

133
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ALTERACIONES CROMOSOMICAS OBSERVADAS EN
LEUCEMIAS LINFOBLASTICAS AGUDAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A :

ANA MARIA DE JESUS DEL MORAL LOPEZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

INDICE

- I RESUMEN
- II INTRODUCCION
- III ANTECEDENTES
 - a) Definición
 - b) Métodos para diagnosticar a las LLA
 - c) Etiología de las LA
 - d) Frecuencia de las LA
 - e) Sobrevida LLA
- IV OBJETIVOS
- V JUSTIFICACION
- VI MATERIAL Y METODO
- VII RESULTADOS
- VIII DISCUSION
- IX CONCLUSIONES
- X BIBLIOGRAFIA
- XI ANEXOS

RESUMEN

Con el objeto de identificar las alteraciones cromosómicas y observar los cambios cromosómicos en el cariotipo durante el curso de la enfermedad en pacientes con LLA, y cuya utilidad sirve al médico en el manejo y tratamiento de ésta enfermedad, se estudiaron 15 pacientes, 13 de los cuales fueron LLA-L₁, 7 hombres y 6 mujeres (2 a 30 años); y dos con LLA-L₂, un niño de 9 años y una niña de 16 años. El análisis cromosómico se realizó en médula ósea y sangre, en el estudio inicial antes de administrarles el tratamiento y después en etapas subsecuentes a la semana 6, 11, 14, 17, 20, 23 y 26 en el estudio. Las muestras se procesaron en forma directa y en cultivo de 24, 48 y 72 horas dejando como último recurso los cultivos de 72 horas estimulados con fitohemaglutinina, las láminas seleccionadas fueron bandeadas con técnicas de bandas G ó Q.

De los pacientes estudiados se obtuvieron resultados en un 84%, los estudios que nó se valoraron fueron consecuencia de material insuficiente o bién, a la pobre calidad de las metafases obtenidas.

En estudios iniciales previos al tratamiento 3 pacientes presentaron anomalías citogenéticas representando el 20%. Pacientes que inicialmente tuvieron cariotipos normales presentaron cariotipos anormales, aumentando así el 50% de alteraciones encontradas en nuestra población. La alteración cromosómica más frecuentemente observada fué la hiperdiploidía tanto en el cariotipo inicial como en estudios subsecuentes, la cual representó el 25.5%, otras de las alteraciones observada fué la t(9;22) (cromosoma filadelfia) la cual representó el 13.3%

Los pacientes que presentaron otro tipo de alteración, ya sea después de haber tenido un cariotipo normal o una hiperdiploidía fueron el 21.4%, por último, los pacientes con un cariotipo normal sin alteraciones estructurales ó numéricas fueron el 40%.

A pesar del pequeño número de casos estudiados se puede inferir que los pacientes con LLA por medio del cariotipo pueden incrementar la oportunidad de hallar una clona cromosómicamente anormal, además de la identificación específica de alteraciones las cuales son de significancia pronóstica para el paciente.

INTRODUCCION

La Leucemia Linfoblástica Aguda, es un padecimiento hematológico que se caracteriza por presentar un aumento de células blancas no diferenciadas por mm^3 en la médula ósea y otros cuerpos hematopoyéticos, así como en la circulación.

Para caracterizar ésta enfermedad se toman en cuenta los siguientes factores: la edad del paciente, el conteo inicial de leucocitos, infiltración a otros órganos fundamentalmente a sistema nervioso central, mediastino y testículos análisis morfológico celular, reacciones citoquímicas, técnicas bioquímicas y estudios inmunológicos, (marcadores de membrana)(17).

Recientemente los estudios cromosómicos han contribuido en forma importante para la clasificación e identificación de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Rowley y Potteren en 1976 y Secker-Walker en 1978, propusieron que un cariotipo con alteraciones cromosómicas tiene valor como diagnóstico y pronóstico de ésta enfermedad, opinión compartida posteriormente por otros investigadores (6); así, la presencia de algunas alteraciones cromosómicas confieren buena respuesta al tratamiento, tal es el caso de los pacientes con Leucemia Mielocítica Crónica(LMC) en la cual, la presencia del cromosoma filadelfia(ph+)tiene un mejor pronóstico que aquellos que no muestran esta anormalidad filadelfia(ph-).

Por otro lado en el caso de los pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) sucede lo contrario, la presencia del mismo cromosoma filadelfia no tiene una respuesta favorable al tratamiento (3,23,28,34 y 35).

A pesar de las ventajas que el cariotipo representa en el manejo de pacientes con leucemia, este no había sido utilizado con frecuencia, debido a la dificultad de obtener material celular de buena calidad. Actualmente con la aplicación de técnicas de bandeado más simplificadas, y el uso de metrotexate, así como bromuro de etidium (los cuales permiten obtener cromosomas más largos), es por lo que se han resuelto en parte los problemas técnicos, y con esto los estudios citogenéticos han cobrado gran auge en el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento de las leucemias.

ANTECEDENTES

Definición de Leucemia.

Las leucemias son trastornos malignos de la médula ósea con producción excesiva de formas inmaduras y disminución de la producción de los elementos normales de la sangre, presentándose una disminución de eritrocitos, granulocitos y plaquetas, lo que conduce a las complicaciones más importantes de la enfermedad, como por ejemplo: anemia, infecciones y hemorragias, siendo característico la proliferación excesiva de los glóbulos blancos inmaduros en los órganos leucohematopoyéticos y un aumento de ellos en la circulación general (3,5,8 y 17).

De acuerdo a la naturaleza de las células blásticas presentes, las leucemias se dividen en dos tipos, en linfoblásticas y mieloblásticas. Las Leucemias de tipo linfoblásticas se caracterizan por estar constituidas de linfoblastos, células relativamente pequeñas, con alta relación núcleo-citoplasma y nucleolo sin granulaciones citoplasmáticas. Por el contrario, las leucemias mieloblásticas están constituidas por células que tienden a la diferenciación mieloide, las cuales son blastos de mayor tamaño que los linfoblastos, en los que la relación núcleo-citoplasma es más pequeña y pueden observarse varios nucleolos.

De acuerdo a su evolución, las leucemias están divididas en dos grandes categorías: Leucemias crónicas y Leucemias agudas (17,22 y 33). Las leucemias crónicas son aquellas que presentan células hematopoyéticas más diferenciadas, e invaden la médula ósea más lentamente. Las células que se presentan en exceso son linfocitos maduros, pequeños y grandes, los cuales no están procesados inmunológicamente. En la biometría hemática se encuentra, una leucocitosis (aumento de leucocitos) de 12 a 20000 mm^3 , linfocitosis (aumento de linfocitos) en un 60 y 90%, trombocitopenia (disminución de plaquetas) en un 20 a 30%, con una infiltración de blastos a médula ósea superior a 40% (normal de 5 a 10%). Estos pacientes presentan un cuadro clínico característico: crecimiento del hígado, bazo y ganglios. La leucemia crónica se presenta con mas frecuencia en adultos de 30 a 60 años de edad.

Las leucemias agudas difieren de las crónicas porque presentan células inmaduras llamadas blastos, que al acumularse progresivamente en la médula ósea produce una disminución de los elementos mieloides normales, ocasionando anemia, hemorragia e infección, las células blásticas que encontramos pueden ser del tipo de los mieloblastos, monoblastos, etc (8,22 y 33).

En una biometría se observa una leucocitosis de 10,000 a 100,000/ mm^3 , una leucopenia de 25%, trombocitopenia de 100,000/ mm^3 , se encuentra una infiltración de blastos mayor del 30% en médula ósea, también se presentan

infiltraciones a testículos, mediastino y sistema nervioso central (SNC). La leucemia aguda se puede presentar en todas las etapas de la vida (tabla I).

METODOS PARA DIAGNOSTICAR LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA

Cuando un paciente llega presentando un cuadro clínico de leucemia aguda se procede a efectuar un frotis en médula ósea y sangre periférica con tinción de Whrite ó Leisman Giemsa, si se observa más del 30% de blastos en médula ósea y en sangre periférica una leucocitosis de 10,000 a 25,000 /mm³, enseguida el hematólogo considera el riesgo del paciente, el cual se clasifica en: a) riesgo habitual cuando presenta las siguientes características: edad entre 3 y 10 años, cifra inicial de leucocitos menor de 25,000/mm³, que no se presente infiltración a testículo, sistema nervioso central y mediastino, b) riesgo alto cuando la edad sea menor de 2 ó mayor de 10 años, cifra inicial de leucocitos mayor de 25,000/mm³, y que halla infiltraciones a testículo, sistema nervioso central y mediastino (3,11 y 33).

CLASIFICACION DE LA LLA.

La leucemia linfoblástica aguda se clasifica de acuerdo a sus características citomorfológicas, citoquímicas, bioquímicas, inmunológicas y citogenéticas.

(a) Análisis morfológico. El grupo cooperativo de la FAB (French-American-British) (6 y 20) ha establecido un sistema

de clasificación morfológica que ha sido aceptada en el mundo occidental, en donde se toma en cuenta el tamaño de la célula, cantidad de cromatina, contorno nuclear, número de nucleolos, cantidad de citoplasma, su basofilia y número de vacuolas, de acuerdo a estos parámetros las leucemias linfoblásticas agudas se subdividen en L1, L2 y L3 (tabla II).

(b) Técnicas citoquímicas. La clasificación citoquímica ha sido establecida como auxiliar en la identificación de los diversos tipos celulares. Las técnicas empleadas están basadas en la demostración de ciertas enzimas y constituyentes químicos de la célula, lo que caracteriza tendencia y grado de diferenciación celular. Dentro de las tinciones se puede mencionar la tinción de PAS-Schiff, el sudán negro, mieloperoxidasa y estearasa inespecífica. La importancia de la citoquímica radica en que, si bien es cierto que la clasificación morfológica permite llegar a un diagnóstico de certeza en el 80% de los casos, la citoquímica incrementa ese valor a 95% (17 y 20).

(c) Técnicas bioquímicas. En relación a la caracterización bioquímica la enzima deoxinucleotidiltransferasa terminal (Tdf) permite diferenciar a la leucemia linfoblástica aguda de la leucemia no linfoblástica aguda, ya que es una enzima presente en los linfoblastos y no en los linfocitos normales, ni en la serie mielode. Esta enzima se produce normalmente en el timo y se ve aumentada en la leucemia linfoblástica aguda de células T.

La determinación de esta enzima también es útil para diagnosticar recaída a nivel testicular o de sistema nervioso central (22 y 28).

(d) Estudios inmunológicos. Desde el punto de vista de diagnóstico uno de los avances más importantes de la última década son los estudios inmunológicos (33), la aplicación de los anticuerpos monoclonales al estudio de las leucemias ha permitido establecer subgrupos inmunológicos, que informan estadios de maduración y diferenciación celular, los cuales tienen implicaciones pronósticas y terapéuticas. La leucemia linfoblástica aguda puede ser clasificada desde un punto de vista inmunológico en tres grupos fundamentales LLA-B, LLA-T, LLA no B no T.

Las características de las células tipo B presentan inmunoglobulinas de superficie y morfológicamente son similares a las células de Burkitt (LLA-L₃ de la FAB), las células tipo LLA-T tiene la característica de formar rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero y poseen la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal, y por último las células tipo no B, no T que tienen como característica una gran cantidad de receptores glucocorticoides en su citoplasma, cuanto mayor es el número de los mismos más larga es la duración de la remisión (desaparición de los síntomas clínicos) (13 y 33).

(e) Estudios cromosómicos. Los estudios citogenéticos de la LLA se han visto frenados durante más de 20 años debido a la mala calidad de las metafases y a la peculiar morfología

de los cromosomas (aspecto deshilachado), recientemente la utilización de técnicas de bandeado más simplificadas aunadas al uso de metrotexate y bromuro de etidium (los cuales alargan los cromosomas) el estudio del cariotipo se ha empleado con mayor frecuencia, observándose anomalías cromosómicas en un 66% de los pacientes con LLA (4 y 5). El análisis cromosómico ha demostrado ser de gran utilidad clínica, tanto en el diagnóstico como en el pronóstico de las leucemias en general y en particular de la LLA; por tal motivo los hematólogos actualmente utilizan el cariotipo para seleccionar el manejo y tratamiento adecuado a cada paciente (5,17 y 20). Los cambios cromosómicos más frecuentemente detectados en este tipo de leucemias son :

a) Hiperdiploidía de 47 a 57 cromosomas y de 51 a 60 cromosomas. La hiperdiploidía fué descrita por primera vez por Secker y Walker en 1982, caracterizándose por la ganancia de un número variable de cromosomas. Frecuentemente se ven involucrados los cromosomas 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 y X. Del 11 al 20% de los niños con hiperdiploida presentan cariotipo con 51 a 60 cromosomas y 11 al 16% con 47 a 50 cromosomas. La edad promedio en que se manifiesta la enfermedad es a los 6 años (4,5,6 y 25) (foto 1).

b) Cercano a lo Haploide. Rowley y Testa en 1982, encontraron clonas leucémicas con esta alteración, donde el rango varió de 26 a 36 cromosomas. Esta alteración

comprende el 1% de los pacientes y se presenta en cualquier edad (11 y 17).

c) Cariotipo normal 46,XX, ó 46,XY. Se presenta en 6 a 22% de pacientes cuya edad en el momento del diagnóstico es de 14 años en promedio (18 y 20) (foto 2).

d) La delección 6q-. Recientemente identificada por Herper 1983, no es muy frecuente, pero también se presenta en pacientes con este padecimiento, encontrándose el oncogen c-myb en el cromosoma 6 banda q22 a q24 (2), la frecuencia de esta alteración es de un 2% y se manifiesta en una edad promedio de 6 años.

e) La translocación t(8;14)(q24;q32). La cual tiene una frecuencia aproximada del 5% y se manifiesta a cualquier edad (14 y 26).

f) La translocación t(9;22)(q34;q11). Se reportó por primera vez en 1975, tiene una incidencia del 12% y edad promedio de aparición de 9 años, se observan en trastornos hematopoyéticos malignos (9,16 y 19) (foto 3).

g) La translocación t(4;11)(q21;q23). Se presenta con una frecuencia aproximada del 5% con una edad promedio de 16 meses al iniciar su aparición (5).

h) La translocación t(1;19)(q23;p13.3). Recientemente fué identificada con una frecuencia aproximada del 4 al 7% y con una edad promedio de aparición de 11 años. Aparentemente es una recombinación cromosómica crítica, la cual puede estar representada como t(1q⁺;19p⁻) o bien (1q⁻;19p⁺). (8,34 y 35).

i) La translocación $t(11;14)(p13;q13)$. Ha sido observada con una frecuencia aproximada del 5% y se manifiesta en cualquier edad (5 y 26).

j) Otras translocaciones reportadas en LLA son la $t(V;12)(V;p12)$ en donde el segundo cromosoma involucrado en el rearreglo puede ser cualquiera del complemento cromosómico, las translocaciones en donde se ve involucrado constantemente el cromosoma 8, $t(2;8)(p12 \text{ ó } p13; q24)$, $t(8;22)(q24;q11)$, $t(X;8)(p23;q24)$ la frecuencia aproximada de este rearreglo es el 2% con una edad promedio al inicio del padecimiento de 5 años (14 y 26).

k) Finalmente esta anomalía $14q+$ que Monlov y Monlova reportan en 1972 con la presencia de una banda extra al final de los brazos largos de este par cromosómico, y cuya frecuencia es muy baja (tabla III). (34).

ETIOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS.

La causa que origina esta enfermedad es desconocida, al parecer se presenta en individuos expuestos a radiaciones excesivas, productos químicos, pacientes con alteraciones del ADN, como síndrome de DOWN, síndrome de BLOOM, anemia de FANCONI y ATAXIA TALANGECTASIA, situaciones en las que son frecuentes los rompimientos cromosómicos y rara vez infecciones con retrovirus (5).

Recientemente el descubrimiento de que células normales presentan protooncogenes, genes con funciones normales que en ciertas condiciones mutan y se transforman en oncogenes

produciendo malignidad, ha abierto un nuevo panorama en el estudio del origen del cancer. Existen cinco mecanismos que explican la transformación de un protooncogen a un oncogen, los cuales son:

a) Transducción

Es el proceso mediante el cual un virus transfiere material genético de una célula donadora hacia otra receptora, ocasionando que el oncogen celular sea colocado bajo el control de elementos reguladores virales, y así el gen no responda más a las señales celulares, o bien produciendo alteraciones celulares en las secuencias codificadoras del oncogen celular.

b) Activación por inserción.

El retrovirus en éste caso es integrado a un gen celular particular como lo es el c-myc y como consecuencia este gen es desplazado y puesto bajo el control de secuencias virales regulatorias.

c) Amplificación del gen

En éste caso la expresión del gen se encuentra amplificada debido a que hay en la célula numerosas copias activas, cuando esto sucede se fabrica excesiva cantidad de proteínas que son codificadas por el gen.

d) Mutaciones puntuales

El cambio de una base por otra en el protooncogen hace que éste se active y se altere un pequeño segmento del gen al recibir radiación o mediante la acción de un carcinógeno químico.

e) Alteraciones cromosómicas

Deleciones. Es la pérdida de un segmento de ADN, han sido bien documentadas por lo menos en dos enfermedades, (tumor de Willms y retinoblastoma). Aquí las secuencias de codificación de un gen podrían ligarse a las secuencias de control de un segundo gen que es activado (5 y 8).

Translocaciones. Son rearrreglos entre dos cromosomas en donde uno de ellos cede su material a otro. Las translocaciones más frecuentemente observadas en las leucemias, son: la t(15;17) en la leucemia promielocítica aguda, ó la t(8;21) en la leucemia aguda no linfoblástica. El primer ejemplo de activación oncogénica en asociación a una reorganización cromosómica lo constituyó el linfoma de Burkitt, donde se observa una t(8;14). En este tipo de neoplasia el oncogen c-myc que se encuentra localizado en la banda q24 del cromosoma 8, se transloca generalmente al cromosoma 14q32 y en ocasiones al 2p11.1 ó 22p11.2, colocándose adyacente o en los genes que codifican para las cadenas de las inmunoglobulinas.

Una translocación aparentemente idéntica, se ha observado en pacientes con LLA-tipo L3 cuyas células tienen marcadores del tipo B en donde se piensa que probablemente sean manifestaciones diferentes de la misma enfermedad (8).

FRECUENCIA DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS (LA).

Las leucemias representan un 10% de todos los cánceres. En Estados Unidos se presentan 6.7 casos nuevos anualmente

por cada 100,000 habitantes(3), de estos el 1.1% corresponden a la leucemia linfoblástica aguda. Es la forma más común de cáncer en la infancia y se estima que en los países sajones uno de cada 2,880 niños la presentan. En general se presenta a cualquier edad en el grupo pediátrico, pero se ha observado un pico máximo entre los 2 y 6 años de edad y ataca con mayor frecuencia el sexo masculino.

En México, de acuerdo al registro nacional de cáncer, de la Secretaría de Salud de 1983 (3), se reporta que las leucemias y los linfomas son la neoplasia más frecuente.

En la población infantil con algún tipo de neoplasia las LA representan un 51%; en los hombres también ocupan el primer lugar y en las mujeres ocupan el tercero, precedido por el cáncer cervicouterino y de mama (5,8 y 33).

SOBREVIDA EN LAS LLA.

Los parámetros que con mayor frecuencia son utilizados para valorar pronóstico y sobrevida de los pacientes con LLA son: estudios morfológicos, inmunológicos y citogenéticos.

Estudios morfológicos. Keleti en 1978, reporta que LLA L1 (predominante en niños) tiene un índice de sobrevivencia del 85%, la LLA L2 el 14.1% y LLA L3 el 0.8% (6).

Tomando en cuenta los patrones inmunológicos se tiene lo siguiente: La LLA-B, representa el 2% de los casos de LLA morfológicamente es similar a las células Burkitt(LLA-L3 de

la FAB). Este tipo de patrón inmunológico tiene una pobre respuesta al tratamiento. La LLA-T, se observa aproximadamente en el 20% de los pacientes, presentando cifras elevadas de leucocitos y afección precóz al sistema nervioso central. El pronóstico de estos pacientes es pobre.

El tipo LLA no T y LLA no B, se presentan con más frecuencia en menores de edad representando el 70% de los casos y suele tener una buena respuesta al tratamiento en un 30%.

Se ha reportado que pacientes diagnosticados como LLA L1 y con fenotipo no T, No B, representan un 85% de todos los pacientes con LLA, los cuales tienen un mejor pronóstico que aquellos clasificados morfológicamente como L2 ó L3 con fenotipo células B ó células T (24,27 y 28).

Análisis Cromosómico.

- a) Hiperdiploidía con 47 a 57 cromosomas y de 51 a 60 cromosomas, este grupo constituye el 30% de los niños presentando un buen pronóstico en donde se logra hasta un 87% de remisión completa y una sobrevida media mayor de 1.5-3 años.
- b) Cercano a lo Haploide, esta alteración manifiesta un pobre pronóstico con una sobrevida media de 6 meses.
- c) Cariotipo 46XX ó 46XY; estos pacientes presentan una sobrevida media mayor de 1 año.

d) Aberraciones estructurales tales como: Translocaciones, Deleciones, Inversiones, presentan pobre pronóstico, siendo la sobrevida en general de menos de un año, con excepción de los pacientes con $t(1;19)(q23;p13.3)$ cuya sobrevida es de uno a dos años (17 y 25).

OBJETIVOS:

1. Identificar las alteraciones cromosómicas en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda.
2. Observar los cambios cromosómicos en el cariotipo durante el curso de la enfermedad.

JUSTIFICACION:

Debido a que en los últimos años los estudios citogenéticos han adquirido gran importancia en el manejo de los pacientes con leucemias, se decidió realizar el presente trabajo conjuntamente con el departamento de Hematología del Centro Hospitalario 20 de Noviembre con el fin de identificar las alteraciones cromosómicas en la población bajo estudio, permitiendo una mejor caracterización de la enfermedad y en consecuencia ayudar al médico a normar su conducta en el manejo y tratamiento del paciente. Por otro lado no existen reportes en la literatura de cambios cromosómicos en el transcurso de la enfermedad, este estudio permitirá valorar si existen cambios en el cariotipo y si estas influyen en la evolución del mismo.

MATERIAL Y METODOS

En el período de Abril de 1987 a Mayo de 1988, se estudiaron 15 pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda, que fueron enviados del servicio de hematología del Hospital Regional 20 de Noviembre. De los cuales 9 correspondieron al sexo Masculino y 6 al sexo Femenino, cuyo rango de edad fluctó entre 2-10, 11-15 y de 16 a 32 años. Trece pacientes tuvieron tipo citomorfológico de L₁, dos pacientes fueron L₂ y no se recibieron pacientes con L₃ (tabla IV).

A cada uno de los pacientes se les practicó un estudio cromosómico (cariotipo) en Médula Osea (MO) y en algunos de ellos en sangre periférica(sp), tanto en directo como en cultivo, cuando hubo material suficiente se cultivó una muestra con estimulación por fitohemaglutinina con el fin de permitir una mejor observación del material y detectar con más precisión las alteraciones cromosómicas esto se realizó en las siguientes etapas:

- (a) Inicial (previo al inicio de la quimioterapia)
- (b) Al conseguirse la remisión
- (c) Al finalizar la consolidación (6 semanas)
- (d) Al finalizar la profilaxis al SNC. (11 semanas)
- (e) Antes de sostén (14 semanas), y a partir de entonces, cada 3 meses en el curso del tratamiento.

TECNICAS DE CULTIVO

El método directo para médula ósea y sangre :

0.5 ml de MO ó sp fueron diluidas en 10ml de solución salina (0.9%), y posteriormente se centrifugaron por 5 min a 1000 rpm, el sobrenadante fué eliminado repitiendo una vez más el paso anterior.

El botón celular se resuspendió nuevamente en 10ml de solución salina (0.9% de NaCl) agregando dos gotas de colchicina a una concentración de (1 μ gr/ml), el cultivo fué incubado a 37°C por 10 min, al término del cual fué centrifugado nuevamente por 5 min a 1000 rpm eliminándose el sobrenadante.

El paquete celular obtenido fue resuspendido en 10 ml de una solución hipotónica de KCl 0.75 M, e incubado a 37°C por 20 ó 30 min; se centrifugó a 1000 rpm para eliminar el sobrenadante.

El botón resultante, fué resuspendido cuidadosamente en 10 ml de fijador Carnoy (metanol-ácido acético 3:1), centrifugándose por 5 min a 1000 rpm; el sobrenadante fue eliminado y resuspendido nuevamente en fijador, paso que se repitió de 3 a 4 veces hasta obtener limpio el botón celular resultante.

Para elaborar las laminillas se resuspendió el botón obtenido en 0.5 a 2 ml de fijador dependiendo del paquete

celular obtenido, se dejaron caer a una altura de 25 a 30 cm una a tres gotas de suspensión sobre un portaobjetos perfectamente limpio y sin grasa , después se flamearon las laminilla para lograr la fijación de las células al portaobjetos.

Método de cultivo a las 24, 48 y 72 hrs y sin estimulación.

Se procesó un frasco de cultivo para cada uno de los tiempos antes mencionados de la siguiente manera: 0.5 ml de MO ó sp, fueron agregadas a 10 ml de cualquiera de estos medios de cultivo, TC-199 , MEM Earle ó HAM F-10, suplementados con 20% de suero fetal de ternera y 100 U/ml de penicilina y estreptomicina. A los cultivos que fueron estimulados se les agregó 0.5 ml de fitohemaglutinina.

Los cultivos fueron incubados a 37°C por el tiempo correspondiente, la cosecha se hizo con la técnica descrita en el método directo, a partir de agregar la colchicina.

BANDEO CROMOSOMICO

Se obtuvieron de 8 a 10 laminillas para cada caso, una de las cuales fué teñida con giemsa para rutina y el resto se procesó con técnicas de banda G y Q.

Técnica de bandas G; a 100 ml de solución salina previamente calentada a 37°C se le adicionó 25 mg de tripsina (difco). Las laminillas se introdujeron en esta solución aproximadamente 1 min para posteriormente ser

lavadas en 3 diferentes soluciones de NaCl al 0.9% por un tiempo de 10 seg cada una, después fueron teñidas con Giemsa durante 5 min se lavaron en agua y se secaron al aire. Si las laminillas no mostraron un patrón de bandas, o la calidad del mismo no fué la adecuada, entonces esta misma laminilla se introdujo nuevamente en la tripsina el tiempo necesario para obtener un bandeo efectivo y se tiñó nuevamente.

Técnica de bandas Q: Las laminillas fueron teñidas en una solución de mostaza de quinacrina [5 µg/ml] por 10 a 15 min, después de lo cual fueron lavadas con una solución de buffer de Sorensen por 30 seg, paso que se repitió dos veces más. Se colocó un cubreobjeto sobre las laminillas y el exceso de buffer fué eliminado presionando la laminilla en papel absorbente (29).

ANALISIS DE LAMINILLAS AL MICROSCOPIO.

Primeramente se analizaron 10 células sin bandear (tinción simple de Giemsa) de la muestra de MO ó sp en directo y en cultivo sin estimular, cuando nó fué posible la obtención del material celular, el análisis se hizo utilizando las muestras de 24, 48 y 72 hrs (dejando como último recurso los cultivos de 72 horas estimulados).

En las muestras en las que se obtuvieron bandas G de buena calidad se valoraron de 10 a 20 células y se microfotografiaron 3 células para obtener su cariotipo. En

aquellos casos en donde no fué posible obtener bandas G se practicaron bandas Q utilizando un microscopio FOMI III ZEISS modelo universal de epifluorescencia, valorándose la fluorescencia en la longitud de onda (400-444).

El cariotipo fué ordenado de acuerdo al Sistema Internacional de Nomenclatura en Citogenética Humana (15).

El material utilizado y la preparación de los reactivos se encuentran en el Anexo 1

RESULTADOS

Se estudiaron 15 pacientes de los cuales 13 fueron LLA-L₁, 7 hombres y 6 mujeres de 1 año a 32 años de edad, y 2 pacientes con LLA-L₂, un varón de 9 años y una niña de 16 años de edad. A todos los pacientes se les practicó aspiración de médula ósea, en el estudio inicial antes de administrarle el tratamiento y después en etapas subsecuentes y durante el curso de la enfermedad. Todas las mitosis fueron valoradas en cuanto al número modal de sus cromosomas. De la valoración microscópica de las laminillas de cada paciente derivan los siguientes datos:

CARIOTIPO INICIAL

En esta etapa del estudio se obtuvo un resultado en 11 pacientes y en 4 pacientes no hubo material para estudio. De estos 11 pacientes 8 presentaron cariotipo normal 46, XX ó 46, XY y 3 un cariotipo anormal. En el paciente número 4, con LLA-L₂ edad 9 años con sexo masculino, se obtuvo un cariotipo con el 23% de células hiperdiploides, con un rango de 46 a 55 cromosomas predominando los grupos C, D y F y 77% de células normales. En el paciente número 9, con LLA-L₁ sexo masculino y 5 años de edad mostró el 38% de células hiperdiploides con un rango de 50-56 cromosomas, predominando los grupos A, C, D, y F y el 62% de células normales. Por último el paciente número 10 el cual presentó

en todas sus células analizadas una translocación 9;22(q34;q11) (tabla V).

En las etapas subsecuentes de tratamiento clínico que se les aplicó a los pacientes se presentó lo siguiente:

El paciente número 1 con LLA-L1, edad 30 años con sexo femenino, en etapa de consolidación y en la etapa de profilaxis a Sistema Nervioso Central (SNC), se obtuvo un cariotipo normal de 46 cromosomas, en la semana 14 de sostén, hubo el 59% de células con un cariotipo normal femenino y el otro 41% presentó células hiperdiploides en un rango de 50-80 cromosomas por célula donde predominaron los cromosomas del par 3 grupo C, D, y pares de 16, 19 y 20. En la semana 17 de sostén, nuevamente se obtuvo un cariotipo normal 46, XX. En la semana 20 no pudo ser valorado el material debido a la pobre calidad del mismo, sin embargo en la semana 23 nuevamente la paciente presentó un cariotipo normal.

En el paciente número 2, con LLA-L1 edad 3 años y de sexo femenino, en la etapa de consolidación obtuvimos un cariotipo normal de 46 cromosomas, en tanto que en la etapa de profilaxis a SNC no se tuvo material para estudio. A la semana 14 de sostén se observó un 62% de células hiperdiploides con un rango de 80 a 87 cromosomas donde predominaron los grupos C, D, F y G; y el 38% de células con un cariotipo normal femenino, donde predominaron los cromosomas C, D, F y G; mientras que en la semana 17 de sostén tuvimos un cariotipo normal 46, XX.

En el paciente número 3, con LLA-L1; de 11 años de edad y sexo femenino, en la etapa de consolidación no se obtuvo material para estudio, en las etapas siguientes, no se realizó el cariotipo debido a que la paciente abandonó el tratamiento.

El paciente número 4, con LLA-L2; de 9 años de edad, sexo masculino en la etapa de consolidación se observó un cariotipo con el 31% de células hiperdiploides con un rango de 47 a 88 cromosomas y el otro 69% de células con un cariotipo normal masculino, predominando los grupos B, C, D, E y F; en la etapa de profilaxis a SNC se mostró un cariotipo el cual presentó el 88% de células normales y el otro 12% fueron células hiperdiploides con un rango de 50 a 83 cromosomas, predominando los grupos A, B, C, D y E. A la semana 14 de sostén observamos también células hiperdiploides con el 13% de éstas, con un rango de 47 a 88 cromosomas predominando los grupos A, C, D y G; en la semana 17 de sostén también presentó un cariotipo hiperdiploide con el 3% de ésta línea con un rango de 46 a 78 cromosomas predominando los grupos A, B, C, D, E y G; y el otro 97% una línea normal de cromosomas el 87% de células.

El paciente número 5, con LLA-L1, edad 9 años con sexo masculino; en la etapa de consolidación no se practicó el cariotipo; en la etapa de profilaxis a SNC se observó un cariotipo normal 46,XY, y en la semana 14 de sostén se obtuvo lo mismo, por otro lado en la semana 17 se tuvo una

línea con el 31% de células en donde se observó la adición de un cromosoma del grupo C el cual no se identificó debido a la calidad del material, y el otro 69% de células normales.

El paciente número 6, con LLA-L1, edad 9 años con sexo masculino, en la etapa de consolidación se observaron dos líneas celulares, una con el 10% de células hiperdiploides, con un rango de 47 a 80 cromosomas, predominando los grupos A, C y D; y el otro 90% con una línea normal 46,XY, en la etapa de profilaxis a SNC no se obtuvo material para estudio. Por otro lado, en la semana 14 de sostén, tuvimos un cariotipo normal masculino en todas las células estudiadas, este paciente presentó una recaída en la cual observamos una línea hiperdiploide con el 30% de células y el otro 70% de células normales.

El paciente número 7, con LLA-L2, edad 16 años con sexo femenino, en la etapa de consolidación se observó un cariotipo normal, en la etapa de profilaxis a SNC mostró el mismo cariotipo, igual que en la semana 14 de sostén, la paciente tuvo una recaída en donde encontramos el 26% de las células con 47 cromosomas donde se observó un cromosoma extra, el cual fué un filadelfia, el 4% con una línea hiperdiploide y un rango de 46 a 50 cromosomas predominando los grupos A, C, D y F y el otro 70% de células normales.

El paciente número 8, con LLA-L1, edad 1 año 8 meses con sexo femenino, en la etapa de consolidación se obtuvo un cariotipo normal masculino 46,XY, en las siguientes etapas

del estudio no se elaboró el cariotipo debido a que el paciente falleció.

El paciente número 9, con LLA-L1, edad 5 años con sexo masculino, en la etapa de consolidación se mostró una línea hiperdiploide con un 7% de células con un rango de 48 a 87 cromosomas predominando los grupos A, C, D, E, F y G; y el 93% de células normales, en la etapa de profilaxis a SNC se tuvo un cariotipo normal masculino 46,XY.

El paciente número 10, con LLA-L1, edad 32 años sexo masculino, no se elaboró el cariotipo en las etapas subsiguientes debido a que falleció el paciente.

El paciente número 11, con LLA-L1, edad 5 años con sexo masculino, en la etapa de consolidación se obtuvo un cariotipo normal masculino 46,XY, en la etapa de profilaxis a SNC y en las etapas de sostén no se elaboró el cariotipo debido a que falleció el paciente.

El paciente número 12, con LLA-L1, edad 7 años con sexo masculino, en etapa de consolidación se obtuvo un cariotipo con 46,XY, en la etapa de profilaxis a SNC no se practicó el cariotipo, por otro lado en la semana 14 de sostén no se elaboró el cariotipo debido a la calidad del material.

El paciente número 13, con LLA-L1, edad 8 años con sexo masculino, en la etapa de consolidación se observó un cariotipo con el 9% de células hiperdiploides, con un rango de 86 a 87 cromosomas, predominando todos los grupos A, B, C, D, E, F y G; y el 91% de células normales 46,XY, en la etapa de profilaxis a SNC presentó una línea de 46

cromosomas con una deleción del cromosoma 22 en el 22% de las células, el 16% de células hiperdiploides con un rango de 47 a 103 cromosomas extras predominando todos los grupos A, B, C, D, E, F y G; y el 62% de células normales.

El paciente número 14, con LLA-L1, edad 24 años con sexo femenino, ya no se realizaron estudios subsecuentes debido a que falleció la paciente.

El paciente número 15, con LLA-L1, edad 14 años sexo femenino, nó se realizó cariotipo en las etapas subsecuentes, debido a que la paciente abandonó el estudio. (tabla V)

DISCUSION

En nuestro estudio se obtuvieron resultados en el cariotipo en un 84%; otros autores reportan un 70 a 80% (34). Los estudios no valorables son consecuencia de material insuficiente o bien, a la pobre calidad de las metafases obtenidas, y que a pesar de haber utilizado cultivos en directo, 24 , 48 y 72 horas y bandas G ó Q alteraciones estructurales o numéricas no pudieron ser descartadas. Problemas similares son reportados por otros investigadores quienes también encontraron que es muy difícil obtener material de buena calidad en este tipo de leucemias (17 y 34).

En estudios iniciales previos al tratamiento 3 pacientes presentaron anormalidades citogenéticas (pacientes 4, 9 y 10) representando 20% del total, otros autores reportan alteración en el 65 al 94% de los pacientes (4, 18, 24 y 34). El bajo porcentaje observado en nuestra población se debió quizá al número de pacientes estudiados, sin embargo en estudios subsecuentes pacientes que inicialmente tuvieron cariotipos normales presentaron cariotipos anormales; aumentando así el 50% de alteraciones encontradas en nuestra población. La alteración cromosómica más frecuentemente observada fué la hiperdiploidia tanto en el cariotipo inicial como en estudios subsecuentes, la cual

representó el 26.5% más de lo reportado por otros autores (18 y 34). La aparición de las hiperdiploidías en estudios subsecuentes no se ha demostrado que sea consecuencia de la quimioterapia (27), en donde se sabe que se producen rearreglos de otra índole, como translocaciones, inversiones, deleciones etc. Por otra parte al igual que en otras revisiones, cuando el número cromosómico sobrepasa de los 50 cromosomas, es de esperar una sobrevida mayor a 36 meses en niños y 21 meses en adultos (28). En nuestra población los pacientes 1, 2, 4, 6, 9 y 13 quienes en alguna etapa del estudio (tabla VI) presentaron un cariotipo hiperdiploide están aún con vida confirmando esto los hallazgos por otros autores (2, 8, 34 y 35).

De los 15 pacientes estudiados predominó el grupo que tenía

de 2 a 10 años, siendo estos 8 casos (pacientes 2, 4, 5, 6, 9, 11, 12 y 13) y con respecto al tipo citomorfológico el más frecuente fué la LLA-L₁ (pacientes 2, 5, 6, 8, 9, 11, 12, y 13), de acuerdo a estos parámetros hematológicos este grupo presentó buen pronóstico lo cual confirmó el estudio citogenético.

Existen pocos reportes en la literatura acerca de la evolución clonal de la enfermedad, Billstrom ha encontrado de un 41 a 94% de alteraciones (35). Nuestros hallazgos sugieren que la aparición de hiperdiploidías o trisomías, durante la evolución de la enfermedad son de buen pronóstico para el paciente aunque inicialmente no hayan tenido dicho

pronóstico como el paciente número 4 con riesgo habitual desde el punto de vista hematológico.

En la literatura se ha reportado que el 25% de los pacientes

con LLA presentan cromosoma filadelfia, en nuestra población se presentó en un 13.3%. La presencia de dicho cromosoma se ha visto que confiere un mal pronóstico (4, 17 y 35), lo cual fué confirmado en nuestros resultados pues los dos pacientes que lo presentaron, paciente número 10 al inicio del tratamiento y el paciente número 7 a la 26 semana de evolución fallecieron en un lapso corto posterior a la aparición de este cromosoma. Lo que llama nuestra atención es el segundo paciente pues éste presentó un cariotipo normal en la etapa inicial, esto indica la importancia de realizar estudios citogenéticos durante la evolución de la enfermedad del paciente y no nada más en el estudio inicial como se efectuó en la mayoría de los casos. En los pacientes número 3, 8, 11, 14 y 15 nó se les pudo hacer una correlación entre el estudio citogenético y el hematológico debido a que abandonaron el tratamiento o a que fallecieron.

CONCLUSIONES

De estas investigaciones se puede concluir que:

- La aplicación de las técnicas de bandeado cromosómico para el estudio de las leucemias, ha producido resultados significativos con respecto a los patrones citogenéticos y correlaciones clínicas.

- Los estudios cromosómicos en leucemia aseguran un diagnóstico y un pronóstico, favoreciendo una mejor selección del tratamiento para un paciente en particular.

- La determinación del número modal de cromosomas y la identificación específica de alteraciones estructurales, son de significancia pronóstica para el paciente.

- Varios estudios citogenéticos durante la evolución del padecimiento incrementan la oportunidad de hallar una clona cromosómicamente anormal.

- En algunos casos, las clonas anormales pueden desaparecer posiblemente por el efecto del tratamiento.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Allouche M., V. Georgoulis, A. Bourinbalar, I. Dupuy, C. Clemenceau, H. Gaget, G. Mathe and C. Jasmin.(1987) Abnormal proliferation of T-colony-forming cells from peripheral blood of patients with T-cell acute lymphoblastic leukaemias and lymphomas in complete remission: potential prognostic value. British Journal of Haematology 65:411-418.
- 2.- Barletta C., P-G. Pelicci, L. C. Kenyon, S. D. Smith, R. D. Favera. (1987) Relationship between the c-myb locus and the 6q- chromosomal aberration in leukemias and lymphomas. Science 235:1064-1067.
- 3.- Berrozpe G, F. Solé, R. Miró, M. R. Caballín, L. Barrias y A. Genesca.(1988) Anomalías cromosómicas en neoplasias humanas. Tratado de medicina práctica. Medicina 2a ed.pag 3075-3079.
- 4.- Blommfield C. D.(1985) The clinical significance of chromosomal changes in acute leukemia. Medical Genetics: Past, Present, Future.pag 153-170.
- 5.- Chaganti, R.S.K., G. Janes. (1985). Genetics in clinical oncology. pp. 3-254.
- 6.- Chessells J. M.(1986) Acute leukaemia in children. Clinics in Haematology 15(3):727-745.
- 7.- Chilcote R. R.,M.D., E. Brown M.D., and J. D. Rowley, M.D.(1985) Lymphoblastic leukemias with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of chromosome 9. The New England Journal of Medicine 313:286-291.
- 8.- Croce, M.C., G. Klein. (1986). Translocaciones cromosómicas y cancer humano. El Cancer, libro de Investigación y Ciencia. Scientifican American. pp. 117-124.
- 9.- Deklen A., A. Hagemeyer, C. R. Bartram, R. Houwen, L. Hoefslot, F. Carbonell, L. Chan, M. Barnett, M. Graves, E. Kleihauer, N. Heisterkamp, J. Groffen and G. Grosveld.(1986) bcr rearrangement and translocation of the c-abl oncogen in philadelphia positive acute lymphoblastic leukaemia. Blood 68(6):1369-1375

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 10.- French M., A. M. Manel, J. P. Magaud, D. Fiere, P. Adeleine, D. Guyotat and P. A. Bryon. (1987) Adult acute lymphoblastic leukaemia :is cell proliferation related to other clinical and biological features? British Journal of Haematology 65(1):419-423.
- 11.- Gale R; Peter, A. and V. Hoffbrand (1986) Acute leukaemias: Biology and tratment. Clinics in Haematology 15(3):567-616.
- 12.- Greaves M. F.(1986) Differentiation-linked leukemogenesis in lymphocytes. Science 234:697-702.
- 13.- Greaves, M. F., S. Mizutani, A. J. W. Fursley, D. R. Sutherland, L. C. Chan, A. M. Ford and H. V. Molgraard. (1986) Differentiation-linked gene rearrangement and expression in acute lymphoblastic leukaemia. Clinic in Haematology 15(3):621635.
- 14.- Haluska F. G., S. Finver, Y. Tsujimoto and C. M. Croce.(1986) The t(8;14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results fromm mistakes in V-D-J joining. Nature 324:158-162.
- 15.- Harnden, D. G., (1985). An International system for human cytogenetic nomenclature. Edit. Karger. pp. 2-215.
- 16.- Heisterkamp, N., R. Jenkins, S. Thibodeau, J. R. Testa, K. Weinberg, and J. Groffen. (1989). The bcr gene in philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. Blood 73(5):1307-1311.
- 17.- Le Beau, M. M. (1985) Cytogenetic analisis of hematologic malignancies. Cytogenetics Laboratory Manual Second Revised, Edition Gittawahrenburg. pp. 26-44.
- 18.- Look A. T.(1985) The emerging genetics of acute lymphoblastic leukemia: Clinical and Biologic Implications. Seminars in Oncology 12(2):92-104.
- 19.- McCarthy, D. M., F. V. Rassool, H. M. Goldman, S. V. Graham, and G. D. Birnie. (1984). Genomic alterations involving the C-MYC proto-oncogene locus during the evolution of a case of chronic granulocytic leukaemia. Thelancet. 1362-1635.
- 20.- Miller D. R., S. Leikin, V. Albo, H. Sather and D. Hammond (1981) Prognostic importance of morphology

(FAB classification) in childhood acute lymphoblastic leukaemia (ALL). British Journal of Haematology 48:199-206.

- 21.- Okabe M., S. Matsushima, M. Morioka, M. Kobayashi, S. Abe, K. Sakurada, M. Kakinuma, and T. Miyasaki. (1987) Establishment and characterization of a cell line, TOM-1, derived from a patient with philadelphia chromosoma-positive acute lymphocytic leukemia. Blood 69(4):990-999.
- 22.- Plasencia A. P., M. S. Mota. (1989) Leucemias no linfoblástica agudas. Tradado de Medicina Práctica. Medicine. 3a. Ed.
- 23.- Prentice H. Grant, J-P. Grob. (1986) Acute lymphoblastic leukaemia in adults. Clinics in Haematology 15(3):755-775.
- 24.- Pui H. Ch., S. C. Raimandi, S. B. Murphy. (1987) An analysis of leukemic cell chromosomal features in infants. Blood 69(5):1289-1293.
- 25.- Pui H. Ch., S. C. Raimondi, R. K. Dodge, G. K. Rivera, L. A. H. Fuchs, M. Abromowitch, A. T. Look, W. L. Furman, W. M. Crist, and D. L. Williams. (1967) Prognostic importance of structural chromosomal abnormalities in children with hyperdiploid (>50 chromosome) acute lymphoblastic leukemia. Blood 73(7):1963-1967.
- 26.- Rowley, J. D., D. Variakojis, Y. Kaneko, and M. Cimino. (1981). A Burkitt-lymphoma variant translocation (2p-; 8q+) in a patient with ALL. L3 (Burkitt type). Hum Genet. 58:166-167.
- 27.- Rubin, Ch. M., L. Robingon, L. Nesbit. (1986) Cytogenetics studies of long term-survivor of childhood acute lymphoblastic leukemia: A follow up Report Medical and Pediatric Oncology 14:295-299.
- 28.- Sandberg A. A. (1984) The leukemias. The American Journals of medicine. 76(6):971-981.
- 29.- Sedbrigh, M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. Lancet 2-1971.
- 30.- Slamon J. D. (1987) Proto-oncogenes and human cancers. The New England Journal of Medicine 317(15):955-957.
- 31.- Sow, L. W., N. Tachibana, S. C. Raimkondi, S. J. Lauer, O. N. Witte, and S. S. Clark. (1989) Comparative biochemical and cytogenetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with the philadelphia

chromosome and other 22q11 variants. Blood. 73(5):1291-1297.

- 32.- Stass S. A., J. Mirro Jr. (1986) Lineage heterogeneity in acute leukaemia: acute mixed-lineage leukaemia and lineage swich. Clinics in Haematology 15(3):811-823.
- 33.- Villegas, A. J., Garcia T., A. Alvares, Carmona y Espinos P. (1982). Leucemia aguda consideraciones generales clasificación y manifestaciones clinicas. Tratado de Medicina Práctica. Medicine. 3a. ed. pp 545-563.
- 34.- Yunis, J. J. and Brunning D. R., (1986) Prognostic significance of chromosomal abnormalities in acute leukaemias and myelodysplastic syndromes. Clinics in Haematology 15(3):597-615.
- 35.- Yunis, J. J. (1985) Genes and chromosomes in human cancer. Prog. Med. Virol. 32:58-71.

ANEXO
MATERIAL EMPLEADO.

I REACTIVOS

- 1.- Cloruro de Sodio
- 2.- Cloruro de Potasio
- 3.- Alcohol Metílico
- 4.- Acido Acético Glacial
- 5.- Fosfato de Potasio Monobásico(KH_2PO_4)
- 6.- Fosfato de Sodio Dibásico(Na_2HPO_4)
- 7.- Típsina(Difco)
- 8.- Colcemid ó Colchicina(colcemid 10mgr/ml)
- 9.- Mostaza de Quinacrina(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
- 10.- Agua Destilada

II SOLUCIONES

- 1.- Solución Isotónica de NaCl al 0.9%
- 2.- Solución Hipotónica de KCl 0.75 M.
- 3.- Solución Buffer de Fosfatos(buffer de Sorensen pH 6.4)
- 4.- Solución Colorante de Giemsa
- 5.- Solución de Colchicina(1 gr/ml)

III MATERIAL BIOLÓGICO

1.- Médula Osea obtenida por aspiración y sangre obtenida por intravenosa, de 15 pacientes que presentan LLA.

IV PREPARACION DE SOLUCIONES

- 1.- Solución isotónica de NaCl; se disuelven 9 gr de NaCl en 1 litro de agua destilada aforando.
- 2.- Solución hipotónica de KCl; se disuelven 5.582 gr de KCl en 1 litro de agua destilada aforando.
- 3.- Fijador Carnoy; 3 partes de metanol por una de ácido acético
- 4.- Solución trabajo de Giemsa; se prepara diluyendo 2.5 ml de buffer A, 2.5 ml de buffer B y 42.5 de agua destilada.
- 5.- Solución A (KH_2PO_4); se pesan 113.4 gr. y se disuelven en 2.5 litros de agua destilada.
- 6.- Solución B (Na_2HPO_4); se pesan 148.3 gr. en 2.5 litros de agua destilada.
- 7.- Solución de Mostaza de Quinacrina; Quinacrina Mustard 5 mgr., buffer A 5 ml, buffer B 7 ml y 108 ml de agua destilada.

Tabla I.

VALORES	NORMALES	
	HOMBRE	MUJER
Conteo de células blancas X 10 ³ en sangre	7.25(3.9-10.6)	7.20(3.5-11.0)
Conteo de células rojas X 10 ⁶ /ml en sangre	5.11(4.4-5.9)	4.51(3.8-5.2)
Hemoglobina g/100ml en sangre	15.5(13.3-17.7)	13.7(11.7-17.7)
Volumen del paquete de RBC ml/100ml en sangre	46.0(39.8-52.2)	40.9(34.9-46.9)
Volumen corpuscular medio m ³ /células rojas	90.1(80.5-99.7)	90.4(80.8-100.0)
Hemoglobina corpuscular media por células rojas	30.2(26.6-33.8)	30.2(26.4-34.0)
Hemoglobina corpuscular media conc.g/100ml RBC	33.9(31.5-36.3)	33.6(31.4-35.8)
Conteo de plaquetas X 10 ³ /l de sangre	295(150-440)	295(150-440)

*RBC- Conteo de Células rojas en Sangre

Tabla II.

**CLASIFICACION DE LA L.L.A. DE ACUERDO A LAS
CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS**

CARACTERISTICAS	L1	L2	L3
Tamaño de la célula	Pequeño hasta 2 veces el linfocito	Grande heterogéneo en tamaño	Grande y Homogéneo
Cromatina	Homogénea	Heterogénea	Finamente punteada y homogénea
Contorno Nuclear	Regular, Identaciones ocasionales	Identificación irregular	Regular oval o redondo
Citoplasma	Escaso	Variable a veces moderadamente abundante	Moderadamente abundante con múltiples vacuolas que se superponen incluso al núcleo
Basófila Citoplasmática	Ligera o moderadamente intensa	Variable	Muy intensa
Vacuolas Citoplasmáticas	Variables	Variables	A menudo prominentes

Tabla III

HALLAZGOS CITOGENICOS EN PACIENTES CON LA L.L.A.
Y SU CORRELACION CON EL PRONOSTICO

FREC. APPROX. %	FAB/TDT	FENOTIPO INMUNOLOGICO	CAROTIPO	EDAD PROMEDIO	SOBREV. MEDIA
5	L1,L2	MIELOMOCITICO Y PRECURSOR CELULAS B	4(4,11) (q21;q23)	16 MESES	1 AÑO
12	L1,L2	PRECURSOR CELULAS B	4(8;22) (q24;q11)	9 AÑOS	1 AÑO
5	L3	CELULAS B	4(8;14) (q24;q32)	RANGO ABIERTO	1 AÑO
5	L1-L2	CELULAS T	4(11;14) (p13;q11.2)	POCOS CASOS	1 AÑO
4-7	L1,L2	PRE-B (CITOPLASMATICO)	4(1;19) (q23;p13.3)	11 AÑOS	1-2 AÑOS
2	L1,L2	B-PRE-B (CITOPLASMATICO)	(V;12)DEL 12P	5 AÑOS	POBRE
1	L1,L2	PRECURSOR CELULAS B	CERCANO A LO HAPLOIDE	RANGO ABIERTO	16 MESES
2	L2	PRECURSOR CELULAS B	DEL 6 q	6 AÑOS	1 AÑO
11-16	L1,L2	PRECURSOR CELULAS B	47-50	6 AÑOS	1.5 AÑOS
11-20	L1,L2	PRECURSOR CELULAS B	51-60	3 AÑOS	2-3 AÑOS
6-22	L1,L2	PRECURSOR CELULAS B	NORMAL	14 AÑOS	1 AÑO

Tabla IV.

DISTRIBUCION POR EDAD Y SEXO

LMITES DE EDAD	FEMENINO	MASCULINO	TOTAL
MENORES DE 2 AÑOS		1	1
2 - 10 AÑOS	1	7	8
11 - 15 AÑOS	2		2
16 - 32 AÑOS	3	1	4
TOTAL	6	9	15

Tabla V.

HALLAZGOS CITOGENETICOS INICIALES Y SUBSECUENTES PARA LOS PACIENTES CON L.L.A.

PTE. SEXO	EDAD	TIPO CITOMORFOLOGICO	ESTUDIO INICIAL	CONSOLID SEMANA 6	PROFLAXIS A B.N.C. SEMANA 11	SOSTEN SEMANA 14	SOSTEN SEMANA 17	SOSTEN SEMANA 20	SOSTEN SEMANA 23	RECADA SEMANA 26	ESTADO ACTUAL DEL PACIENTE
1/F	30	L1	Normal (a)	Normal (b)	Normal (a)	Hiperdiploide (a) 41%	Normal (a) (b)	No valorable	Normal (a)		Vive
2/F	3	L1	No valorable	Normal (b)	-----	Hiperdiploide (a) (b) 62%	Normal (a)				Vive
3/F	11	L1	Normal (a)	No valorable							Abandonó
4/M	9	L2	Hiperdiploide (a) 23%	Hiperdiploide (a) 31%	Hiperdiploide (a) 12%	Hiperdiploide (a) 13%	Hiperdiploide (a) 3%				Vive
5/M	9	L1	Normal (a)	-----	Normal (a)	Normal (a) (b)	46XY/47,XY +c (a)31%				Vive
6/M	9	L1	Normal (a)	Hiperdiploide (a) 10%	No valorable	Normal (a)				Hiperdiploide (a) 30%	Vive
7/F	16	L2	Normal (a)	Normal (a)	Normal (a)	Normal (a)				Hiperdiploide (a)26%ph,4%	Falleció
8/F	18	L1	No valorable	Normal (a)							Falleció
9/M	5	L1	Hiperdiploide (a) 38%	Hiperdiploide (a) 7%	Normal (a) (b)						Vive
10/M	32	L1	Translocación (a) (b) 100%								Falleció
11/M	5	L1	Normal (a) (c)	Normal (a)							Falleció
12/M	7	L1	No valorable	Normal (a)		No valorable					Vive
13/M	8	L1	No valorable	Hiperdiploide (a) (b) 9%	46XY/46,XY(a) 22q/47-103 22% 16%	Hiperdiploide (a) 10%					Vive
14/F	24	L1	Normal (a)								Falleció
15/F	14	L1	Normal (a)								Abandonó

a.- Médula Osea en directo

b.- Médula Osea de 24 Hrs.

c.- Médula Osea de 48 hrs.

----- Cariotipo no practicado

% Porcentaje de células anormales



1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

1. 總行及各分行
2. 儲蓄部
3. 信託部
4. 保險部
5. 倉庫部
6. 運輸部
7. 郵政部
8. 其他

FOTO 1



1957

11	11	11	11	11	11	11	11
11	11	11	11	11	11	11	11
11	11	11	11	11	11	11	11
11	11	11	11	11	11	11	11



NATIONAL BUREAU OF GENETIC RESOURCES
INDIA

NUMBER

Muntiacus gazelle

NO

2/2

Diag. L.A.

50

