento normal de las células humanas de médula ósea (216). La edad promedio de los pacientes con LNLA y pérdida aislada del Y es de 62.5 años, mientras que la edad promedio para pacientes con esta anomalía asociada a $t(8;21)$ es de 24 años (24).

La mayor frecuencia de cambios estructurales corresponde al cromosoma 17 (16.6%) y puede presentarse como única anomalía (56.4%) o asociada a otros defectos. Le siguen en frecuencia las anomalías de los cromosomas 8, 16 o 21 y en la mayoría de los casos constituyen cambios únicos. La $t(15;17)$ se presentó en 10.7% de los pacientes, más de dos tercios la tuvieron como único cambio; la $t(8;21)$ se observó en 8.6%, de los que una cuarta parte la presentaron en forma aislada y poco más de la mitad

asociada con pérdida de un X ó Y (24).

Translocación (8;21) en Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)
con Maduración (M-2)

En 1968, Kamada y cols (201) reconocieron que un subgrupo de pacientes con LNLA se caracterizaba por una translocación entre un cromosoma del grupo C y uno del G (220). Rowley la identificó con la técnica de bandas Q como una translocación balanceada entre los cromosomas B y 21 ($t(8;21)(q22;q22)$) (183). La frecuencia de esta translocación varía de un laboratorio a otro y va de 30 a 3% (24,212,260). La variación en la frecuencia es ocasionada por factores de tipo metodológico. La aberración se presenta sólo en monocitos y células granulocíticas, en cambio los eritroblastos son normales, por lo que al cultivar la médula ósea la frecuencia se incrementa ya que las células leucémicas tienen más posibilidades de división (261). En la revisión realizada por Rowley y Testa la $t(8;21)$ fue encontrada como la anomalía más frecuente en niños con LNLA, siendo reportada en 17% (10 de 60) de los casos con cariotipo anormal (24).

Inicialmente, la alteración parecía estar restringida a pacientes con un diagnóstico de M-2 de acuerdo a la clasificación de la FAB (60,262). Sin embargo, 7% (3 de 44) de los pacientes con $t(8;21)$ analizados durante el Cuarto Taller Internacional de Cromosomas en Leucemia (TICL), presentaron un diagnóstico de M-4 (260). Prigogina y cols. reportaron 20 pacientes con la translocación y M-2, cuatro con M-1 y tres con M-4. En los

pacientes con M-4 hubo un aumento de células monocíticas además de los mieloblastos (263).

El interés en la translocación (8;21) ha sido por tres razones: (a) los cromosomas 8 y 21 pueden participar en translocaciones complejas, por ejemplo, t(2;8;21) (264), (b) la t(8;21) a menudo se acompaña de la pérdida de un gonosoma (X ó Y): esta asociación es particularmente notable porque las alteraciones aisladas de los cromosomas sexuales son raras en LNLA (24,260,263), (c) Esta translocación puede conferir características ultraestructurales peculiares a los granulocitos y nunca ha sido reportada como una alteración constitucional ni observada en otras enfermedades malignas (265). Los pacientes con esta translocación tienen una sobrevivencia media relativamente larga (11.5 meses) (266) y se ha observado que la remisión y la sobrevivencia son mejores siempre y cuando existan metafases normales (24,234,238).

Translocación (15;17) en Leucemia Promielocítica Aguda M-3

Otro rearrreglo estructural específico es la translocación (15;17)(q22;q12-21) para la leucemia promielocítica aguda (M-3). Se observa en la variante "hipergranular" y en la microgranular e imparte un mal pronóstico (202). Inicialmente se creyó que la anomalía consistía en una delección del cromosoma 17 pero Rowley y cols. en 1977 reconocieron la translocación (268-270).

De 80 pacientes con M-3 incluyendo 7 con la variante

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

microgranular, 33 (41%) tuvieron una t(15;17), en 23 casos (28.7%) esta fue la única anomalía, siete (8.7%) tuvieron otros cambios cromosómicos y cuarenta (50%) presentaron un cariotipo normal (266). En el Cuarto Taller Internacional para estudio de Cromosomas en Leucemia, utilizando metodología más reciente se encontró que cuarenta y tres de sesenta y un pacientes analizados (70%) tenían una t(15;17), en tres de ellos (5%) se encontraron otros cambios y en 15 (25%) el cariotipo fue normal (260). Este rearrreglo no ha sido encontrado en otro tipo de leucemia o en tumores sólidos. La especificidad de la t(15;17), además de ciertas características clínicas son factores que permiten identificar M-3 microgranular y diferenciarla de M-2 (44).

La t(15;17) es de especial interés por diversas razones. La primera es porque está implicada en rearrreglos complejos con los cromosomas 2 y 3. La segunda se relaciona con la controversia acerca de los puntos de ruptura exactos, debido a que las regiones críticas de los cromosomas 15 y 17 tienen un patrón de bandeado semejante y frecuentemente son de mala calidad morfológica. Los puntos de ruptura propuestos por técnicas de alta resolución, con bandas R-, Q- y G durante el Cuarto TICL (204) son 15q22 y 17q12-21 (260), pero según Yunis corresponde a 17(q11.2) (26). Kaneko propone como sitio de ruptura 17(q21.1) el cual fue confirmado al determinar que no hay cambio del oncogén erb-c-B2, por análisis interespecífico de células somáticas híbridas derivadas de un paciente con M-3 (271). En todos los reportes los puntos de ruptura corresponden a regiones

pericentroméricas (44,272).

Otra característica interesante de la M-3 se relaciona con la dificultad en demostrar la translocación (15;17), por lo que se tienen variaciones geográficas en su frecuencia (44). Cuando las células de médula ósea se observan directamente puede no detectarse la anomalía, pero si las células se cultivan 24 horas, esta aparece en 9 a 64% de las metafases (44,273). Berger y cols. han presentado evidencia de que la translocación esta presente solo en mieloblastos y promielocitos, mientras que las células eritroides son normales. Aparentemente, los eritroblastos detienen su división en cultivo permitiendo que solamente las células granulocíticas se dividan (274). Por lo que las variaciones en la frecuencia pueden estar relacionadas con factores técnicos tales como métodos de cultivo (275).

A aberraciones del Cromosoma 16 en Leucemia Mielomonocítica Aguda M-4 asociada a eosinófilos anormales

Las alteraciones estructurales del cromosoma 16 en M-4 se han asociado con eosinófilos morfológica y citoquimicamente anormales. Arthur y Bloomfield en 1983 (220) describieron cinco casos (3 con M-2 y 2 con M-4) cuyos eosinófilos de médula ósea se encontraban significativamente aumentados (8 a 54%); todos los pacientes tuvieron una delección parcial del brazo largo del cromosoma 16 (del (16) (q22)) (276). Le Beau y cols. han estudiado 18 pacientes con leucemia M-4 y eosinófilos morfológicamente anormales, gránulos basofílicos grandes o

irregulares (277). Muchos de estos pacientes no tenían alto porcentaje de eosinófilos en médula, mientras que un tercio presentaban menos de 5% de eosinófilos. Todos los pacientes mostraban una inversión del cromosoma 16, inv (16) (p13;q22) y tres también tenían una del (16) (q22). El punto de ruptura en el brazo largo para la delección y la inversión del cromosoma 16 es el mismo (q22) (277). La correlación entre los eosinófilos anormales y los rearrreglos estructurales del cromosoma 16 fue confirmada en el Cuarto TICL al encontrarlas en 40% de los pacientes con M-4 y más de 5% de eosinófilos (260). Al igual que en las aberraciones anteriores se presentan problemas técnicos para la identificación de estas anomalías (260). De la Chapelle y cols, proponen que M-4 con eosinofilia se asocia con una translocación balanceada que implica también la banda 16q22, (278). Testa y cols sugieren que la transformación maligna puede ocurrir en una célula madre multipotencial capaz de diferenciar hacia las vías neutrofilicas, monociticas y eosinofilicas, por lo que es lógico el hallazgo de inv(16) en leucemias tipo M2, M4 y M5b y probablemente explicaría la eosinofilia (45,177).

Los pacientes con anomalías estructurales del 16 manifiestan una buena respuesta a la terapia, remisión completa en un alto porcentaje y la mayor sobrevivencia de los pacientes con LNLA (35 meses) (58,199).

Translocación (6;9) y basofilia

Esta es una translocación rara en LNLA que implica a los

cromosomas 6 y 9 (t(6;9) (p23;q34)) y se asocia con un incremento en el número de basófilos en médula ósea (1.5 a 12% siendo el valor normal 0.2%). Se han reportado nueve pacientes con esta anomalía, cinco con M-2, tres con M-4 y uno con M-1, con una edad media de 38 años y sin respuesta a la terapia, por lo que su pronóstico es malo (44,279). El punto de ruptura en 9q es el mismo que en la t(9;22) de la LGC, otra entidad asociada con aumento del número de basófilos en médula ósea, lo cual sugiere que la ruptura en 9q34 podría alterar la función de un gen crítico relacionado con la producción de basófilos (26).

Alteraciones estructurales del cromosoma 11

Las alteraciones estructurales en 11q son relativamente comunes en la Leucemia Monocítica Aguda M-5, sobre todo en el tipo "a" o leucemia monoblástica, siendo más frecuente en niños que en adultos. Su incidencia en M-5 tipo "b" o leucemia monocítica bien diferenciada es baja en niños y prácticamente nula en adultos (24,27).

Las aberraciones de 11q son principalmente translocaciones de diferentes cromosomas, sin embargo también se han reportado algunas deleciones. El punto de ruptura principalmente es 11q23-24 aunque puede presentarse en 11q13-14 (44,260).

Durante el Cuarto TICL encontraron aberraciones de 11q principalmente en pacientes con M-5 tipo "a", sin embargo también se encontraron estas aberraciones en pacientes con M-4 y

M-2 (260). Aproximadamente el 22% de los pacientes con M-5 presentan una aberración implicando 11q (44,280). También se han registrado casos de LNLA M-1, M-4 y M-6 con una t(2;11) (p21;q23) (281) y casos de leucemia mielomonocítica aguda (M-4) altamente indiferenciada con un t(4;11) (q21;q23) que previamente se habían diagnosticado como LLA, debido a que dicha translocación afecta probablemente una célula madre pluripotencial (27,282). A menudo una t(9;11) (p22;q23) se asocia con leucemia monocítica pobremente diagnosticada; y una translocación del cromosoma 11 (banda q23) a un cromosoma variable, 6,10,17 o 19 con leucemia mielomonocítica (M-4). Lo anterior sugiere la existencia de un gen importante para la diferenciación mielomonocítica, en la banda 11q23 (44).

Recientemente se reportó una translocación que implica el brazo corto del cromosoma 11, t(7;11) (p15;p15) predominantemente en LNLA subtipo M-2 y ocasionalmente en otros subtipos de LNLA y LBC con o sin cromosoma Phi, lo cual es frecuente como única anomalía. Los pacientes se caracterizaron en su mayoría por baja reacción de fosfatasa alcalina de neutrófilos y presentan bastones de Auer en sus células (283).

Las relaciones cromosomas-morfología hasta aquí analizadas y los informes de varios autores (12,23,24,26,253), demuestran que los estudios cromosómicos son útiles para establecer un pronóstico más certero. Aún cuando siempre deben complementarse con otros estudios ya que la mayoría de las aberraciones hasta

ahora reportadas han sido asociadas con diferentes neoplasias (26) (tabla 2.9). El método primario actual para la clasificación de LNLA planeado por el grupo FAB (55), basado en características morfológicas y citoquímicas solamente puede identificar diferencias pronósticas generales, pero existe una considerable variación individual en remisión y supervivencia entre los diferentes subtipos de la FAB (55,284). El estudio citogenético en LNLA permite la separación en subtipos, un buen ejemplo es el análisis de alta resolución de muestras de médula ósea de 105 pacientes adultos consecutivos con LNLA de novo, realizado por Yunis y cols (270). Se identificaron 17 categorías cromosómicas en LNLA de las cuales 9 presentaron defectos recurrentes simples (tabla 2.9) lo que demuestra el valor pronóstico del análisis cromosómico (tabla 2.10). Pacientes con una inv(16) (9%), diagnosticados con subtipo M-2, M-4 o M-5b de acuerdo a la clasificación del FAB tuvieron completa y prolongada remisión y supervivencia media de 35 meses. En contraste, 14 pacientes (14%) con anomalías complejas y un diagnóstico de enfermedad M-1, M-2, M-4, M-5a o M-6 presentaron pronóstico muy pobre y en 12 de estos 14 pacientes los esfuerzos por conseguir remisión de la leucemia fallaron. Este grupo exhibió una supervivencia media de 2.5 meses. Un tercer grupo con una trisomía 8 como único defecto (11%) mostró un pronóstico intermedio y una supervivencia media de 10 meses (60).

Varios autores han considerado que la edad también puede ser un factor pronóstico (26,77,254). Según los resultados de Yunis

TABLA 2.9 NEOPLASIAS QUE COMPARTEN UN DEFECTO CROMOSOMICO SIMPLE RECURRENTE (26).

t(1;3) (p36;q21)	Estado preleucémico mielodisplásico. Leucemia no linfocítica aguda, M4.
inv(3) (q21;q27)	Estado preleucémico mielodisplásico. Leucemia no linfocítica aguda M1,M2.
t(4;11) (q21;q23)	Leucemia linfocítica aguda L1,L2. Leucemia mielomonocítica aguda, M4.
del(5) (q13q31)	Estado preleucémico mielodisplásico. Leucemia no linfocítica aguda M1, M2, M4, M5, M6.
del(6) (q21q25)	Leucemia linfocítica aguda,L2. Linfoma difuso de célulasgrandes.
del(7) (q31.2q36)	Estado preleucémico mielodisplásico. Leucemia no linfocítica aguda, M1, M2, M4, M5, M6.
trisomia 8	Estado preleucémico mielodisplásico. Leucemia no linfocítica aguda, M1, M2, M4, M5, M6.
t(8;14) (q24.1;q32.3)	Linfoma de Burkitt. Leucemia linfocítica aguda, L3.
t(8;21) (q22.1;q22.3)	Leucemia mielógena aguda, M1,M2,M4.
t(9;11) (p22;q23,3) (en desordenes relacionados los cromosomas X,1,6,10,17 y 19 son alternativos al 9)	Leucemia no linfocítica aguda, M5, M4, M2.
t(9;22) (q34.1;q11.21)	Leucemia granulocítica crónica. Leucemia mielógena aguda, M1, M2. Leucemia linfoblástica aguda, L1,L2.
t(11;14) (q13.3;q32.3)	Leucemia linfocítica crónica de célulasB.
trisomia 12	Leucemia linfocítica crónica de célulasB.
inv(14) (q11.2q32.3) o t(14;14) (q11.2;q32.3)	Leucemia linfocítica crónica de célulasT.
inv(16) (p132.1q22.1)	Leucemia no linfocítica aguda, M2, M4, M5b.

TABLA 2.10 LEUCEMIA NO LINFOCITICA AGUDA DE NOVO EN ADULTOS CON DEFECTOS CROMOSOMICOS ESPECIFICOS (26).

Frecuencia (%)	F A B *	Defecto cromosómico	Sobrevivencia media (meses)	Edad promedio de inicio (años)
1	M1, M2, M4, M6	inv(3) o t(3;3)	8	44
1	M2	del(5q)	Pocos casos	Pocos casos
3	M2, M1, M4, M5, M6, M7	-7/del(7q)	3	51
2	M2, M1, M4	t(6;9)	Pocos casos	34
5-20	M2	t(8;21)	14+	38
9	M2, M1, M4, M5, M6	+8	9-10	52
8	M1, M2	t(9;22)	Pocos casos	Pocos casos
9	M4, M5a, M2	t(6;11)	Pocos casos	34
6	M3	t(15;17)	19	31
9	M4, M2, M5b	inv(16)	35	49
14	M1, M2, M4, M5a, M6	Defectos complejos	2.5	60

* Subtipos morfológicos citados de acuerdo a su frecuencia.

y cols y del Cuarto T1CL (tabla 2.10) los pacientes menores de 40 años de edad poseen un pronóstico considerablemente mejor que quienes sobrepasan esta edad (26,260). El factor edad puede estar asociado con las anomalías cromosómicas. Los pacientes con una t(8;21), t(15;17) y t(9;11) presentan una edad promedio de 30 a 40 años (260), los pacientes con una inv (16) ostentan una edad media de 49 años y aquéllos con defectos complejos asociados con pronósticos malos tienen una edad media de 60 años (177). Así por ejemplo, es frecuente que la delección total o parcial de los cromosomas 5 o 7, trisomía 8 o 21 y otros defectos cromosómicos se asocien con edad avanzada y exposición a radiación o carcinógenos químicos. Esta situación a su vez puede ir acompañada por inestabilidad cariotípica y comúnmente corresponde a los subtipos M-6 y M-2. Esto es congruente con una disminución en la capacidad para reparar el ADN y una alta frecuencia de lesiones cromosómicas encontradas en células de individuos de edad avanzada (26,00,116,202,223,253,285).

Leucemia no Linfocítica Aguda como una Enfermedad Secundaria

Como ya se expresó en la sección de Etiología, existen cada vez más indicios de que los pacientes que han recibido radiación terapéutica y/o quimioterapia, debido a enfermedades malignas o trasplantes de órganos, tienen un riesgo mayor de desarrollar LNLA secundaria. Esto ocurre aproximadamente en 1 a 2% de estos enfermos de 3 a 5 años después del tratamiento precedido por un cuadro de mielodisplasia o preleucemia, con menos de 6 meses de

sobrevivencia una vez que se ha diagnosticado franca leucemia (24,26,132,202). Esto es particularmente cierto en pacientes con monosomía parcial o total 5 ó 7 y trisomía 8 (24,26,116). Clara Bloomfield reportó, recientemente, que el cariotipo puede asociarse con el tipo de cáncer original, monosomías 5 y 7 y trisomía 8 se asocian con malignidades hematológicas previas, así como los rearrreglos específicos de LNLA y del (5q) corresponden a tumores sólidos previos (286). También es posible relacionar el cariotipo con la terapia recibida, así, -5, -7 y del (7q) se asocian con quimioterapia (sola o con radioterapia) y la del (5q), rearrreglos específicos de LNLA, otros cambios estructurales y cariotipo normal con radioterapia. El estudio citogenético puede servir como indicador de remisión completa, así, del (5q) y -5 se asocian con el porcentaje más bajo y rearrreglos específicos de LNLA y otras anomalías estructurales corresponden a la proporción mayor. El cariotipo puede indicar el estado preleucémico previo, lo cual permite la aplicación de una terapia efectiva (132). Por otra parte, la monosomía 7 se ha asociado con alteraciones de la línea celular megacariocítica y las anomalías del cromosoma 5 (-5 ó del (5q) con producción deficiente de interferón (265,271). La mayoría de los pacientes con LNLA secundaria, muestran una anormalidad cromosómica clonal (89-95% de los casos se detectan con técnicas comunes y 100% con técnicas de alta resolución) (26). A menudo estas leucemias secundarias no pueden clasificarse con el sistema del FAB (55).

Oncogenes en Leucemia No-Linfocítica Aguda

Con lo revisado hasta aquí es obvia la especificidad biológica y clínica de ciertos defectos cromosómicos en LNLA. Los mecanismos moleculares por los cuales se dá esta especificidad son inciertos, sin embargo, los puntos de ruptura en alguna de las aberraciones cromosómicas corresponden a la localización de ciertos oncogenes que han sido mapeados en bandas o subbandas específicas (tablas 2.6 y 2.7) (26). En LNLA de novo los defectos cromosómicos más comunes están representados por varios tipos de translocaciones recíprocas y por una inversión del 16 (40% de todos los casos) (26). Por ejemplo, los puntos de ruptura de la t(9;22) (q34.1;q11.21) en LNLA, parecen ser idénticos a los encontrados en LGC, sin embargo una banda cromosómica contiene aproximadamente 5×10^6 pares de nucleótidos, por lo que el punto de ruptura en 9q34 podría estar muy distante; actualmente se ha establecido que el punto de ruptura en el cromosoma 22 está fuera de la región bcr y que se forma un ARNm quimérico de 6.5 kb (diferente al de LGC que es de 8.7 kilobases) y una nueva proteína de 190 kD peculiar de leucemias agudas (244,289).

En la leucemia mielomonocítica (M-4) con eosinofilia y una inv(16)(p13q22.1) el grupo de genes de la metalotioneína, normalmente localizado en la banda 16q22.1, es dividido durante el rearrreglo, de tal manera que algunos de los genes de la metalotioneína pasan al brazo corto (173,244). Es significativo que tanto el punto de ruptura de la inversión (16q), como un

sitio frágil constitutivo hayan sido localizados en la subbanda 16q22.1 en la unión con la banda 16q21 (26). Esto sugiere que uno de los genes de la metalotioneína o su secuencia reguladora se localiza en un sitio frágil y podría funcionar como una secuencia reguladora para un oncogén implicado en funciones de crecimiento y regulación, aún no identificado en el segundo punto de ruptura de la inversión del 16 (banda p13) (26,290).

En leucemias mielomonocíticas (M-4) con una t(V;11) (V;q23), siempre esta implicada la banda 11q23 y se han encontrado rearrreglos del oncogén ets-1 (26,27,177). Una vez más, el oncogén ets-1, un sitio frágil y el punto de ruptura 11q23 están localizados en la subbanda 11q23.3 en la unión con la banda 11q24. El cromosoma variable (V) puede ser un cromosoma X, 1, 2, 4, 6, 9, 10, 17 o 19. Yunis (26) sugiere que cada uno de los cromosomas variables puede conferir un pronóstico diferente ya que cada uno puede implicar la localización de un gen específico.

En el caso de la t(8;21) (q22;q22) se considera importante la banda Bq22 ya que en ella se localiza un sitio frágil y el oncogén mos-c, donde se une el fragmento translocado del cromosoma 21, sugiriéndose un mecanismo similar al del linfoma de Burkitt, o que exista exaltamiento de actividad a distancia (267,291-293). Por otra parte, el oncogén myc-c del cromosoma 8 se transloca al cromosoma 21 (293). La importancia de este oncogén es notoria ya que en células de pacientes con LMA con un cromosoma doble muy pequeño se presentó amplificación del oncogén myc-c, lo que sugiere que la evolución clonal de algunas células

leucémicas implique la selección de una dosis mayor de oncogenes (294). Asimismo, no puede menospreciarse la importancia de la banda 21q22, puesto que los pacientes con síndrome de Down, en los que la trisomía de la banda 21q22 es la responsable del fenotipo, presentan mayor riesgo de desarrollar leucemia aguda. También han reportado alteraciones del cromosoma 21 en M-4 y M-7, aunque no en forma constante, y trisomía 21 en pacientes previamente expuestos a carcinógenos (23,59,116,160,162,220,293, 295).

En la translocación (15;17) (q22;q12-21) y M3 posiblemente estén implicados los oncogenes erb-A1-c (17q21.3-22) y erb-b2-c (17q21) cuya activación probablemente ocurre por yuxtaposición al producirse la translocación. Además en las células HL-60 con LNLA M-3 se ha visto una expresión anormal del oncogén myc-c el cual estaría relacionado con el mantenimiento del estado relativamente indiferenciado (199,271,272,296,297).

Se han encontrado formas activas del oncogén N-ras (1cen-1p21) en varios tipos de leucemia y otras neoplasias. La activación ocurre por una mutación puntual en el codón 13 de la proteína p21 en el que un residuo de glicina es reemplazado por uno de valina o asparagina; en algunos casos la alteración se produce en el codón 61. La activación de N-ras se ha observado en la línea celular HL-60 aislada de un paciente con leucemia promielocítica aguda (M-3), en los subtipos de LNLA M-1, M-2, M-4 y M-5 (20 a 25% de los casos) y en leucemia aguda de células T

(10-15%). En los tumores sólidos tal vez la activación de N-ras sea un evento tardío relacionado con el progreso de la enfermedad, pero en las leucemias parecería un evento temprano y es probable que afecte algún proceso esencial para todas las células de la línea mieloide (246,248,297-299).

En pacientes con una monosomía 7 parcial o total, aislada o asociada con otros defectos, la célula afectada sería una célula madre pluripotencial, lo que explicaría que se encuentre en varios tipos de leucemia (LNLA M-1, M-2, M-4, M-5, M-6 ó M-7 e incluso casos con infidelidad de linaje o bifenotípicos, es decir que presentan blastos linfoides y mieloides). El cromosoma 7 está involucrado en la producción de la glicoproteína GP130 de neutrófilos que probablemente regula la mieloproliferación. En este cromosoma se encuentra también el oncogén erb-B y el gen para el receptor del factor de crecimiento epidérmico, que pudieran estar relacionados con el proceso maligno (48,257,300,301).

2.6.4. Leucemia linfoblástica aguda

Los estudios citogenéticos en leucemia linfoblástica aguda (LLA) no han sido tan amplios como en LNLA. Desafortunadamente, las técnicas empleadas solo permiten el análisis cromosómico de

70 a 80% de los casos y únicamente en 50 a 70% se encuentra un defecto cromosómico bien definido (23). Así por ejemplo, durante el Tercer Taller Internacional de Cromosomas en Leucemia Aguda (302), se revisaron 330 niños y adultos con LLA con tratamiento previo y se encontraron anomalías clonales en 66% y no clonales en 17%. El perfeccionamiento de una técnica de cultivo de médula ósea ha permitido demostrar un defecto cromosómico en 78% de los pacientes y anomalías cromosómicas clonales en 94% (109 de 116 pacientes), demostrándose pseudodiploidia en la mayoría de los casos referidos como "normales" (303,304).

La anomalía más común en LLA es la pseudodiploidia (69%), dentro de este grupo se encuentran los cinco tipos de translocaciones recíprocas recurrentes más frecuentes: t(1;19) (q23;p13); t(8;14) (q24;q32); t(9;22) (q34;q11); t(4;11) (q21;q23); y t(11;14) (p13;q11). Todas ellas representan aproximadamente 40% de los casos de LLA y las translocaciones (8;14) y (9;22) se presentan más comúnmente en adultos que en niños (305) (tabla 2.11). Todas estas translocaciones se encuentran en individuos con diagnóstico de L-1 o L-2 de acuerdo a la clasificación del FAB (61,306), excepto la t(8;14) que se presenta en pacientes con L-3. Debido a que esta translocación se detectó inicialmente en linfomas de Burkitt, africanos o no, y Epstein-Barr positivos o negativos, se propone que el linfoma de Burkitt y la mayoría de las LLA de células B tipo L-3 sean diferentes manifestaciones de la misma enfermedad (24). Por otra parte, la presencia de trisomía (1q) asociada a la t(8;14),

TABLA 2.11 LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA EN NIÑOS (26).

Frecuencia aproximada (%)	FAB	Marcadores celulares inmunológicos	Cromosomas	Edad promedio	Sobrevivencia (años)
5	L1,L2	pre-B	t(4;11)	menos de 16 m	menor a 1
12	L1,L2	nula	t(9;22)	9a	menor a 1
5	L3	cel-B	t(8;14)		menor a 1
5	L1,L2	cel-T	t(11;14) (p13;q11)	10 a	menor a 1
4-7	L1,L2	pre-B	t(1;19)	11 a	1-4
menor a 1		nula	casi haploidía	13 a	menor a 1
2	L2	nula	del(6q)	6 a	menor a 1
16	L1,L2	nula	47 a 50	6 a	1.25
20	L1,L2	nula	más de 50 cromosomas	3 a	más de 5
22	L1,L2	nula	normal	14 a	más de 5

confiere cierta ventaja proliferativa (306), Clínicamente es importante la identificación de los pacientes con pseudodiploidia debido a que tienen muy mal pronóstico y se necesitan tratamientos muy agresivos para preparar a los pacientes para un trasplante de médula ósea durante la primera remisión. El promedio de supervivencia es menor de 12 meses, comparado con 50% de casos de LLA en niños curados completamente y más de 5 años de remisión completa en un tercio de los adultos con tales aberraciones (26).

Se ha encontrado un cariotipo de más de 50 cromosomas en el 30% de los casos de LLA y corresponden a L-1 o L-2 de células nulas (307,308) (tabla 2.11). Los cromosomas implicados con mayor frecuencia son 6, 10, 14, 17, 21 y X (24,307,309). Estos pacientes tienen buen pronóstico ya que presentan una remisión más larga y mayor supervivencia después de la quimioterapia (más de 36 meses en niños y más de 21 en adultos) (26,302,310). Los pacientes con 40 a 45 o 47 a 49 cromosomas tienen un pronóstico intermedio (sobrevivencia de 15 meses en niños) (26,311).

La hiperdiploidia puede detectarse por medición del contenido celular de ADN (citometría de flujo), en cualquier etapa de la proliferación celular. Esto ha permitido relacionar la cantidad de ADN con subtipos morfológicos e inmunológicos de leucemia. Así, en un estudio de 446 pacientes con LNLA de novo y LLA se encontró que en LMA-M1 son menos frecuentes las líneas madres leucémicas con ADN aneuploide y el grado de aneuploidia es

menor en leucemia M-1 y M-2 que en M-4 y M5. En el caso de LLA, la LLA positiva al antígeno LLAc, noT/noB presentó una frecuencia mayor de ADN aneuploide y en niños se observó un periodo mayor de remisión (310). En otro estudio de 98 niños, la hiperdiploidia en LLA se asoció con la expresión del marcador de superficie LLAc, tri o tetrasomias del cromosoma 21, menor conteo de leucocitos periféricos que en los pacientes diploides, mayor supervivencia y buen pronóstico (308).

Aún cuando existe poca información sobre LLA y algunos defectos cromosómicos específicos, tales como la t(11;19) y la t(11;14) que fueron descritos recientemente (312-314), la información disponible sugiere una asociación entre algunas categorías cromosómicas y la edad de aparición de la enfermedad. Por ejemplo, una t(4;11) parece ser más frecuente en infantes menores de 16 meses (leucemia a menudo congénita) (282, 311, 314, 315) y cariotipos con más de 50 cromosomas corresponden a niños con una edad media de 3 a 5 años (26, 302). La delección 6q o cariotipos con 47 a 50 cromosomas son comunes en niños con una edad media de 6 años (26, 151, 302, 316). En los niños con translocación (8;14) la edad media es de 10 años (26, 302). La t(9;22) en niños corresponde a una edad promedio de 9 años (224), y en pacientes con t(1;19) (71, 312, 313), con cariotipos casi haploides, o con cromosomas normales (26), la edad promedio es de 11, 13 y 14 años respectivamente (tabla 2.11).

Actualmente el uso combinado del sistema del FAB, marcadores

inmunológicos y análisis cromosómico podría servir como base para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las LLA. De esta manera, han emergido los siguientes subgrupos: (i) LLA-L1 o L2 con una t(1;19) específica de células pre-B (71,312,313); (ii) LLA-L1/L2 con t(4;11), TdT positiva, ácido de Schiff positivo, antígenos Ia y B4 positivos, cuyo origen es una línea celular muy primitiva (314); (iii) LLA-L1 o L2 con t(11;14) específica para células T E+ (positivo en formación de rosetas con eritrocitos de carnero) (312,317); (iv) LLA-L3 con t(8;14) de células B, positivas para IgM citoplásmica e IgM superficial; y (v) LLA-L1 o L2 con t(9;22) de células pre-B (26). La presencia o ausencia de translocaciones específicas en LLA diferencia a los pacientes que responden pobremente de los que responden bien a la quimioterapia clásica. Esto permite decidir cuales pacientes recibirán un tratamiento alternativo como un trasplante de médula ósea. El número cromosómico o ploidía también influye en la elección del tratamiento ya que la hiperdiploidía indica buena respuesta y próximo a la haploidía una pobre respuesta a la quimioterapia (26,156,307,311,312). El grupo de pacientes con 47 a 50 cromosomas e incierta recurrencia de defectos cromosómicos necesita definirse mejor (26,307).

Por otra parte en LLA también se han detectado deleciones, tal es el caso de la leucemia adulta de células T (LAT), la cual es particularmente común en Japón y en el Caribe y se asocia con el virus VLHT-I (virus linfotrópico humano de células T), aunque aún no se han establecido defectos cromosómicos específicos

(147,148). Wang-Peng y cols, encontraron una delección 6q asociada con hipercalcemia y lesiones líticas de hueso en esta enfermedad (151). Sanada y cols. (184), sugieren que las trisomías 7 y/o 3 son las más frecuentes (150). También se ha reportado pérdida del cromosoma X y aberraciones complejas (318). Todo esto está relacionado con la severidad de la enfermedad y podrían representar lesiones secundarias. En pacientes con LLA y previa exposición a radiaciones, se ha reportado monosomía 7 (80) y se cree que la delección (5q) está relacionada con un nuevo tipo de leucemia con morfología linfoide y expresión de determinantes de membrana mieloides (50). Otra alteración referida es la pérdida de la región 9p21-p22 ya sea por una delección o una translocación no balanceada asociada con LLA (319) o con la LLA linfomatosa (320,321), la cual presenta características de leucemia y linfoma. Esta delección podría originar la pérdida de la enzima metiltioadenosina fosforilasa haciendo a estos pacientes sensibles a ciertos agentes quimioterápicos que inhiben la síntesis de novo de purinas (26).

De lo anterior es evidente que el cariotipo representa un indicador pronóstico independiente en LLA. Probablemente en los próximos años, una clasificación revisada de LLA, basada en análisis cromosómicos, marcadores inmunológicos y citología, reemplazará la presente clasificación morfológica del FAB. Mientras tanto, es de crucial importancia que una clasificación combinada FAB-C1 (cromosomas y marcadores inmunológicos), sea

empleada para caracterizar nuevos subgrupos de LLA (61,322).

Oncogenes en Leucemia Linfoblástica Aguda

El mecanismo molecular involucrado en las translocaciones bien podría ser similar al de la LGC y el linfoma de Burkitt. La t(9;22) o Phi se presenta en el 10% de los pacientes con LLA y es citogenéticamente similar a la de la LGC, sin embargo desde el punto de vista molecular se ha encontrado que el punto de ruptura se encuentra en el extremo 5' de bcr en la banda 22q11, por lo que el oncogén abl-c no tiene una expresión similar a la que tienen en LGC sugiriendo que los mecanismos de activación deben ser diferentes (224,323-325). Se ha comprobado, al igual que para LNLA Phi-positivo, que en los pacientes LLA Phi-positivo se forma un ARNm quimérico de 6.5 kb (diferente al de LGC que es de 8.7 kilobases) y una proteína quimérica de 190 kD (210 kD en LGC) (244).

El mecanismo de acción de la t(8;14)(q23;q32) establecido para el linfoma de Burkitt, y que probablemente se presenta en LLA-L3, es el movimiento del oncogén myc-c de su localización normal en la banda 8q24.1 a la banda 14q32.3, lo cual produce un rearreglo entre su extremo 5' y los genes constantes de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgH) que lo activan (26,326). En las leucemias de células T que involucran esta translocación probablemente ocurre lo mismo a myc-c, pero el rearreglo es con el gen de la cadena alfa del receptor de células

T (RCT) ubicado también en el cromosoma 14 (14q11.2) (327-329). Existe LLA de células T con t(11;14) (p13;q11) en estos casos el gen de la cadena alfa queda dividido por el punto de ruptura en los segmentos génicos que codifican para la región variable (V) y la región constante (C) (330). Los puntos de ruptura en la t(11;14) están cerca de la ubicación de los genes H-ras y cadena alfa de RTC, aunque su implicación es aún incierta (47,330). Otro oncogén que se ha encontrado activo en los pacientes con leucemia aguda de células T es el N-ras (300), que se ubica en la región icen-1p21 y su activación se da por una mutación puntual del codón 13 de la proteína 21, en donde un residuo de glicina es reemplazado por uno de valina o asparagina (246-248).

Por otra parte, se considera que existe asociación entre LLA y los genes del brazo corto del cromosoma 6, sobre todo los del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) y el factor B (Bf). Un gen unido al complejo podría incrementar la susceptibilidad como en el caso de niños negros americanos que presentan con mayor frecuencia LLA que los niños negros africanos (331). En otro aspecto, parecería haber una mayor sobrevivencia en los pacientes con LLA y los antígenos HLA-A2 y HLA-B12 (159). Además en los casos de LLA que presentan del (6q) se ha observado amplificación del proto-oncogén myb-c además de cambios estructurales y funcionales, factiblemente implicados en la leucemogénesis (224,316).

2.6.5 Leucemia linfocítica crónica

Originalmente fué muy difícil el estudio de anomalías cromosómicas en la Leucemia Linfocítica Crónica (LLC), debido a la baja proporción mitótica de las células malignas. En la mayoría de los casos la proliferación clonal es de células B, por lo que el empleo de fitohemaglutinina, que es estimulante de células T, no induce división celular. Actualmente se utilizan mitógenos específicos de células B, tales como mitógeno hierba carmin fitolaca, lipopolisacárido B, proteína A o virus de Epstein-Barr. Las alteraciones cromosómicas se presentan en más del 50% de los pacientes, con un número cromosómico de hipodiploide a hiperdiploide (64, 66, 150, 332-336). Los cambios más comunes son trisomía 12 y translocaciones que involucran al cromosoma 14. Cuando existe una trisomía parcial del cromosoma 12, implica la región q13 a q22 (337,338). Generalmente la trisomía 12 es la única anomalía en pacientes con la enfermedad temprana y puede presentarse en combinación con otros defectos cromosómicos en pacientes con la enfermedad avanzada lo que indica un mal pronóstico (339, 340). Estos datos sugieren que la trisomía 12 es el cambio cariotípico inicial y que otras alteraciones cromosómicas pueden resultar de la evolución clonal, dediferenciación o tratamiento, sin embargo, algunos pacientes pueden manifestar otras anomalías cromosómicas clonales que no involucran al 12 (64). La sobrevivencia media de los pacientes con trisomía 12 como único cambio es un poco menor que la de aquellos con cariotipo normal. Las aberraciones del

cromosoma 12 también son frecuentes en otras leucemias crónicas (64, 339).

Los defectos del cromosoma 14, incluyen inversiones y translocaciones (333). Los puntos de ruptura usuales en este cromosoma son q11 y q32. Es frecuente que en los pacientes con LLC de células B (LLC-B) el punto de ruptura sea en q32 mientras que en los pacientes con LLC de células T (LLC-T) es en la banda q11 (23,341).

Los rearrreglos de la LLC de células T incluyen inv(14)(q11.2q32.3) o la translocación equivalente t(14;14)(q11.2;q32.3); en el caso de inversión la enfermedad es menos agresiva (23,341). Han sido reportadas rupturas en q11 en pacientes con leucemia/linfoma de células T y en pacientes con ataxia telangiectasia, estos últimos tienen un mayor riesgo de desarrollar LLC-T (64,341). El gen que codifica para la cadena alfa del receptor de células T se ha mapeado en el cromosoma 14 en la región q11.2 (327,342). La presencia de una t(11;14) sugiere progresión clínica de la enfermedad con un tiempo de vida más corto, sobre todo si está asociada con otros defectos cromosómicos (333,339).

Los pacientes con LLC-B muestran defectos en el cromosoma 14, incluyendo inv(14)(q11.2q32.3) y translocaciones que implican al 14 y a un segundo cromosoma que puede ser el otro 14, el 11, el 18 ó el 19. Se ha reportado también una del(11)(9q14.2q23) que indica refractariedad al tratamiento y una supervivencia más

corta. La translocación (11;14)(q13.1;q32.3) también se puede presentar en pacientes con linfoma linfocítico pobremente diferenciado difuso y linfoma histiocítico difuso (339,343-349).

Es interesante señalar que las células malignas de algunos pacientes con leucemia linfocítica crónica pueden progresar a un tipo celular menos maduro semejando un linfoma difuso de células grandes, conocido como síndrome de Richter. En este padecimiento, aún es incierta la existencia de alguna asociación con la t(11;14). La leucemia prolinfocítica también puede desarrollarse por progresión de LLC-T y recientemente se ha asociado con una deleción del brazo corto del cromosoma 13 (del(13)(p12)), inv(14)(q11q32), +8 y en menor frecuencia con del(6q) y trisomía parcial o total del cromosoma 7 (67). En los cromosomas 3, 6, 11 y 12 implicados en LLC y desórdenes relacionados se encuentran proto-oncogenes de la familia ras-c (64).

Debido a las dificultades para estudiar células en división, pocos reportes describen anomalías cromosómicas en pacientes con leucemia de células peludas. Los datos disponibles indican que los cromosomas 3, 6, 12, 14 y Y están frecuentemente afectados (64).

Oncogenes en Leucemia Linfocítica Crónica

Poco se conoce acerca de la probable función de los oncogenes en LLC. El cromosoma 14 frecuentemente involucrado en

esta leucemia, contiene los genes que codifican para las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (IgH) en la banda q32 (346). En la LLC generalmente la proliferación clonal es de linfocitos B Ig positivos, por lo que la relación con el cromosoma 14 podría no ser completamente casual. Un niño con LLC presentó una translocación entre los cromosomas 2 y 14 (t(2;14)) afectando los loci de las cadenas ligeras kappa y los de las cadenas pesadas de Ig (347). El gen que codifica la cadena alfa del receptor de células T se localiza en el cromosoma 14 en la banda q11.2 además de un oncogén putativo designado tcl-1 (linfoma/leucemia de células T - 1) (327,330). En los pacientes con ataxia telangiectasia y anomalías de esta región del cromosoma 14 tienen mayor riesgo de desarrollar LLC. En estos casos la enfermedad generalmente afecta más a las células T que a las células B (64, 327, 341).

Croce identificó dos loci diferentes en 11q13 y 11q21 implicados en la patogénesis de la mayoría de los neoplasmas humanos de células B (342). En un estudio colaborativo se describió una línea celular derivada de un paciente con LLC con una t(11;14)(9q13;q32) en donde ocurre un rearrreglo similar al de myc-c en el linfoma de Burkitt (64,326). Empleando células somáticas híbridas se demostró que el punto de ruptura en el cromosoma 14 está en el segmento de ensamble de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas (JH) el cual es translocado al cromosoma 11 a la banda q13 en donde activa un oncogén designado bcl-1 (linfoma-leucemia de células B) que se encuentra en la banda 11q13.3 y que parece estar relacionado con la

transformación maligna de células B humanas con una t(11;14). No se conoce ningún oncogén retroviral transformante homólogo mapeado en el cromosoma 11 (330). De esta manera, en células con la t(14;18) se asume la existencia del oncogén bcl-2 en el cromosoma 18 banda q21, que tal vez también estaría relacionado con la patogénesis de neoplasias B (348). La desregulación de bcl-1 y bcl-2 puede ser por aumento de elementos entre la región de ensamble (J) y la región de encendido de los genes de las cadenas pesadas de Ig (349). De esta manera las pruebas moleculares pueden usarse en forma alternativa con los estudios citogenéticos (348).

En LLC se han tratado de identificar otros oncogenes, sin embargo, solo el oncogén K-ras se encontró en un paciente. Este oncogén se localiza en el cromosoma 12(q24.2) y la trisomía 12 es la alteración más frecuente en estos pacientes (350). Por otra parte, se han identificado varias clonas de ADN complementario (ADNc) que reaccionan fuertemente con ARNm aislado de células de LLC, pero la identidad de estas clonas se desconoce (351). Recientemente se reportaron rearrreglos clonales de la cadena beta del receptor de células T, mapeado tentativamente en el cromosoma 7, en dos pacientes con LLC-B (48,49,64).

CAPITULO III.- OBJETIVOS

- 1) Realizar el análisis citogenético mediante las técnicas de procesamiento directo y bandedo en muestras de médula ósea de pacientes con probable leucemia, del Hospital General de México SSA, durante el periodo septiembre de 1982 a diciembre de 1984.
- 2) Correlacionar el tipo y frecuencia de las alteraciones cromosómicas con las diferentes formas de leucemia y el estadio en que se encuentran.
- 3) Comparar el tiempo de sobrevida esperado que establece la literatura con el determinado en los pacientes estudiados.

CAPITULO IV.- MATERIAL Y METODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Durante el período septiembre 1982 - diciembre 1984 se procesaron en el Servicio de Genética del Hospital General de México SSA, muestras de 30 pacientes tomadas por el Servicio de Hematología, con diagnóstico presuntivo de leucemia. Todos los casos fueron bandeados pero sólo en 13 muestras fué posible el estudio citogenético, microscópico y fotográfico.

Las muestras de médula ósea empleadas para el estudio citogenético se procesaron mediante la técnica de Hozier y Linquist (352) modificada. Todos los casos fueron bandeados con la técnica rutinaria de bandas G (353) y solamente en un caso en que era necesario se realizaron bandas C (354).

Se analizaron de 5 a 40 mitosis, según lo permitiera la preparación o lo necesitara el caso. Las anomalías cromosómicas fueron descritas de acuerdo a la nomenclatura propuesta en la conferencia de París (180,181) (pag. 56 de este texto). Una clona anormal fué definida por la presencia de un defecto idéntico en dos o más mitosis. Se consideró presente una clona normal si se observaba al menos una mitosis normal. Las mitosis apropiadas para análisis se examinaron y fotografiaron con un fotomicroscopio Carl Zeiss FOMI III con un aumento de 10 x 1.25 x 100 x.

4.2 METODOS

4.2.1 Método directo para obtención del cariotipo en médula ósea

Las muestras de médula ósea se procesaron mediante la técnica directa de Hozier y Linqvist (352). Se inicia agregando 0.2 a 0.5 ml de aspirado de médula ósea heparinizado a un frasco de vidrio de 30 ml, el cual lleva 10 ml de la siguiente solución - a 37°C: 9 partes de KCl 0.075 M más una parte de solución de tripsina-EDTA al 0.25% más colchicina a una concentración final - de 0.08 g/ml. Esta suspensión de células se incubó a 37°C durante 30 min, se vacía a tubos cónicos de centrifuga de 15 ml para centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min, decantar y resuspender, fijar en metanol-ácido acético 3:1 fresco, dejando reposar 30 min a temperatura ambiente. Después de aproximadamente 10 centrifugaciones a 3,000 rpm durante 5 min y lavados con solución fijadora se hacen las laminillas goteando la suspensión de células a una altura de 1.50 m sobre portaobjetos colocados en un ángulo de 30°, secados al aire y "envejecidos" (las laminillas para bandear se dejaron "envejecer" a temperatura ambiente al menos una semana). Antes de "envejecerlas" se revisó la existencia de metafases en la laminilla.

4.2.2 Bandas G

Las bandas G son consideradas como un tipo de bandeo positivo, son estructuras constituidas por heterocromatina

intercalar que comprenden cerca del 50% de las cromátidas, reconocidas por sus intensas cualidades cromofílicas especialmente para la solución Giemsa, Whright y otros colorantes, presentan resistencia relativamente alta al tratamiento calorífico, a la digestión con enzimas proteolíticas, urea y detergentes (353).

Técnica: El bandeó G fué obtenido mediante la técnica modificada de Wang y cols (354) la cual consiste en colocar las laminillas por aproximadamente 10 seg o más, según cada caso, en un coplick que contiene 3 ml de de solución de tripsina al 1% más 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 en baño maría a 37° C. Se lavan con solución salina isotónica y posteriormente en agua corriente. Se tiñen durante un minuto en Giemsa (3 ml de Giemsa más 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8). Nuevamente se lavan con agua corriente y se secan al aire. Se analizan al microscopio y/o en fotografía.

Solución de tripsina al 1%.— Para su preparación se disuelve un gramo de tripsina en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.01 M a pH 6.8 libre de calcio y magnesio (con EDTA al 0.02%). Agitar durante 5 a 6 hrs en agitador magnético. Filtrar y fraccionar en alícuotas pequeñas (5-10 ml) para guardar congelada.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8 (Sorensen).— En un matraz aforado de 1000 ml, se disuelve en agua destilada 6.63 g de KH₂PO₄ más 2.56 g de Na₂HPO₄, se afora.

2 4

2 4

4.2.3 Bandas C

Las bandas C identifican heterocromatina constitutiva, localizada en el centrómero y regiones pericentroméricas de los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Estas bandas son sumamente resistentes a la extracción con ácidos y bases, tiñen intensamente con Giemsa y otras combinaciones de colorantes (DA/Dapi) (353).

Técnica: las bandas C se obtuvieron con la técnica de Sumner (355), en la que se sumergen las laminillas en HCl 0.2 N durante 15 a 30 min, después se lavan con agua destilada y se colocan en Ba(OH)₂ (0.065 M) a 37 C por 15 a 30 min. Nuevamente se lavan con agua destilada pero ahora a 37 C para colocarlas en 2xSSC (8.82 g de citrato de sodio más 17.53 g de NaCl en 1,000 ml de agua destilada) a 60 C durante 2 hrs, lavar con agua destilada a 60 C y con agua corriente. Por último se tiñen en Giemsa (5 ml de Giemsa más 45 ml de buffer de fosfatos pH 6.8), para observar y analizar al microscopio y/o en fotografía.

CAPITULO V.- RESULTADOS

Durante el periodo septiembre de 1982 a diciembre de 1984 se procesaron 30 muestras de pacientes con probable leucemia para análisis citogenético, sin embargo, solamente en 13 (43.3%) fué posible un estudio adecuado (figura 5.1-A). De éstos, siete casos correspondían a un diagnóstico presuntivo de LGC y seis a LA de acuerdo a su clasificación del FAB. Sin embargo el análisis citogenético y estudios ultramicroscópicos, citológicos posteriores de su médula ósea permitieron un diagnóstico más preciso, por lo que algunos enfermos fueron reclasificados (tablas 5.1 y 5.2).

La distribución de los pacientes de acuerdo al sexo, edad, tipo de leucemia, sobrevivencia y hallazgos citogenéticos se presenta en la tabla 5.1 para las leucemias crónicas (LC) y en la tabla 5.2 para las leucemias agudas (LA). Los pacientes fueron numerados del 1 al 13, correspondiendo del 1 al 7 para LC (tabla 5.1) y del 8 al 13 para LA (tabla 5.2).

De las 7 muestras con diagnóstico presuntivo de LGC (tabla 5.1, figura 5.2-A), en cinco se confirmó el diagnóstico (casos 2, 3, 4, 5 y 6). De éstos, cuatro fueron Phi positivo (80%) (foto 1) y el paciente 6 fué Phi negativo (20%). El paciente 2 se encontraba en fase crónica, el paciente 6 en probable fase acelerada y los pacientes 3, 4 y 5 en fase blástica. En los pacientes 1 y 7 el diagnóstico final fué trombocitosis hemorrágica esencial y leucemia mielomonocítica crónica (LMMoC),

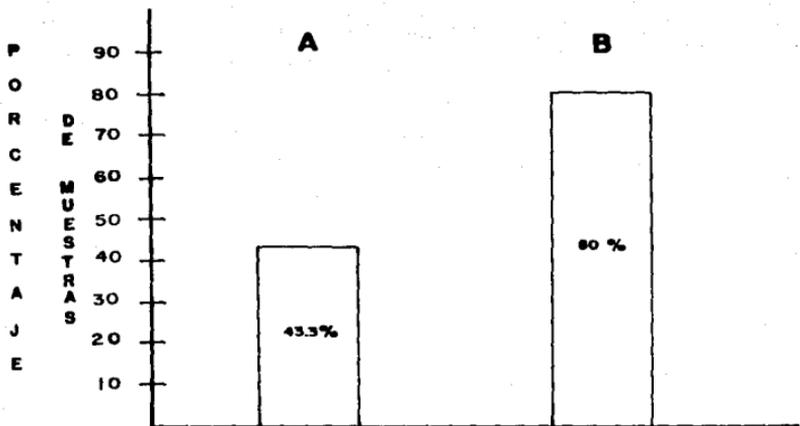


FIGURA 5.1 Porcentaje de muestras analizables con técnicas estándar. La columna A ilustra los casos del presente estudio. La columna B al porcentaje reportado en la literatura. La comparación de estos datos se presenta en el capítulo de Discusión.

TABLA 5.1 Datos clínicos y citogenéticos de pacientes con diagnóstico presuntivo LGC.

Paciente, sexo, edad	DxI/DxF	Contacto con sustancias \ddagger	Sobrevivencia del paciente/esperada \ddagger	Cariotipo (foto)
1, M, 26	LGC/TNE(SWP)	No	más de 2 años	46,XY,Ph1+ (foto 1)
2, M, 57	LGC/LGC,FC	No	? / 3-4 a	46,XY,Ph1+ (foto 1)
3, F, 46	LGC/LGC,FB	Herbicidas e insecticidas	FC: 2 a / 3-4 a FB: 1 a / 25 d	46,XX,Ph1+ 47,XX,+C,Ph1+ 50,XX,Ph1+ 53,XX,+8,+8,+18, +12,+13,+18,+19, +21,+22, 21Ph11, t(5;8)(q+q)-. (foto 2)
4, F, 52	LGC vs/LGC,FB SWP	No	? / 3-4 a	46,XX,Ph1- 47,XX,+8,9q+,Ph1- 47,XX,+8,Ph1+ 47,XX,+8,Ph1- 47,XX,+8,i(17q),Ph1+ (fotos 3-5)
5, F, 70	LGC/LGC, probable FB	No	3.5 a / 3-4 a	46,XX,Ph1+ 46,XX,Ph1- (foto 1)
6, F, 60	LGC/LGC probable FA	Insecticidas	3 a / 15 a	46,XX,Ph1-
7, M, 47	LGC/LMNoC (SMD)	Herbicidas e insecticidas	aprox. 12 a / 43 a	46,XX,Ph1(-)

DxI, diagnóstico inicial o presuntivo. DxF, diagnóstico final. FB, fase blástica. FA, fase acelerada. FC, fase crónica. \ddagger , sustancia potencialmente mutagénica o mielotóxica. TNE, trombocitosis hemorrágica esencial. SWP, síndrome mieloproliferativo. LMNoC, leucemia mielomonocítica crónica. SMD, síndrome mielodisplásico. LGC, leucemia granulocítica crónica. \ddagger , de acuerdo a lo informado en literatura.

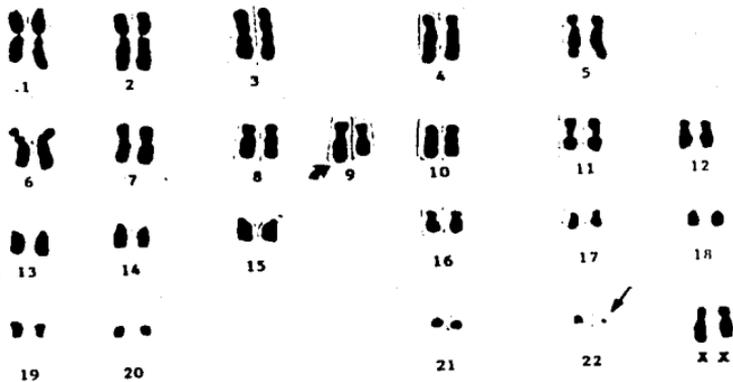


FOTO 1.- Cariotipo 46,XX,Ph1+⁴ correspondiente al paciente 4.
 Técnica de bandas C. Nótese la translocación(9;22)(q34;q11).



FOTO 2.- Cariotipo 54,XX,+8,+8,+10,+13,+18,+19,+21,+22,2Ph1,
 t(5;8)(q+;q-), de la paciente 3. Técnica de bandas G. Observar
 las diferentes polisomías 8, 10, 13, 18, 19, 21, 22 y las
 translocaciones (9;22) y (5;8).

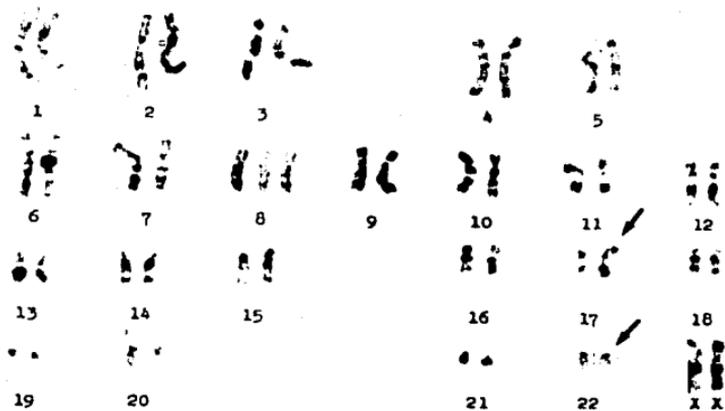


FOTO 3.- Cariotipo 47,XX,+8,i(17q),Ph+. De la paciente 4.
 Bandas G. Se observa trisomía 8, el isocromosoma(17q) y la
 translocación(9;22).



FOTO 4.- Cariotipo 47,XX,+8,Ph1+. Perteneciente a la paciente 4.
Bandas G. Observar trisomía 8 y translocación (9;22).

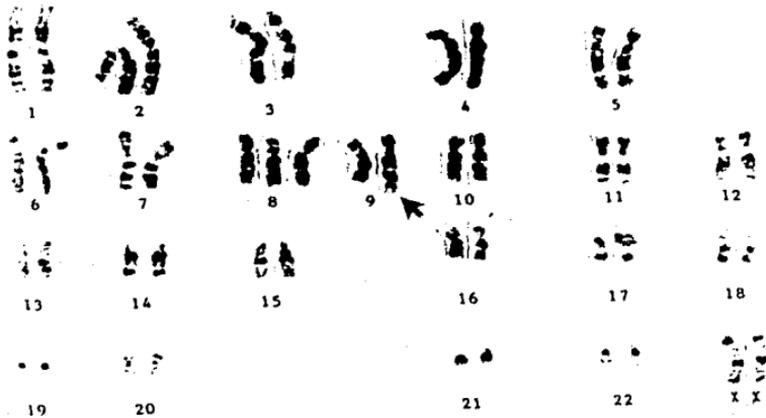


FOTO 5.- Cariotipo 47,XX,+8,9q+,Phi-. De la paciente 4, técnica de bandas G. Se observa el der(9), t(9;22)(q34;q11).

TABLA 5.2 Datos clínicos y citogenéticos de pacientes con diagnóstico presuntivo de leucemia aguda (LA)

Paciente sexo, edad	DxI / DxF	Contacto con sustancias †	Sobrevivencia del paciente/esperada ‡	Cariotipo (foto)
8, F, 20	LMLA-M6/ AM vs. SWMP	No	Más de 4 años con excelente evolución y recuperación total.	46, XX (foto 6)
9, M, 17	LMLA-M3/LMLA-M3	No	2 a / 19 a	46, XY, t(15;17) (q34;q12-22) (figura 5.3) 46, XY
10, F, 33	LMLA-M4/LMLA-M4	No (solamente tabaquismo)	3 a / 9-10 a	46, XY 47, XX, +8 (fotos 3 y 7)
11, M, 16	LMLA-M2/LMLA-M5	Insecticidas caseeros casualmente	3 a / 3a	46, XY 45, XY, -7 (foto 5)
12, M, 50	LMLA-M4/LA	No	?	46, XY 46, XY, i(17q) (foto 9) cromosomas pulverizados
13, F, 19	LLA/LLA	No	4 a /+ de 21 a	46, XX mas de 50 cromosomas x = 92 (foto 10)

DxI, diagnóstico inicial o presuntivo. DxF, diagnóstico final. SWMP, síndrome dismieloproliferativo. AM, anemia multicarencial. † sustancia potencialmente mielotóxica o mutagénica. LMLA, leucemia no linfocítica aguda. LLA, leucemia linfoblástica aguda. ‡, de acuerdo a lo informado en la literatura.

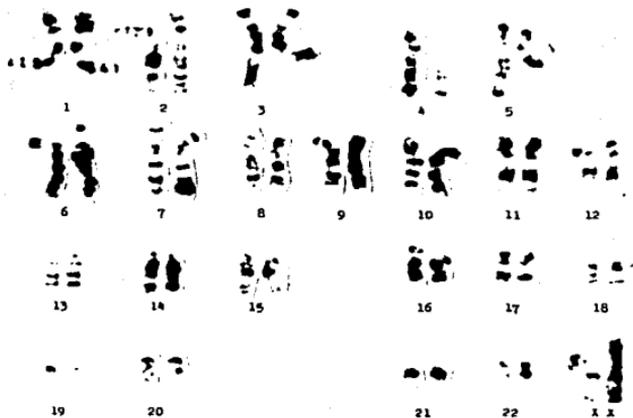


FOTO 6.- Cariotipo normal 46,XX. Perteneciente a la paciente B.
Técnica de bandas G.

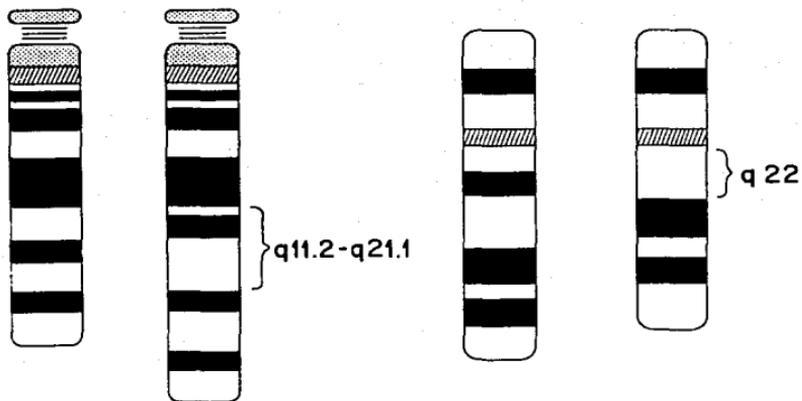


FIGURA 5.3.- Esquema de la translocación (15;17)(q22;q11-21), observada en algunas de las metafases analizadas del paciente 9.

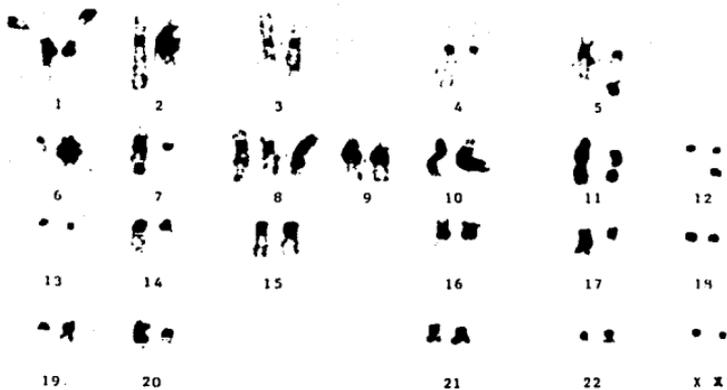


FOTO 7.- Cariotipo 47,XX,+8, correspondiente al caso 10. Técnica de bandas C. Obsérvese la trisomía del cromosoma 8

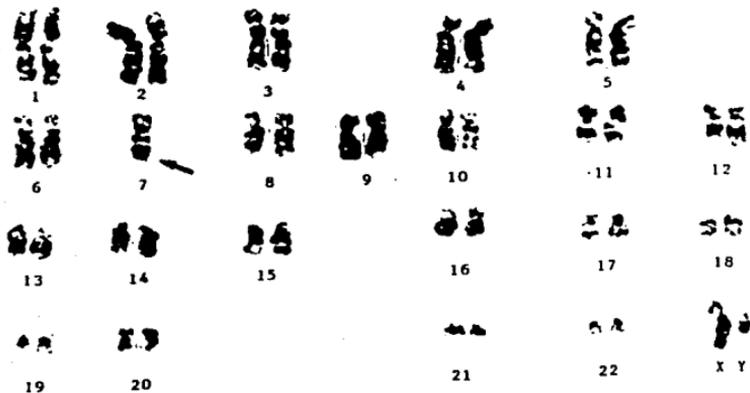


FOTO 8.- Cariotipo 45,XY,-7. Paciente 11, técnica de bandas G.
Se observa monosomía 7.



FOTO 9.- Cariotipo 46,XY,i(17q). Corresponde al paciente 12, técnica de bandas G. Nótese el isocromosoma (17q).

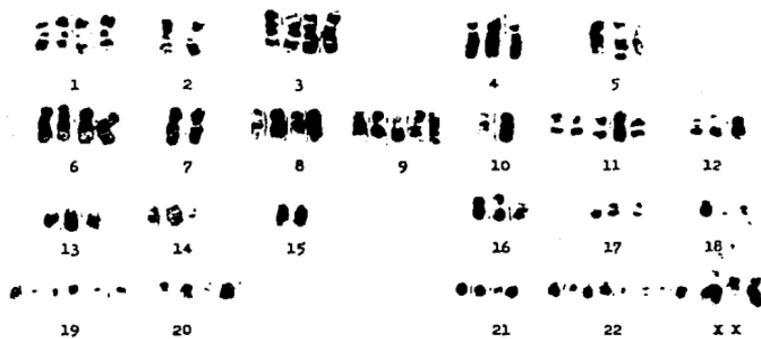


FOTO 10.- Cariotipo hiperdiploide (83 cromosomas) del caso 13.
 Técnica de bandas G.

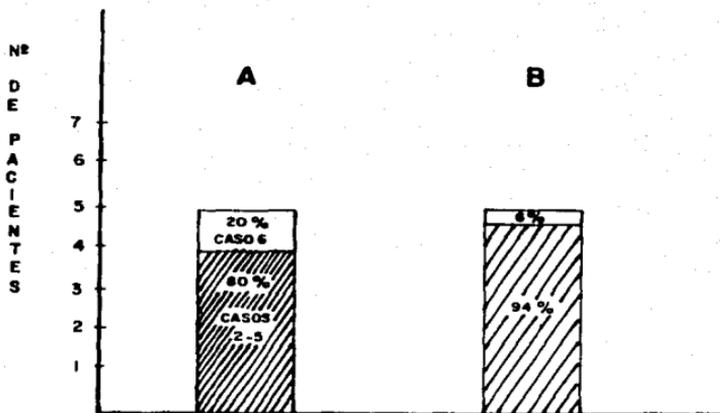


FIGURA 5.2 Histograma de la proporción de casos con Leucemia Granulocítica Crónica Phi+ (parte rayada de la columna) y Phi- (parte blanca de la columna). Las columnas A son los resultados de este estudio. Las columnas B son los datos reportados en la literatura (26). La comparación de datos se discute en el capítulo VI.

respectivamente.

Las seis muestras restantes de médula ósea pertenecieron a enfermos con diagnóstico probable de leucemia aguda (pacientes 8, 9, 10, 11, 12, 13). La paciente 8 presentó un cariotipo normal que estuvo de acuerdo al diagnóstico final de su padecimiento de anemia multicarencial, en los cinco casos restantes (pacientes 9 a 13) se observó alguna aberración cromosómica y se confirmó el diagnóstico de LA (tabla 5.2, figura 5.4-A).

Las anomalias cromosómicas que más se presentaron fueron en orden decreciente de frecuencia: cromosoma Ph1, trisomía 8, isocromosoma (17q) (figura 5.5).

El sexo de los cinco pacientes con diagnóstico de LGC fue: 4 mujeres y 1 hombre; y de los cinco con diagnóstico final de LA fué: 2 mujeres y 3 hombres (tablas 5.1 y 5.2, figura 5.6-A).

La edad de los pacientes con diagnóstico final de LGC fué de: 46-70 años y de los pacientes con LA de 16-50 años (tablas 5.1 y 5.2, figura 5.7).

Se desconoce la sobrevivencia de algunos casos, sin embargo, en las que se conocen se observa para los pacientes con LGC un

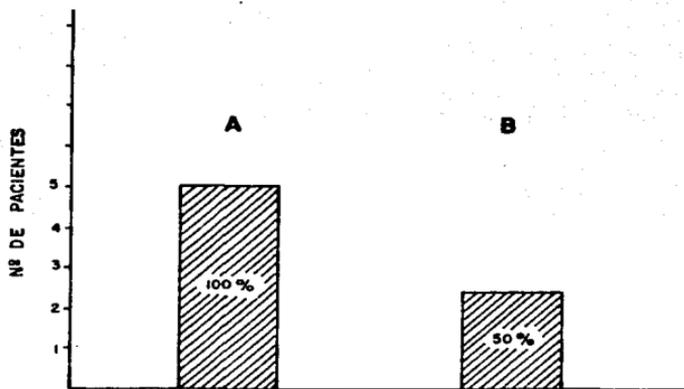
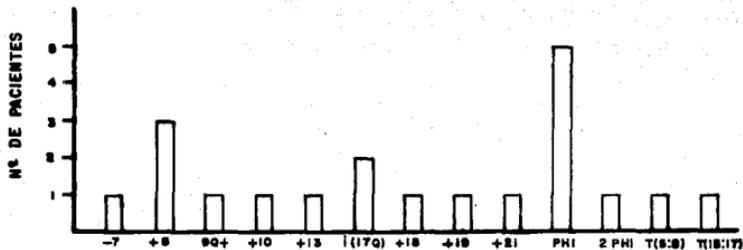


FIGURA 5.4 Histograma del porcentaje de pacientes con leucemia aguda que presentaron alguna aberración cromosómica al analizarlos con técnicas estándar. La columna A se refiere a los pacientes del presente estudio la B a los datos de la literatura (24).



ABERRACION CROMOSOMICA

FIGURA 5.5 Frecuencia de las diferentes anomalías cromosómicas encontradas en los 13 pacientes .



FIGURA 5.6 Representación de la proporción de mujeres y hombres afectados. Las columnas A corresponden a los casos del estudio. La columna B a lo informado en la literatura (26). La región rayada de las columnas corresponde al porcentaje de hombres y la parte blanca al porcentaje de mujeres, en ambos casos.

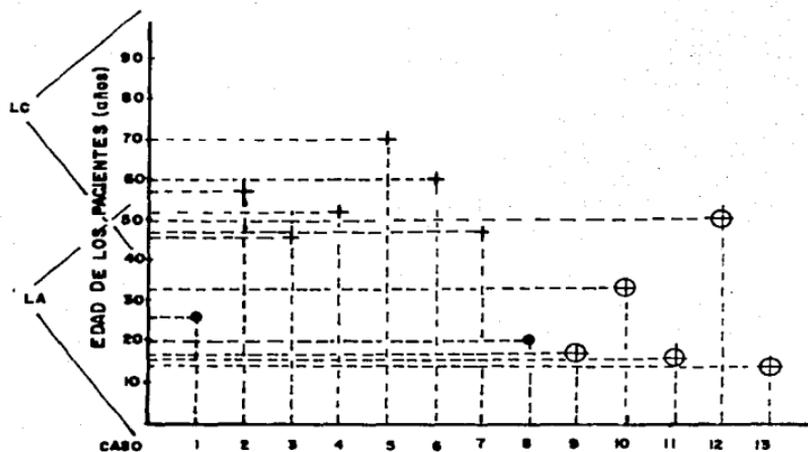


FIGURA 5.7 Representación gráfica de la edad de los pacientes del estudio. ⊕ con leucemia aguda. + con leucemia crónica. ● otros.

promedio de 2-4 años y en los pacientes con LA fué de 1-4 meses (tablas 5.1 y 5.2, figura 5.8 señalada con †).

Cuatro de los pacientes estudiados refirieron contacto previo con herbicidas e insecticidas. Se asume que son de uso agrícola dado el origen y ocupación de los pacientes en los casos 3 y 7 y, con insecticidas caseros los pacientes 6 y 12. Los pacientes 3 y 12 presentaron alteraciones cromosómicas (tablas 5.1 y 5.2).

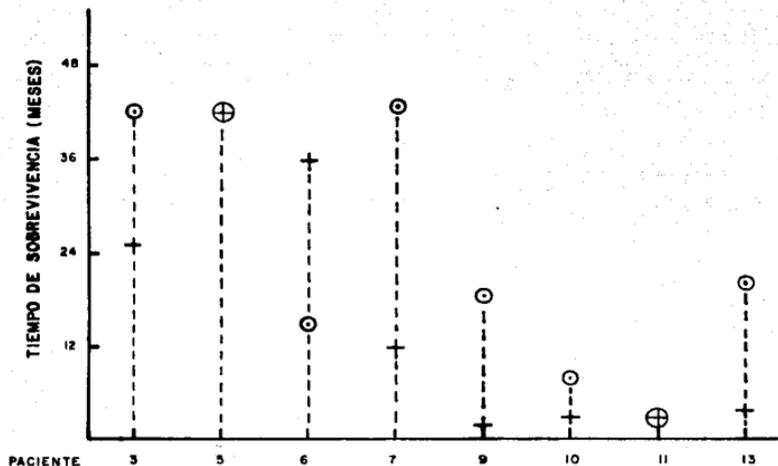


FIGURA 5.8 Correlación de la supervivencia esperada de acuerdo a la literatura y la reportada en el expediente clínico del paciente. Únicamente se comparan siete casos de los trece estudiados pues los otros seis en uno de ellos el diagnóstico de leucemia se descartó y los otros cinco no continuaron su tratamiento. ⊙: esperada +: reportada ⊕: coincidencia de esperada y reportada.

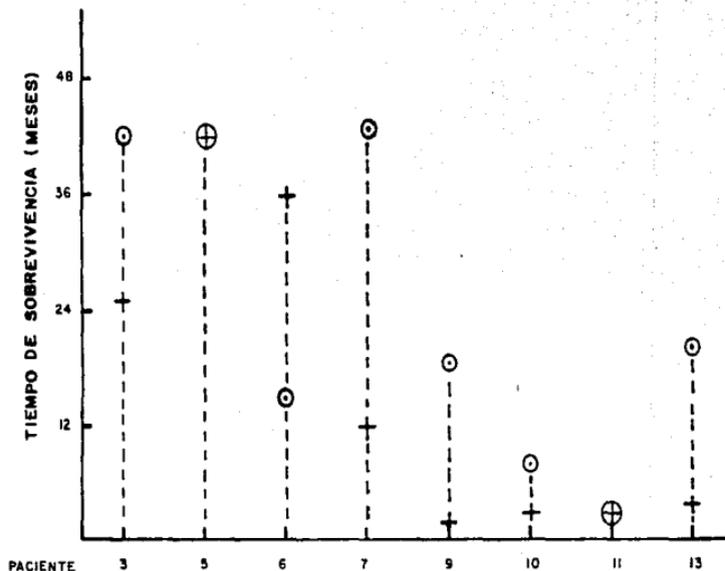


FIGURA 5.B Correlación de la supervivencia esperada de acuerdo a la literatura y la reportada en el expediente clínico del paciente. Únicamente se comparan siete casos de los trece estudiados pues los otros seis, en uno de ellos el diagnóstico de leucemia se descartó y los otros cinco no continuaron su tratamiento. O: esperada +: reportada ⊕: coincidencia de esperada y reportada.

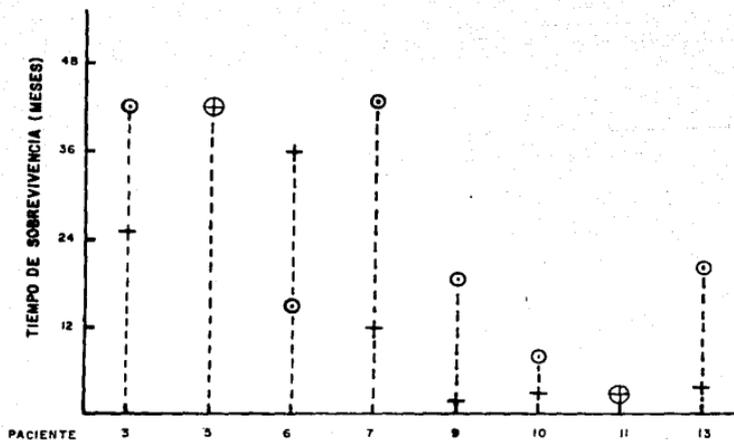


FIGURA 5.8 Correlación de la supervivencia esperada de acuerdo a la literatura y la reportada en el expediente clínico del paciente. Únicamente se comparan siete casos de los trece estudiados pues los otros seis, en uno de ellos el diagnóstico de leucemia se descartó y los otros cinco no continuaron su tratamiento. ⊕: esperada +: reportada ⊗: coincidencia de esperada y reportada.

CAPITULO VI.- D I S C U S I O N

Las 30 muestras de médula ósea de pacientes con probable leucemia procesadas provenían del pabellón de Hematología donde se realizó el aspirado de médula ósea. Sólo en 13 muestras (43.3%) fué posible un análisis citogenético adecuado lo que contrasta con los datos referidos en la literatura donde se logra 80% de éxito utilizando técnicas estandar (24) (figura 5.1). Este número reducido de preparaciones analizables fué debido a que en algunos casos el material era insuficiente o traía tejido membranal, hueso o coágulos. En ocasiones no fué posible el análisis porque las mitosis tenían citoplasma, el cual podía eliminarse con un tratamiento con ácido clorhídrico, pero dificultando el bandedo. Otro problema fué que los cromosomas no estaban suficientemente dispersos, a pesar de haberse sometido a varios cambios de fijador y de haber hecho las laminillas goteando desde una altura de 1.50m sobre el portaobjetos colocado - en un ángulo de 30°. Este procedimiento ocasionó en algunos casos que las mitosis se rompieran con la consecuente pérdida de cromosomas. Por otra parte, algunos tipos de leucemia se caracterizan por cromosomas pulverizados o "deshilachados", en ellos tampoco fué posible lograr un buen bandedo. Otro inconveniente es que un método directo como el empleado, no es favorable para apreciar algunas anomalías cromosómicas, las cuales parecerían potenciarse in vitro, por ejemplo la t(8;21), t(15;17) y la inv(16) (275). No obstante, la t(15;17) se pudo apreciar al microscopio en la muestra del paciente 9 (figura

5.3), mediante la observación muy minuciosa de muchas metafases.

Para obviar muchos de estos problemas es importante acudir personalmente para asegurar la primera alícuota del aspirado y experimentar en forma combinada diversas técnicas y ciertas variantes. Es decir, realizar una técnica directa con diferentes tiempos de colchicina, cultivar células durante 24-72 hrs e incluso hasta 15 días y en lo posible emplear la técnica de bandeado de alta resolución que mejoran la calidad de la mitosis, permiten un alto porcentaje de preparaciones exitosas donde pueden observarse cambios cromosómicos que de otra manera pasarían desapercibidos. También deben intentarse estudios seriados siguiendo la evolución del paciente. Todo lo anterior permitirá encontrar alteraciones de la célula clonogénica (9,26,44,275). Es importante hacer notar que este fué nuestro primer intento de bandear preparaciones de médula ósea lo cual implicaba montar y adaptar las diferentes metodologías.

De las cinco preparaciones que fueron analizadas con diagnóstico final de L6C, 88% de los casos presentaron cromosoma Ph1+, el 20% restante fué Ph1-. Considerando que se trata de un número muy pequeño de muestras se puede tomar como un porcentaje cercano al reportado en la literatura, 94% Ph1+ y 6% Ph1- (26), (tabla 5.1) (figura 5.2). Sin embargo es interesante señalar que en los cinco casos con diagnóstico final de LA (100%) de observó alguna aberración cromosómica, aún cuando en la literatura se reporta que utilizando técnicas de rutina, solamente 50% de los casos tienen alteraciones cromosómicas (24) (tabla 5.2) (figura

5.4).

Y en cuanto a las anomalías cromosómicas más frecuentes, el cromosoma Phi fué el que más se presentó porque fueron varios pacientes con LGC Phi+ y uno con trombocitosis hemorrágica esencial. En segundo lugar fué la trisomía 8 y después el isocromosoma (17q) las cuales han sido consideradas en la literatura como la anomalía numérica y estructural, respectivamente, más frecuente (24) (tablas 5.1 y 5.2, figura 5.5).

El caso 1 que fuera inicialmente diagnosticado como LGC, también presentó cromosoma Phi (foto 1), aún cuando, estudios posteriores revelaron que se trataba de un síndrome mieloproliferativo: trombocitosis hemorrágica esencial. La presencia del Filadelfia ha sido previamente reportada en este padecimiento (23,160).

El caso 2 fué LGC Ph positivo y por las características clínicas y hematológicas presentadas se pudo demostrar el diagnóstico de LGC Phi típica (23) (foto 1).

En los casos 3 y 4 los cambios cromosómicos permitieron confirmar el diagnóstico de LGC en fase blástica. En el caso 3 se presentaron clones con 47, 50 y 54 cromosomas. La clona de 54 fué la mejor analizada manifestando las trisomías 8, 10, 13, 18, 19, 21 y dos Phi además de un cromosoma 22 normal y una probable t(5;8)(q+;q-) (foto 2). El rápido deceso del paciente podría

explicarse por el elevado número cromosómico ya que en la literatura se señala que pacientes con LGC en fase blástica con más de 48 cromosomas en médula ósea, tienen una supervivencia marcadamente corta, 25 días (221). El caso 4 presentó clones de 47 cromosomas, además en una clona con Phi positivo fué evidente la presencia de i(17q) y trisomía 8 (foto 3). En este paciente también se observaron células Phi+, células Phi- y un cromosoma B supernumerario (fotos 4 y 5). Un hallazgo interesante en este caso fué la presencia de una clona con trisomía 8 y una banda extra en brazos largos de un cromosoma 9 (9q+) que probablemente se trate de la porción translocada del 22 en la t(9;22), aún cuando esta clona sea Phi- (foto 5).

Las anomalías observadas en nuestros pacientes confirman los datos de la literatura que refieren que la mayoría de los pacientes con LGC (80%) al entrar en fase blástica muestran anomalías cromosómicas adicionales. Son características las células con números cromosómicos modales de 47 a 50, tanto en células Phi+ como en las Phi-. Además del Phi los cambios cromosómicos que se presentan son en orden de frecuencia, un segundo Phi, un i(17q) o trisomía 8, en cambio en presencia de dos alteraciones es frecuente la asociación del i(17q) y un cromosoma 8 supernumerario (24,27).

El caso 5 presentó LGC con células Ph positivo (foto 1) y células Ph negativo. Puesto que la paciente tuvo un largo tiempo de sobrevida (3.5 años) con quimioterapia, podía considerarse que

la presencia de ambas clonas se debió a una buena respuesta al tratamiento. En la literatura se ha sugerido que en casos similares donde se observan algunas células normales y otras anormales el pronóstico es mejor que en los que presentan todas las células Ph⁺. Además, cuando se intenta reducir la proporción de estas células anormales, los pacientes que responden presentan sobrevivencia mayor al promedio (12,24,202, 211).

El caso 6 fué LGC con células Ph negativo y fué diagnosticado en fase acelerada, la cual se considera una etapa previa a la fase blástica. Tal vez la ausencia de cambios cromosómicos en este paciente permita incluirlo dentro del 20% de los casos que no presentan estas anomalías hasta seis meses antes de que se manifieste la fase aguda (23,24,27). Otro aspecto que llama la atención es que este paciente hubiera sobrevivido 3 años con el padecimiento a pesar de que ha sido reportado que los pacientes con LGC Ph negativo solo sobreviven en promedio 15 meses. Su tiempo de sobrevida es más congruente con los enfermos LGC Ph positivo (3-4 años), siendo probable que la t(9;22) estuviera presente aún cuando no fuese observable con las técnicas citogenéticas empleadas, casos similares han sido reportados en la literatura (206).

El caso 7 presentó cariotipo normal y el diagnóstico final en este paciente correspondió a leucemia mielomonocítica crónica (LMMoC). Esta asociación (cariotipo normal y LMMoC) ha sido informada en varios pacientes (26).

Dentro de los pacientes con diagnóstico presuntivo de leucemia aguda está el caso B en quien se observó cariotipo normal (foto 6), el cual coincide con un diagnóstico final de anemia multicarencial. En esta muestra fué posible realizar un buen análisis cromosómico debido a la excelente calidad de las mitosis, lo que desde un principio sugirió que se trataba de médula ósea normal.

El paciente 9 con diagnóstico de LNLA-M3 presentó una $t(15;17)(q34;q12-22)$, (figura 5.3), la que sólo pudo reconocerse mediante el análisis extremadamente minucioso en cromosomas elongados y por observación directa al microscopio. Lamentablemente en las fotografías no pudo observarse esta anomalía cromosómica ya que, las bandas translocadas son muy semejantes. La banda que se transloca del 15 al 17 es clara y queda precisamente junto a una similar en el cromosoma 17 (44). Sin embargo, en el cromosoma 15 pudo observarse una banda oscura extra muy pequeña, en la región donde se considera que está la porción translocada del 17 (figura 5.3). Rowley insiste que la translocación se presenta en todos los pacientes con LNLA-M3, pero es difícil detectarla, siendo mejor cultivar la muestra para facilitar la detección de la célula clonogénica (44). A pesar de esta última aseveración fué posible la observación de la anomalía con el método directo empleado.

El caso 10 con LNLA-M4 presentó trisomía 8 en la mayoría de

las células (foto 5). En estas preparaciones se sospechó de una inversión del cromosoma 16 lo cual se descartó mediante la técnica de bandas C (foto 7), ya que con esta técnica se observa el centrómero de todos los cromosomas y las regiones heterocromáticas de los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Según los datos de la literatura, cuando la trisomía 8 se presenta como única alteración es frecuente que exista un estado preleucémico o una previa exposición a mutágenos. No obstante, la paciente únicamente refirió tabaquismo, el cual hasta el momento no se considera un agente leucemógeno (69).

En el paciente 11, diagnosticado como LNLA-M5, se observó monosomía 7 en células de médula ósea (foto 8). Clínicamente presentó fiebre e infecciones recurrentes y una supervivencia de 3 meses. Estos datos son semejantes a los informados en la literatura donde se refiere que la monosomía 7 se asocia con mal pronóstico y susceptibilidad a infecciones y fiebre alta probablemente como consecuencia de la quimiotaxis deficiente en los neutrófilos sin un cromosoma 7 (26,257).

En el paciente 12 que fuera originalmente diagnosticado LNLA-M6 no se llegó a un diagnóstico preciso pero su leucemia aguda se asoció a un isocromosoma de brazos largos del 17 (foto 9) y cromosomas pulverizados. Ambas alteraciones pueden presentarse en diversos padecimientos por lo que no son útiles para un diagnóstico diferencial (23).

El resultado citogenético en el caso 13 cuyo diagnóstico

correspondía a LLA, fué de células con un promedio de 92 cromosomas (foto 10). Los cariotipos hiperdiploides de más de 50 cromosomas generalmente se observan con LLA (L1 o L2) y se asocia con mejor pronóstico (más de 21 meses de sobrevivencia) ya que tiene una primera remisión prolongada (26). Nuestro paciente tuvo 4 meses de sobrevivencia que es muy inferior al esperado.

En nuestros casos con LGC predominan las mujeres y en los casos con LA los hombres. En la literatura se informa que en todos los tipos de leucemia existe cierto predominio de hombres afectados, sin embargo últimamente se ha observado que ambos sexos están afectados por igual ya que están expuestos al mismo ambiente y riesgos (figura 5.6) (1). La diferencia de lo que se observó con respecto a lo establecido en la literatura, sobre todo de los casos con LGC, probablemente está dada por el número tan pequeño de pacientes estudiados.

Los rangos de edad presentados por los pacientes estudiados (tablas 5.1, 5.2 y figura 5.7) son congruentes con los reportados en la literatura que señalan edades más avanzadas para LC y edades más tempranas para LA (1,24).

Los datos de la sobrevivencia de los pacientes estudiados y los informados en la literatura para esas condiciones claramente se pueden comparar en las tablas 5.1, 5.2 y en la figura 5.8. Aún cuando se desconoce la sobrevivencia en algunos casos debido a que el paciente no continuó su tratamiento en el Hospital, puede apreciarse lo siguiente: (i) la sobrevivencia de los

pacientes con diagnóstico final de LGC se puede considerar como cercana a la reportada en la literatura, probablemente porque los tratamientos están disponibles en la Institución y (ii) la sobrevivencia de los pacientes con leucemia aguda y el paciente 7 fué marcadamente más corta que la esperada. En la mayoría de los pacientes la diferencia de resultados puede estar dada por factores técnicos, geográficos, genéticos y la terapia aplicada. Por ejemplo, es frecuente que los pacientes que asisten a este hospital padezcan un alto grado de desnutrición y algunos ya se encuentran en estados avanzados de la enfermedad. Por otra parte, la institución frecuentemente carece de recursos para aplicar la terapia más adecuada al paciente. Por todo lo anterior la LMMoC y las leucemias agudas, aparentan ser de peor pronóstico al establecido.

En cuanto a los pacientes que refirieron contacto con insecticidas y herbicidas solamente los pacientes 3 y 12 presentaron alteraciones cromosómicas y lo importante de este hecho es que se ha reportado una mayor proporción de alteraciones cromosómicas en los enfermos expuestos a insecticidas (117). Desafortunadamente no se tienen datos del período de exposición ni del tipo específico del agente, que permitiera establecer algún tipo de correlación. Sin embargo, si se considera que cada vez es mayor la contaminación con insecticidas y plaguicidas, tanto de alimentos como del medio ambiente, es posible considerar que sin darse cabal cuenta, todos los pacientes de este estudio y la mayor parte de la población estemos en contacto periódico con

estas sustancias. Esto permitiría preguntarnos, ¿hasta que grado pueden ser leucemógenos o carcinogénicos los insecticidas caseros y tantos agentes a los que estamos comúnmente expuestos?. Esto es aún incierto y materia de investigación. Actualmente se considera que para el surgimiento de la célula leucémica inicial o clonogénica deben ocurrir varios eventos como podrían ser la acción de uno más de los probables agentes etiológicos (radiaciones, sustancias químicas o virus) afectando el material genético, favoreciendo la expresión de sitios frágiles y/o cambios cromosómicos y/o activación o desinhibición de proto-oncogenes, lo que podría originar el desacoplamiento entre los genes de proliferación y diferenciación celular y otros cambios (9,26,42,51,52,68).

CAPITULO VII.- C O N C L U S I O N E S

Las técnicas estandar de bandedo permitieron demostrar en diez de las trece muestras estudiadas la presencia de aberraciones cromosómicas (casos 1 a 5 y 9 a 13) y fueron como las ya reportadas en la literatura. Esto permitió en algunos casos confirmar el diagnóstico de leucemia y el estadio en que se encontraba el padecimiento (casos 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 13). De los tres casos con cromosomas normales uno fué LGC Ph1- (caso 6), otro una LMMoC (caso 7) que en ocasiones no presentan anomalías cromosómicas y en el tercero (caso 8) se descartó el diagnóstico de leucemia y se confirmó por otros estudios que se trataba de una anemia multicarencial. Se infiere que los resultados citogenéticos ayudan al diagnóstico pero no son definitivos. La técnica de procesamiento directo de médula ósea proporciona resultados susceptibles de mejorar combinándola con técnicas de cultivo de 24 a 72 hrs y 15 días y la metodología de alta resolución pues se considera que con ello aumentaría el número de muestras analizables y se lograrían resultados más fidedignos.

En los pacientes estudiados con LA el tiempo de sobrevida fué inferior al informado. Se considera que esto se debió a las diferencias en las condiciones socio-económicas de los pacientes de este estudio con respecto a los de la literatura, así como la limitación en recursos de la institución para la elección de la terapia adecuada.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- WILLIAMS, J. W. (1983). Hematología. 2a ed. Salvat, Barcelona. 1475 p.
- 2.- WINTROBE, M. M. (1968). Clinical Hematology. 6th ed. Lea & Febiger, Philadelphia. 1167 p.
- 3.- WILLIAMS, J. W., BEUTLER, E., ERSLEV, A., RUNDLESS, W. (1977). "Hematology". 2th ed. Mc Graw-Hill, New York. 1720 p.
- 4.- UPTON, A. C. (1982). Radiaciones ionizantes de bajo nivel y sus efectos biológicos. En: El cáncer. (1986). SANTOS, E., RODRIGUEZ, V. E. ed. 2da ed. Scientific American, Barcelona: 26-35.
- 5.- BOVERI, T. (1914). "Zur frage der entstehung maligner tumoren" Gustav Fischer, Jena: 1-64.
- 6.- TJIU, J. H., LEVAN, A. (1956). "The chromosome number of man". *Hereditas*, 42: 1-6.
- 7.- CHU, E. H. (1960). "The chromosome complements of human somatic cells. *Am. J. Hum. Genet.*, 12: 97-103.
- 8.- NOWELL, P. C., HUNGERFORD, D. A. (1960). "A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia". *Science*, 132: 1497.
- 9.- FRANKS, L. M., TEICH, M. (1986). Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press, London. 974 p.
- 10.- BEUTLER, E., COLLINS, Z., IRWIN, L.E. (1967). "Value of genetic variants of glucose-6-phosphate-dehydrogenase in tracing the origin of malignant tumors". *N. Engl. J. Med.*, 276:389.
- 11.- BARR, R. D., FIALKOW, P. J. (1973). "Clonal origin of chronic myelocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 289: 307.
- 12.- ROWLEY, J. D. (1980). "Chromosome abnormalities in human leukemia". *Ann. Rev. Genet.*, 14: 17-39.
- 13.- MITELMAN, F., LEVAN, G. (1981). "Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1,871 cases". *Hereditas*, 95: 79-139.
- 14.- HOSSFELD, D. K., HAN, T., HOLDSWORTH, R.N., SANDBERG, A. A. (1971). "Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. VII. The significance of the Ph1 in conditions other than CML". *Cancer*, 27: 186.

- 15.- CASPERSSON, T. A., ZECH, L., JOHANSSON, C. (1970). "Analysis of human metaphase chromosome set by aid of DNA binding fluorescent agents". *Exp. Cell. Res.*, 62: 490-492.
- 16.- SEABRIGHT, M. (1971). "A rapid banding technique for human chromosomes". *Lancet*, 2: 971-972.
- 17.- SUMER, A. T., EVANS, H. J., BUCKAND, R. A. (1971). "New technique for distinguishing between human chromosomes". *Nature, New. Biol.*, 232: 31-32.
- 18.- DUTRILLAUX, B., LEJEUNE, J. (1971). "Sur une nouvelle technique d'analysis du caryotype humain". *C. R. Acad. Sci. Paris Ser. D.*, 272: 2638-2640.
- 19.- CHANDLEY, A. C., FLETCHER, J. M. (1973). "Centromere staining at meiosis in man". *Humangenetik*, 18: 247-252.
- 20.- DUTRILLAUX, B. (1973). "Nouveau systeme de marquage chromosomeque: les bandes T". *Chromosoma* 41: 395-402.
- 21.- MATSUI, S., SASAKI, M. (1973). "Differential staining of nucleolus organizers in mammalian chromosomes". *Nature (London)*, 246: 148-150.
- 22.- BLOOM, S. E., GOODPASTURE, C. (1976). "An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions on human chromosomes". *Hum. Genet.*, 34: 199-206.
- 23.- SANDBERG, A. A. (1980). The chromosomes in human cancer and leukemia. Elsevier North Holand. New York, 748 p.
- 24.- ROWLEY, J. D., TESTA, J. R. (1982). "Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases". *Adv. Cancer Res.*, 36: 103-138.
- 25.- YUNIS, J. J. (1981). "New chromosome techniques in the study of human neoplasia". *Hum. Pathol.*, 12: 540-550.
- 26.- YUNIS, J. J. (1986). "Chromosomal rearrangements, genes and fragile sites in cancer: clinical and biologic implications. In: Important advances in oncology (1986). De Vita, V. T. Jr, Hellman, S., Rosenberg, S. A., ed. Lippincott Co. 93-128.
- 27.- YUNIS, J. J. (1983). "The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, 221: 227-236.
- 28.- YUNIS, J. J., BLOODFIELD, C. D., ENSRUD, K. (1981). "All patients with acute nonlymphocytic leukemia may have chromosomal defect". *N. Engl. J. Med.*, 305: 131-139.
- 29.- HAYATA, I., SAKURAI, M., KAKATI, S., SANDBERG, A. A. (1975). "Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XVI. Banding studies of chronic myelocytic leukemia, including five unusual Ph translocations". *Cancer*, 36:1177.

- 30.- BURNETT, M. (1958). "Leukemia as a problem in preventive medicine". N. Engl. J. Med., 259: 423.
- 31.- WRIGHT, W. E., PETERS, J. M., MACK, T, M. (1982). "Leukaemia in workers exposed to electrical and magnetic fields. Lancet 2: 1160-1161.
- 32.- SANCHEZ, F. J., OUTERINO, J., CALABUIG, M. T. (1981). "Cinetica celular en las leucemias agudas". Sangre, 26: 718-737.
- 33.- VON MELCHNER, H., HOFFKEN, K. (1985). "Disconnection of genes coding for self-renewal and differentiation: a possible mechanism of diversity in acute myeloid leukemias". Blut, 50: 257-265.
- 34.- FAUSER, A. A., LOHR, G. W. (1982). "Myelo-lymphopoietic stem cells in human bone marrow". Blut, 45: 151-155.
- 35.- OGAWA, M., PORTER, P. N., NAKAHATA, T. (1983). "Renewal and commitment to differentiation of hemopoietic stem cells (an interpretative review)". Blood, 61: 823-829.
- 36.- WINTROBE, M. M., LEE, G. R., BOGGS, D. R. (1981). Clinical hematology. 8th ed. Lea & Febiger, Philadelphia, 846 p.
- 37.- BARTRAM, C. R., RACHAVACHAR, A., ANGER, B., STAIN, C., BETTELHEIM, P. (1987). "T lymphocytes lack rearrangement of the bcr gene in Philadelphia chromosome positive chronic myelocytic leukemia". Blood, 69: 1682-1685.
- 38.- KUMAR, S., LAVIN, M. F., SMITH, P. J., PEMBLE, L.; COLLINS, R. J., PRENTICE, R. (1985). "Rearrangements of T-cell receptor beta-chain genes in human leukaemias". Molecular Immunol., 23: 1349-1356.
- 39.- SANGSTER, R. N., MINOWADA, J., SUCIU FOCA, N., MINDEN, M., MAK, T. W. (1986). "Rearrangement and expression of the alpha, beta and gamma chain T cell receptor genes in human thymic leukemia cells and functional T-cells". J. Exp. Med., 163: 1491-1508.
- 40.- ASOU, N., MATSUOKA, M., HATTORI, T., KAWANO, F., MAEDA, S., SHIMIDA, K., TATASUK, K. (1987). "T-cell gamma gene rearrangements in hematologic neoplasmas". Blood, 69: 968-970.
- 41.- TAWA, A., BENEDICT, S. H., HARA, J., HOZUM, N., GELFAND, E. W. (1987). "Rearrangement of the T cell receptor gamma-chain gene in childhood acute lymphoblastic leukemia". Blood, 70: 1933-1939.

- 42.- SACHS, L. (1980). "Constitutive uncoupling of pathways of gene expression that control growth and differentiation in myeloid leukemia: a model for the origin and progression of malignancy". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 77: 6152-6156.
- 43.- FIALKOW, P. J., SINGER, J. W., ADAMSON, J. W., VAIDYA, K., DOW, L. W., OCHS, J., MOOHR, J. W. (1981). "Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin". *Blood*, 57: 1068-1073.
- 44.- ROWLEY, J. D. (1984). "Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma". *Cancer Res.*, 44: 3159-3168.
- 45.- TESTA, J. R., HOBGE, D. E., MISAW, S., IANPARSA, N. (1984). "Chromosome 16 rearrangements in acute myelomonocytic leukemia with abnormal eosinophils". *N. Engl. J. Med.*, 310: 468-469.
- 46.- PALUMBO, A., MINOWADA, J., ERIKSON, D., CROCE, C. M., ROVERA, G. (1984). "Lineage infidelity of a human myelogenous leukemia cell line". *Blood*, 64: 1059.
- 47.- KITCHINGMAN, G. R., ROVIGATTY, U., MAUER, A. M., MELVIN, S., MURPHY, S. B., STASS, S. (1985). "Rearrangement of immunoglobulin heavy chain genes in T-cell acute lymphoblastic leukemia". *Blood*, 65: 725-729.
- 48.- CHENG, G. Y., MINDEN, M. D., TOYONAGA, B., MAK, T. W., Mc CULLOCH, E. A. (1986). "T-cell receptor and immunoglobulin gene rearrangement in acute myeloblastic leukemia". *J. Exp. Med.*, 414-424.
- 49.- HINSBERG, A. C., KRONIRIS, T. G., MARK, T. W., WILKES, B. M. (1985). "Rearrangement of the gene for the beta chain of the T-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders". *N. Engl. J. Med.*, 313: 529-533.
- 50.- HAAS, D. A., BETTELHEIN, P., SCHMIDMEIER, W., GADNER, H., LUDWIG, H., MADJIC, O., SCHULZ, U. (1985). "5q- chronic some in acute leukemia with lymphoid morphology and expression of myeloid membrane determinants". *Blood*, 65: 1342-1348.
- 51.- BOGGS, D. R. (1981). "Clonal origin of leukemia: site of origin in the stem cell hierarchy and the significance of chromosomal changes". *Blood cells*, 7:205-215.
- 52.- FIALKOW, P. J., MARTIN, P. J., NAJFELD, V., PENFOLD, G. K., JACOBSON, R. J., HANSEN, J. A. (1981). "Evidence for a multistep pathogenesis of chronic myelogenous leukemia". *Blood*, 58: 158-163.
- 53.- GRANLNICK, H. R., GALTON, D. A., CATOVSKY, D. (1977). "Classification of acute leukemia". *Ann. Int. Med.* 48: 740.

- 54.- NECHELES, T. F. (1979). "The acute leukemias". George Thieme publishers, Stuttgart, 840 p.
- 55.- CATOVSKY, D. (1982). "The classification of acute leukemia in: Symposium: classification of leukemia". Pathology, 14: 277-281.
- 56.- BERGER, R., BERNHEIN, A., DANIEL, M. T., VALANSI, F., FLANDRIN, G. (1981). "Karyotype and cell phenotypes in primary acute leukemias". Blood cells, 7: 287-292.
- 57.- GARSON, O. M. (1982). "The value of chromosome studies in the classification and management of the leukemias". Pathology, 14: 291-294.
- 58.- SCHMITZ, N., GODDE-SALZ, E., GASSMANN, W., LOFFER, H. (1984). "Acute myelomonocytic leukemia with involvement of eosinophil and inversion of chromosome 16". Blut, 48: 263-267.
- 59.- BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, D. A. G., GRALNICK, H. R., SULTON, M. D. (1985). "Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7)". Ann. Int. Med., 103: 460-462.
- 60.- BENNETT, J. M., CATOVSKY, D., DANIEL, M. T. (1976). "Proposals for the classification of the acute leukaemias". Br. J. Haematol., 33: 451-463.
- 61.- EYS, J. V., PULLEN, J., HEAD, D., BOVETT, Y., CRIST, W., FALLETA, J., HUMPHREY, G. B., JACKSON, J., RICCARDI, W., BROCK, P. (1986). "The french american british (FAB) classification of leukemia". Cancer, 57: 1046-1051.
- 62.- SEREMETIS, S., CUTTNER, J., WINCHESTER, R. (1985). "Definition of a possible genetic basis for susceptibility to acute myelogenous leukemia associated with the presence of a polymorphic Ia epitope". J. Clin. Invest., 76: 1391-1397.
- 63.- DE KLEIN, J. (1982). "Cells of the immune system. In: Immunology, the science of self-nonself discrimination. John Wiley and Sons, New York: 142.
- 64.- CHAMPLIN, R., GALE, R. P., FOON, K. A., GOLDE, D.W. (1986). "Chronic leukemias: oncogenes, chromosomes, and advances in therapy". Annals of Internal. Med., 104: 671-688.
- 65.- CHAMPLIN, R. (1985). "Chronic myelogenous leukemia: review of recent advances". In: 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985". Abstract J. Cell Biochem. (Suppl), 9A: 75-130.
- 66.- FOON, K. A., GALE, R. P. (1985). "Chronic lymphocytic leukemia". In: 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985". Abstracts J. Cell Biochem., (Suppl) 9A: 75-130.

- 67.- BRITO-BABAPULLE, V., PRONIFRET, M., MATUTE, E., CATOVSKY, D. (1987). "Cytogenetics studies on prolymphocytic leukemia T. T-cell prolymphocytic leukemia". *Blood*, 70: 926-931.
- 68.- TORRES, A., MARTINEZ, G., GOMEZ, G., GARCIA, C., MANZANARES, E. (1981). "Conceptos actuales de la etiopatogenia de las leucemias agudas". *Sangre*. 26: 700-717.
- 69.- CANELLOS, G. P., WHANG-PENG, J. (1972). "Philadelphia chromosome-positive preleukemia state". *Lancet*, 2: 1227-1229.
- 70.- FIALKOW, P. J., JACOBSON, R. J., PAPAYANNOPOULOU, M. (1977). "Chronic myelocytic leukemia: clonal origin in a stem cell common to granulocyte, erythrocyte, platelet, and monocyte/macrophage". *Am. J. Med.*, 63: 125-130.
- 71.- ABROMOWITCH, M., WILLIAMS, D. L., MELVIN, S. L., STASS, S. (1984). "Evidence for clonal evolution in pre-B-cell leukemia". *Br. J. Haematol.*, 56: 409-416.
- 72.- LEWIS, E. B. (1963). "Leukemia multiple myeloma and aplastic anemia in american radiologist". *Science*, 142: 1492.
- 73.- MARCH, H. C. (1961). "Leukemia in radiologists ten years later". *Am. J. Med. Sci.*, 242: 127.
- 74.- BEEBE, G. W., KATO, H., LAND, C. E. (1978). "Studies of the mortality of a bomb survivors. Mortality and radiation dose, 1950-1974". *Radiat. Res.*, 75: 138.
- 75.- BIZZOZERO, O. J., JOHNSON, K. O., CIOCCO, A. (1966). "Radiation-related leukemia in Hiroshima and Nagasaki: 1946-1964. Int. "Distribution, incidence and appearance time". *N. Engl. J. Med.*, 274: 1096.
- 76.- BRILE, A. B., TOMONAGA, M., HEYSSEL, R. M. (1962). "Leukemia in man following exposure to ionizing radiation". *Ann. Intern. Med.*, 56: 590-609.
- 77.- NISHIYAMA, H., ANDERSON, R. E., ISHIMARU, T. (1973). "The incidence of malignant lymphoma and multiple myeloma in Hiroshima and Nagasaki atomic bomb survivors, 1945-1965". *Cancer*, 32: 1301.
- 78.- WATANABE, S. (1964). "Present status of somatic effects in atomic bomb survivors living in Hiroshima". *Acta Haematol. Jap.*, 27: 121-130.
- 79.- BLOOM, A. D., NAKAGONE, Y., AWA, A. A., NERISHI, S. (1970). "Chromosome aberrations and malignant disease among a survivors". *Am. J. Public. Health.*, 60: 641-644.
- 80.- STRICKER, R. B. (1983). "Acute lymphoblastic leukemia with monosomy 7 in a Hiroshima survivors 37 years after the bomb". *JAMA*, 250: 640-641.

- 81.- O'DONELL, J. F., BRERETON, H. D., GRECO, F. A., GRALNICK, H. R., JOHNSON, R. E. (1979). "Acute nonlymphocytic leukemia and acute myeloproliferative syndrome following radiation therapy for non-Hodgkins lymphoma and chronic lymphocytic leukemia: clinical studies". *Cancer*, 44: 1930.
- 82.- ZARRABI, M. H., ROSNER, F., BENNETT, J. M. (1979). "Non-Hodgkin's lymphoma and acute myeloblastic leukemia. A report of cases and review of the literature". *Cancer*, 44: 1070.
- 83.- KARCHMER, R. K., CADWELL, G. G., CHIN, T. D. (1974). "Acute leukemia following irradiation for carcinoma of the larinx". *Blood*, 43: 721.
- 84.- ROSNER, F., CAREY, P. W., ZARRABI, M. H. (1978). "Breast cancer and acute leukemia: report of 24 cases and review of the literature". *Am. J. Hematology*, 4: 151.
- 85.- BERNARD, J. F., RENOUX, M., DHERMY, D., SCHNEIDER, M., COURADUI, F., AMAR, M., BOIVIN, P. (1978). "Leucemie aigue et polyglobulie primitive de Vazquez Vingt observations". *Sem. Hop. Paris*, 54: 797.
- 86.- MONDAN, B., LILIENTELD, A. M (1965). "Polycytemia vera and leukemia, the role of radiation treatment. A study of 1222 patients". *Medicine*, 44:305.
- 87.- TUBIANA, M., FLAMANT, R., ATTIE, E. (1968). "A study of hematological complications accurin in patients with polycytemia vera treated with P32". *Blood*, 32: 536.
- 88.- ABBATT, J. D. (1967). "Leukemia and other fatal blood discrasias in thorium dioxide patients". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 145: 767.
- 89.- DA SILVA HORTA, J. (1967). "Late effects of thorotrast on the liver and spleen and their efferent lymphnodes". *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 145: 676.
- 90.- Mc MAHON, B., (1962). "Prenatal X-ray exposure and childhood cancer". *J. Natl. Cancer Inst.*, 28: 1173.
- 91.- STEWART, A., WEBB, J., HEWITT, D. (1958). "A survey of childhood malignancies". *Brit. Med. J.*, I: 1495.
- 92.- HOPTON, P. A., Mc KINNEY, P. A., CARTWRIGHT, R. A., MANN, J. K., BIRCH, J. M. HARTLEY, A. L., WATERHOUSE, J. A., JOHNSTON, H. E., DRAPER, G. J. (1985). "X-rays in pregnancy and the risk of childhood cancer". *Lancet*, 2: 773.
- 93.- ENNIS, J., MUIRHEAD, C. R. (1985). "X-rays in pregnancy and risk of childhood cancer". *Lancet*, 2: 1185.

- 94.- KERSEY, J. H., SPECTOR, B. D., GOOD, R. A. (1973). "Primary immunodeficiency diseases and cancer: the immunodeficiency". *Cancer registry*. *Int. J. Cancer*, 12: 333.
- 95.- WITKOWSKY, R., ANGER, H. (1976). "Premature chromosome condensation irradiated man". *Hum. Genet.*, 34: 65-68.
- 96.- BEEK, B. (1981). "Cell proliferation and chromosomal damage in human leukocytes dicentrics and premature chromosome condensations in first, second, and third mitoses after X-irradiation". *Hum. Genet.*, 57: 75-77.
- 97.- BLOOM, A. D., NEVIISHI, S., KAMADA, M., ISEKI, T., KEEHN, R. J. (1966). "Cytogenetics investigations of the atomic bombing of Hiroshima and Nagasaki". *Lancet*, 2: 672.
- 98.- EZDINLI, E. Z., SOKAL, J. E., AUNGST, C. W., KIM, U., SANDBERG, A. A. (1969). "Myeloid leukemia in Hodgkin's disease: chromosomal abnormalities". *Ann. Intern. Med.*, 71: 1097-1104.
- 99.- MERUELO, D., OFFER, M., ROSSOMANDO, A. (1983). "Induction of leukemia by both fractionated alpha-irradiation and radiation leukemia virus involves loci in the chromosome 2 segment H-30-A". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80: 162-166.
- 100.- HARAN-GHERA, N. (1966). "Leukemogenic activity of centrifugates from irradiated mouse thymus and bone marrow". *Int. J. Cancer*, 1: 81.
- 101.- SHEIKH, K. (1986). "Exposure to electromagnetic field and the risk of leukemia". *Arch. Environmental Health* 41: 56-63.
- 102.- COLEMAN, M., BELL, J., SKEET, R. (1983). "Leukemia incidence in electrical workers". *Lancet*, 1: 982-983.
- 103.- MILHAM, S. Jr. (1982). "Mortality from leukemia in workers exposed to electrical and magnetic field". *N. Engl. J. Med.*, 309: 247.
- 104.- WERTHEIMER, N., LEEPER, E. (1979). "Electrical wiring configurations and childhood cancer". *Am. J. Epidemiol.*, 109: 223-284.
- 105.- BONNELL, J. A. (1982). "Effects of electrical field near power transmission plant". *J. Roy. Soc. Med.*, 75: 933-941.
- 106.- MACK, T. M. (1977). "Cancer surveillance program in Los Angeles". *Country Natl. Cancer Inst. Monogr.*, 47: 99-101.
- 107.- WIKLUND, K., EINHORN, J., EKLUND, G. (1981). "An application of the swedish cancer environment registry. Leukemia among telephone operators of the telecommunications administration in Sweden". *International Journal of Epidemiology*, 10: 373-376.

- 108.- WRIGHT, W. E., PETERS, J. M., MACK, T. M. (1982). "Leukaemia in workers exposed to electrical and magnetic fields". *Lancet*, 2: 1160-1161.
- 109.- AKSOY, M. (1976). "Types of leukemia in chronic benzene poisoning. A study in thirty-four patients". *Acta Haematol.*, 55: 65.
- 110.- VIGLIANI, E. C., SARTA, G. (1964). "Benzene and leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 271: 872.
- 111.- AKSOY, M. (1977). "Leukemia in workers due to occupational exposure to benzene". *N. Istanbul Countr. Clin. Sci.*, 12: 3-14.
- 112.- COHEN, T., GREGER, W. P. (1967). "Acute myeloid leukemia following seven years of aplastic anemia induced by chloramphenicol". *Am. J. Med.*, 43: 762.
- 113.- JEDLIKA, V. (1958). "Paramyeloblastic leukemia appearing simultaneously in two blood cousins after simultaneous contact with gammexane (hexachlorocyclohexane)". *Acta Med. Scand.*, 81: 445.
- 114.- JENSEN, M. K., ROLL, K. (1965). "Phenylbutazone and leukemia". *Acta Med. Scand.*, 178: 505.
- 115.- HOGSTEDT, CH., MALMQUIST, N., WADMAN, V. (1979). "Leukemia in workers exposed to ethylene oxide". *JAMA*, 242: 1132.
- 115.- MITELMAN, F., BRANDT, L., NILSSON, P. G. (1978). "Relation among occupational exposure to potential mutagenic/carcinogenic agents, clinical findings, and bone marrow chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia". *Blood*, 52, 1229-1237.
- 117.- MITELMAN, F. G., NILSSON, P. G., BRANDT, L., ALIMENA, G., MONTUORO, A., DALLAPICCOLA, B. (1975). "Chromosomes, leukemia, and occupational exposure to leukemogenic agents". *Lancet*, 2: 1195-1196.
- 119.- ROSNER, F., GRUNWALD, H. W. (1974). "Multiple myeloma terminating in acute leukemia: report of 12 cases and review of the literature". *Am. J. Med.*, 57: 927.
- 119.- ROSNER, F., GRUNWALD, H. W. (1975). "Hodgkin's disease and acute leukemia. Report of eight cases and review of the literature". *Am. J. Med.*, 58: 339.
- 120.- ZARRABI, M. H., GRUNWALD, H.D., ROSNER, F. (1977). "Chronic lymphocytic leukemia terminating in acute leukemia: a review". *Arch. Intern. Med.*, 137: 1059.

- 121.- REIMER, R. R., HOOVER, R., FRAUMENI, J. F. Jr, YOUNG, R. C., (1977). "Acute leukemia after alkylating agent therapy of ovarian cancer". N. Engl. J. Med., 297: 177.
- 122.- BERK, P. D., GOLDBERG, J. D., SILVESTEIN, M. N., WEINFELD, A., DONOVAN, P. E., ELLIS, J. T., LANDAW, S. A., LASZLO, J., NAJEAN, V., PISCROTH, A. V., WASSERMAN, L. R. (1981). "Increased incidence of acute leukemia in polycythemia vera associated with chlorambucil therapy". N. Engl. J. Med., 304: 441.
- 123.- CADMAN, E. C., CAPIZZI, R. L., BERTINO, J. R. (1977). "Acute nonlymphocytic leukemia. A delayed complication of Hodgkin's disease therapy: analysis of 109 cases". Cancer, 40: 1280.
- 124.- ROSNER, F. (1976). "Acute leukemia as a delayed consequence of cancer chemotherapy". Cancer, 37: 1033.
- 125.- COLEMAN, C. N., WILLIAMS, C. J., FLINT, A., GLATSTEIN, E. J., ROSENBERG, S. A., KAPLAN, H. S. (1977). "Hematologic neoplasia in patients treated for Hodgkin's disease". N. Engl. J. Med., 297: 1249.
- 126.- GREENWAD, H. W., ROSNER, F. (1977). "Acute leukemia in patients receiving immunosuppressive agents". Blood (suppl), 50: 192.
- 127.- LOVI, S., SCHWARTZ, R. S. (1978). "Immunodeficiency and the pathogenesis of lymphoma and leukemia". Sem. Haem., 1: 22.
- 128.- ROBERTS, M. M., BELL, R. (1976). "Acute leukemia after immunosuppressive therapy". Lancet, 2: 768.
- 129.- TCHERNIA, G., MIELOT, F., SUBTIL, E., PARMENTIER, C. (1976). "Acute myeloblastic leukemia after immunodepressive therapy for primary non-malignant disease". Blood Cells, 2: 67.
- 130.- LOWELESS, A. (1969). "Possible relevance of O-6 alquilation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides". Nature, 223: 206.
- 131.- PEGG, A. E. (1977). "Formation and metabolism of alquilated nucleosides: possible role in carcinogenesis by nitroso-compounds and alquilatin agents". Adv. Cancer Res., 25: 195.
- 132.- GRAMONT, A., LOUVET, C., KRULIK, M., SMADJA, N., DONADIO, D., LAPORTE, J. P., BRISSAND, P., SMITH, M., DELAGE, J. M., DROLET, Y., RIOUX, E., JACQUILLAT, C., NAJMAN, PARLIER, Y., BOIRON, M., DEBRAY, J. (1986). "Preleukemic changes in cases of nonlymphocytic leukemia secondary to citotoxic therapy". Cancer, 58: 630-634.

- 133.- DANG, S. P., LIBERMAN, B. A., SHE...
TWEENDDALE, M., GARDNER, A., COLGAN, T., ROSE, T. H., EVANS,
W. K. (1986). "Therapy related leukemia and myelodysplasia
in small-cell lung cancer". Arch. Intern. Med., 146: 1689-
1694.
- 134.- TROSKO, J. E., CHU, E. H. (1975). "The role of DNA repair
and somatic mutation in carcinogenesis". Advan. Cancer Res.,
21: 391.
- 135.- CREASEY, W. (1976). "Basic mechanisms. Nat. Cancer. Inst.
Conference on the delayed consequences of cancer therapy:
proven and potential, Orlando, Fl. January 9-11, 1975".
Cancer (suppl), 37: 999.
- 136.- BOUTWELL, R. K. (1974). "The function and mechanism of
promoter of carcinogenesis". Crit. Rev. Toxicol., 2: 419.
- 137.- Mc CULLOCH, E. A., BUICK, R. N., CURTIS, J. E., MESSNER, H.
A., SENN, J. S. (1981). "The heritable nature of clonal
characteristics in acute myeloblastic leukemia. Blood, 48:
34-38.
- 138.- BISHOP, J. M. (1982). "Oncogenes". Scientific American,
246: 66-78.
- 139.- SHENIN, R. (1981). "Tumor viruses as modifiers of the
nuclear genome of eucariotic cells". Annals New York Academy
of Science, 361: 435-460.
- 140.- GALLO, R. C., WONG-STAAAL, F. (1982). "Retroviruses as
etiologic agents of some animal and human leukemias and
lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism
of leukemogenesis". Blood 60:545-557.
- 141.- BISHOP, J. M. (1978). "Retroviruses". Annu. Rev. Biochem.,
47: 35.
- 142.- HILL, M., HILLOVA, J. (1976). "Genetic transformation of
animal cells with viral DNA and RNA tumor viruses". Adv.
Cancer Res., 23: 237.
- 143.- CHOSA, T. (1982). "Infectivity dissociated from
transforming activity in human retrovirus, adult T-cell
leukemia virus". Gann, 73: 844-847.
- 144.- HEISTERKAMP, N., GROFFEN, J., STEPHENSON, J. R., SPURR, N.
K., GODDFELLOW, P. N., SOLOMON, E., CARRITT, B., BODMER, W.
F. (1982). "Chromosomal localization of human cellular
homologues of two viral oncogenes". Nature, 299: 747-749.
- 145.- OZANNE, B., WHEELER, T., ZACK, J., SMITH, G., DALE, B.
(1982). "Transforming gene of a human leukaemia cells is
unrelated to the expressed tumour virus related gene of the
cell". Nature, 299: 744-46.

- 146.- GEISLER, E., THEILE, M. (1983). "Virus induced gene mutations of eukaryotic cells". *Hum. Genet.*, 63: 1-12.
- 147.- WONG-STAAAL, F., GALLO, R. C. (1985). "The family of human T-lymphotropic leukemia viruses: HTLV-I as the cause of adult T cell leukemia and HTLV-III as the cause of acquired immunodeficiency syndrome". *Blood*, 65: 253-263.
- 148.- MIYAMOTO, K., KITAJIMA, K., SUEMARA, S., TANAKA, T. (1982). "Karyotypic findings and prognosis of adult-T-cell leukemia patients". *Gann*, 854-856.
- 149.- TAJIMA, K., TOMINAGA, S., SHIMIZU, H., SUCHI, T. (1981). "A hypothesis on the etiology of adult T-cell leukemia/lymphoma". *Gann*, 72: 684-691.
- 150.- SANADA, I., TANAKA, R., KUMAGI, E., TSUDA, H., NISHIMURA, H., YAMAGUCHI, K., KAWANO, F., FUJIWARA, H., TATASUKI, K. (1985). "Chromosomal aberrations in adult T cell leukemia: relationship to the clinical severity". *Blood* 65: 649-654.
- 151.- WHANG-PENG, J., BUNN, P. A., KNUTSEN, T., KAO-SHAN, C. S. (1985). "Cytogenetic studies in human T-cell lymphoma virus (HTLV)-positive leukemia-lymphoma in the United States". *JNCI*, 74: 357-359.
- 152.- HAYWARD, W. S., NEEL, B. C., ASTRIN, S. M. (1981). "Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis". *Nature*, 290: 475-480.
- 153.- MARX, J. L. (1984). "How the HTLV's might cause cancer". *Science*, 225: 398-399.
- 154.- HARRISON, J. F., LILLEYMAN, J. S. (1980). "Acute leukemia in sibling". *Postgrad Med. J.*, 56:271.
- 155.- HORBAR, J. D. (1981). "Hodgkin's disease following acute lymphocytic leukemia in a patient from a cancer-prone family". *Med. Pediatr. Oncol.* 9: 219-223.
- 156.- CHAGANTI, R. S., DENIS, D., MILLER, R., MEYERS, P., GERMAN, J. (1979). "Cytogenetic evidence of the intrauterine origin of acute leukemia in monozygotic twins". *New Engl. J. Med.*, 300: 1032-1034.
- 157.- HARTLEY, S. E., SAINSBURY, C. (1981). "Acute leukaemia and the same chromosome abnormality in monozygotic twins". *Hum. Genet.* 58: 408-410.
- 158.- CLARKSON, B. D., BOYSE, E. A. (1971). "Possible explanation of the high concordance for acute leukaemia in monozygous twins". *Lancet*, 1: 699-701.

- 159.- VON FLIEDNER, V. E., KHAN, Z., JEANNET, M. (1981). "HLA-A and HLA-B antigens in acute leukemia: A2-B12 phenotypes correlate with longer survival in acute myelogenous leukemia". *Acta Haematol.*, 65: 73-78.
- 160.- EPSTEIN, C. J. (1986). "The consequence of chromosome imbalance". Cambridge University Press, Cambridge. 486 p.
- 161.- KANEKO, Y., ROWLEY, J. D., VARIAKOJIS, D. (1981). "Chromosome abnormalities in Down's syndrome patients with acute leukemia". *Blood*, 58: 459-466.
- 162.- ROWLEY, J. D. (1981). "Down syndrome and acute leukaemia: increased risk may be due to trisomy 21". *Lancet*, 2: 1020-1022.
- 163.- SIKAND, G. S., TAYSI, K., STRANDJORD, S. E. (1980). "Trisomy 21 in bone marrow cells of a patient with a prolonged preleukemia phase". *Med. Pediatr. Oncol.* 8: 237-242.
- 164.- LAND, H., PARADA, L. F., WEINBERG, R. A. (1983). "Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis". *Science*, 222: 771-778.
- 165.- BISHOP, M. J. (1983). "Cellular oncogenes and retroviruses". *Annu. Rev. Biochem.*, 52: 301-354.
- 166.- LITTLEFIELD, J. W. (1984). "Genes, chromosomes and cancer". *Journal of Pediatrics* 104: 489-494.
- 167.- SLAMON, D. J., DE KERNION, J. B., VERMA, I. M., CLINE, M. J. (1984). "Expression of cellular oncogenes in human malignancies". *Science*, 224: 256-262.
- 168.- CROCE, C. M., KLEIN, G. (1985). "Translocaciones cromosómicas y cáncer humano". En: "El cáncer". (1986). Santos, E., Rodríguez, V. E., ed. Scientific american. Prensa científica. 2a ed. Barcelona: 26-35.
- 169.- HUNTER, T. (1984). "Proteínas de oncogenes". En: "El cáncer". (1986). Santos, E., Rodríguez, V. E., ed. Scientific american. Prensa científica. 2a ed. Barcelona: 75-85.
- 170.- NOTARIO, V. (1986). "Retrovirus factores de crecimiento y oncogénesis". En: "El cáncer". (1986). Santos, E., Rodríguez, V. E., ed. Scientific american. Prensa científica. 2a ed. Barcelona: 117-123.
- 171.- WEINBERG, R. A. (1983). "A molecular basis of cancer". En: "El cáncer". (1986). Scientific american. Prensa científica. 2a ed. Barcelona: 86-97.

- 172.- COOPERMAN, B. S., LINGER, H. P. (1981). "Double minute chromosome in a case of acute myelogenous leukemia resistant to chemotherapy". *Cytogenet. cell genet.*, 30: 25-30.
- 173.- BARTRAM, C. R. (1985). "Activation of proto-oncogenes in human leukemias". *Blut*, 51: 63-71.
- 174.- GLOVER, T. W., BERGER, C., COYLE, J., ECHO, B. (1984). "DNA polymerase alpha inhibition by aphidicolin induces gaps and breaks at common fragile sites in human chromosomes". *Hum. Genet.*, 67: 136-142.
- 175.- SUTHERLAND, G. R., JACKY, P. B., BAKER, E., MANUEL, A. (1983). "Heritable fragile sites on human chromosomes: X. New folate-sensitive fragile sites: 6p23, 9p21, 9q23 and 11q23". *Am. J. Hum. Genet.*, 35: 432-437.
- 176.- YUNIS, J. J. (1984). "Constitutive fragile sites and cancer". *Science*, 226: 1199-1204.
- 177.- YUNIS, J. J., BRUNING, R. D., HOWE, R. B., LOBELL, M. (1984). "High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.* 311: 812-818.
- 178.- TESTA, J. R., ROWLEY, J. D. (1981). Chromosomes in leukemia and lymphoma with special emphasis on methodology. In "The leukemic cell". Catovsky, D., ed. Churchill-Livingston. Edinburgh and London: 184-202.
- 179.- LATT, S. A. (1974). "Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes". *Science*, 185: 74-76.
- 180.- PARIS CONF. 1971. 1972. "Standardization in human cytogenetic. In: Birth Defects Orig. Artic. Ser., vol 8, No. 7. Natl. Found. March of Dimes, New York.
- 181.- YUNIS, J. J. (1981). "Chromosomes and cancer nomenclature and future directions". *Hum. Pathol.*, 12: 494-502.
- 182.- O'RIORDAN, M. L., ROBINSON, J. A., BUCKTON, K. E. (1971). "Distinguishing between the chromosomes involved in Down's syndrome (trisomy 21) and chronic myeloid leukaemia (Ph) by fluorescence". *Nature*, 230: 167-168.
- 183.- ROWLEY, J. D. (1973). "A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. letter". *Nature* 243: 298-299.
- 184.- DE KLEIN, A., VAN KESSEL, A. G., GROSVELD, G., BARTRAM, C. R., HAGEMEIJER, A., BOATSMA, D., SPURR, N. K. (1982). "A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia". *Nature*, 300: 765-767.

- 185.- MAYALL, B. H., CARRANO, A. V., MOORE, D. H. II. (1977). "Quantification by ADN-based cytophotometry of the 9q+/22q- chromosomal translocation associates with chronic myelogenous leukemia". *Cancer Res.*, 37: 3590-3593.
- 186.- NOWELL, P. C. (1976). "The clonal evolution of tumor cell populations". *Science*, 194: 23-28.
- 187.- DALAPICCOLA, S., ALIMENA, G. (1979). "Inactive normal X in a female leukaemic patient with an acquired X/autosome translocation". *Hum. Genet.*, 48: 169-177.
- 188.- FLEISHMAN, E. W., PRIGOGINA, E. L., VOLKOVA, M. A., PETROVICH, I. (1977). "Unusual translocation (10;22) in chronic myelogenous leukemia". *Hum. Genet.*, 39: 127-129.
- 189.- FRANCESCONI, D., PASQUALI, F. (1978). "Three chromosomes' (7;9;22) rearrangement and the origin of the Philadelphia chromosome". *Hum. Genet.*, 43: 133-137.
- 190.- GAHRTON, G., FRIBERG, K., ZEICH, L. (1977). "A new translocation three in chronic myelocytic leukemia 46XY, t(9;11;22)". *Cytogenet. Cell Genet.* 18: 75-81.
- 191.- GAHRTON, G., FRIBERG, K., ZECH, L. (1979). "Translocation between chromosome 7 and chromosome 22, t(7;22)(p22;q12), in a patient with chronic myelocytic leukemia". *Hum. Genet.*, 49: 225-227.
- 192.- GEURTS VAN KESSEL, A. H. M., VAN AGTHOVEN, A. J., DE GROOT, P. G., HAGEMEIJER, A. (1981). "Characterization of a complex Philadelphia translocation (1p-;9q+;22q-) by gene mapping". *Hum. Genet.*, 58: 162-165.
- 193.- HAYATA, I., KAKATI, S., SANDBERG, A. A. (1973). "A new translocation related to the Philadelphia chromosome". *Lancet*, 15: 1385.
- 194.- NOWELL, P. C., JENSSEN, J., GARDNER, F. (1975). "Two complex translocation in chronic granulocytic leukemia involving chromosomes 22, 9, and third chromosome". *Human. genetik.*, 30: 13-21.
- 195.- OSHIMURA, M., OHYASHIKI, K., VEHARA, M., MIYASAKA, Y., OSAMURA, S., TONOMURA, A. (1981). "Chronic myelogenous leukemia with translocation (3q-;9q+) and (17q-;22q+). Possible crucial cytogenetic events in the genesis of CML". *Hum. Genet.*, 57: 48-51.
- 196.- SONTA, S., OSHIMURA, M., SANDBERG, A. A. (1976). "Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXI. Cytogenetically unusual cases of leukemia". *Blood*, 48(5): 697-705.

- 197.- SONTA, S., SANDBERG, A. A. (1977). "Chromosomes and causation of human cancer leukemia. XXIV. Unusual and complex Ph1 translocations and their clinical significance". *Blood*, 50: 691-697.
- 198.- VANDER BLY-PHILIPSEN, M., BREED, W., HUSTINX, T. (1977). "A case of chronic myeloid leukemia with a translocation (12;22)(p13;q11)". *Hum. Genet.*, 39: 229-231.
- 199.- PEARSON, M., ROWLEY, J. D. (1985). "The relation of oncogenesis and cytogenetics in leukemia and lymphoma". *Ann. Rev. Med.* 36: 471-483.
- 200.- BARTRAM, C. R. (1985). "Rearrangement without juxtaposition of c-abl in chronic myelocytic leukemia". *J. Exp. Med.*, 162: 2175-2179.
- 201.- VERMA, R. S., DOSIK, H. (1980). "Heteromorphisms of the Philadelphia (Ph) chromosome in patients with chronic myelogenous leukaemia (CML)". *Br. J. Haematol.*, 45: 215-222.
- 202.- LARSON, R. A., GOLOMB, H. M., ROWLEY, J. D. (1981). "Chromosome changes in hematologic malignancies". *Cancer Journal for clinicians*, 31: 223-238.
- 203.- PUGH, W. C., PEARSON, M., VARNDINA, J., ROWLEY, J. D. (1985). "Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukaemia: a morphological reassessment". *Br. J. Haematol.*, 60: 457-467.
- 204.- PUCHKOVA, G. P., FRIGOGINA, E. L., FLEISCHMAN, E. W., DOROSDOVA, T. S., MAYAKOVA, S. A., PETERSON, I. S. (1983). "Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukemia in children". *Hum. Genet.*, 64: 257-262.
- 205.- TRAVIS, L. B., PIERRE, R. V., DEWALD, G. W. (1986). "Ph-negative chronic granulocytic leukemia: a nonentity". *Am. J. Clin. Pathol.*, 85: 186-193.
- 206.- BERNSTEIN, R., PINTO, M. R., ROSENDORFF, KRAMER, S., MENDELOW, S. (1984). "Masked Ph1 chromosome abnormalities in CML: a report of two unique cases". *Blood*, 63: 399-406.
- 207.- BARTRAM, C. R., KLEIN, A., GROSVELD, G. (1985). "C-abl y bcr rearrangments in Ph1 negative CML. En: 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985. Abstracts *J. Cell Biochem. (suppl)*, 9A: 75-130.
- 208.- SOKAL, J. E. (1980). "Significance of Ph-negative marrow cells in Ph1-positive chronic granulocytic leukemia". *Blood*, 56: 1072-1076.
- 209.- BARTRAM, C. R., KLEIHAVER, E., DE KLEIN, A. (1985). "C-abl and bcr are rearranged in a Ph1-negative patient". *EMBO J.*, 4: 683-686.

- 210.- TEYSSIER, J. R., BARTRAM, C. R., DEVILLE, J., POTRON, G., PIGEON, F. (1985). "C-abl oncogene and chromosome 22 "bcr" juxtaposition in chronic myelogenous leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 312: 1393-1394.
- 211.- CERVANTES, F., ROZMAN, C., BALLESTA, F., MILA, M., (1982). "Prognostic significance of cytogenetical studies in chronic granulocytic leukaemia". *Scand. J. Haematol*, 28: 77-81.
- 212.- "FIRST INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN LEUKAEMIA". (1978). *Br. J. Haematol.*, 39: 311-316.
- 213.- PASQUALI, F., PANARELLO, C., BERNASCONI, P., CASALONE, R. (1982). "The isochromosome (17q) in chronic myelocytic leukaemia mechanism of origin, centromeric function and clonal evolution". *Hum. Genet.*, 62: 89-90.
- 214.- ENGEL, E., Mc GEE, B. J., FLEXNER, J., RUSSELL, M., MYERS, B. (1974). "Philadelphia chromosome (Ph1) translocation in an apparently Ph1 negative, minus 522, case of chronic myeloid leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 18: 154.
- 215.- PRIGOGINA, E. L., FLEISCHMAN, E. W. (1975). "Certain patterns of karyotype evolution in chronic myelogenous leukaemia". *Humangenetik*, 30: 113-119.
- 216.- VERMA, R. S., THOMAS, S., COLEMAN, M., SILVER, R., DOSIK, H. (1986). "Position of the Y-chromosome at somatic metaphase in patients with chronic myelogenous leukemia (LMC)". *Experientia*, 42: 440-441.
- 217.- HASS, O. A., SCHWARZMEIER, J. D. (1984). "Investigations on karyotype evolution in patients with chronic myeloid leukemia (CML)". *Blut*, 48: 33-43.
- 218.- PRIGOGINA, E. L., FLEISCHMAN, E. W., VOLKOVA, M. A., FRENKEL, M. A. (1978). "Chromosome abnormalities and clinical and morphologic manifestations of chronic myeloid leukemia". *Hum. Genet.*, 41: 143-156.
- 219.- SONTA, S., SANDBERG, A. A. (1978). "Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXIX. Further studies on karyotypic progression in CML". *Cancer*, 41: 153-163.
- 220.- ALIMENA, G., DALLAPICCOLA, B., GASTALDI, R., MANDELI, F., BRANDT, L., MITELMAN, F., NILSSON, P. G. (1982). *Scand. J. Haematol.*, 28: 103-117.
- 221.- SADAMORI, N., GOMEZ, G. A., SANDBERG, A. A. (1983). "Therapeutic and prognostic value of initial chromosomal findings at the blastic phase of Ph-positive chronic myeloid leukemia". *Blood*, 61: 935-939.

- 222.- SHTIVELMAN, E., GALE, R. P., DRAZEN, O., BERREBI, A., ZAIZOV, R., KUBONISHI, I., MIYOSHI, I., CANAANI, E. (1987). "bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia". *Blood*, 69: 971-973.
- 223.- BELLO, J. L., GOMEZ, M. J., VIEJO, A., FERRO, M. T. (1984). "Leucemia aguda no linfoblástica presentando un cromosoma Filadelfia y monosomia 7". *Rev. Clin. Esp.*, 174: 107-108.
- 224.- PRIEST, J. R., ROBINSON, L. L., Mc KENNA, R. W., LINDQUIST, L. L., WARKENTIN, P. I., LE BIEN, T. W., WOODS, W. G., KERSEY, J. H., COCCIA, P. F., NESBIT, M. E. (1980). "Philadelphia chromosome positive childhood. Acute lymphoblastic leukemia". *Blood*, 56: 15-22.
- 225.- DOR, J. F., MATTEI, J. F., MATTEI, M. G., GIRAND, F., MONGIN, M. (1977). "Subacute myelocytic leukemia associated with the Philadelphia chromosome and supplementary translocation (9;12)". *Biomedicine*, 27: 131-134.
- 226.- SKARCH, E., DE LA TORRE, E. (1977). "Short reports. myelomonocytic leukaemia with a preleukaemic syndrome and Ph chromosome in monozygotic twins". *Archives of Diseases in Childhood*, 52: 72-80.
- 227.- SMADJA, M. (1985). "Acquisition of a Philadelphia chromosome concomitants with transformation of a refractory anemia into an acute leukemia". *Cancer*, 55: 1477-1481.
- 228.- VERHEST, A., VAN SCHOUBROECK, F. (1973). "Philadelphia chromosome positive preleukaemic state". *Lancet*, 15: 1386.
- 229.- VAN DEN BERGHE, H., DAVID, G., BROEKAERT, F., VAN ORSHOVEN, A. (1978). "Unusual Ph translation in acute myeloblastic leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 299: 360.
- 230.- RIBEIRO, R. C., ABROMOWITZ, M., RAIMOND, S. C., MURPHY, S. B., BEHM, F., WILLIAMS, D. L. (1987). "Clinical and biological hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia". *Blood*, 70: 948-953.
- 231.- REID, M. M. (1984). "Relevance to leukaemia of oncogene translocations". *Lancet*, 2: 94.
- 232.- ADAMS, J. M. (1985). "Oncogene activation by fusion of chromosomes in leukemia". *Nature*, 315: 542-543.
- 233.- VERMA, R. S., DOSIK, H. (1985). "'Masked' Ph-chromosome in chronic myelogenous leukaemia (CML). *Blut*, 50: 129-133.
- 234.- GALE, R. P., CANAANI, E. (1984). "An 8-kilobase abl ARN transcript in chronic myelogenous leukemia". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81:5648-5652.

- 235.- HEISTERKAMP, N., GROFFEN, J., KLEIN, A., GROSVELD, G. (1985). "Distribution of Ph breakpoints in the bcr region on chromosome 22". Int 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985. Abstracts J. Cell Biochem. (suppl), 9A: 75-130.
- 236.- GROFFEN, J., STAIN, K., HEISTERKAMP, N., KLEIN, A., GROSVELD, G. (1985). "The involvement of oncogenes in CML". In: 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985. Abstracts J. Cell Biochem (suppl), 9A: 74-130.
- 237.- SHTIVELMAN, E., LIFSHITZ, B., GALE, R. P., CANAANI, E. (1985). "Fused trascript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia". Nature, 315: 550-554.
- 238.- CANAANI, E., STEINER, S. D., AGHAI, D., GALE, R., BERREBI, A., JANUSEWIEZ, E. (1984). "Altered transcription of an oncogene in chronic myeloid leukaemia". Lancet, 1: 593-595.
- 239.- COLLINS, S. J., KUBONISHI, I., MIYOSHI, I., GROUNDINE, M. T. (1984). "Altered transcription of the c-abl oncogene in K-562 and other chronic myelogenous leukemia cells". Science, 225: 72-74.
- 240.- HEISTERKAMP, N., STAM, K., GROFFEN, J., DE KLEIN, A., GROSVELD, G. (1985). "Structural organization of the bcr gene and its roll in the Phi translocation". Nature, 315: 758-761.
- 241.- KONOPKA, J. B., WATANABE, S. M., SINGER, J. W., COLLINS, S. J., WITTE, O. N. (1985). "Cell lines and clinical isolates derived from Phi-positive chronic myelogenous leukemia patient expresses c-abl proteins with a common structural alteration". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82: 1810-1814.
- 242.- WITTE, O. N., KONOPKA, J. B., WATANABE, S. M. (1985). "An altered c-abl protein is detected in Phi-positive CML cell lines and patients". In: 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985. Abstracts J. Cell Biochem. (suppl), 9A: 75-130.
- 243.- DREAZEN, O., RASSOOL, F., SPARKES, R. S., KLISAK, I., GOLDMAN, J. M., GALE, R. P. (1987). "Do oncogenes determine clinical feature in chronic myeloid leukaemia?" Lancet, 1: 1402-1405.
- 244.- BELLERI, L., NARNI, F., EMILIA, G., COLO, A., TORELLI, D., TORELLI, G. (1987). "Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with a chromosome 22 break point outside the breakpoint cluster region". Blood, 70: 1659-1664.
- 245.- COLLINS, S. J., GROUNDINE, M. T. (1987). "Chronic myelogenous leukemia: amplification of a rearranged c-abl oncogene in both chronic phase and blast crisis". Blood, 69: 893-898.

- 246.- JANSSEN, J. W. (1985). "Oncogene activation in human myeloid leukemia". *Cancer Res.*, 45: 3262-3267.
- 247.- GAMBEKE, C., HALL, A., MORONI, C. (1985). "Activation of an-N-ras genes in acute myeloblastic leukemia through somatic mutation in the first exon". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 82: 879-882.
- 248.- SOUYRI, M., FLEISSNER, E. (1983). "Identification by transfection of transforming sequences in ADN of human T-cell leukemias". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 80: 6676-6679.
- 249.- GOLOMB, H. M., VARDIMAN, J. W., ROWLEY, J. D. (1976). "Acute nonlymphocytic leukemia in adults: correlations with G-banded chromosomes". *Blood*, 48: 9-21.
- 250.- HORNSTEIN, P., LINDQUIST, R., GAHRTON, G. (1984). "Prognostic implications of in vitro colony studies and clonal chromosomal aberrations in adults with acute leukaemia". *Scand. J. Haematol.*, 32: 297-305.
- 251.- GOLOMB, H. M. (1980). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1: 249-256.
- 252.- TESTA, J. R., MINTZ, U., ROWLEY, J. D. (1979). "Evolution of karyotypes in acute non-lymphocytic leukemia". *Cancer Res.*, 39: 3619-3627.
- 253.- ROWLEY, J. D., ALIMENA, G., GARSON, O. M., HAGEMEIJER, A., MITELMAN, F., PRIGOGINA, E. L. (1982). "A collaborative study of the relationship of the morphologic type of acute non-lymphocytic leukemia with patient age and karyotype". *Blood*, 59: 1013-1022.
- 254.- BERNSTEIN, R. (1982). "Karyotype analysis in acute non lymphocytic leukemia comparison with ethnic group, age, morphology, and survival". *Cancer Genet Cytogenet.*, 61:62-170.
- 255.- ROWLEY, J. D. (1975). "Nonrandom chromosomal abnormalities in hematologic disorders of man". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 72: 152-156.
- 256.- LAWLER, S. D. (1982). "Significance of chromosome abnormalities in leukemia". *Semin. Haematol.*, 19: 257-272.
- 257.- PASQUALI, F., BERNASCONI, P., CASALONE, R., FRACIARO, M. (1982). "Pathogenetic significance of "pure" monosomy 7 in myeloproliferative disorders". *Hum. Genet.*, 62: 40-51.
- 258.- TOOMEY, K. E., ROTTER, J. I., MOHANDAS, T., KABACK, M. M. (1978). "Pericentric inversion of chromosome 7 and a balanced 10;15 translocation in skin and blood of an individual with acute myelogenous leukemia (AML)". *Birth. Defects Orig. Artic. Ser.*, 14: 424-425.

- 259.- KAMADA, N., OKADA, K., ITO, T., NAKATSUI, T., UCHINO, H. (1968). *Lancet*, 1: 364.
- 260.- FOURTH INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN LEUKEMIA. (1984). *Cancer Genet. Cytogenet.*, 11: 249-360.
- 261.- BERGER, R., BERNHEIM, A., DANIEL, M. T. (1981). "Translocation t(8;21) et leucemie aigue granuleuse: interpretation des mitoses normales". *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 292: 289-291.
- 262.- OSHIMURA, M., OHYASHIKI, K., MORI, M., TERADA, H., TAKAKU, F. (1982). "Cytogenetic and hematologic findings in acute myelogenous leukemia, M-2 according to the FAB classification". *Gann*, 73: 212-216.
- 263.- PRIGOGINA, E. L., FLEISCHMAN, E. W., PUCHKOVA, G. P., MAYAKOVA, S. A., VOLKOVA, M. A., PROTASOVA, A. K., FRENKEL, M. A. (1986). "Chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia" *Hum. Genet.*, 73: 137-146.
- 264.- PASQUALI, F., CASALONE, R. (1981). "Rearrangement of three chromosomes (N.2, 8, and 21) in acute myeloblastic leukemia". *Cancer Genet. Cytogenet.*, 3: 335-339.
- 265.- TRICOT, G., BROECKAERT, D. A. (1984). "8;21 translocation in acute myeloid leukemia an ultrastructural study". *Cancer*, 53: 453-456.
- 266.- SECOND INTERNATIONAL WORKSHOP CHROMSOMES IN LEUKEMIA. (1980). "Chromosomes in preleukemia". *Cancer Res.*, 40: 4826-4827.
- 267.- SWIRSKY, D. M., MATHEWS, J. G., FLEMANS, R. J., REE, J. K., HAYHOE, F. G., (1984). "8;21 translocation in acute granulocytic leukaemia: cytological, cytochemical and clinical features". *Br. J. Haematol.*, 56: 199-213.
- 268.- GOLOMB, H. M., ROWLEY, J. D., VARDIMAN, J. (1976). "Partial deletion of long arm of chromosome 17 a specific abnormality in acute promyelocytic leukemia?" *Arch. Intern. Med.*, 136: 825-828.
- 269.- ROWLEY, J. D., GOLOMB, H. M., VARDIMAN, J., FUKUHARA, S., DOUGHERTY, C., POTTER, D. (1977). "Further evidence for a non-random chromosomal abnormality in acute promyelocytic leukemia". *Int. J. Cancer*, 20: 869-872.
- 270.- SCHERES, J. M., HUSTINX, T. W., DE VAAN, G. A., RUTTEN, F. J. (1978). "15/17 translocation in acute promyelocytic leukemia" *Hum. Genet.* 43: 115-117.

- 271.- KANEKO, Y., HOMMA, C., MASIKI, N., SAKURA, M., TOYOSHIMA, K., YAMAMOTO, T. (1987). "Human c-erb B-2 remains on chromosome 17 in band q21 in the 15;17 translocation associated with acute promyelocytic leukemia". Jpn. J. Cancer Res. (Gann), 78: 16-19.
- 272.- SHEER, D., LISTER, T. A., AMESS, J., SOLOMON, E. (1985). "Incidence of the 15q+, 17q- chromosome translocation in acute promyelocytic leukaemia (APL)". Br. J. Cancer 52: 55-58.
- 273.- PRIETO, F., BADIA, L., CASTELL, V., PEREZ-SIRVENT, M. L., MARTY, M. L. (1981). "Citogenética de las leucemias agudas". Sangre, 26: 738-755.
- 274.- BERGER, P., BERNHEIM, A., FLANDRIN, G. (1980). "Absence d'anomalie chromosomique". C. R. Hebd. Seances Acad. Sci., 290: 1557-1559.
- 275.- BENITEZ, J., SANCHEZ-FAYOS, J., BELLO, M. J., VALCARCEL, E. (1983). "Variabilidad de resultados citogenéticos obtenidos con el método directo y con cultivos de cierta duración en 32 pacientes afectados de diferentes trastornos hematológicos". Sangre, 28: 393-400.
- 276.- ARTHUR, D. C., BLOOMFIELD, C. D. (1983). "Partial deletion of the long arm of chromosome 16 and bone marrow eosinophilia in acute nonlymphocytic leukemia: a new association". Blood, 61: 994-998.
- 277.- LE BEAU, M. M., LARSON, R. A., BITTE, M. A., VARDINAN, J. W., GOLDB, H. M., ROWLEY, J. D. (1983). "Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia: a unique cytogenetic-clinic-pathologic association". N. Engl. J. Med.: 630-636.
- 278.- DE LA CHAPELLE, A., LAHTINEN, R. (1983). "Chromosome 16 and bone-marrow eosinophilia". N. Engl. J. Med., 309: 1594.
- 279.- FLEISCHMAN, E. W., PRIGOGINA, E. L., ILJINSKAKJ, G. W., KONSTANTINOVA, L. N., PUCHKOVA, G. P., VOLKOVA, M. A., FRENKEL, M. A. (1983). "Chromosomal rearrangements with a common breakpoint at 6p23 in five cases of myeloid leukemia". Hum. Genet. 64: 254-256.
- 280.- BLOOMFIELD, C. D., GOLDMAN, A., HOSSFELD, D., DE LA CHAPELLE, A. (1984). "Fourth international workshop on chromosomes in leukemia". Cancer Genet. Cytogenet., 11: 332-350.
- 281.- DE LA CHAPELLE, A., KNUTILA, S., ELONEN, F., ERKKI, L. (1986). "Translocation (2;11)(p12;q23) in acute non-lymphocytic leukaemia: a non-random association". Scand. J. Haematol., 36(suppl): 91-97.

- 282.- SECKER-WALKER, L. M., SETEWART, E. L., CHAN, L. (1985). "The (4;11) translocation in acute leukaemia of childhood: the importance of additional chromosomal aberrations". *Br. J. Haematol.*, 61: 101-111.
- 283.- SATO, Y., ABE, S., MISE, K., SASAKI, M., KAMADA, N., KOUDA, K., MUSASHI, M., SABURI, Y., HORIKOSHI, A., NINAMI, Y., MIYAKUNI, T., YOKOYAMA, Y., ISHIHARA, Y., MIURA, Y. (1987). "Reciprocal translocation involving the short arms of chromosomes 7 and 11, t(7p-;11p-), associated with myeloid leukemia with maturation". *Blood*, 70: 1654-1658.
- 284.- GOODMAN, R. A. (1985). "FAB M7: acute megakaryoblastic beyond morphology". *Ann. Int. Med.*, 103: 450-454.
- 285.- NIMER, S. D., GOLDE, D. W. (1987). "The Sq- abnormality". *Blood*, 70: 1705-1712.
- 286.- BLOOMFIELD, C. D. (1986). "Chromosome abnormalities in secondary myeloid-plastic syndromes". *Scand. J. Haematol.*, 36 (suppl): 82-90.
- 287.- BERGER, R., BERNHEIM, A., DANIEL, M. T., VALENSI, F., FLANDRIN, G. (1981). "Karyotypes and cell phenotypes in acute leukemias following other diseases". *Blood Cells*, 7: 293-299.
- 288.- PEDERSEN-BJERGAARD, J., HAAHR, S., PHILIP, P. (1980). "Abolished production of interferon by leucocytes of patients with the acquired cytogenetic abnormalities 5q- or -5 in secondary and de novo acute non-lymphocytic leukemia". *Br. J. Haematol.*, 46: 211-223.
- 289.- KURZROCK, R., SHTALRID, M., TALPAZ, M., KLOETZER, GUTTERMAN, J. (1987). "Expression of c-abl in Philadelphia-positive acute myelogenous leukemia". *Blood*, 70: 1584-1588.
- 290.- LE BEAU, M. M., DIAZ, M. O., KARIN, M., ROWLEY, J. D. (1985). "Metallothionein gene cluster is split by chromosome 16 rearrangements in myelomonocytic leukemia". *Nature*, 313: 709-711.
- 291.- DIAZ, M. O., LE BEAU, M. M., ROWLEY, J. D. (1985). "The role of the mos-c gene in the 8;21 translocation in human acute myeloblastic leukemia". *Science*, 229: 767-769.
- 292.- DRABKIN, H. A., DIAZ, M., BRADLEY, C., LE BEAU, M. M., ROWLEY, J. D., TRUJILLO, J., CORK, A., PETERSON, D. (1985). "Analysis of the acute myelogenous leukemia 8;21 translocation". *Int 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985. Abstracts J. Cell Biochem. (suppl)*, 9A: 75-130.

- 293.- DRABKIN, H. A., DIAZ, M., BRADLEY, C. M., LE BEAU, M. M., KIWLEY, J. D., PETTERSON D. (1985). "Isolated and analysis of the 21q+ chromosome in the acute myelogenous leukemia B121 translocation, evidence that c-mos is not translocated" Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82: 464-468.
- 294.- ALITALO, K., WINQUIST, R., KESK-OJA, J. (1985). "Acute myelogenous leukaemia with c-myc amplification and double minute chromosomes". Lancet, 1035-1039.
- 295.- ALIMENA, G., DALLAPICOLA, B., ROSARIA DE CUIA, M. (1981). "Acute lymphocytic an myelomonocytic leukemia associated with low platelet counts and a 21-q marker chromosome". Hum. Genet., 57: 329-331.
- 296.- LE BEAU, M. M., WESTBROOK, M., DIAZ, M. D., ROWLEY, J. D., OREN, M. (1985). "Translocation of the p53 gene in t(15;17) in acute promyelocytic leukaemia". Nature, 316: 826-828.
- 297.- COLLINS, S. J. (1987). "The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogen expression". Blood, 70: 1233-44.
- 298.- BOS, J. L., TOKSOZ, D., MARSHALL, C. J., VERLAN DE VRIES, M., VEENEMAN, G. H., G. H., VANDER EB, A. J., VAN BOOM, J. H., JANSE, J. W., STEEN VOORDEN, A. C. (1985). "Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia". In: 14th annual UCLA symposia. Leukemia 1985. Abstracts J. Cell Biochem. (suppl), 9A: 75-130.
- 299.- BOS, J. L., VERLAAN DE VRIES, M., VANDER EB, A., JANSSEN, J. W. DELWEL, R., LOWENBERG, B., COLLY, L. F. (1987). "Mutation in N-ras. Predominate in acute myeloid leukemia". Blood, 69: 1237-1241.
- 300.- STIRRINS, T. J., DAVIS, R. B., SANGE, W., FRITZ, J., PURTILO, D. (1984). "Transformation of Fanconi's anemia to acute nonlymphocytic leukemia associated with emergence of monosomy 7". Blood, 64: 173-176..
- 301.- CHAN, L. C., SHEER, D., DRYSDALE, H. C., BEVAN, D., GREAVES, M. F. (1985). "Monosomy 7 and multipotential stem cell transformation". Br. J. Haematol., 61: 531-539.
- 302.- THIRD INTERNATIONAL WORKSHOP ON CHROMOSOMES IN LEUKEMIA 1980. "Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute lymphoblastic leukemia". Cancer Genet. Cytogenet. 4: 111-137.
- 303.- KANEKO, Y., ROWLEY, J. D., VARIAKOJIS, D., CHILCOTE, R. R., CHECK, I., SAKURAI, M. (1982). "Correlation of karyotype with clinical features in acute lymphoblastic leukemia". Cancer Res. 42: 2918-2929.

- 304.- WILLIAMS, D. L., RAIMOND, S., RIVERA, G., GEORGE, S., BEVARS, C. W., MUYPHY, S. B. (1985). "Prasence of clonal chromosome abnormalities in virtually all cases of acute lymphoblastic leukemia". N. Engl. J. Med., 313:640-641.
- 305.- WILLIAMS, D. L., HARRIS, A., WILLIAMS, K. J., BROSIUS, M., LEMONDS, W. (1984). "A direct bone marrow technique for acute lymphoblastic leukemia". Cancer Genet. Cytogenet., 13: 239-258.
- 306.- BENNETT, J. M., CATOWSKY, D., DANIEL, M. T., FLANDRIN, G., GALTON, A. G., GRALNICK, M. R., SULTAN, C. (1981). "Morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations". Br. J. Haematol., 47: 553-561.
- 307.- WILLIAMS, D. L., TSIATIS, A., BRODEUR, G. M., LOOK, T., MELVIN, S. L., BOWMAN, W. P., KALWINSKY, D. K., RIVERA, G., DAHL, G. V. (1982). "Prognostic importance of chromosome number in 136 untreated children with acute lymphoblastic leukaemia". Blood, 60: 864-871.
- 308.- SMETS, L. A., SLATER, R. M., BEHRENDT, H., VAN'T VERR, M. B., HOMAN BLOCK, J. (1985). "Phenotypic and karyotypic properties of hyperdiploid acute lymphoblastic leukaemia of childhood". Br. J. Haematol., 61: 113-123.
- 309.- CIMINO, M. C., ROWLEY, J. D., KIMNEALEY, A. (1979). "Banding studies of chromosomal abnormalities in patients with lymphocytic leukemia". Cancer Res., 39: 227-238.
- 310.- HIDDEMAN, W., WORMAN, B., RITTER, J., THIEL, E., GOHDE, W., LAHME, B., HENZE, G., SHELLONG, G., RIEHM, H., BUCHNER, T. H. (1986). "Frequency and clinical significance of DNA aneuploidy in acute leukemia". Ann. N. Y. Acad. Sci., 468: 227-240.
- 311.- ARTHUR, D. C., BLOOMFIELD, C. D. (1982). "Translocation 4;11 in acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and prognostic significance". Blood, 59: 96.
- 312.- WILLIAMS, D. L., LOOK, A. T., MELVIN, S. L., ROBERSON, P. K., DAHL, G., FLAKE, T., STASS, S. (1984). "New chromosomal translocation correlated with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia". Cell, 36: 101-109.
- 313.- CARROL, A. J., CRIST, W. M. (1984). "Pre-B cell leukemia associated with chromosoma translocation 1;19". Blood, 63: 721-724.
- 314.- STARK, B., UMIEL, T., MAMMON, Z., GALILI, N., DZALEDETTI, M., COHEN, T. J., STEINBERG, M., VOGEL, R., ZARZOV, R. (1986). "Leukemia of early infancy: early B-cell lineage associated with t(4;11)". Cancer, 58: 1265-1271.

- 315.- WALTHER, J. V., WIRTZ, A., THIEL, E., BENDER, S., GOTZE, B. (1983). "Specific translocation t(4;11) in an infant with acute lymphoblastic leukemia of null cell type". *Blut*, 47: 195-202.
- 316.- BARLETTA, C., PELICCI, P. G., KENYON, L. C., SMITH, S. D., DALLA-FAVERA, R. (1987). "Relationship between the c-myc locus and the 6q-chromosomal aberration in leukemias and lymphomas". *Science*. 235: 1064-1067.
- 317.- HAYASHI, Y., OHTA, Y., KANEKO, Y., SAKURAI, M., BESHU, F., SANTO, F. (1985). "11;14 translocation in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia". *Gann*, 76: 160-161.
- 318.- SANDBERG, A. A. (1981). "Chromosome changes in the lymphomas". *Hum. Pathol.*, 12: 531-539.
- 319.- MURPHY, S. B., RAIMONDI, S., WYLLIAMS, D., CARROLL, A. J., CASTLEBERRY, R. P., CRIST, W. M. (1985). "Lymphomatous all with abnormalities of the short arm of chromosome 9". *N. Engl. J. Med.*, 313: 1611-1612.
- 320.- CHILCOTE, R. R., BROWN, E., ROWLEY, J. D. (1985). "Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9". *N. Engl. J. Med.*, 313: 286-291.
- 321.- SMITH, S. D., LINK, M. P., TRELA, M., AMYLOD, M., SKLAR, J., MORGAN, R., HECHT, F. (1986). "Chromosome 9 abnormalities in childhood T-cell-leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 315: 195-196.
- 322.- GILBERT, F. (1983). "Chromosomes, genes, and cancer: a classification of chromosome abnormalities in cancer". *JNCI*, 71: 1107-1114.
- 323.- MACKAWA, T. (1984). "Ph positive acute lymphoblastic leukemia with a 14q+ chromosome abnormality". *Blood* 63: 310-313.
- 324.- RODENHIUS, S., SMETS, L. A., SLATER, R. M. (1985). "Distinguishing the Philadelphia chromosome of acute lymphoblastic leukemia from its counterpart in chronic myelogenous leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 313: 51-52.
- 325.- ERIKSON, J., GRIFFIN, C. A., RUSHDI, A., VALTHERI, M. (1986). "Heterogeneity of chromosomes 22b breakpoint in Philadelphia positive (Ph+) acute lymphocytic leukemia". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 1807-1811.
- 326.- TSUJIMOTO, Y., YUNIS, J., ONDRATO-SHOWE, L., ERIKSON, K., NOWELL, P. C., CROCE, C. M. (1984). "Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphoma and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation". *Science*, 224: 1403-1406.

- 327.- CROCE, C. M., ISOBE, M., PALUMBO, A., PUCK, J., MING, J., TWEARDY, D., ERIKSON, J., DAVIS, M., ROVERA, G. (1985). "Gene for alfa-chain of human T-cell receptor: location of chromosome 14 region involved in T-cell neoplasms". *Science*, 227: 1044-1047.
- 328.- HAYASHI, Y., YAMAMOTO, K., KOJIMA, S. (1986). "T-cell acute lymphoblastic leukemias with a t(8;14) possibly involving a c-myc locus and T-cell-receptor alfa chain genes". *N. Engl. J. Med.*, 314: 650-651.
- 329.- FINGER, L. R., HARVEY, R. C., MOORE, R. C., SHOWE, L. C., CROCE, C. M. (1986). "A common mechanism of chromosomal translocation in T- and B-cell neoplasia". *Science*, 234: 982-985.
- 330.- ERIKSON, J., WILLIAMS, D., FINAN, J., NOWELL, P. C., CROCE, C. M. (1985). "Locus of the alfa chain of the T-cell receptor is split by chromosome translocation in the T-cell leukemias". *Science*, 229: 784-786.
- 331.- BUDOWLE, B., DEARTH, U., BOWMAN, P., MELVIN, S., CRIST, W., GO, R., KIM, T., IYER, R., ROSEMAN, J., BARGER, B., ACTON, R. (1985). "Genetic predisposition to acute lymphoblastic leukemia in american blacks". *Cancer*, 55: 2880-2882.
- 332.- GAHRTON, G., ROBERT, K. H., FRIBERG, K., ZECH, L., BIRD, A. G. (1980). "Nonrandom chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation". *Blood*, 56: 640-647.
- 333.- PITTMAN, S., CATOVSKY, D. (1984). "Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukaemia". *Br. J. Haematol.*, 58: 649-660.
- 334.- GAHRTON, G., JULIUSSON, G., ROBERT, K. H., ZECH, L. (1985). "Review: specific chromosomal marker in B-cell chronic lymphocytic leukemia". *Tumour Biology*, 6: 1-12.
- 335.- MORITA, M., MONDWADA, J., SANDBERG, A. A. (1981). "Chromosomes as a causation of human cancer and leukemia. XLV. Chromosome patterns in stimulated lymphocytes of chronic lymphocytic leukemia". *Cancer*, 47: 45-49.
- 336.- VAHDATI, M., GRAAFLAND, H., EMBERG, J. M. (1983). "Karyotype analysis of B-lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus in 21 patients with B cell chronic lymphocytic leukemia". *Hum. Genet.*, 63: 327-331.
- 337.- GAHRTON, G., ROBERT, K. H., ZECH, L. (1981). "Incidence of specific chromosomal aberrations in chronic lymphocytic leukemia". *Blood*, 58: 859.

- 338.- NEULAND, C. Y., BLATHER, W. A., MANN, D. L., FRASE, M. C., TSAI, S., STRONG, D. M. (1983). "Familial chronic leukemia". *JNCI*, 71: 1143-1150.
- 339.- HAN, T., OZER, H., SADAMORI, N., ENRICH, L., GOMEZ, G. A., HENDERSON, E. S., BLOOM, M. L., SANDBERG, A. A. (1984). "Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 310: 288-292.
- 340.- GUNNAR, J., KARL-HENNK, R., GAHRTON, G. (1984). "Cytogenetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 311: 123-124.
- 341.- UESHIMA, Y., ROWLEY, J. D., VARIAKOJIS, D., WINTER, J., GORDON, L. (1984). "Cytogenetic studies on patients with chronic T-cell leukemia/lymphoma". *Blood*, 63: 1028-1038.
- 342.- CROCE, C. M. (1985). "Molecular genetics of B cell neoplasms of adults". In: 14th annual UCLA symposia. *Leukemia 1985. Abstracts J. Cell Biochem. (suppl)*, 9A: 75-130.
- 343.- YUNIS, J. J., OKEN, M. M., KAPLAN, M. E., ENSRUD, K. M., HOWE, R. R., THEOLOGIDES, A. (1982). "Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma". *N. Engl. J. Med.*, 307: 1231-1236.
- 344.- SCHRODER, J., VUOPIO, P., AUTIO, K. (1981). "Chromosome changes in human chronic lymphocytic leukemia". *Cancer Genet. Cytogenet.*, 4: 11-21.
- 345.- UESHIMA, Y., BIRD, M. L., VARDIMAN, J. W., ROWLEY, J. D. (1985). "A 14;19 translocation in B-cell chronic lymphocytic leukemia: a new recurring chromosome aberration". *Int. J. Cancer*, 36: 287-290.
- 346.- WALDMANN, I. H., KORSMEYER, S. J., BAKHSHI, A., ARNOLD, A., KIRSH, I. R. (1985). "Molecular genetic analysis of human lymphoid neoplasms: immunoglobulin genes and the c-myc oncogene". *Ann. Intern. Med.*, 102: 497-510.
- 347.- SONNIER, J. A., BUCHANAN, G. R., HOWARD, S., PEEBLES, P. N., RUTLEDGE, J., SMITH, R. G. (1983). "Chromosomal translocation involving the immunoglobulin kappa-chain and heavy chain loci in a child with chronic lymphocytic leukemia". *N. Engl. J. Med.*, 309: 590-594.
- 348.- TSUJIMOTO, Y., FINGER, L. R., NOWELL, P. C., CROCE, C. M. (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosomes translocation". *Science*, 226: 1097-1099.
- 349.- SHOWE, L. C., CROCE, C. M. (1987). "The role of chromosomal translocation in B- and T-cell neoplasia". *Ann. Rev. Immunol.*, 5: 253-277.

- 350.- EVA, A., PIERCE, J., AARONSON, S. A. (1985). "Interactions of oncogenes with hematopoietic cells". In: Leukemia: recent advances in biology and treatment. Gale, R. P., Golde, D. W., ed. Alan R. Liss. New York, 3-16.
- 351.- SHIOSAKA, I., SHUNKER, G. F. (1982). "Differential expression of selected genes in human leukemia leukocytes". Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 79: 4668-4671.
- 352.- HOZIER, J. C., LINQUIST, L. L. (1980). "Banded karyotypes from bone marrow: a clinical useful approach". Hum. Genet., 53: 205-209.
- 353.- COMINGS, D.E. (1978). "Mechanism of chromosome banding and implications for chromosome structure". Ann.Rev.Genet. 12: 25-46.
- 354.- WANG, H. C., FEDOROFF, S. (1972). "Banding in human chromosomes treated with trypsin" Nature New Biol. 253:52-54
- 355.- SUMNER, A.T. (1972). "A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin". Exp. Cell Res. 75: 304-306.