

0346
Leje.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ESTIMACION DE LA PROLIFERACION
CELULAREN PACIENTES PEDIATRICOS
CON LEUCEMIA POR MEDIO DEL INDICE
DE PROLIFERACION POTENCIAL Y
CITOCALASINA B.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A:

SILVIA PATRICIA PEREZ VERA

DIRECTORA DE TESIS:
MED. CIR. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI

MEXICO, D. F.,

1994.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la División de Investigación en Genética Humana del Instituto Nacional de Pediatría de la S.S., bajo la dirección de la Méd Cir. Alessandra Carnevale Cantoni.

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of connected loops and a trailing line.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los Doctores: Alessandra Carnevale, Miguel Betancourt, Sara Frías, Rocío Ortíz, Patricia Ramos, Emilio Rojas y Fabio Salamanca, la revisión de este trabajo de tesis.

Mi más sincero agradecimiento a los Servicios de Genética y de Hematología del Instituto Nacional de Pediatría, por su valiosa colaboración en la elaboración de esta tesis.

**ESTIMACION DE LA PROLIFERACION CELULAR EN PACIENTES PEDIATRICOS
CON LEUCEMIA POR MEDIO DEL INDICE DE PROLIFERACION POTENCIAL Y
CITOCALASINA B.**

INDICE

RESUMEN	1
ABREVIATURAS	3
I. INTRODUCCION	4
1. Leucemia linfoblástica aguda.	4
1.1 Definición.	4
1.2. Epidemiología.	4
1.3. Clasificación.	4
1.3.1. Clasificación citomorfológica.	4
1.3.2. Clasificación inmunológica.	5
1.3.3. Clasificación citogenética.	5
1.4. Características clínicas de las leucemias.	8
1.4.1. Cuadro clínico.	8
1.4.2. Diagnóstico.	8
1.4.3. Pronóstico.	9
1.4.4. Tratamiento.	10
1.4.4.1. Agentes quimioterapéuticos utilizados en leucemia linfoblástica aguda y su relación con el ciclo celular.	12
2. El ciclo celular.	13
2.1. Características generales.	13
2.1.1. Factores que intervienen en la progresión del ciclo celular.	14
2.2. Modificaciones de la cromatina a través del ciclo celular y repercusiones en su regulación.	14
2.3. Ciclo celular de las leucemias agudas.	21
2.4. Estimación del ciclo celular por el método de condensación prematura de cromosomas.	23
2.4.1. Características de los cromosomas prematuramente condensados.	23

2.4.2. Morfología de los cromosomas prematuramente condensados.	23
2.4.3. Aplicaciones de los cromosomas prematuramente condensados en leucemia aguda.	24
3. Agentes bloqueadores de la división celular.	26
JUSTIFICACION.	26
OBJETIVOS.	27
HIPOTESIS.	27
Población de estudio.	27
Criterios de inclusión.	27
Definiciones operacionales.	28
Criterios de eliminación.	28
II. MATERIALES Y METODOS	28
Hoja de captación de datos	29
Metodología para la obtención de cromosomas prematuramente condensados y estimación del índice de proliferación potencial.	30
Metodología para la obtención de células binucleadas con citocalasina B.	33
Análisis estadístico.	35
III. RESULTADOS.	35
IV. DISCUSION.	42
V. CONCLUSIONES.	46
VI. REFERENCIAS.	47

ESTIMACION DE LA PROLIFERACION CELULAR EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA POR MEDIO DEL INDICE DE PROLIFERACION POTENCIAL Y CITOCALASINA B.

RESUMEN

La morfología de los cromosomas prematuramente condensados que se obtienen mediante la fusión de una célula en mitosis y una en interfase, se ha utilizado para estudiar el ciclo celular en médula ósea de pacientes leucémicos. Se ha considerado que la proporción de células en G1 tardía con respecto al total en G1 representa un índice de proliferación potencial y por lo tanto un indicador predictivo de recaída.

Recientemente se ha demostrado que el índice de proliferación potencial en médula ósea correlaciona con el evaluado en sangre periférica, sin embargo se desconoce si existe correlación entre el índice de proliferación potencial y la proporción de células que se dividen.

Las células leucémicas se caracterizan por su división acelerada, y para investigar esta capacidad proliferadora, se utilizaron muestras de sangre periférica no estimuladas con fitohemaglutinina (como agente mitogénico) de niños leucémicos y controles normales. Se realizaron las metodologías de fusión celular para obtener cromosomas prematuramente condensados y la exposición a citocalasina B que inhibe la citocinesis y produce células binucleadas como evidencia del proceso de división, con el objeto de correlacionar los patrones de los cromosomas prematuramente condensados en las diferentes fases del ciclo celular, el índice de proliferación potencial y la proporción de células binucleadas.

No se encontró diferencia estadísticamente significativa en los patrones de condensación prematura de los cromosomas y los valores de índice de proliferación potencial entre las muestras de sangre no estimuladas de los pacientes leucémicos y las de sujetos controles normales. Se observó un índice muy bajo de fusión celular e inducción de cromosomas prematuramente condensados tanto en los pacientes como en los sujetos controles, por lo que se propone la existencia de un sesgo en la selección de las células que se fusionan y condensan sus cromosomas que explique estos resultados.

En contraste, la metodología de citocalasina B identificó células binucleadas y figuras mitóticas en los cultivos no estimulados de los pacientes leucémicos y en los

cultivos con fitohemaglutinina de los controles normales, y no se detectó ninguna célula binucleada ni figura mitótica en los cultivos sin fitohemaglutinina de los controles.

En conclusión, la técnica de condensación prematura de cromosomas no fue útil para distinguir entre la sangre periférica de los pacientes leucémicos y la de los controles normales, mientras que el método con citocalasina B detectó células en proliferación en las muestras de sangre periférica de los pacientes leucémicos.

Además de detectar la presencia de células leucémicas residuales es importante conocer su capacidad proliferadora, ya que ambos datos son útiles en la predicción del momento en el que se presenten nuevamente los síntomas de la enfermedad. La estimación del número de células binucleadas con citocalasina B podría ser una opción metodológica fácil de realizar.

Por lo tanto, el análisis de células binucleadas, en combinación con otras técnicas moleculares o inmunológicas, podría utilizarse para definir la proliferación de las células positivas para marcadores genéticos de malignidad en muestras de sangre periférica y para predecir recaída en pacientes leucémicos.

ABREVIATURAS

BN	binucleada(s)
CCB	citocalasina B
CPC	cromosomas prematuramente condensados
FAB	grupo Francés-Americano-Británico
FM	figura(s) mitótica(s)
ID	índice de división
IPP	índice de proliferación potencial
LLA	leucemia linfobástica aguda
LMA	leucemia mieloide aguda
MO	médula ósea
SP	sangre periférica

I. INTRODUCCION

1. LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA.

1.1. DEFINICION.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un padecimiento que se caracteriza por la proliferación excesiva y la acumulación, en sangre periférica (SP) y médula ósea (MO), de células linfoides inmaduras (1, 2). Se considera que es una enfermedad de origen clonal, que resulta de la transformación maligna de una célula progenitora que se expande a través de divisiones celulares (1).

1.2.EPIDEMIOLOGIA.

Las estadísticas en varios países muestran intervalos amplios en la frecuencia con la que se presenta la leucemia, aunque la incidencia es de 8 a 10 casos por cada 100,000 habitantes en la población general (3).

En la infancia las leucemias representan la neoplasia más común, el Registro Nacional de Cáncer refiere que en el Distrito Federal de 819 casos de neoplasia en niños, 311 (38%) corresponden a leucemias y linfomas. De todos los casos de leucemia que se presentaron, el 80% correspondió a LLA (3).

Como puede observarse, esta entidad es la que se presenta con mayor frecuencia durante la edad pediátrica y es la que se considerará en este trabajo. A continuación se describirán algunas de sus características.

1.3.CLASIFICACION.

1.3.1.CLASIFICACION CITOMORFOLOGICA.

Desde 1976 existe una clasificación para la LLA propuesta por el grupo cooperativo Francés-Americano-Británico (FAB) que atiende a los criterios de tamaño celular,

variación citomorfológica, grado de maduración y tipo de diferenciación (1, 2). De acuerdo con ellos se distinguen 3 subgrupos:

a) L1: presenta células pequeñas con cromatina homogénea, envoltura nuclear regular, nucléolo pequeño o invisible y citoplasma escaso.

b) L2: sus células son grandes con cromatina variable, envoltura nuclear denticular, uno o más nucléolos y citoplasma moderadamente abundante.

c) L3: con células grandes y homogéneas, cromatina finamente punteada, envoltura nuclear regular, con uno a más nucléolos, citoplasma abundante, basófilo y vacuolado (1, 2).

1.3.2. CLASIFICACION INMUNOLOGICA.

Los blastos leucémicos expresan antígenos correspondientes a diferentes estados del desarrollo de las células B o T. Aproximadamente el 80% de los casos con LLA presenta células que provienen de un linaje de tipo B; de éstos, la mayoría expresan un antígeno común, CALLA, aunque también antígenos B y portan rearrreglos en los genes de las inmunoglobulinas (Igs). Alrededor del 80% de las LLA carecen de células con Igs citoplasmáticas y se designan como pre-B tempranas; el 20% restante expresa Igs en citoplasma y se denominan pre-B. Menos del 5% de los pacientes presentan células B maduras y corresponden al subtipo citomorfológico L3 (4).

Aproximadamente del 10% al 20% de los casos con LLA provienen de un linaje tipo T, el antígeno CALLA generalmente está ausente y pueden presentar rearrreglos en los genes del receptor de células T. Estas leucemias pueden subdividirse según el grado de maduración de los timocitos, con base en la expresión de los antígenos de diferenciación T (4).

También se presentan LLA que no exhiben características B ni T que se conocen como nulas (null), y por último, otras que expresan antígenos linfoides y mieloides en el mismo tipo celular denominadas híbridas que pueden ser bifenotípicas (4).

1.3.3. CLASIFICACION CITOGENETICA.

La mayoría de las LLA presentan alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales. Las leucemias cuyas células portan alteraciones numéricas se pueden

clasificar en 5 grupos basados en el número modal de cromosomas. En el cuadro 1 se muestran en relación con su inmunofenotipo y la frecuencia aproximada en que se presentan (5, 6, 7, 8).

CUADRO 1. Clasificación de las LLA según su número modal de cromosomas.

<i>Grupo</i>	<i>Inmunofenotipo</i>	<i>Frecuencia</i>
<i>hiperdiploide (>50 cromosomas)</i>	<i>pre B</i>	<i>28%</i>
<i>hiperdiploide (47-50 cromosomas)</i>	<i>pre B</i>	<i>13%</i>
<i>diploide (46 cromosomas normales)</i>	<i>T</i>	<i>9%</i>
<i>pseudodiploide (46 cromosomas con alteraciones numéricas o estructurales)</i>	<i>variable</i>	<i>38%</i>
<i>hipodiploide (<46 cromosomas)</i>	<i>T</i>	<i>7%</i>

Tomado de Pui (8).

Con respecto a las alteraciones estructurales, en el "Décimo Taller Internacional sobre el Mapa del Genoma Humano" se describieron 31 rearrreglos diferentes asociados con LLA (9). En el cuadro 2 se presentan las alteraciones más frecuentes en esta leucemia y el inmunofenotipo con el que se asocian.

CUADRO 2. Alteraciones cromosómicas asociadas a LLA.

<i>Alteración</i>	<i>Incidencia aproximada (% respecto a todas las LLA)</i>	<i>Inmunofenotipo específico</i>
<i>Linaje B</i>		
<i>t(8;14)(q24;q32)</i>	3	B
<i>t(1;19)(q23;p13)</i>	5-6	pre-B
<i>t(9;22)(q34;q11)</i>	2-5	pre-B temprana
<i>t(4;11)(q21;q23)</i>	2	pre-B temprana con componente monocítico
<i>Linaje T</i>		
<i>t(11;14)(p13;q11)</i>	1	T
<i>t(10;14)(q24;q11)</i>	1	T
<i>Linaje no específico</i>		
<i>del(6q)</i>	4-13	variable
<i>t/del(9p)</i>	7-12	
<i>t/del(11q)</i>	3-5	
<i>t/del(12p)</i>	10-12	

Tomado de Raimondi (5).

1.4. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS LEUCEMIAS.

1.4.1. CUADRO CLÍNICO.

Todas las leucemias presentan manifestaciones clínicas generales similares entre sí. Los síntomas principales son:

a) Hipermetabolismo: Los síntomas secundarios asociados a hipermetabolismo son la astenia (debilidad), anorexia (falta de apetito) y sudación. Se presentan al inicio de la enfermedad y son el primer dato de sospecha de leucemia.

b) Invasión medular: Es responsable de algunas manifestaciones como anemia, que se produce por la incapacidad de la MO para formar precursores eritroides y se manifiesta por la presencia de palidez, cansancio y taquicardia. La disminución de la granulopoyesis ocasiona infecciones locales o generalizadas acompañadas de fiebre y ulceraciones de la mucosa oral. El fracaso en la megacariopoyesis produce manifestaciones púrpuro-hemorrágicas.

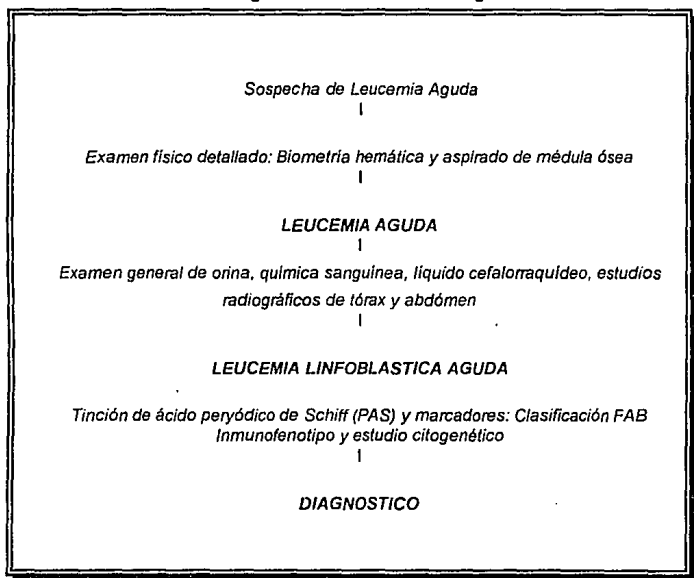
c) Invasión extramedular: Produce los signos y síntomas secundarios a la invasión de órganos y tejidos. Con frecuencia se encuentran adenomegalias cervicales, axilares o inguinales; masa mediastinal y hepatoesplenomegalia. Con menor frecuencia se presentan invasiones a sistema nervioso central, o testículos, ojos y pulmones (3, 4).

1.4.2. DIAGNÓSTICO.

Se puede sospechar de una leucemia por la presencia de anemia, procesos hemorrágicos y fiebre. En la exploración física se deben buscar datos de palidez, dolor óseo, visceromegalias y lesiones infiltrativas en amígdalas, encías y piel. El diagnóstico se establece en forma definitiva con una biometría hemática completa y con el aspirado de MO, en la que se observa la sustitución de células con hematopoyesis normal por blastos leucémicos (3, 10).

El diagnóstico diferencial se hace entre los diferentes tipos de leucemias agudas y crónicas, y con los síndromes mielodisplásicos. El tipo de padecimiento se clasifica de acuerdo con la propuesta del grupo FAB y se apoya con otras pruebas como las reacciones citoquímicas y varios exámenes de gabinete como se muestra en el cuadro 3 (3, 10, 11).

CUADRO 3. Exámenes de gabinete utilizados en el diagnóstico.



Tomado de Rivera (11).

1.4.3. PRONOSTICO.

Para la LLA se ha referido una gran variedad de factores con valor pronóstico que se correlacionan con la duración del estado de remisión y con la sobrevida de los pacientes. Estos factores incluyen: la edad, el tiempo en el que el paciente alcanza la

remisión completa, la cuenta de leucocitos en el momento del diagnóstico de la enfermedad, el inmunofenotipo de la leucemia, el cariotipo, el porcentaje de blastos que circulan en la SP, la presencia de hepatomegalia, esplenomegalia o masa mediastinal, así como la presencia de enfermedad extramedular principalmente a nivel de sistema nervioso central (7, 12, 13).

Los factores con valor pronóstico influyen en la respuesta de los individuos leucémicos al tratamiento. Por ejemplo, se ha demostrado que el incremento de la edad es un factor adverso en función de alcanzar el estado de remisión, en particular los pacientes entre 2 y 10 años de edad tienen mejor pronóstico de acuerdo a lo observado. El mismo efecto ocurre cuando los pacientes presentan en el momento del diagnóstico cuentas leucocitarias menores de $10^9/l$, en contraste con las cuentas mayores de $50^9/l$ así como la presencia de enfermedad extramedular que son datos que cursan con mal pronóstico (7,12).

En cuanto al inmunofenotipo de los blastos leucémicos, la presencia del antígeno CALLA está relacionado con buen pronóstico a diferencia de los inmunofenotipos de T y B o con características mixtas mieloides y linfoides (7, 12).

Como ya se mencionó, las alteraciones citogenéticas también son de importancia en la predicción de la evolución de estos pacientes. Las hiperdiploidías con más de 50 cromosomas están relacionadas con un pronóstico favorable, entre los hallazgos citogenéticos considerados de alto riesgo están las hipodiploidías con menos de 45 cromosomas y las siguientes translocaciones: t(9;22), t(4;11) y t(8;14) (7, 12).

Es importante recordar que la LLA se considera un desorden hematopoyético de origen genético y que la morfología e inmunofenotipo de sus células son un reflejo de estas alteraciones. Debido a esto, como se discutirá posteriormente, los tratamientos antileucémicos actúan generalmente a través de modificaciones en la síntesis y en la estructura del ácido desoxirribonucleico (ADN). Sin embargo, ninguna de estas características, morfológicas, inmunológicas o genéticas, explican completamente las diferencias en cuanto a posibilidades de curación que ofrece cada uno de los esquemas de quimioterapia (13).

1.4.4. TRATAMIENTO.

La finalidad del tratamiento es eliminar las células leucémicas, pero preservar una cantidad suficiente de células normales que permita repoblar la MO. La estrategia quimioterapéutica utilizada en el tratamiento antineoplásico se basa en la existencia de

un estado de proliferación continua en la mayoría de las células leucémicas. Cuando se aplica quimioterapia con agentes que afectan específicamente la fase S del ciclo celular no sólo se daña a las células neoplásicas, sino también a otras poblaciones proliferadoras como células hematopoyéticas normales epiteliales y foliculares. Se deben aplicar varios ciclos de quimioterapia para eliminar a las células leucémicas que se encuentren en otras fases del ciclo diferentes a S (10, 14, 15).

Durante los últimos treinta años, el tratamiento de la LLA se ha modificado adquiriendo mayor complejidad en cuanto a las combinaciones de medicamentos utilizadas. Los esquemas terapéuticos también han sido influidos por la identificación de pacientes con diversos pronósticos basados en las características anteriormente mencionadas, de tal manera que los esquemas, rutas y dosis de fármacos utilizados actualmente en los pacientes con LLA han sido producto de la experiencia acumulada durante estos años (13, 14, 15, 16).

Las etapas que incluye el tratamiento de las leucemias se describen a continuación:

a) **Inducción a la remisión:** por medio de la eliminación de las células leucémicas se induce la recuperación de la hematopoyesis normal con la mejoría del estado general del paciente. Los agentes quimioterapéuticos que se han utilizado en este período han sido: vincristina, prednisona, daunorubicina, L-asparaginasa y ciclofosfamida. La mayor parte de los esquemas terapéuticos incluyen la combinación de vincristina y prednisona, ya que se ha demostrado su gran eficacia. La administración de otros fármacos depende de la respuesta del paciente a este tratamiento inicial (10, 16).

b) **Consolidación:** en esta fase se reduce la población de células leucémicas que es potencialmente resistente al tratamiento. Se considera que las meninges representan un reservorio para los blastos leucémicos desde el inicio de la enfermedad. Por esta razón se administra terapia intracraneal con radiación y metotrexate con el fin de prevenir una recaída a sistema nervioso central (10, 16).

c) **Mantenimiento:** se continúa la quimioterapia por 2 a 3 años para eliminar células neoplásicas residuales y se espera conseguir su erradicación completa. Se realiza con

la combinación básica de 6-mercaptopurina y metotrexate, posteriormente se suspende el tratamiento y se reintroduce con vincristina, prednisona y daunomicina (10, 16).

d) Suspensión del tratamiento: después de 30 a 36 meses de remisión continua se suprime la quimioterapia, se debe verificar la ausencia de blastos en MO, líquido cefalorraquídeo y testículos. Se administra un nuevo ciclo de medicamento igual al de la inducción, a esta fase se le conoce como intensificación (10, 16).

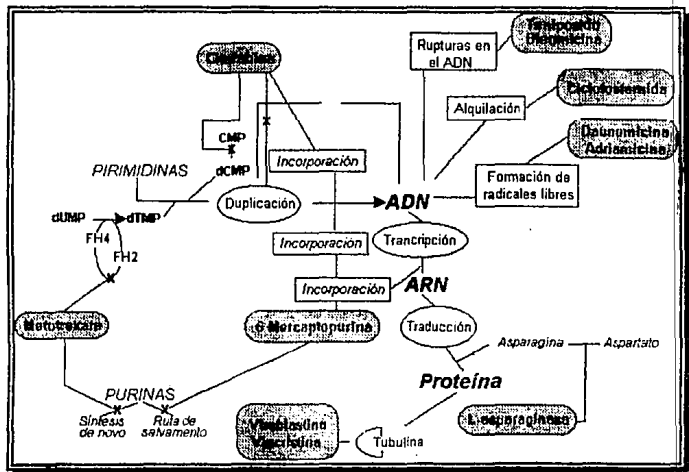
1.4.4.1. AGENTES QUIMIOTERAPEUTICOS UTILIZADOS EN LLA Y SU RELACION CON EL CICLO CELULAR.

La mayoría de las drogas antileucémicas producen su efecto citotóxico en las diversas fases del ciclo celular, principalmente en las etapas de síntesis del ADN y del ácido ribonucleico (ARN), como se muestra en la figura 1. Los antimetabólitos son análogos estructurales de moléculas intermediarias en las vías biosintéticas, actúan como sustratos falsos de las enzimas que ahí intervienen, inhiben procesos en la síntesis de ácidos nucleicos o son incorporados dentro de estas macromoléculas y dan como resultado productos defectuosos (15, 16).

Los fármacos como la ciclofosfamida, la daunomicina y el tenipósido dañan a los ácidos nucleicos al producirlos enlaces cruzados intercatenarios e intracatenarios, daño por formación de radicales libres y rupturas en la doble hélice. La vincristina y la vimblastina se unen a la tubulina dañando el sistema de microtúbulos y por tanto interfieren con el proceso de mitosis. La L-asparaginasa proporciona terapia nutricional selectiva al disminuir la concentración de L-asparagina, un aminoácido no esencial, que los blastos leucémicos no pueden sintetizar (figura 1). El efecto linfofítico producido por los corticoesteroides aún no es completamente comprendido, se presume que funciona a través de sus receptores, cuando éstos son ocupados se inducen cambios en los niveles de proteínas de ciertos tipos celulares llevándolos a la muerte (15, 16).

Con respecto al tratamiento con agentes quimioterapéuticos combinados, se pueden utilizar drogas que sincronicen poblaciones celulares para detener su proliferación, como el arabinósido de citosina que se usa junto con otros medicamentos como metotrexate, leucovorin y vincristina (17, 18).

FIGURA 1. Esquema representativo del sitio de acción de las drogas antileucémicas.



Tomado de Balis y Adamson (15,16).

2. EL CICLO CELULAR.

2.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES.

El ciclo celular se compone de varias etapas: la G1, que antecede a la duplicación del ADN que ocurre en la etapa de síntesis o S; el período G2, posterior a la duplicación y la fase M de mitosis que culmina con la división celular. De forma general, se conoce como interfase a toda la etapa previa de preparación para que se

lleve a cabo la mitosis (19, 20, 21). Cada estado de la interfase presenta un patrón específico de síntesis de moléculas. Durante la G1 se sintetizan las proteínas, carbohidratos y lípidos característicos de cada tipo celular; en la fase S, como se mencionó, se duplica el ADN y se terminan de sintetizar las proteínas histonas y no histonas de los cromosomas. Durante la G2 se sintetiza un grupo de proteínas necesarias para que la célula llegue a la mitosis (22). Existe una etapa independiente del ciclo de proliferación, la G0, que se considera una fase intermedia en la que se encuentran las células quiescentes (20)

2.1.1. FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA PROGRESIÓN DEL CICLO CELULAR.

Mediante la acción de factores de crecimiento la célula en G0 es capaz de entrar en el ciclo, el primer paso consiste en avanzar hacia la G1, para que la célula pase a través de ella con la ayuda de factores de competencia (23). Posteriormente se alcanzará la fase S por medio de factores de progresión. Existe un punto de restricción en G1 que debe ser superado, para ello se requiere de ambos tipos de factores además de condiciones nutricionales adecuadas (23). La célula prosigue hasta la etapa de duplicación del ADN y llega a la fase G2 donde la síntesis debe estar terminada al igual que la reparación del ADN. El paso hacia la mitosis se lleva a cabo mediante la activación del factor promotor de la maduración (MPF) que se compone de la proteína cinasa p34^{cdc2} y la ciclina B; su desfosforilación sirve de señal para la transición de G2 a M (23, 24).

2.2. MODIFICACIONES DE LA CROMATINA A TRAVÉS DEL CICLO CELULAR Y REPERCUSIONES EN SU REGULACION.

La cromatina de las células eucariotes requiere para su organización de cambios de tipo estructural, bioquímico y en su composición. Estos involucran modificaciones post-traduccionales de proteínas, en particular reacciones reversibles de fosforilación y desfosforilación como ya se mencionó anteriormente, las cuales cambian la estructura y función de la cromatina alterando las interacciones ADN-proteína y proteína-proteína (25, 26).

A continuación se mencionarán algunos sistemas que se relacionan con los cambios de la cromatina a través del ciclo celular y por lo tanto con su regulación; algunos de ellos requieren de modificaciones post-traduccionales para su función.

p34cdc2 cinasa.

La actividad de la cdc2 cinasa en mamíferos es requerida en dos momentos del ciclo celular: durante la fase G1, que es el punto en el que la célula se compromete a continuar hacia la fase S y en el paso de G2 a M (26).

La actividad enzimática de cdc2 cinasa está regulada por fosforilaciones y desfosforilaciones dependientes de la etapa del ciclo, así también por la formación de complejos entre la cinasa estable y las ciclinas, como es el caso del complejo MPF (p34cdc2-ciclina B) (26).

Proteína reguladora de la condensación de la cromatina (RCC1).

En el ciclo celular de eucariotes existen varios puntos de control; uno de ellos consiste en que la mitosis no puede iniciarse sin que la duplicación del ADN haya concluido. Por lo tanto debe existir algún sistema que detecte la presencia de ADN no duplicado y transmita una señal inhibitoria que detenga la activación de los factores mitóticos (27).

La proteína RCC1 participa en este proceso de regulación ya que cuando está ausente, la mitosis puede iniciar antes de que la síntesis de ADN haya terminado. RCC1 también es capaz de inhibir la condensación prematura de cromosomas y el paso hacia la mitosis, por bloqueo de la actividad de la cdc2 cinasa (26).

En cuanto a su mecanismo de acción, se ha encontrado que en células humanas está firmemente asociada con Ran que es una proteína nuclear que se une a guanina y está relacionada con la oncoproteína Ras. La proteína RCC1 activa, cataliza un intercambio de nucleótidos de guanina sobre Ran; si las moléculas de GTP están unidas a la proteína Ran, ésta se disocia del complejo RCC1. Cuando se mantiene una concentración intranuclear alta de Ran-GTP, se detiene la síntesis o la activación de un inductor de la mitosis (probablemente la cdc2 cinasa).

Una vez terminada la síntesis de ADN y a medida que la célula progresa hacia G2, disminuye la actividad de RCC1 como intercambiador de nucleótidos así como los niveles de complejo Ran-GTP a través de la interacción de una proteína activadora de la GTPasa. De esta forma RCC1 es inactivada y permite que se inicie la condensación de la cromatina y el paso de la célula a las siguientes fases del ciclo (26, 27).

Si se presenta una disminución en las concentraciones de GTP o se activa la GTPasa antes de que finalice la fase S, Ran se uniría a RCC1 y podría ocurrir el fenómeno de condensación prematura de cromosomas (26).

En cuanto a la caracterización de RCC1, se conoce que el gen que codifica para esta proteína está localizado en el cromosoma 1 humano y que la proteína consta de 421 aminoácidos. Su región carboxilo terminal muestra alta homología con otras proteínas que se asocian a la cromatina y a la región amino terminal se atribuye su capacidad de unión al ADN (27).

Histonas.

Las histonas y sus modificaciones son parte importante en el fenómeno de la condensación de cromosomas y por lo tanto en la regulación del ciclo celular. Presentan fundamentalmente tres tipos de modificaciones: fosforilaciones, acetilaciones y unión de moléculas de ubiquitina (25).

La fosforilación se lleva a cabo principalmente en la histona H1 sobre sus residuos de serina, treonina o histidina, y se produce por la acción de la cdc2 cinasa. Esta modificación es cíclica, ya que durante la fase S la H1 presenta niveles bajos de grupos fosfato que se elevan en la G2 hasta alcanzar un estado hiperfosforilado en M. La función que se le atribuye es la de inducir el empaquetamiento y la condensación de los cromosomas (22, 26).

El proceso de acetilación ocurre en las histonas H2A, H2B, H3 y H4, está asociado con la descondensación de la cromatina y por lo tanto está involucrada con los eventos de duplicación y expresión de genes. Durante las fases S y G2 las histonas se acetilan y bajan sus niveles al alcanzar la mitosis, para empaquetar nuevamente la cromatina (25).

La unión de moléculas de ubiquitina se efectúa en las histonas H2A y H2B a nivel de la lisina carboxilo terminal, se incrementa en S y G2 para disminuir en la profase y metafase y volver a elevarse en la anafase de la mitosis. Su remoción promueve el empaquetamiento de la cromatina (25).

Topoisomerasa II.

Esta molécula tiene múltiples funciones, una de ellas es la de constituir el principal componente del "andamio" (scaffold) de la cromatina. La condensación que adopta el ADN con la topoisomerasa II se considera que corresponde al nivel de compactación conocido como de asa (loop) y es dependiente del ciclo celular (21, 26).

Proteínas de alta movilidad electroforética del grupo I (HMG)-I.

Se considera que la proteína HMG-1 tiene diversas funciones, en algunos casos actúa sobre la cromatina en un papel estructural a través del ciclo celular, y en otros como una molécula involucrada en la regulación de los procesos de duplicación y transcripción. Recientemente se ha encontrado correlación entre la transformación neoplásica de células de mamífero y su potencial metastásico, con la presencia de HGM-1 (26).

La HGM-1 es un sustrato eficiente de la cdc-2 cinasa a nivel de su residuo de treonina amino-terminal. La fosforilación de esta molécula provoca que disminuya su afinidad por el ADN. Se ha propuesto un modelo en donde la histona H1 o nucleosomas intactos pueden unirse a las secuencias promotoras o potenciadoras (enhancer) de la transcripción del gen, produciendo represión en su expresión, se especula que la función de HGM-1 podría permitir la "apertura" de la cromatina y funcionar como una molécula antirepresora que compita con la inhibición causada por H1 o los nucleosomas (26).

Ensamblaje y desensamblaje de la envoltura nuclear: Participación de las láminas.

La envoltura nuclear consiste en dos membranas perforadas por complejos de poros nucleares, internamente presenta unas estructuras que semejan placas llamadas láminas las cuales están íntimamente asociadas con la cromatina. Las láminas deben ser desensambladas para que se lleve a cabo la mitosis y para ser despolimerizadas se requiere de su fosforilación, ésta es activada por la cdc-2 cinasa. De manera inversa, durante la interfase, el balance del sistema favorece la desfosforilación (26).

Por lo tanto, la asociación de membranas nucleares a cromatina durante la mitosis parece ser regulada indirectamente por la cdc-2 cinasa ya que modula el estado de fosforilación de las láminas (26).

Grupos sulfhidrilos y disulfuros de las proteínas.

Como ya se ha mencionado, se ha encontrado que las fosforilaciones reversibles de las proteínas nucleares representan uno de los procesos fundamentales en la modulación de la estructura de la cromatina durante el ciclo celular. Sin embargo, un factor que también es importante es la conversión reversible de grupos sulfhidrilos y disulfuros de las proteínas asociadas a esta estructura. La cromatina difusa tiende a presentar proteínas no histonas e histonas (H3) asociadas con grupos sulfhidrilo, en contraste con la cromatina condensada de los cromosomas metafásicos donde las proteínas presentan grupos disulfuro que forman puentes y confieren mayor estabilidad. Por lo tanto esta modificación también es dependiente del ciclo (28).

Fosforilación de los factores de duplicación y de transcripción: Inducción de cambios en la estructura fina de la cromatina a través de oncogenes y genes supresores.

La actividad biológica de algunas moléculas que participan en los procesos de duplicación y transcripción se regula por medio de fosforilaciones presumiblemente efectuadas por la cdc2 cinasa, este es el caso de la ADN polimerasa α humana y de la ARN polimerasa II del ratón (26).

La fosforilación dependiente del ciclo celular también afecta a varios productos de oncogenes así como a algunos factores de transcripción que se unen al ADN. Este tipo de regulación es un mecanismo de control rápido y reversible de la expresión de genes, particularmente cuando las señales se transmiten a través de cascadas que involucran fosforilaciones (28).

A continuación se revisarán con mayor detalle las funciones de los productos derivados de los oncogenes y de los genes supresores.

Oncogenes.

Los proto-oncogenes son genes que funcionan normalmente en las células, los cuales pueden sufrir mutaciones y dar origen a los oncogenes que se asocian con un fenotipo particular caracterizado por el crecimiento no controlado, típico de las células neoplásicas (29).

Los proto-oncogenes participan fundamentalmente en los procesos de crecimiento y diferenciación celular, generalmente se activan por mutaciones puntuales, translocaciones o amplificaciones. En general no se asocian con cáncer hereditario y su expresión es dominante (29).

Por su función, los productos de los oncogenes se han clasificado en:

Clase I: factores de crecimiento (sis)

Clase II: receptores

A: en la superficie celular, con actividad de tirosina-cinasa (trms, erb B, rev, ros)

B: intracelulares (erb A)

Clase III: proteínas de acoplamiento y mensajeros intracelulares

A: tipo proteína-tirosina cinasa (src, yes, fes, abl, mef)

B: tipo proteína-serina/tréonina cinasa (mos, raf)

C: proteínas Ras con función de unión a guanina, con actividad de GTPasa (H-ras, Kí-ras, N-ras)

D: proteínas relacionadas con fosfolipasa C (cik)

Clase IV: factores nucleares o reguladores de la transcripción (jun, fos, myc, N-myc, myb, ski) (29)

El conocimiento sobre los oncogenes y sus productos, se ha incrementado rápidamente, y a continuación se describen las funciones particulares de algunos de ellos:

ras: Se ha propuesto un modelo que sugiere que la proteína Ras (p21) activa cinasas que fosforilan factores de transcripción, que una vez modificados son capaces de inducir expresión de genes. Particularmente, activa cinasas tipo MAP que son capaces de fosforilar e importar hacia el núcleo factores de transcripción de la familia Ets. Su activación depende de la posibilidad de convertir las proteínas Ras que unen nucleótidos de guanina, de su forma inactiva GDP a su forma activa GTP (30).

myc, max, mad, mxl-1: Se conoce que el producto del gen *myc* es un activador de la transcripción que actúa en secuencias específicas a través de su unión con el factor de transcripción Max. En ausencia de Myc, que es una proteína inestable, Max puede formar un homodímero o asociarse con otros factores como Mad o Mxi-1. Se ha propuesto que estos complejos reprimen la proliferación celular e influyen en el proceso de diferenciación. En contraste, la asociación de Max con Myc promueve la división celular. Sin embargo, es interesante considerar que en cultivos de fibroblastos con bajas concentraciones de suero, y que expresan activamente a Myc, se estimula el fenómeno de la apoptosis (30).

E2A-PBX1: El oncogen producido por la fusión de *E2A* (potenciador de la transcripción) y *PBX1* (dominio homeótico de unión al ADN), es otro ejemplo de la función de crecimiento-muerte celular. El gen fusionado resulta de la translocación (1;19) presente en la LLA. Sin embargo, no sólo confiere actividad oncogénica, sino que también induce alteraciones en el desarrollo de las células linfoides y durante la fase pre-maligna, en la que se ha encontrado evidencia de apoptosis masiva (30, 31).

Genes supresores.

En contraste con la función de los oncogenes, los genes supresores normalmente intervienen en la detención del proceso de proliferación celular, y se inactivan por pérdida cromosómica, deleción, mutación puntual (29). Para ejemplificar su función se describirán algunas características de *p53* y *rb*.

p53: La proteína de este gen ha llegado a tener gran importancia por el hecho de que está ausente en una gran variedad de tumores. Entre sus funciones se ha encontrado que detiene a las células que portan daño en el ADN durante la fase G1, de tal forma que si *p53* está inactivo o ausente las células con daño podrán pasar a

través de esta fase del ciclo acumulando mutaciones, lo que favorece la inestabilidad cromosómica, y ocasionando oncogénesis (31, 32).

rb: El gen supresor *rb* regula la progresión de la célula de la fase G1 hacia S, se fosforila de S a M para ser desfosforilado en G1. La proteína RB (pRB) desfosforilada en G1 se asocia firmemente a la cromatina y conforme se acerca a la fase S va disminuyendo su afinidad. Se han identificado numerosas moléculas, entre ellas factores de transcripción, la ciclina A y la proteína c-Myc que se asocian exclusivamente a pRB no fosforilada. Por todo esto, se sugiere que pRB desfosforilada suprime la proliferación celular al unirse a factores promotores y reguladores de crecimiento, y que su fosforilación inhibe su función permitiendo el paso de la célula hacia la fase S (26, 31, 33). Otra característica que presenta, es que se inactiva frecuentemente por los productos de los virus tumorigénicos. El adenovirus transformante E1A se une a pRB en la misma región que reconocen otras proteínas que estimulan la entrada al ciclo celular (33).

2.3. CICLO CELULAR DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS.

El método tradicional para analizar la división celular se basa en la cuantificación del ADN que se sintetiza en un cultivo, midiendo la cantidad de marca radioactiva incorporada en el ADN cuando las células en división han sido expuestas a un pulso de timidina tritiada durante 6h (34).

La citometría de flujo ha proporcionado otra alternativa para este tipo de estudios, ya que permite conocer el contenido de ADN de los núcleos analizados. Si consideramos a C como el contenido haploide de ADN, 2C correspondería a las células en G0 ó G1, 4C a las células en G2 ó M, y los núcleos cuyo contenido se encuentra entre estos dos valores se ubicarían en la fase S del ciclo celular (34).

En el estudio del ciclo celular de las leucemias, la fase S tiene un significado importante ya que las células que se encuentran en esta etapa constituyen la fracción proliferadora. La evaluación de esta fracción es importante ya que puede proporcionar datos acerca del potencial de proliferación de las células y de la evolución de la enfermedad (2, 34).

Con el uso de la citometría de flujo también ha sido posible la detección y medición de la fracción de células en proliferación utilizando diversas estrategias. Entre ellas la cuantificación de la proporción de ARN, conocido como índice de ARN, mediante el

uso del fluorocromo naranja de acridina, que tñe diferencialmente las hebras dobles de color verde (ADN) y las hebras sencillas de color rojo (ARN); se asume que las células menos proliferadoras y que han entrado al proceso de diferenciación presentan un contenido de ARN menor (2, 34).

Otra alternativa para captar a las células en fase S es la estimación del porcentaje de polimerasa unida al ADN, o bien, la detección de Ki67 que es una proteína nuclear que se presenta exclusivamente en células que han entrado al ciclo y está ausente en células en G0 (2). Una proteína que también es útil en este tipo de estudios es el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), que se considera como un auxiliar de la ADN polimerasa δ . PCNA se expresa en células en G1 antes de que la síntesis de ADN inicie, por lo tanto podría preceder la aparición de Ki67 (2, 35). Un estudio realizado en leucemia aguda en el que se midió la presencia de ambas moléculas por medio de la metodología de anticuerpos monoclonales, mostró que Ki-67 permite detectar actividad proliferadora en las células leucémicas dependiendo del subtipo de la enfermedad, en contraste con PCNA que permitió evaluar la proliferación celular en cualquier tipo de leucemia (35).

El desarrollo de anticuerpos monoclonales contra bromodeoxiuridina (BrdU) ha facilitado la evaluación de la duración del ciclo celular y de la fase S particularmente en leucemia mieloide aguda (LMA) (2, 34, 36). Las células que incorporaron BrdU son las que sintetizaron ADN, este ensayo puede llevarse a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* en pacientes con leucemia mediante una infusión intravenosa de BrdU (36, 37). Utilizando este mismo método *in vivo* y con la posterior obtención de una biopsia de MO, es posible identificar los grupos de células que sintetizan ADN y a la vez evaluar su citomorfología (37).

La duración del ciclo celular de la LLA también ha sido estudiada por medio de citometría de flujo. Se refiere que el periodo de síntesis en los blastos de este tipo de leucemia es significativamente más prolongado que el de los linfocitos normales en los cuales la duración total del ciclo es de 13 a 18h. Al estudiar diferentes tejidos comprometidos en la producción de células leucémicas, se encontró que el periodo de síntesis en células de MO es de 13.5 h y en nódulos linfáticos de 12.7 h (2, 38).

Al tomar en cuenta las características citogenéticas de las leucemias, se ha encontrado que en las células hiperdiploides la fase S es más prolongada que en las diploides. Cuando las leucemias portan translocaciones, se ha observado que aquellas que presentan mayor acumulación de células en la etapa de síntesis son las de tipo B con t(8;14), en las tipo pre-B las que tienen t(1;19) y de las T aquellas con t(4;11) (2, 39, 40).

2.4. ESTIMACION DEL CICLO CELULAR POR EL METODO DE CONDENSACION PREMATURA DE CROMOSOMAS.

Quando la célula se encuentra en interfase no es posible observar la estructura cromosómica al microscopio óptico y es hasta la mitosis, en la que se lleva a cabo la condensación de la cromatina, cuando se pueden observar los cromosomas a este nivel de microscopía (41).

2.4.1. CARACTERISTICAS DE LOS CROMOSOMAS PREMATURAMENTE CONDENSADOS.

Mediante la fusión de dos células, una en metafase (inductora) y otra en interfase se puede inducir la formación de cromosomas prematuramente condensados (CPC). La cromatina difusa típica de la célula interfásica se condensa en unidades fácilmente visibles al microscopio óptico (41). Entre los métodos empleados para la fusión de las células está el que utiliza al virus Sendai y el polietilenglicol (PEG), que actualmente es muy común por su bajo costo, fácil manejo y gran efectividad (41, 42, 43, 44).

Una vez finalizada la fusión, el núcleo interfásico empieza a presentar cambios característicos independientes del estado en el que se encontraba previamente. Estos cambios incluyen la condensación de la cromatina, la disolución de la envoltura nuclear y finalmente la desaparición del nucléolo. Los resultados de la condensación cromosómica dependerán de la fase del ciclo celular en la cual se encontraba la célula interfásica en el momento de la fusión (41).

2.4.2. MORFOLOGIA DE LOS CPC.

La cromatina de los CPC en G1, así como los cromosomas en anafase, consiste en una cromátida sencilla por cromosoma lo cual implica que el genoma no ha sido duplicado. Conforme la célula se acerca a la fase S, la cromatina se observa más descondensada. De hecho, se han descrito para G1 seis estados morfológicamente diferentes (a,b,c,d,e,f), los tres últimos presentan el mayor grado de descondensación y corresponden a G1 tardía (41, 45).

Las células que se encuentran en fase S al momento de la fusión presentan CPC que aparentan pulverizaciones o bien, brechas formadas por regiones de cromátidas sencillas (zonas claras) y dobles (zonas oscuras). Al parecer es en las regiones sencillas, no condensadas, donde se lleva a cabo la duplicación del ADN (41).

Las células de la fase G2 presentan CPC semejantes a los metafásicos, excepto en que, en los primeros, los cromosomas son más largos y extendidos. Los CPC en G2 consisten en dos cromátidas alineadas, estrechamente unidas (41).

En varios experimentos realizados sobre el fenómeno de CPC, se ha encontrado que no únicamente se modifica la estructura de la cromatina, sino que también cambian algunas de las funciones de la célula interfásica fusionada. Por ejemplo, la iniciación de la síntesis de ADN es significativamente más temprana en las células en G1 que se fusionaron, este efecto podría producirse por dos situaciones alternativas: 1) que se presente desorganización en el núcleo durante la inducción de CPC y ésto facilite el acceso de las moléculas inductoras de la síntesis de ADN en la célula en G1; 2) que la célula inductora mitótica proporcione los factores de síntesis a la célula interfásica en el momento de la fusión, ya que se ha encontrado que las células mitóticas detenidas con colcemida durante períodos prolongados (18h) acumulan los factores necesarios para la iniciación de la síntesis. Otros factores que intervienen son el desensamblaje de la envoltura nuclear y la interacción de los factores citoplasmáticos con la cromatina (41).

La metodología de obtención de los CPC se ha aplicado en diversos campos de investigación básica y clínica, por ejemplo en estudios de Biología Celular particularmente en el proceso de la mitosis, en mutagénesis, en la obtención de cromosomas para realizar estudios citogenéticos en células cancerosas y también en la evaluación del ciclo celular en diversas neoplasias (22, 41, 42, 44). A continuación se menciona la experiencia que se ha tenido con esta metodología en el estudio de las leucemias.

2.4.3. APLICACIONES DE LOS CPC EN LEUCEMIA AGUDA.

Se ha utilizado la posibilidad de distinguir la fase G1 temprana de la tardía con el uso de CPC para diferenciar poblaciones celulares normales de las leucémicas (46). Hittelman y cols. utilizaron esta técnica para estimar la cinética de proliferación de ambas poblaciones y encontraron que las células normales se encuentran en la fase G1 temprana, mientras que las malignas se acumulan en la G1 tardía, por lo que

concluyeron que esta técnica puede identificar a las poblaciones celulares que son susceptibles de entrar a la fase de duplicación del ADN. A partir de estos estudios los autores formularon un índice de proliferación potencial (IPP) que corresponde a la fracción de células en G1 tardía, de todas las células en fase G1, expresada en porcentaje (45, 46, 47).

Trabajos posteriores realizados en individuos adultos con LLA y LMA revelaron que en once de catorce pacientes se pudo detectar recaída mediante la metodología de CPC, 3.5 meses antes de que aparecieran manifestaciones clínicas de la enfermedad. Con base en estos estudios se ha informado que las muestras de MO de los pacientes con leucemia aguda tienen valores de IPP entre 35 y 40%, que son tres o cuatro veces mayores que los encontrados en individuos normales que se estiman del 12 %. Los pacientes en remisión presentan valores variables que se encuentran por debajo del 35%; cuando el IPP rebasa esta cifra el individuo se encuentra en riesgo de recaer y presentar nuevamente síntomas de la enfermedad (46, 47, 48).

Por otro lado, Morse y colaboradores (49) midieron el IPP durante la evolución de la enfermedad en pacientes pediátricos y adultos, encontraron valores fluctuantes y un elevado número de IPP falsos positivos. La experiencia de estos autores ha sugerido que los valores altos de IPP de la MO de pacientes leucémicos dependen del número y tipo de célula fusionada y que pueden deberse no sólo a la proliferación de las células leucémicas, sino también a procesos de regeneración de la médula posteriores a la quimioterapia, o como una respuesta a procesos infecciosos, o bien como un efecto ante estímulos aún desconocidos. Sin embargo, la relación entre la elevación del IPP y la presencia de estos eventos durante la evolución de la enfermedad aún no se ha podido establecer debido a la dificultad para obtener muestras de MO en los diferentes momentos en los que estos procesos se presentan (49).

Recientemente, McLeod y colaboradores (50) encontraron una alta correlación entre el IPP de las células de MO y el de las células de SP en pacientes con LLA. Este hallazgo plantea la posibilidad de realizar estudios de CPC en muestras de SP con la ventaja de que la muestra se puede obtener más fácilmente y a intervalos más cortos.

De acuerdo a estos estudios el IPP representa la proporción de células potencialmente proliferadoras, sin embargo se desconoce qué porcentaje de esta población realmente alcanza la división celular a corto plazo. Para contestar esta pregunta sería útil comparar el porcentaje de células potencialmente proliferadoras (IPP) con el porcentaje de células que llegan a la división celular en el mismo tipo de muestra.

3. AGENTES BLOQUEADORES DE LA DIVISION CELULAR.

Los agentes bloqueadores de la división celular han sido útiles en la detección de células en proliferación, un ejemplo de ellos es la colcemida que se utiliza para el análisis cromosómico en metafase, así como en la estimación del índice mitótico. Sin embargo esta sustancia es tóxica para las células ya que no sobreviven largos periodos en presencia de este agente (51, 52).

Otro bloqueador de la división celular es la citocalasina B (CCB) que inhibe la función de la actina durante la citocinesis, no es tan dañina para las células y origina células binucleadas (BN) o multinucleadas como producto de la división celular (52, 53).

Si se exponen las células en cultivo a la acción de la CCB de 24 a 44h a una concentración óptima de 4µg/ml, las células que alcanzaron la mitosis durante ese lapso se observan BN. El porcentaje de células BN en relación a las células analizadas representa el porcentaje de células que se dividieron en el lapso estudiado (52, 53, 54, 55).

Este método se ha utilizado con éxito en la cuantificación de micronúcleos en células que se han dividido en estudios de mutágenos *in vitro* (52, 54, 55).

JUSTIFICACION

Existe controversia acerca de la utilidad del método de CPC y del IPP como indicador de enfermedad residual ya que se desconocen las causas por las que se eleva en pacientes con leucemia y su significado real. En este trabajo se propone investigar si el valor del IPP así como la proporción de células en la fase S del ciclo celular en SP, correlacionan con el número de células que alcanzan la división celular y con la carga tumoral en pacientes con LLA de un mismo subtipo citomorfológico e inmunofenotipo.

La aplicación de las metodologías de CPC y CCB en la misma muestra de SP permitirán conocer la capacidad proliferadora de las células leucémicas.

OBJETIVOS

- 1) Correlacionar la proporción de células en la fase S del ciclo de celular y los valores de IPP con la proporción de células que llegan a dividirse, en linfocitos de individuos con LLA en etapa activa y en individuos normales sin estimulación con fitohemaglutinina (PHA).
- 2) Correlacionar la proporción de células en la fase S del ciclo celular, el IPP y la proporción de células que se dividen con la carga tumoral (alto porcentaje de blastos e infiltración extramedular).

HIPOTESIS

- 1) La proporción de células en la fase S y los valores de IPP correlacionan con el porcentaje de células que alcanzan la división, y son significativamente más elevados en la SP de los individuos con LLA activa que en SP sin estimular con PHA de sujetos normales.
- 2) La proporción de células que se encuentra en la fase S del ciclo de proliferación, el IPP y el porcentaje de células que se dividen en SP de los pacientes con leucemia, correlacionan con la carga tumoral.

POBLACION DE ESTUDIO

- 1) Individuos en edad pediátrica sanos (controles).
- 2) Individuos en edad pediátrica con diagnóstico de LLA basado en los criterios propuestos por el FAB y en etapa activa, sin tratamiento previo, con inmunofenotipo común (pre-B, CALLA positivo).

CRITERIOS DE INCLUSION

- 1) Individuos normales.
Sujetos en edad pediátrica que acudieron a la toma de productos para una intervención quirúrgica programada, con datos hematológicos normales y sin datos de infección.
- 2) Individuos con LLA activa.
Pacientes en edad pediátrica con diagnóstico de LLA con inmunofenotipo común (pre-B, CALLA positivo), sin tratamiento previo.

DEFICIONES OPERACIONALES

Se consideró que un niño presentaba LLA cuando mostró:

a) Biometría hemática (BH) con datos de anemia, neutropenia y trombocitopenia así como sustitución de elementos celulares normales por células inmaduras y más de 10% de blastos circulantes.

b) Aspirado de MO con sustitución de elementos celulares normales por células inmaduras (blastos) $\geq 30\%$.

c) Estado general: cuadro de anemia, procesos hemorrágicos, fiebre, cefalea, astenia y anorexia.

d) Exploración física: palidez, dolor óseo, adenomegalias, visceromegalia (10).

CRITERIOS DE ELIMINACION

Se eliminó del grupo de estudio a aquéllos pacientes en los que se diagnosticó posteriormente una enfermedad diferente a la LLA.

MATERIALES Y METODOS

A cada sujeto se le tomó en una sola ocasión una muestra de SP de 5ml para realizar las metodologías de CPC y CCB.

Además, a los pacientes con LLA activa se les tomó una muestra de MO para cariotipo, utilizando parte de la muestra obtenida por aspiración para el inmunofenotipo en el momento del diagnóstico.

Se anotaron los datos del paciente en una hoja de captación de datos la cual se muestra a continuación:

HOJA DE CAPTACION DE DATOS PARA EL ESTUDIO DE IPP Y CCB EN
PACIENTES CON LLA

Nombre _____ Registro _____
Dirección _____ Teléfono _____
Diagnóstico _____ Inmunofenotipo _____
Edad al diagnóstico _____ Sexo _____
Fecha _____ Otros _____

OBSERVACIONES

Estado actual _____
Número de células en las fases del ciclo celular:
G1 temprana _____
G1 tardía _____
S _____
G2 _____
IPP _____
BN _____
FM _____
Cariotipo _____
Biometría hemática
Hemoglobina _____
Reticulocitos _____
Leucocitos _____
Neutrófilos _____
Linfocitos _____
Blastos _____
Plaquetas _____
Médula ósea
Formas jóvenes _____
Formas maduras _____
Linfocitos _____
Blastos _____
Promielocitos _____
Megacariocitos _____
Celularidad _____
Transfusiones _____

METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE CPC Y ESTIMACION DEL IPP

El estudio de CPC consistió en la determinación de la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular y en la estimación del IPP. Consta de los siguientes pasos:

1) Preparación de las células inductoras mitóticas.

Las células de ovario de hamster chino de la línea E36 (CHO) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado al 20% con suero fetal de ternera (SFT) (Hyclone), L-glutamina (Gibco) y antibióticos (penicilina-estreptomicina) (Gibco). Se mantuvieron como cultivos en monocapa en botellas de 80cm². Los subcultivos se pusieron en presencia de BrdU (Sigma) a una concentración final de 10µg/ml, a 37°C en una incubadora con una atmósfera de CO₂ durante 24-48h, dependiendo del momento en que alcanzaron la fase de crecimiento logarítmico. Posteriormente se lavaron en solución de Hank (Gibco) o con medio de cultivo. Se agregaron 6ml de medio de cultivo fresco con BrdU y colcemida (Gibco) a una concentración final de 10µg/ml. Las células se incubaron durante 24h con el fin de obtener el mayor número de mitosis, finalmente se agitaron y transfirieron a un tubo de centrifuga de plástico.

2) Preparación de las células de SP.

A partir de 5ml de las muestras de SP heparinizadas, se separaron las células mononucleares mediante un gradiente de Ficoll-Hypaque (Nycomed). Se tomó la interfase y se resuspendió en un volúmen igual de medio RPMI 1640. Se lavó dos veces con el mismo tipo de medio (56).

3) Procedimiento de fusión celular.

En un tubo de centrifuga de 10ml se mezclaron las células CHO y las mononucleares en una proporción de 1:3. Se centrifugaron 5min a 2000rpm, se retiró el sobrenadante y se agregó 1ml de una solución al 5.0% de PEG 1500 (Sigma) diluido

en solución de Hank, durante 1min se agitó suave y constantemente. En los siguientes 3min, se agregaron gota a gota 3ml de solución de Hank resuspendiendo las células después de cada gota para diluir el PEG. La suspensión celular se centrifugó a 2000rpm por 3min, se retiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 0.5ml de medio RPMI 1640 con 20% de SFT y 1% de colcemida para prolongar el estado de mitosis. El tubo se cerró e incubó a 37°C durante 1h (42, 43).

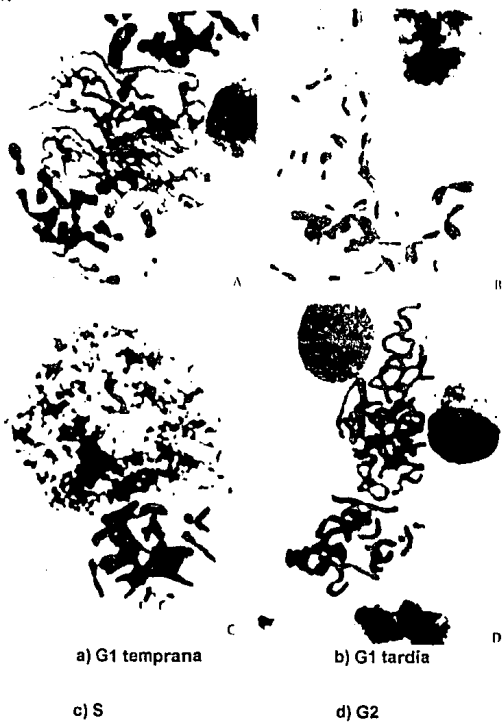
A las células fusionadas de les agregaron 10ml de solución hipotónica de KCl (0.075M) a 37°C durante 13min. Las células se fijaron en metanol-ácido acético (Merck) (3:1) (líquido de Carnoy) y se lavaron dos veces en éste. Las preparaciones se hicieron por goteo sobre un portaobjetos y se fijaron a la flama. Posteriormente se tiñeron de acuerdo con la técnica de fluorescencia más Giemsa con objeto de distinguir a las células inductoras mediante sus cromosomas diferenciados por efecto de la incorporación de BrdU (57).

Para cada caso se trataron de analizar 50 células con CPC para determinar cuántas se encontraban en las fases G1 temprana, G1 tardía, S y G2. Se consideraron las fusiones entre células humanas y de hámster, se diferenciaron por presentar un grupo de cromosomas uniformemente teñido, provenientes de la célula humana, y otro grupo de cromosomas teñido diferencialmente debido a la incorporación de BrdU, que correspondía a las de hámster. La proporción de células en G1 tardía con respecto a las células que se encontraron en la fase G1 completa representó el IPP y se expresó en porcentaje ($G1\text{ tardía}/G1\text{ total}\times 100=\text{IPP}$).

La morfología de los CPC refleja la fase del ciclo en que se encuentra la célula interfásica en el momento de la fusión (41).

La cromatina de los CPC en G1, así como los cromosomas en anafase, consiste en una cromátida sencilla, por cromosoma, con estructura ininterrumpida. Conforme la célula se acerca más a la fase S la cromatina se observa más descondensada, de hecho, se han descrito para G1 seis estados morfológicamente diferentes (a,b,c,d,e,f), los tres últimos presentan el mayor grado de descondensación y corresponden a G1 tardía (41, 45). Las células en fase S aparentan pulverizaciones o bien, brechas formadas por regiones de cromátidas sencillas (zonas claras) y dobles (zonas oscuras) (41). Las células que se encuentran en la fase G2 presentan CPC semejantes a los metafásicos, excepto en que, en los primeros, los cromosomas son más largos, extendidos y con dos cromátidas alineadas, estrechamente unidas (41). En la figura 2 se muestran imágenes de los CPC en diferentes fases del ciclo celular.

FIGURA 2. Cromosomas prematuramente condensados en diferentes fases del ciclo celular.



METODOLOGIA PARA LA OBTENCION DE CELULAS BN CON CCB

La metodología de obtención de células BN con CCB consistió en la determinación del porcentaje en que éstas se presentan en 2000 células de un cultivo (estimulado o no con PHA) expuesto a este agente, como se describe a continuación:

1) Procedimiento de CCB para la obtención de células BN.

Se sembraron 0.5ml de SP en 5ml de medio RPMi 1640 suplementado, como se describió anteriormente, se agregaron 0.2ml de CCB (Sigma) a una concentración de 4µg/ml, a las 24h de cultivo, en el caso de los individuos leucémicos y de los normales sin PHA. En los cultivos de individuos normales que se sembraron con PHA (Gibco), ésta se agregó desde el inicio y 24h después se expusieron a CCB para permitir que las células se estimularan con el mitógeno. En todos los casos los cultivos estuvieron expuestos a CCB durante 48h después de las cuales se obtuvo el paquete celular, se fijó con líquido de Carnoy y se prepararon las laminillas para su observación al microscopio. Las preparaciones se tiñeron con el sistema de colorantes May Grünwald-Giemsa (Sigma-Merck) (52, 53).

Se analizaron 2000 células y se contaron aquéllas que fueron BN o multinucleadas, así como las que presentaron figuras mitóticas (FM). Los criterios que se tomaron en cuenta para establecer que una célula es BN (figura 3) son:

- a) Presencia de citoplasma íntegro.
- b) Presencia de dos núcleos completamente separados entre sí.

Se formuló un índice de División que considera la suma de las células BN y de las FM con respecto al total de células analizadas (2000) expresado en porcentaje.

En ambos estudios una persona ajena codificó las laminillas, de tal manera que el análisis se realizó en ciego.

FIGURA 3. Célula binucleada.



ANALISIS ESTADISTICO

La proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular y los valores del IPP entre los cultivos de los pacientes y los de los controles se compararon mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Para la correlación entre el IPP y el porcentaje de división celular se calculó el coeficiente de correlación simple de Spearman (58).

RESULTADOS

Resultados obtenidos con la metodología de CPC.

Se estudiaron cinco niños normales y nueve leucémicos. Las características de los análisis de laboratorio de los pacientes leucémicos en el momento del diagnóstico como: cariotipo, hemoglobina, leucocitos, neutrófilos, linfocitos, blastos y plaquetas se muestran en el cuadro 4. El número y la proporción de células que se encontraron en las diferentes fases del ciclo, así como los valores de IPP se muestran en los cuadros 5 y 6. El número de células fusionadas por individuo fue entre 10 y 119, únicamente en dos de los pacientes con leucemia se encontraron más de 50 células para el análisis de CPC.

La proporción de células en las fases G1 tardía y S fue variable tanto en los pacientes como en los controles. En la fase G1 temprana se registró menor número de células y la fase G2 del ciclo celular fue la menos representada en ambos grupos.

Los valores del IPP en los individuos leucémicos variaron desde 42 hasta 100% y en los sujetos normales desde 9 hasta 83%. Estos porcentajes fueron mayores de 35% en todos los pacientes leucémicos y en cuatro de los cinco sujetos normales.

Al comparar, en número y proporción, las células en fase G1 tardía, en S y los valores del IPP de las muestras de los pacientes y de los controles mediante la prueba de U de Mann-Whitney, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) (58).

CUADRO 4. Datos de laboratorio de los pacientes leucémicos en el momento del diagnóstico.

<i>Individuos</i>	<i>Dx</i>	<i>Cariotipo</i>	<i>Hb g/dl</i>	<i>Leucocitos /mm³</i>	<i>NT /mm³</i>	<i>Linfocitos%</i>	<i>Blastos%</i>	<i>Plaquetas /mm³</i>
L1	L2	--	5.1	34000	0	91	6	25000
L2	L1	inv(11)	5.8	15600	4386	46	23	10000
L3	L1	46,xy	7.4	15100	2150	67	15	250000
L4	L1	46,xy	11.0	3000	360	86	0	250000
L5	L1	46/48-56	2.6	2900	290	34	1	10000
L6	L1	--	9.8	6400	1920	42	20	10000
L7	L1-L2	t(13;14)	4.1	6400	384	94	0	160000
L8	L1	46,xx	1.3	3800	152	69	15	300000
L9	L1	46/51	4.5	15700	0	20	75	10000
Valores de referencia			14.6 a 16.4	4000 a 11000	1800 a 7000	22 a 40	—	150000 a 450000

Dx= Diagnóstico Hb= hemoglobina NT= Neutrófilos
Valores de referencia tomados de Carrasco (59).

CUADRO 6. Patrones de CPC en muestras de sangre periférica no estimuladas de pacientes leucémicos e individuos normales expresados en proporciones.

<i>Ind</i>	<i>G1te</i>	<i>G1ta</i>	<i>S</i>	<i>G2</i>	<i>IPP</i>
<i>Pacientes leucémicos</i>					
L1	0.10	0.27	0.63	0.00	0.75
L2	0.00	0.50	0.50	0.00	1.00
L3	0.15	0.41	0.44	0.00	0.74
L4	0.34	0.24	0.24	0.17	0.42
L5	0.14	0.43	0.33	0.10	0.75
L6	0.12	0.32	0.48	0.08	0.73
L7	0.05	0.45	0.49	0.00	0.89
L8	0.26	0.45	0.25	0.00	0.64
L9	0.01	0.37	0.62	0.00	0.98
<i>Individuos normales</i>					
N1	0.55	0.06	0.22	0.17	0.09
N2	0.13	0.39	0.48	0.00	0.75
N3	0.37	0.23	0.23	0.17	0.39
N4	0.24	0.41	0.32	0.03	0.64
N5	0.07	0.33	0.60	0.00	0.83
		U=12*	U=14*		U=19*

*Valores obtenidos al comparar las fases S, G1ta y el IPP de los controles y los pacientes leucémicos con la prueba de U de Mann-Whitney, que resultó ser no significativa ($p > 0.05$).

CPC= cromosomas prematuramente condensados

Ind= individuos G1te= G1 temprana

G1ta= G1 tardía S= síntesis de ADN

Resultados obtenidos con la metodología de células BN con CCB.

La técnica de células BN obtenidas mediante CCB se realizó en los cultivos de linfocitos sin PHA de 11 pacientes leucémicos y de diez sujetos controles y en los cultivos con PHA de cuatro sujetos controles. El número de células BN y de FM en 2000 células analizadas fue de cero en los cultivos de los sujetos normales sin estimulación con PHA, mientras que en los cultivos de los individuos normales estimulados con este mitógeno, se observaron entre 8 y 33 células BN y entre 5 y 151 FM. Todos los cultivos de los pacientes leucémicos mostraron proporciones variables de células BN que fueron desde 4 hasta 88 en 2000 células analizadas, y en cuatro casos se observaron entre 2 y 16 FM.

Se calculó el índice de división (ID) que es el porcentaje de células BN y FM. En los cultivos de los individuos normales sin estimulación con PHA el ID fue de cero; cuando se estimularon el ID varió de 1.9 hasta 6.65 y en los pacientes leucémicos sin estimular se encontró entre 0.35 y 4.4. Estos datos se muestran en el cuadro 7.

No se encontró correlación entre las siguientes combinaciones: ID y fase S, número de blastos e IPP, ID e IPP (cuadro 8), ni entre el ID y el número de blastos (cuadro 9) con la prueba de correlación simple de Spearman, ya que en todos los casos la r fue menor de 0.2 (58). En ambos cuadros se muestran los valores de ID en orden ascendente.

CUADRO 7. Células binucleadas, figuras mitóticas e índice de división en 2000 células sanguíneas de niños leucémicos e individuos normales.

<i>Pacientes leucémicos -PHA</i>				<i>Individuos normales +PHA</i>			
<i>Ind</i>	<i>BN</i>	<i>FM</i>	<i>ID%</i>	<i>Ind</i>	<i>BN</i>	<i>FM</i>	<i>ID%</i>
L1	4	3	0.35	N4	33	5	1.90
L2	5	3	0.40	N5	14	129	7.15
L3	15	0	0.75	N6	13	151	8.20
L4	8	0	0.40	N7	8	125	6.65
L5	15	0	0.75				
L6	88	0	4.40				
L7	12	0	0.60				
L8	11	0	0.55				
L9	10	0	0.50				
L10	9	16	1.25				
L11	6	2	0.40				

No se encontraron BN ni FM en 2000 células analizadas en cada uno de los cultivos de 10 sujetos normales sin estimulación mitogénica con PHA.

Ind= Individuos

BN= células binucleadas

FM= figuras mitóticas

ID= Índice de división

CUADRO 8. Valores del Índice de división y del Índice de proliferación potencial de los pacientes leucémicos.

<i>Individuos</i>	<i>ID%</i>	<i>IPP %</i>
L1	0.35	75
L2	0.40	42
L4	0.40	100
L9	0.50	98
L8	0.55	61
L7	0.60	89
L3	0.75	74
L5	0.75	75
L6	4.40	73

ID= Índice de división IPP= Índice de proliferación potencial

CUADRO 9. Valores del Índice de división y porcentajes de blastos y linfocitos de los pacientes leucémicos.

<i>Individuos</i>	<i>ID %</i>	<i>Linfocitos %</i>	<i>Blastos %</i>
L1	0.35	91	6
L2	0.40	52	23
L4	0.40	86	0
L9	0.50	20	75
L8	0.55	69	15
L7	0.60	94	0
L3	0.75	67	15
L5	0.75	34	11
L6	4.40	68	5

ID= Índice de división

DISCUSION

Fases del ciclo celular e índice de proliferación potencial estimados mediante condensación prematura de cromosomas.

De acuerdo con estos resultados, el método de CPC en las muestras de SP no mostró diferencias entre los pacientes leucémicos y los controles normales al comparar la proporción de células en las diferentes fases del ciclo celular y el valor del IPP. De hecho, el IPP fue mayor a 35% en ambos grupos a excepción de un individuo normal. Por el contrario, Hittelman y Rao (45) observaron una clara diferencia en los valores del IPP entre la SP de los pacientes leucémicos y la de los individuos normales. Por ello, en este estudio, era de esperarse que los sujetos normales mostraran una alta proporción de células en G1 temprana y un IPP bajo.

Los trabajos posteriores de Hittelman y cols. (47, 48) en pacientes con leucemia, se realizaron en muestras de MO y apoyaron la hipótesis de que la técnica de CPC y el valor del IPP eran útiles como indicador temprano de recaída. Sin embargo, en un estudio realizado por Morse y cols. en un grupo de pacientes en remisión y fuera de tratamiento, se encontraron valores de IPP en muestras de MO fluctuantes y falsos positivos ya que a pesar de presentar altas proporciones de células en G1 tardía los individuos de ambos grupos no recayeron y mantuvieron períodos de remisión continua completa. En este estudio también se observó que el IPP tuvo valor predictivo de recaída únicamente en los pacientes con LLA que habían presentado recaídas previas, o bien, en los que se diagnosticaron con LMA (49).

En 1989, McLeod y cols. (50) demostraron una alta correlación entre los valores del IPP en muestras de MO y de SP, independiente del estadio de la enfermedad. El IPP en ambas muestras estaba elevado en el momento del diagnóstico y durante la recaída y bajo durante la remisión. Estos autores también registraron las proporciones de células presentes en las fases S y G2 del ciclo celular, sin embargo para estas etapas no encontraron correlación ya que en la mayoría de los casos la MO presentó para ambas fases una mayor proporción de células con respecto a la SP.

El procedimiento de CPC en SP facilita la obtención de las muestras y permitió realizar el presente estudio. Como ya se mencionó, los resultados mostraron que la proporción de células en diferentes fases del ciclo de proliferación y los valores del IPP fueron similares en pacientes leucémicos e individuos normales. Un factor que pudo

haber influido en estos resultados fue la dificultad para determinar la fase en la cual se encuentran las células, ya que se pueden confundir morfológicamente algunas de las fases, principalmente la G1 tardía y la fase S. De hecho, actualmente se sugiere realizar la metodología de hibridación in situ con fluorescencia para facilitar, mediante el análisis de las marcas fluorescentes, la identificación de la fase del ciclo de los CPC (60). Además durante el estudio se observó un índice muy bajo de éxitos en las fusiones celulares y de inducción de CPC tanto en las muestras de los pacientes como en las de los controles. Estas dificultades metodológicas ponen en duda la validez de los resultados y hacen suponer que pudo haber existido un sesgo hacia una pequeña población de células con características particulares, independientes del estado de leucemia o normalidad.

Células Binucleadas obtenidas con Citocinasina B.

Puesto que se ha propuesto que las células detenidas en G1 tardía representan una población potencialmente proliferadora, uno de los objetivos fue correlacionar los valores del IPP con la evidencia de división celular en la misma muestra de sangre. Esta estimación puede obtenerse mediante el uso de un bloqueador de la división celular como la colcemida que se utiliza para el análisis cromosómico en metafase. Sin embargo esta sustancia es tóxica para las células que no sobreviven largos períodos en presencia de este agente (51). La CCB, a diferencia de la colcemida, es menos tóxica para las células y permite su exposición a períodos más prolongados (51). Además se ha comprobado a través de los estudios citogenéticos realizados en SP de pacientes leucémicos sin estimulación mitogénica, que la colchicina y la colcemida no son capaces de captar a las células en mitosis en todos los casos, ya que la tasa de proliferación en esta enfermedad es variable (20).

Como se mencionó anteriormente, la CCB inhibe la citocinesis y origina células BN, como producto de la división celular (52, 53, 54, 55). La identificación de células BN después de la exposición a la CCB durante 48h permite calcular la proporción de células que se dividieron durante ese período.

Los resultados obtenidos con esta metodología no mostraron correlación entre los valores del IPP y la presencia de células en división ya que, con valores similares del IPP, los cultivos no estimulados con PHA de los pacientes leucémicos mostraron tanto células BN como FM mientras que en los cultivos no estimulados de los sujetos normales no se encontraron ni BN ni FM. Por lo tanto, estos datos no apoyan la

hipótesis de que las células en G1 tardía representen una población celular potencialmente proliferadora, por lo menos en un corto tiempo.

Con respecto a la estimación de las fases del ciclo de proliferación por medio de otras metodologías como la citometría de flujo, realizada en células de LLA, varios autores han referido que la mayoría se encuentra en fase S y no en G1 tardía como lo muestran los resultados con CPC (2, 39, 61).

Por otro lado, en este trabajo la prueba de CCB detectó proporciones variables de células proliferantes en todos los cultivos sin PHA de los pacientes leucémicos y no detectó ninguna BN o FM en los cultivos sin PHA de los controles. Los valores de ID de los pacientes leucémicos comparados con el total de linfocitos y blastos presentes en las muestras de SP no mostraron correlación, este hecho podría deberse a que se comparan eventos que ocurren en diferentes condiciones, uno de ellos *in vitro* y evaluado con un agente químico (la obtención de células BN con CCB) y el otro *in vivo* (la proliferación de linfocitos y blastos).

De estos resultados se concluye que la técnica de CPC resultó ser un método con alto índice de fallas, muy laborioso que no permitió distinguir las muestras de SP de los pacientes leucémicos de los controles normales, mientras que la prueba de CCB, más precisa y sencilla, detecta poblaciones celulares proliferantes en pacientes leucémicos.

En la actualidad, la detección de enfermedad mínima residual y la predicción de recaída siguen siendo un grave problema en los pacientes leucémicos. La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) permite la búsqueda de células que portan regiones rearrregladas de genes relacionados con el cáncer y la detección de aneuploidías de células residuales leucémicas; por otro lado se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que facilita la identificación de mutaciones en los genes responsables de la tumorigénesis y de la resistencia a las drogas. Estas metodologías son útiles y sensibles en la búsqueda de células neoplásicas, pero no reflejan el estado funcional de la leucemia residual (62, 63, 64).

Además de detectar la presencia de células leucémicas residuales es importante conocer su capacidad proliferadora ya que ambos datos son útiles en la predicción del momento en el que se presenten nuevamente los síntomas de la enfermedad. Se han propuesto algunas metodologías con el fin de captar células en división, como son los ensayos de formación de colonias o la separación específica de células que se encuentren en fase S, sin embargo estas técnicas resultan complicadas. Los ensayos de formación de colonias requieren el establecimiento de las colonias celulares en cultivo y el mantenimiento de éstas hasta después de varios subcultivos para que finalmente puedan ser evaluadas citomorfológicamente y utilizadas para la detección

de marcadores moleculares. Por otro lado, la metodología de separación de células en la fase S requeriría para su realización de un equipo especial de citometría de flujo (63, 65). Recientemente se ha referido que si con la metodología de FISH se obtiene una señal completamente nítida, es posible determinar el estado del ciclo proliferación en células en interfase según la morfología de la señal (G1: única y puntual, S: barrida, G2: bipartida) (60).

Los resultados de este trabajo sugieren que la estimación del número de células BN con CCB podría ser una opción más que ofrece una metodología fácil de realizar. Por lo tanto, el análisis de BN, en combinación con otras técnicas moleculares o inmunológicas, podría utilizarse para definir el potencial de proliferación de las células positivas para marcadores genéticos de malignidad en muestras de SP y para predecir recaída en pacientes leucémicos.

-- CONCLUSIONES.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio mostraron que la técnica de CPC resultó ser un método con alto índice de fallas, muy laborioso, que no permitió discriminar entre las células normales sin estimulación y las leucémicas. En contraste, la prueba de CCB, más precisa y sencilla, detectó poblaciones celulares proliferantes únicamente en los pacientes leucémicos.

El análisis de BN, en combinación con otras técnicas moleculares o inmunológicas, podría utilizarse para definir el potencial de proliferación de las células positivas para marcadores genéticos de malignidad en muestras de SP y para predecir recaída en pacientes leucémicos.

REFERENCIAS

- 1) Poplack D. y Reaman G.: Acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Pediatr Clin North Am* 1988; 35: 903-911.
- 2) Andreeff M.: Biological characterization and therapy monitoring of leukemia. En: *Flow cytometry in Hematology*. Laerum O. y Bjerknes R. (Eds.), Academic Press, Londres. 1992; pp: 231-266.
- 3) Sales V.: Leucemia no linfoblástica. *Medicine* 1985; 2: 501-511.
- 4) Champlin R. y Gale R: Acute lymphoblastic leukemia: Recent advances in biology and therapy. *Blood* 1989; 73: 2051-2066.
- 5) Raimondi S.C.: Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Blood* 1993; 81: 2237-2251.
- 6) Heerema N.A.: Cytogenetic abnormalities and molecular markers of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 795-810.
- 7) Rivera G., Raimondi S.C., Hancock M.L., Behm F.G., Pui Ch., Abromowitch M., Miro J., Ochs J.S., Look A.T., Williams D.L., Murphy S.B., Dahl G.V., Kalwinsky D.K., Evans W.E., Kun L.E., Simone J.V. y Crist W.M.: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy. *The Lancet* 1991; 337: 61-66.
- 8) Pui Ch., Crist W.M. y Look T: Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1990; 76: 1449-1463.
- 9) Heim S. y Mitelman F.: Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* 1992; 70: 1701-1709.
- 10) Bernácer M., Sánchez J., Vecilla C. y Lillo M.: Leucemias agudas linfoblásticas. *Medicine* 1985; 2: 502-511.
- 11) Rivera R. y Martínez G.: *Protocolos de quimioterapia en Hemato-Oncología Pediátrica*. Ed. Farmitalia Carlo Erba S.A. de C.V. México. 1987; pp: 13-15.
- 12) Hoelzer D.: Therapy of the newly diagnosed adult with acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1993; 7: 139-160.
- 13) Pinkel D.: Lessons from 20 years of curative therapy of childhood acute leukemia. *Br J Cancer* 1992; 65: 197-200.
- 14) Pinkel D.: Curing children of leukemia. *Cancer* 1987; 59: 1663-1691.

- 15) Balis F.M., Holcenberg J.S. y Poplack D.G.: General principles of chemotherapy. En: Principles and practice of pediatric oncology. Pizzo P. y Poplack D. (Eds.), J.B. Lippincott Company, Filadelfia. 1989; pp: 165-205.
- 16) Adamson P.C., Poplack D.G. y Balis F.M.: Pharmacology and drug resistance in childhood lymphoblastic leukemia. Hematol Oncol Clin North Am 1990; 4: 871-894.
- 17) Rashid A. y Al-Rashid M.O.: Pediatric cancer chemotherapy. Medical Examination Publishing Co., Inc., Nueva York. 1979; pp: 62-73.
- 18) Schertz G.L. y Marsh J.C.: Applications of cell kinetic techniques to human malignancies. En: Cancer 5. A comprehensive treatise: Chemotherapy. Becker F.F. (Eds.), Plenum Press, Nueva York. 1977; pp: 41-43.
- 19) Hartwell L.H. y Weinert T.A.: Checkpoints: Control that ensure the order of cell cycle events. Science 1989; 246: 629-634.
- 20) Pardee A.B.: G1 events and regulation of cell proliferation. Science 1989 246: 603-608.
- 21) Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Watson J.D.: Cell growth and division. En: Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing Inc., Nueva York. 1983; pp: 611-668.
- 22) Wolff S.: Molecular and cellular biology. Wadsworth Publishing Company, California. 1993; pp: 910-950.
- 23) Aaronson S.A.: Growth factors and cancer. Science 1991; 254: 1146-1152.
- 24) Jacobs T.A.: Control of the cell cycle. Develop Biol 1992; 153: 1-5.
- 25) Bradbury E.M.: Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. BioEssays 1992; 14: 9-16.
- 26) Reeves R.: Chromatin changes during the cell cycle. Curr Op Cell Biol 1992; 4: 413-423.
- 27) Dasso M.: RCC1 in the cell cycle: the regulator of chromosome condensation takes on new roles. TIBS 1993; 18: 96-101.
- 28) Sumner A.T.: The role of proteins sulphhydryls and disulphides in chromosome structure and condensation. Kew Chromosome Conference II. George Allen & Unwin, Nueva York. 1983; pp: 1-9.
- 29) Darnell J., Lodish H. y Baltimore D.: Molecular cell biology. Scientific American Books, Nueva York. 1990; pp: 984-992.
- 30) Harrington E.A., Fanidi A. y Evan G.I.: Oncogenes and cell death. Curr Op Cell Biol 1994; 4: 120-129.

- 31) Lafrancone L, Pelicci G. y Pelicci P.G.: Cancer genetics. *Curr Op Cell Biol* 1994; 4: 109-119.
- 32) Oliner J.D.: Discerning the function of p53 by examining its molecular interactions. *BioEssays* 1993; 15: 703-707.
- 33) Weinberg R.A.: Tumor suppressor genes. *Science* 1991 254: 1138-1146.
- 34) Longobardi A.: Cells from within: DNA and Molecular Biology. En: *Flow cytometry. First principles*. Longobardi (Ed.) Wiley-Liss, Nueva York. 1993; pp:103-133.
- 35) Ito M., Tsurusawa M., Zha Z., Kawai S., Takasaki Y. y Fujimoto T.: Cell proliferation in childhood acute leukemia. *Cancer* 1992; 69: 2176-2182.
- 36) Raza A., Preisler H.D., Day R., Yasin Z., White M., Lykins J., Kukla C., Barcos M., Bennett J., Browman G., Goldberg J., Grunwald H., Larson R., Vardiman J. y Vogler R.: Direct relationship between remission duration in acute myeloid leukemia and cell cycle kinetics: A leukemia intergroup study. *Blood* 1990; 76: 2191-2197.
- 37) Raza A., Yousuf N., Abbas A., Umerani A., Mehdi A., Bolthari J., Sheikh Y., Qadir K., Freeman J., Masterson M., Miller M.A., Lampkin B., Browman G., Bennett J., Goldberg J., Grunwald H., Larson R., Vogler R. y Preisler H.: High expression of transforming growth factor- β long cell cycle times and a unique clustering of S-phase cells in patients with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1992; 79: 1037-1048.
- 38) Salamanca F.: Los cromosomas y la división celular. En: *Citogenética humana*. Salamanca (Ed.) Editorial Panamericana, México. 1990; pp: 27-28.
- 39) Williams D., Look T., Melvin S.L., Roberson P.K., Dahl G., Flake T. y Stass S.: New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 1984; 36: 101-116.
- 40) Look T., Roberson P. K., Williams D.L., Rivera G., Bowman W.P., Pui Ch., Ochs J., Abramowitch M., Kalwinsky D., Dahl G.V., George S. y Murphy S.B.: Prognostic importance of blast cell DNA content in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1985; 65: 1079-1086.
- 41) Rao P.; The phenomenon of premature chromosome condensation. En: *Premature chromosome condensation. Application in basic, clinical and mutation research*. Rao, P., Johnson, R., Sperling, K. (Eds.) Academic Press, Nueva York. 1982; pp: 2-37.
- 42) Pantelias G.E. y Maillie H.D.: The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat Res* 1984; 99: 140-150.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 43) Morse H. Odom L., Castro R., Hays T., Blake M., Vannais D. y Robinson A.: Methodology of premature chromosome condensation and its potential for relapse prediction in acute leukemia of children and adolescents. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 27: 51-61.
- 44) Herrera L.A. y Ostrosky-Wegman P.: La condensación cromosómica prematura (PCC). Una nueva herramienta en la investigación básica y clínica. *LAB-acta* 1991; 3: 37-42.
- 45) Hittelman W.N. y Rao P.N.: Premature chromosome condensation: Conformational changes of chromatin associated with phytohemagglutinin stimulation of peripheral lymphocytes. *Exp Cell Res* 1976; 100: 219-222.
- 46) Hittelman W.N., Broussard L.C. y McCredie K.: Premature chromosome condensation studies in human leukemia.I. Pretreatment characteristics. *Blood* 1979; 54: 1001-1014.
- 47) Hittelman W.N., Broussard L.C., Dosik G. y McCredie B.: Predicting relapse of human leukemia by means of premature chromosome condensation. *N Engl J Med* 1980; 303: 179-184.
- 48) Hittelman W.N., Menegaz S.D., McCredie K.B., Keating M.J.: Premature chromosome condensation studies in human leukemia: 5. Prediction of early relapse. *Blood* 1984; 64: 1067-1073.
- 49) Morse H. Odom L., Castro R., Hays T., Blake M., Vannais D. y Robinson A.: Premature chromosome condensation as a predictive indicator of relapse in children and adolescents with acute leukemia: Initial observations. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 4: 63-72.
- 50) McLeod R., Hill F., Creasy M. y Hulten.: Premature chromosome condensation in childhood acute lymphoblastic leukemia: Correlation of proliferative potential index in blood and marrow. *Genes Chrom Canc* 1989; 1: 135-148.
- 51) Sasaki M.S. y Norman A.: Proliferation of human lymphocytes in culture. *Nature (London)* 1966; 210: 912-914.
- 52) Norman A., Mitchell J.C. e Iwamoto K.S.: A sensitive assay for 6-thioguanine-resistant lymphocytes by benzene metabolites. *Mutat Res* 1988; 208: 17-19.
- 53) Channarayappa J.N. y Ong T.: Micronuclei assay in cytokinesis-blocked binucleated and conventional mononucleated methods in human peripheral lymphocytes. *Terat Carc Mut* 1990; 10: 273-279.
- 54) Yager J.W., Eastmond D.A., Robertson M.L., Paradisin W.M. y Smith M.T.: Characterization of micronuclei induced in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Res.* 1990; 50: 393-399.

- 55) Fenech M.: The cytokinesis-block micronucleus technique: A detail description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993; 285: 35-44.
- 56) Boyum A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Invest* 1968; 21: 77-79.
- 57) Perry P. y Wolff S.: New giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251: 156-158.
- 58) Spiegel S.: Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conducta. Ed. Trillas, México. 1986; pp:143-154.
- 59) Carrasco G., Nieto R., Salazar A.M., González G.: Manual de prácticas de hematología. Ed. División de Química y Farmacia, Departamento de Biología de la Facultad de Química UNAM, México. 1991; pp: 3-4.
- 60) Mukherjee A.B., Murthy V.V.V.S., y Chaganti R.S.K.: Detection of cell cycle stage by fluorescence in situ hybridization: its application in human interphase cytogenetics. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 61: 91-94.
- 61) Duque R.E.: Flow cytometric analysis of lymphomas and acute leukemias. *Ann NY Acad Sci* 1993; 677: 309-315.
- 62) Anastasi J.: Fluorescence in situ hybridization in leukemia. *Ann NY Acad Sci* 1993; 677: 214-224.
- 63) Lee M. y Stass S.A.: Uses of polymerase chain reaction in leukemia: Detection of minimal residual disease and identification of novel genetic mutations. En: *Leukemia: Advances research and treatment*. Emil F. Kantarjian H. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Nueva York. 1993; pp: 36-44.
- 64) McComick F.: The polymerase chain reaction and cancer diagnosis. *Cancer Cells* 1989; 1: 56-61.
- 65) Bernabei P.A., Santini V., Dal Pozzo O., Bezzini R., Gattei V., Saccardi R., Rombolà G. y Rossi Ferrini P.: Clonogenic growth of acute non-lymphocytic leukemia cells in serum-free medium. *Experientia* 1988; 44: 903-906.