

11
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO CITOGENETICO EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LEUCEMIA AGUDA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
NORMA ELENA BETANCOURT VALLADARES



MEXICO. D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

Jurado asignado:

Presidente:	prof. Gerardo Kono Yáico
V o c a l :	prof. Manisol Lopez Lopez
Secretario:	prof. Alicia Cervantes Peredo
1er. Suplente:	prof. Maria Estela Cevallos Ferriz
2do. Suplente:	prof. Eva Delia Calderon Garduñetas

Sitio donde se desarrollo el tema:

**SERVICIO DE GENETICA
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO S.S.a.**

Asesor del tema:

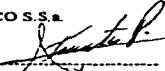
Q.F.B. ALICIA CERVANTES PEREDO

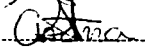
Supervisor técnico:


Q.F.B. ROSA MARIA ARANA TREJO

Sustentante:

NORMA ELENA BETANCOURT VALLADARES







MAMA Y PAPA ESTE TRABAJO
ESTA DEDICADO A USTEDES.
POR TODO EL AMOR Y
DEDICACION QUE TUVIERON
AL ENSEÑARME A LEER Y
A LUCHAR PARA PODER
ALCANZAR ESTE FINAL.

A MIS HERMANOS PATY Y FOR
POR EL APOYO Y CARISO QUE
ME BRINDAN.

A MI PEQUEÑA ALEXIA POR QUE ERES LA
RAZON PARA SEGUIR ADELANTE.
ERES MI VIDA.

A LEONEL POR TODA SU AYUDA.
COMPANIA Y AMOR.

AGRADEZCO A LA QFB ALICIA
CERVANTES LA DIRECCION
DE LA PRESENTE TESIS.

GRACIAS POR LA COLABORACION
DE LOS QFB ADRIAN PEREZ Y
KOSY ARANA.

A TODOS MIS COMPANEROS DEL
HOSPITAL GENERAL DE MEXICO
POR SU APOYO.

A MIS COMPANEROS Y AMIGOS
DEL HCM. POR SU MOTIVACION
PARA LA CONCLUSION DE ESTE
TRABAJO.

INDICE

1.-	INTRODUCCION	3
1.2	OBJETIVOS.....	5
2.-	DATOS HISTORICOS.....	6
2.1	DEFINICION.....	8
2.2	CLASIFICACION DE LEUCEMIAS.....	8
2.2.1	Leucemia Linfoblastica Aguda.....	10
2.2.1.1	Clasificación del grupo FAB.....	10
2.2.1.2	Clasificación inmunológica.....	13
2.2.2	Leucemia Mieloblástica Aguda.....	18
2.2.2.1	Clasificación del grupo FAB.....	18
2.2.2.2	Clasificación Inmunológica.....	23
2.3.3	Clasificación Morfológica, Inmunológica y Citoquímica (MIC).....	25
3.-	CITOGENETICA DE LEUCEMIA AGUDA.....	27
3.1	Nomenclatura.....	29
3.2	Anormalidades Cromosómicas en LA.....	31
3.2.1	Anormalidades Cromosómicas en LLA.....	34
3.2.1.1	Anormalidades Numéricas.....	35
3.2.1.2	Anormalidades Estructurales.....	40
3.2.2	Anormalidades Cromosómicas en LMA.....	51
3.2.2.1	Anormalidades Numéricas.....	51
3.2.2.2	Anormalidades Estructurales.....	52

4.- PRONOSTICO Y TRATAMIENTO DE PACIENTES PEDIATRICOS...	58
4.1 LLA.....	58
4.1.1 Factores Pronósticos.....	58
4.1.2 Tratamiento.....	64
4.1.3 Trasplante de Médula Osea.....	71
4.2 LMA.....	73
4.2.1 Tratamiento.....	73
4.2.2 Trasplante de Médula Osea.....	76
5.- MATERIAL Y METODOS.....	77
5.1 Material Biológico.....	77
5.2 Cariotipo en Médula Osea.....	78
5.3 Cariotipo en Sangre Periférica.....	79
5.4 Bandas GTG.....	80
6.- RESULTADOS.....	84
7. DISCUSION Y CONCLUSIONES.....	95
8.- BIBLIOGRAFIA.....	103

CAPITULO 1

INTRODUCCION

Durante la infancia el cáncer más común es la Leucemia Aguda, (LA) representando 30% de todos los casos diagnosticados. La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es la forma más usual y constituye 80% de estos casos, mientras que la Leucemia Mieloítica Aguda (LMA), sólo representa cerca de 17% (1).

Recientemente se han relacionado anomalías cromosómicas específicas con el resultado de la quimioterapia combinada para la leucemia de la infancia, haciendo surgir la posibilidad del tratamiento individualizado en base a las características citogenéticas de las células malignas de un paciente (2).

La presencia de anomalías cariotípicas clonales en las células de médula ósea puede proporcionar la única prueba definitiva de malignidad, especialmente cuando hay una sustitución incompleta de la médula ósea por el proceso leucémico (2).

Además de su importancia clínica, las anomalías citogenéticas han proporcionado puntos focales para la investigación sobre los orígenes de la leucemia. Los estudios moleculares de las aberraciones cromosómicas han enlazado los rearrreglos de los protooncogenes celulares con la leucemogénesis. La identificación y caracterización molecular de genes, cuya regulación o función ha sido alterada por cambios cromosómicos relacionados con el fenotipo de la célula, prometen

ser contribuciones importantes para la comprensión de las bases moleculares de la transformación maligna en la leucemia humana. En este trabajo se presenta el estudio citogenético realizado en 20 pacientes pediátricos con leucemia aguda, estudiados antes de iniciar el tratamiento. Se discute la importancia del tipo de leucemia y su relación con el cariotipo inicial como factor de riesgo, que al ser asociado con otros criterios clínicos permite establecer un mejor diagnóstico y pronóstico (2).

1.1 OBJETIVOS

- 1.- Realizar estudios cromosómicos en pacientes pediátricos con leucemia aguda, previo al inicio del tratamiento.
- 2.- Evaluar los factores de predisposición para el desarrollo de leucemias en los pacientes.
- 3.- Utilizar la técnica de alta resolución para comparar los resultados con los de la técnica estándar.
- 4.- Correlacionar el cariotipo con los datos clínicos y tipo de leucemia para tratar de establecer factores pronósticos.

CAPITULO 2

DATOS HISTORICOS

En cuanto a su historia, la leucemia es una enfermedad relativamente nueva, en el sentido de que la primera descripción data tan sólo de hace ciento cuarenta años. Además, tampoco hay ninguna referencia en los escritos bíblicos o grecorromanos a alguna enfermedad que pueda considerarse retrospectivamente como leucemia (3).

Los primeros estudios sobre la anatomía humana datan como mínimo de hace cuatro siglos, sin embargo, no existen referencias de esplenomegalia sino hasta 1838-1847 en que se conoció su existencia y significado y las primeras descripciones de leucemia (3.4).

En 1838, Richard Bright escribió un artículo en el que ilustraba casos de enfermedades del bazo, al cual siguieron diversas descripciones de leucemia, estudiadas tanto en vida como después de la muerte del enfermo (3).

En 1844 Donne comunicó pacientes con esplenomegalia en los cuales al observar su sangre al microscopio descubrió que "una proporción considerable de células tenía todas las características de la pus" (3).

En Escocia, Craigie (1845) y John Bennett (1845) comunicaron casos caracterizados por esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatía y muchos glóbulos de materia purulenta en la sangre y pensaron que se trataba de una "supuración en la sangre". Indudablemente estos pacientes sufrían leucemia (3.5.6).

En Berlín, Virchow en 1845 descubrió que la enfermedad no era plemia, puesto que no se descubrió una infección primaria que pudiese haberse extendido a la sangre, y debido a que la sangre tenía una coloración "blanca amarillenta", se refirió a ella como Weisses blut. Dos años después propuso el nombre de leucemia y en años sucesivos amplió y definió la enfermedad. Hizo notar que además de aumento de leucocitos, había reducción de hemáticas. También efectuó la distinción entre leucemia granulocítica y leucemia linfocítica (3.6).

La leucemia aguda fue descrita primeramente por Friedrich en 1857 (6). El primer caso de leucemia monocítica fue señalado por Reschad y Schilling-Torgau, en 1913. En 1930 ya estaban bien establecidas las variaciones morfológicas de las leucemias agudas y crónicas (7). La leucemia aguda es más común en niños y ocupa el noveno lugar en cáncer de adultos. A su vez, la leucemia linfocítica aguda es más común en niños entre los 4 y 5 años de edad. La incidencia de leucemia aguda se incrementa en pacientes con varias enfermedades congénitas o adquiridas y en pacientes con inmunodeficiencias y desórdenes autoinmunes (3).

2.1 DEFINICION

La leucemia es una enfermedad neoplásica, caracterizada por la proliferación anormal de las células hematopoyéticas de la médula ósea y de otros órganos (bazo, ganglion linfáticos e hígado), dando como resultado la aparición de formas inmaduras en la sangre periférica (6.8.9).



2.2 CLASIFICACION DE LEUCEMIA.

La leucemia se divide en dos formas: aguda y crónica dependiendo de su agresividad y del grado de diferenciación de las células neoplásicas (6.8.10.14).

En la leucemia aguda (LÁ) el tipo predominante de células en proliferación es una célula inmadura poco diferenciada, conocida como "blasto" (10), en cambio en la leucemia crónica la proliferación encontrada es de células diferenciadas (12).

De esta manera, las leucemias agudas son un grupo heterogeneo de padecimientos caracterizados por proliferación desordenada y acumulación progresiva de una clona de precursores hematopoyéticos, malignos e inmaduros en la médula ósea (6).

Las leucemias agudas se clasifican en dos categorías según el tipo de célula precursora en que ocurre la lesión primaria : a) Si la anomalía afecta de manera primaria a la célula precursora mielóide, la leucemia se clasifica como mielocítica o mieloblástica aguda. b) Si el defecto modifica en forma primaria



a la célula precursora linfóide. La leucemia se clasifica como linfocítica aguda (13).

La diferenciación y clasificación de las leucemias agudas depende de la identificación precisa de la población blástica. Las leucemias agudas se clasifican en varios grupos según las características morfológicas, citoquímicas, inmunológicas y hoy en día también se utilizan las características citogenéticas y moleculares de las células cancerosas (TABLA 11(4,5)).

En 1976, el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (Grupo FAB) propuso un sistema de clasificación y nomenclatura basado en las características morfológicas de las células blásticas en frotis con tinción de Romanovski y en los resultados de tinciones citoquímicas (6).

Las técnicas citoquímicas son utilizadas en la diferenciación de varios tipos y subtipos de leucemia aguda y proporcionan información adicional a la morfología (14).

A su vez el conocimiento cada vez más claro de la diferenciación de células linfoides humanas, y el empleo de marcadores y reactivos específicos para identificar a las células, han hecho que la clasificación morfológica de las LLA resulte incompleta. Ahora es posible estudiar a las células linfoides para analizar no sólo su morfología sino su diferenciación en las líneas de linfocitos T, B, nulos, etc. permitiendo establecer la clasificación inmunológica de estas neoplasias (15,16).

Por último, la investigación citogenética de la leucemia aguda provee información que apoya fuertemente el principio central de la teoría de la mutación somática del cáncer. De esta manera, el tipo de aberración puede revelar si el paciente tiene LLA o LMA y de que subtipo es. La remisión y la recaída pueden monitorizarse mediante el análisis citogenético. Finalmente el patrón cariotípico es un parámetro independiente que debe considerarse en la elección de la terapia (11.17).

2.2.1 Leucemia Linfoblástica Aguda

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad caracterizada por la proliferación maligna de células precursoras linfoides. Los linfocitos malignos reemplazan el tejido hematopoyético normal en la médula ósea y se filtran en ganglios linfáticos, bazo, hígado y otros órganos. La célula predominante en médula ósea y sangre periférica se puede identificar como linfoblasto (4.11.13).

2.2.1.1 Clasificación del grupo FAB.

El grupo FAB (17) definió tres subgrupos de LLA basados en la morfología y heterogeneidad de los linfoblastos en la médula ósea. Las características citológicas usadas para valorar la morfología de los blastos son: tamaño celular, cromatina nuclear, forma nuclear, núcleo, cantidad de citoplasma y vacuolización citoplásmica (Tabla 2).

T A B L A 1. Métodos utilizados en la clasificación de células leucémicas (14).

Morfología.
Citología de la médula ósea (clasificación del FAB)
Patología de biopsia de médula ósea
Observación de células en microscopio electrónico
Citoquímica
Métodos enzimáticos: peroxidasa, cataractano específica y específica fosfatasa, B-glucuronidasa, aril sulfatasa
Métodos no enzimáticos: Negro de Sudan, PAS, pironina
Inmunológico
Marcadores de superficie celular, Rosetas E, receptor Fc receptor de complemento, inmunoglobulina de membrana.
Antígeno de superficie celular : * HTA , ** CALLA
Síntesis de inmunoglobulinas celulares.
Inmunoglobulina citoplasmática.
Bioquímica
Deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt)
Adenosin deaminasa
Lisozima en suero y orina
5-Nucleotidasa
Hexosaminidasa
Sitios de unión de insulina
Receptor de glucocorticoides
Citogenética
Alteraciones Numéricas
Alteraciones Estructurales
Citometría
Análisis del ciclo celular
Cinética celular
Índice mitótico
Radiosensibilidad <u>in vitro</u>
Estudio de sensibilidad a drogas. Sensibilidad <u>in vitro</u> a Ara-C y L-asparaginasa

*HTA Antígeno de Timocito Humano. **CALLA Antígeno LLA Comun.

T A B L A 2.

Criterios del grupo FAB para los subtipos de LLA (10).

Características	S u b t i p o s		
	L1	L2	L3
Citológicas			
Tamaño Celular	Predominan Células Pequeñas	Tamaño grande heterogéneo	Grande y homogéneo
Cromatina Nuclear	Homógena en todos los casos	variable-heterógena en todos los casos	Puntilleo fino y homogéneo
Forma Nuclear	Regular. en ocasiones hendidas	Irregular. hendidas. indentadas común	Regular oval a redondo
Nucleólos	No visibles o pequeños y no discernibles	Existen 1 ó más a menudo grandes	Destacado(s): uno ó más.
Cantidad de Citoplasma	Escasa	Variable a menudo abundante-moderada	Abundante-moderada
Basofilia del Citoplasma	Ligera o moderada intensa en raras ocasiones	Variable intensa en algunas células	Muy intensa
Vacuolación Citoplasmica	Variable	Variable	A menudo importante

2.2.1.2 Clasificación Inmunológica

El análisis fenotípico de las células malignas por identificación de sus marcadores de membrana se emplea para definir y subdividir las leucemias linfoides. En general, los marcadores de membrana se pueden agrupar como receptores o como antígenos. Los primeros incluyen receptores para complemento, para eritrocitos de carnero y para eritrocitos murinos. La presencia de inmunoglobulinas citoplasmáticas o de membrana es también un marcador importante de los linfocitos B. La identificación de Ag de diferenciación de membrana (Ag que aparecen en ciertas etapas de maduración y de diferenciación celular) ha proporcionado información sobre las etapas de maduración de linfocitos T y B, basada en la constitución antigénica de la célula (6) (TABLAS 3 y 4 Figura 2).

Por ejemplo, uno de los marcadores de superficie recientemente definido es el CD34, este marcador fue encontrado en la mayor parte de casos diagnosticados como LLA pre-B temprana, seguido en LLA pre-B, y por último en LLA de células T. La expresión de este marcador en la línea B parece tener un pronóstico favorable, puesto que se encontró también el marcador CD10, que es de buen pronóstico. En cambio en LLA-T es el contrario: ya que presenta características clínicas de mal pronóstico (18,19). Así, la investigación con marcadores de superficie e intracelulares indica que los linfoblastos en LLA varían de manera considerable en su maduración inmunológica (13).

T A B L A 3. Esquema de Maduración normal de la Celula T con las contrapartes leucémicas. (13,14,19).

*TdT -->	TdT -->	TdT -->	CD8, CD3 CD4, CD2 TdT -->	CD2, CD3, CD4
		-->	TdT -->	CD2, CD3, CD8
&CD7	CD5 CD2	CD1, CD2, CD4 CD8, CD3	CD5, CD8 CD4, CD2	
Timocito Inmaduro	Timocito Común	Timocito Maduro	Linfocitos T Periféricos maduros	LLC-T rara
LLA-T (70%)	LLA-T (20%)	LLA-T rara		

*TdT: desoxinucleotidil transferasa terminal. &CD("cluster of differentiation"): grupo de diferenciación.

T A B L A 4. Esquema de maduración normal de la célula B, y sus equivalentes leucémicos. (13,14,19)

	LLA-V	CALLA	LLA PRE B	LLA-B	LLC LLP	LCM LLP
O -->	TdT -->	TdT -->	TdT -->	O -->	O -->	B -->
Célula	Célula	Pre-preB	Pre B	B tem-	B madura	B
Precursora	Precursora	CD24	CD24	prana	Inter-CD24	media CD19
Pluripo-	linfoide	CD19	CD19	CD24	CD24	CD21
tencial.		CD10	CD20	CD20	CD19	IgS
		CD34	CD10	IgS	CD20	IgS
			IgC		IgS	CD21
			CD34			
		Mieloma Múltiple				Cadena pesada de Walderstrom
						Plasmacito
		Célula Plasmática				CD24
		Ig C				CD19
		Ig S +/-				CD20
						IgS

IgC inmunoglobulina citoplasmática. IgS inmunoglobulina de superficie.

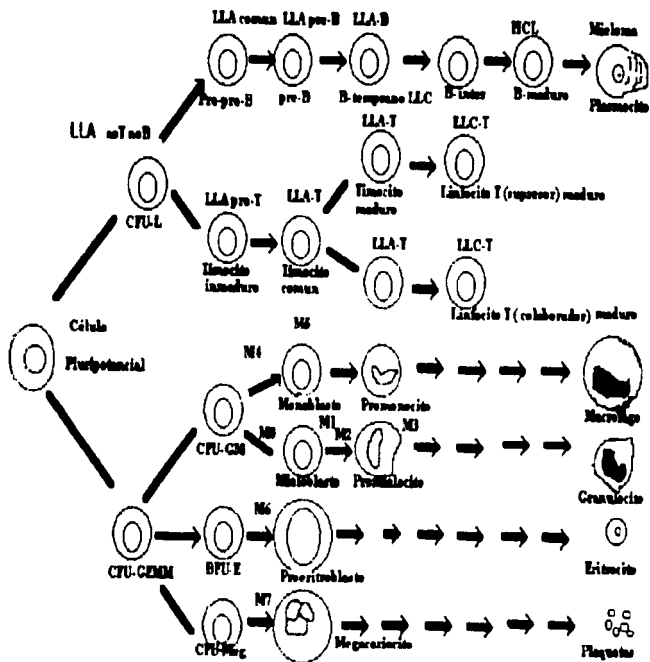


Figura 2: Esquema de diferenciación hematopoyética mostrando el predominio celular en cada tipo de lincomitas (7).

En la actualidad, los anticuerpos monoclonales identifican 4 subtipos inmunológicos de LLA: LLA-común : LLA-T: LLA-B Y LLA inclasificable o nula (13,16).

LLA común (CALLA) (cd10)

La LLA común se identifica por la presencia del Ag común de la leucemia linfocítica aguda ("CALLA" por sus siglas en inglés) y por tanto con frecuencia se le nombra como el subtipo CALLA. El marcador CALLA se encuentra en las etapas iniciales de desarrollo de las células B, aún antes de que aparezcan las inmunoglobulinas citoplasmáticas (16).

Los Ag tempranos de las células B se encuentran también en las células CALLA positivas. La mayoría de los niños tienen leucemias linfocíticas de este tipo. Al parecer, tienen el mejor pronóstico de todos los subtipos inmunológicos. Este es también el subtipo de LLA que con mayor frecuencia se transforma en LMC (13,15).

LLA-T

El subtipo LLA-T se identifica por la presencia de marcadores típicos de células T. Los subtipos están de acuerdo con la etapa de diferenciación. La mayor parte de las células T leucémicas de LLA al parecer se ha estancado en las etapas tempranas del

desarrollo tímico. En las células tempranas de linfocitos T se encuentra el Ag TdT, que también se encuentra en las células Pre-B, además se pueden diferenciar de estas porque contienen el marcador de membrana CD7 y el marcador común CD2 (13,16).

LLA-B

Las LLA-B se identifican por marcadores de superficie y/o por la presencia de inmunoglobulina citoplasmática o de superficie o por el rearrreglo de los genes de inmunoglobulinas (13,16).

El Ag CALLA existe también en las células LLA-B. Como en LLA-T, también LLA-B puede subdividirse de acuerdo con las etapas de diferenciación en LLA-V, LLA pre B y LLA-B. La LLA-B es la forma menos común de LLA (13,16).

LLA no Clasificable (LLA Nula) (LLA no B no T).

La LLA no clasificable se distingue de las demás, porque sus linfoblastos carecen de todos los marcadores que caracterizan a los tres subtipos anteriores. No obstante, con el descubrimiento de marcadores adicionales para las células B, puede demostrarse que la mayor parte de los linfoblastos LLA de células nulas son en realidad células B. Por ello, ahora son muy pocas las LLA que se clasifican como nulas (13,16).

2.2.2 Leucemia Mieloblástica Aguda.

En la leucemia mielocítica aguda la anomalía afecta de manera primaria a la célula precursora mielóide. Es probable que la clona leucémica se origine de una sola célula precursora mutante que retiene su habilidad para proliferar, pero ha perdido la capacidad para diferenciarse y madurar. La enfermedad tiene su origen en el tejido hematopoyético de la médula ósea, pero cuando progresa, es posible encontrar células malignas infiltradas en muchos órganos. La célula blanco en transformación maligna puede ser desde la célula precursora (mielóide (cfv-5) hasta una célula precursora restringida o más madura (13).

Las variantes de LMA se clasifican de acuerdo a la línea celular neoplásica que predomina en la médula ósea, siendo común que un subtipo evolucione a otro, en especial cuando la lesión primaria ocurre en la célula precursora CFV-5 (3,13).

2.2.2.1 Clasificación del grupo FAB.

El grupo FAB clasifica a la LMA en 7 grupos dependientes de la morfología de los blastos medulares, del grado de maduración de las células y de los resultados de tinciones citoquímicas adicionales (13,20) (Tabla 5).

**T A B L A 5 Clasificación de Leucemia Mieloblástica Aguda.
Grupo FAB (9.14.18).**

Designación	Terminología común	Tipos de células que predominan
M1 ---	Indiferenciada	-> Mieloblastos sin signos de maduración
M2 ---	Mielocítica aguda	-> Mieloblastos con signos generalmente de diferenciación promielocítica, con granulación azurófila y bastones de Auer
M3 ---	Promieloblástica	-> Promielocitos hipergranulosos
M4 ---	Mielomonocítica aguda	-> Granulocitos y monocitos
M5 ---	Monocítica aguda	-> Monocitos
M6 ---	Eritroleucemia	-> Eritrocitos y granulocitos
M7 ---	Megacarioblástica	-> Megacariocitos

Leucemia Mielocítica Aguda M1.

Esta variante de LMA es la más común en adultos y en lactantes menores de un año de edad. La célula predominante en sangre periférica es por lo general un mieloblasto apenas diferenciado con cromatina de retícula fina y nucléolos destacados. En ocasiones se observan solo escasos blastos, pero la médula ósea revela siempre un incremento agudo de células blasticas. Es común una disminución de plaquetas (21).

La médula ósea hipercelular revela que 90% o más de las células no eritroides son mieloblastos. En las leucemias M1 más o menos 50% de los blastos contienen cuerpos de Auer. Algunos blastos pueden tener gránulos azurófilos dispersos (9,12,21).

Los mieloblastos son grandes con una cantidad pequeña a moderada de citoplasma azul grisáceo. El núcleo es redondo, oval o irregular con cromatina reticulada, fina y varios nucléolos definidos. Pueden poseer vacuolas (9,14).

La tinción con negro de sudán para mieloperoxidasa B es positiva en más de 3% de los blastos, lo que indica diferenciación granulocítica. El cloroacetato de naftol AS-D (esterasa específica) da reacción positiva fuerte, pero las esterases inespecíficas, butirato y acetato de alfa-naftol dan reacción negativa (13,20).

Leucemia Mielocítica Aguda M2.

La célula presenta maduración más allá del estadio promielocito con alrededor de 50% de blastos y progranulocitos. La célula tiene abundante citoplasma basófilo con número variable de gránulos, algunos fusionados. Sin embargo, la cromatina es fina y pueden verse uno o dos nucleolos (13,21).

Leucemia Promielocítica Aguda M3.

Se conocen dos formas de M3 : el tipo hipergranular típico y la variante hipogranular o microgranular (21).

M3 Hipergranular.- La mayor parte de las células en la médula ósea son promielocitos con granulación azurófila abundante. En ocasiones, los gránulos se aglomeran tanto que oscurecen el núcleo. Hay también algunas células llenas de gránulos finos. Es característico observar células con bastoncillos unidos en haces. Con frecuencia el citoplasma de estas células es azul pálido, aunque pueden contener algunos gránulos azurófilos y cuerpos de Auer encima y entre las células intactas. (13)

M3 Microgranular.- Las células que predominan en la sangre periférica son promielocitos con núcleo bilobular, reniforme o multilobular y citoplasma de gránulo o con alguna granulación azurófila fina. La cromatina nuclear es sutil, con nucleolos visibles. Pueden encontrarse células con un sólo cuerpo de Auer. (13)

Leucemia Mielomonocítica Aguda M4.

Esta variante de LMA deriva su nombre del hallazgo de formas de diferenciación monocítica y mielocítica en sangre periférica y en médula ósea. Los monocitos predominan en la sangre periférica y los granulocitos en médula ósea. Es una de las variantes de LMA más común (13,16,21).

Leucemia Monocítica Aguda M5

El criterio para un diagnóstico de M5 es que 80% de las células no eritroides en médula ósea sean de origen monocítico (incluidos, monoblastos, promonocitos y monocitos). Hay dos formas distintas, 5A y 5B clasificadas de acuerdo con el grado de diferenciación de la célula monocítica. (19)

En la primera forma se presentan más monoblastos, en la segunda hay mayor cantidad de promonocitos (13,16).

Eritroleucemia M6

La eritroleucemia es una forma poco común, que afecta en primer lugar a las células eritroides. Los cambios que dominan en sangre periférica son anemia con anisocitosis y poiquilocitosis. Los eritrocitos nucleados muestran configuraciones nucleares anormales. Los leucocitos y las plaquetas son por lo general escasos. El diagnóstico de eritroleucemia puede hacerse cuando más de 50% de las células medulares son eritroides (15,16).

Leucemia Megacarioblástica M7

Esta leucemia se identifica con varios nombres, mieloesclerosis maligna aguda, mielodisplasia aguda con mielofibrosis y mielofibrosis aguda. Es posible observar micromegacariocitos y blastos indiferenciados (13). En médula ósea 30% o más de las células son megacarioblastos (21).

2.2.2.2. Clasificación inmunológica

El análisis de marcadores de superficie usando anticuerpos monoclonales inmunofluorescentes es importante en la clasificación inmunológica de la LMA, y se ha establecido la línea atípica de las células blásticas. Los anticuerpos contra antígenos de superficie expresados en la LMA y algunos CD (grupos de diferenciación) son correlacionados con la clasificación del FAB (21) (TABLA 6).

En conclusión, estos criterios de clasificación inmunológica son complementarios a la clasificación morfológica y citoquímica.

T A B L A 6.
 INMUNOFENOTIPO DE VARIANTES DE LMA. (21)

Anticuerpos Monoclonales	CD*	Clasificación FAB						
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
HLA-DR		+	+	-	+	+	+/-	+/-
MY9.L4F3	CD33	+	+	+	+	+	+/-	+/-
MCS-2.MY7	CD13	+/-	+	+	+	+	-	NR
Mo1.OKM1	CD11b	-	+	+/-	+	+	-	NR
Leu M1	CD15	-	+	+/-	+	+	+/-	NR
Mo2.UCHL1	CD14	-	+/-	-	+	+	-	NR
Glicoproteína IIb/ IIIa	CDw41	-	-	-	-	-	-	+
Glicoproteína Ib factor von Willebran(vWF)	CDw42	-	-	-	-	-	-	+

CD.- Cluster of differentiation (grupo de diferenciación)

2.2.3. Clasificación Morfológica, Inmunológica y Citogenética (MIC).

Los estudios citogenéticos realizados en neoplasias demuestran que las alteraciones cromosómicas se distribuyen en el genoma de un modo no aleatorio. Las leucemias agudas se caracterizan por rearrreglos genéticos adquiridos que en la mayoría de los casos pueden detectarse por métodos citogenéticos como anormalidades cromosómicas clonales (17).

El MIC asocia estas alteraciones citogenéticas con los subtipos morfológicos e inmunológicos reflejando las características patobiológicas de la LLA y la LMA (20) (Tablas 7 y 8).

Algunas veces la especificidad de la asociación hemato-inmuno - citogenética permite un diagnóstico preciso de un subtipo de leucemia aguda (13). Por eso es que algunos autores consideran esta clasificación como completa, siendo de gran ayuda para el diagnóstico y pronóstico de los pacientes (20).

T A B L A 7

ALTERACIONES GENETICAS EN LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA LLA (26)

ALTERACION CROMOSOMICA	ONCOGENES IMPLICADOS	SUBTIPO LLA	FRECUENCIA (%)
t(9:22)(q34;q11) 11q23	BCR/ABL	LLA-preB	5-25
t(1:19)(q23;p13)	HRX(ALL/1)	LLA-preB	5-70
t(8:14)(q24;q32)	PBX1/E2A	LLA-preB	25
t(11:14)(p13;q11)	MYC/Ig γ s	LLA-B	100
t(1:14)(p32;q11)	RHOM-2/TTC2	LLA-T	10
t(1:14)(p32;q11)	TAL-1/TCR	LLA-T	20
t(10:14)(q24;q11)	HOX11/TCR	LLA-T	7
t(8:14)(q24;q11)	MYC/TCR	LLA-T	10

T A B L A 8

ALTERACIONES GENETICAS EN LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA (LMA) (26)

ALTERACION CROMOSOMICA	ONCOGENES IMPLICADOS	SUBTIPO LMA	FRECUENCIA %
t(15:17)(q21;q21)	PML/RARA α	M3	100
t(8:21)(q22;q22)	AHL1/ETO	M2	40
t/del/inv(16)(p13;q22)	CBFB/MYH1	M4	75
t(6:9)(p23;q24)	DEK/CAN	M1/M2/M4	<5
t/del(11)(q23)	HRX(ALL1)	M5	<6
t(9:22)(q34;q11)	ABL/BCR	M1/M2/M5	<5

CAPITULO 3
CITOGENETICA DE LEUCEMIAS AGUDAS

Las investigaciones citogenéticas en la leucemia aguda proveen información que apoya fuertemente el principio central de la teoría de la mutación somática del cáncer. Las células neoplásicas contienen cambios cromosómicos clonales adquiridos (20).

En 1914 (23), Boveri fue el primero en declarar que las anomalías cromosómicas eran la base de la célula neoplásica. Sin embargo, durante mucho tiempo las ideas de Boveri no fueron aceptadas del todo por la deficiente tecnología existente en la época, lo cual hacía difícil la visualización de los cromosomas. Hace apenas 20 ó 25 años dicha teoría fue confirmada, gracias a los avances de la biología molecular (20,22).

Una de las primeras técnicas que se utilizó para el estudio de los cromosomas, fue la técnica de "squash and smear" (aplanar y extender) que aparece en los años veinte, en el estudio citogenético de plantas. Sin embargo fue empleada hasta 1950 en el análisis citogenético de células animales, en especial de mamíferos (20,22,24).

En forma simultánea aparece el uso de la colchicina en las técnicas de cultivo de tejidos, para detener el crecimiento en aquéllos que estaban más expandidos, siendo este hallazgo de gran importancia para la citogenética actual (20,25).

Esta tecnología fue usada en la citogenética de mamíferos culminando con la descripción correcta del número cromosómico del hombre en 1956 por Joe Hin Tijo y Albert Levan (26) y con ello el posterior descubrimiento de síndromes cromosómicos (20,24).

Otra técnica que abrió una brecha de particular importancia fue la utilización de fitohemaglutinina (PHA) que tiene un efecto mitogénico en los linfocitos (20,24).

El Dr. Hungerford y cols. hicieron el primer cariotipo de sangre periférica en 1959 usando la técnica de "squash" (aplastado). Morehead y cols. (27) publicaron la técnica de secado al aire de cromosomas de sangre periférica usando como fijador, metanol y ácido acético .

En 1960, Nowell y Hungerford (28) reportan la primera anomalía cromosómica concreta, en cáncer humano. Estos investigadores observaron un cromosoma diminuto llamado cromosoma Filadelfia (Ph), en pacientes con LMC. La naturaleza de la aberración cromosómica fue aclarada en 1973, cuando Rowley (29) reportó que era producto de una translocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22.

Los trabajos realizados por Nowell y Hungerford llevaron a la búsqueda de anomalías cromosómicas específicas que explicaran la patogénesis del cáncer. Se encontraron con mayor frecuencia en la progresión del tumor, lo cual demostró que son un factor esencial en el curso de la enfermedad (20).

La introducción de las técnicas de bandeado por Caspersson y cols. (30,31) en 1970 facilitó la identificación de cada cromosoma y el reconocimiento de cambios citogenéticos específicos, iniciando así la revolución del análisis citogenético. Más tarde las técnicas de alta resolución facilitaron la visualización de una gran cantidad de aberraciones estructurales antes no detectables (20).

3.1.- Nomenclatura.

Los cromosomas no sólo tienen un número constante en cada especie, sino que además presentan estructura y morfología definidas. Los cromosomas se analizan durante la profase tardía o durante la metafase, en las cuales cada cromosoma consta de dos cromátidas unidas por una constricción primaria que es el centrómero (32,33).

Con el surgimiento de las técnicas de bandas se hizo necesario actualizar la nomenclatura de los cromosomas que se venía utilizando desde la primera reunión internacional celebrada con este objeto en Denver en 1960. Este primer intento de nomenclatura fue ampliado en Londres en 1966 y posteriormente en la conferencia de Chicago en el mismo año. La conferencia que introdujo la terminología de bandas se llevó a cabo en París en 1971 y fue ampliado con la publicación de un suplemento en el año de 1975 (32,33).

En este sistema, una banda se define como la porción de un cromosoma que se distingue claramente de los segmentos

adyacentes, porque se observa clara ú oscura, o fluorescente o no fluorescente, con los distintos métodos de bandas (10). Los cromosomas parecen entonces formados por una serie continua de bandas claras y oscuras (32,33,34).

Para designar los brazos, las regiones y las bandas de un cromosoma, se tiene el siguiente sistema; p designa el brazo corto y q designa el brazo largo (34).

Las regiones y las bandas se numeran consecutivamente desde el centrómero a lo largo de cada uno de los brazos del cromosoma. Así las dos regiones adyacentes al centrómero son la región 1 en cada brazo, la siguiente será la 2 y así sucesivamente (32,33,34).

Para designar una banda en particular se requieren 4 parámetros: el número del cromosoma, el brazo, la región y la banda en esa región, y se escriben sin espacios y sin puntuación. Así por ejemplo, 1p35 indica el cromosoma 1, su brazo corto, la región 3 y la banda 5. Con el aumento del número de bandas que se obtienen con las técnicas de alta resolución, las bandas se subdividen en sub-bandas, según la distancia relativa que hay desde el punto que se desea señalar hasta el límite proximal de esta banda (34).

3.2.-Anormalidades Cromosómicas en LA.

Las células malignas muestran anomalías del número o de la estructura de los cromosomas. Para la clasificación de estas alteraciones es útil tener en cuenta algunas definiciones. Una clona es una población celular que ha derivado de una simple célula progenitora. Se infiere este origen clonal cuando las células tienen la misma o muy similar anomalía cromosómica. En general se acepta que existe una clona cuando dos o más células tienen la misma aberración estructural o presentan el mismo cromosoma supernumerario. Cuando la aberración implica la pérdida de un cromosoma, este cambio debe estar por lo menos en 3 metafases. El número modal es el número cromosómico encontrado con mayor frecuencia en la población de células tumorales y la línea o estirpe celular es la constitución cromosómica más frecuente, teniendo en cuenta tanto alteraciones estructurales como numéricas (30,34,35).

Las aberraciones cromosómicas son clasificadas generalmente en estructurales y numéricas. Las alteraciones estructurales incluyen duplicaciones (dup), isocromosomas (i), inversiones (inv) paracéntrica y pericéntricas, cromosomas en anillo (r), cromosomas dicéntricos (dic), deleciones (del) terminales, ó intersticiales, translocaciones recíprocas (t), translocaciones robertsonianas (rob), inserciones directas (dir ins) e invertidas (inv ins), e inserciones directas o indirectas entre 2 cromosomas (31,32,36). Mientras que en las anomalías

numéricas encontramos 4 subtipos de aneuploidia basados en el número de cromosomas: hiperdiploidia con 47 a 50 cromosomas; hiperdiploidia con más de 50 cromosomas; hipodiploidia menos de 46 cromosomas, casi haploidia 26-28 cromosomas (37) (Tabla 9). De esta manera, la pérdida o la ganancia de cromosomas completos, se escribe con un - o un + antes del cromosoma en cuestión (38).

Es característico encontrar en las células tumorales aumento (hiperdiploidia) o disminución (hipodiploidia) en el número de cromosomas o células pseudodiploides que contienen un número cromosómico aparentemente normal pero con aberraciones estructurales como pueden ser, fragmentos acéntricos, cromosomas marcadores, dobles diminutos, cromosomas dicéntricos o en anillo (29,30). También suele observarse el fenómeno de la endorreduplicación, cuando los cromosomas se duplican pero no se separan (34,35,39).

Dependiendo de la importancia patogénica relativa, las aberraciones cromosómicas encontradas en las células neoplásicas se pueden clasificar en tres grupos :

Anormalidades Primarias que se piensa son esenciales en el establecimiento de la neoplasia. Pueden ocurrir como cambio citogenético aislado en las primeras fases de la enfermedad y están, por regla, estrictamente correlacionadas con el tipo de tumor (38).

TABLA 9
ALTERACIONES CROMOSOMICAS NUMERICAS EN LLA

ALTERACION CROMOSOMICA	FRECUENCIA	FAB	INMUNOFENOTIPO	PRONOSTICO
Prox.haploidia	<1.0	L1	pre-B temprano	malo
Hipodiploidia 30-40	<1.0	L1	pre-B temprano	malo
Hipodiploidia 41-45	6	L1	pre-b temprano	malo
Hiperdiploidia 47-50	15.5	L1	pre-B temprano	intermedio
Hiperdiploidia >50	27.0	L1	pre-B	bueno
Triploidia	<1.0	L2	-T	malo
Tetraploidia	1.0	L1	T	malo

Anormalidades Secundarias. Alteraciones cromosómicas adicionales al rearreglo primario, ocasionando la variabilidad genética y fenotípica en la población de células tumorales. Por definición las anomalías secundarias no pueden ocurrir solas (38).

Ruido Citogenético. Es una inestabilidad citogenética pronunciada de las células tumorales, generalmente no clonal. Las aberraciones de ruido algunas ocasiones pueden dominar el cariotipo y oscurecer los cambios patogénicos importantes, por lo que pueden no diferenciarse de las anomalías secundarias (38).

3.2.1.-Anormalidades cromosómicas en LLA

Actualmente se sabe que las anomalías cromosómicas encontradas en las células malignas no son alteraciones constitucionales del individuo sino adquiridas durante el proceso maligno. Es por ello que el poder poner de manifiesto la presencia de las alteraciones cromosómicas de tipo clonal resulta sumamente importante para la caracterización de la enfermedad (40). Los estudios citogenéticos en LLA han demostrado que aproximadamente 70 a 94% de los casos presentan rearrreglos cromosómicos numéricos y estructurales demostrables (40,41).

3.2.1.1.-Anormalidades Numéricas.

Hiperdiploidía > 50 Cromosomas.

Secker - Walker y cols. (42), se dieron cuenta de que la ploidía de los cariotipos celulares leucémicos era un determinante pronóstico importante en la LLA de la infancia. Los niños con un pronóstico relativamente favorable tenían más de 50 cromosomas en un cariotipo de células leucémicas y en aquéllos con una hiperdiploidía con menos cromosomas tenían una cifra de fracasos más elevada. Los datos del autor han mostrado consistentemente un peor pronóstico en los pacientes de otros grupos de ploidías, incluyendo los que tienen cariotipos con pseudodiploidía, hipodiploidía o hiperdiploidía 47 a 49 (43,44,45).

Los pacientes con esta característica se pueden identificar rápidamente con un análisis del DNA contenido en las células leucémicas, por citometría de flujo. Este método no provee información de las anomalías cromosómicas estructurales, por lo que debe utilizarse junto con las técnicas citogenéticas. El cariotipo de pacientes con más de 50 cromosomas tiene ciertas características en común. A menudo se encuentran copias extra de los cromosomas X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20 y 21, con duplicación de 1q y en ocasiones se observa isocromosoma de 17q (20,32,34,37,46).

Además de la hiperdiploidía se encuentran anomalías estructurales en cerca de 62% de las cuales 20% son translocaciones. El pronóstico de los pacientes con más de 50

cromosomas es favorable cuando se acompaña de otras características como son: inmunofenotipo pre-B temprano, bajo número de leucocitos, niveles séricos bajos de deshidrogenasa láctica y edad entre 2 y 10 años (37).

El análisis de los cariotipos de los linfoblastos leucémicos con más de 50 cromosomas ha mostrado otras características citogenéticas distintivas, como trisomías de cromosomas específicos (45). La hiperdiploidía >50 cromosomas se presenta aproximadamente en 20% de los niños con LLA y es un subgrupo de un grupo mayor con fenotipos precursores de células pre-B, cuyos linfoblastos expresan el antígeno CALLA y morfología L1 (2,37,47).

Hiperdiploidía 47-50.

De los casos de LLA en niños, en 10% a 15% se encuentran 47-50 cromosomas teniendo un pronóstico intermedio al compararlos con otro tipo de ploidias (16,20.). En un estudio de pacientes con LLA 14.4% presentó hiperdiploidía con 47 a 50 cromosomas, de éstos 72.1% tenían 47 cromosomas, 19.6% 48, 4.6% 49 y 3.5% 50. Al comparar el tiempo de sobrevida libre de enfermedad se encontró que no hay diferencias significativas entre estas hiperdiploidias (40).

Se ha observado que generalmente los cromosomas adicionales son: 8,10,21 ó X. También puede acompañarse de alteraciones estructurales, siendo las más frecuentes las que implican regiones de 1q, 6p, 12p y 19p (40).

Se han reportado casos en niños de 10 años, con cuenta de leucocitos de $800 \times 10^6/L$, morfología L1 y células T, en que el cromosoma adicional es el 10 (48).

En una revisión de 11 casos con sólo trisomía 21 se encontró una edad media de 3.3 años (rango de 1 a 18 años), un conteo de leucocitos con una media de $11.6 \times 10^6/L$ (rango de 1.8 a $82 \times 10^6/L$) con riesgo bajo e inmunofenotipo de células precursoras B, teniendo períodos largos de sobrevida libre de enfermedad (49). En general esta hiperdiploidía se encuentra en morfología L1 e inmunofenotipo de células pre-B temprano (37).

Hipodiploidía/casi haploidía.

La hipodiploidía (<46 cromosomas) es encontrada en 7 a 8% de los casos de LLA en niños. (37,50). En la mayoría de estos casos (80%) el número de cromosomas es 45 y surge de pérdida de cromosomas enteros, de translocaciones no balanceadas ó de formación de cromosomas dicéntricos (37).

El cromosoma que más frecuentemente se pierde es el 20 y en algunos casos es la única anomalía. Es frecuente encontrar alta incidencia de translocaciones comparándola con la pseudodiploidía. El pronóstico es pobre a pesar del tratamiento intensivo. Los casos de hipodiploidía se dividen en tres subgrupos basados en citogenética y características clínicas: casi haploidía, hipodiploidía 30 a 40 e hipodiploidía 41 a 45 cromosomas (41).

Casi haploidía.

Las células blásticas de pacientes con casi haploidía muestran la retención de dos copias de los cromosomas 8,10,14,18,21 y del cromosoma sexual y tienen otra línea celular con doble número de cromosomas o índice de DNA doble que la primera línea, que no presentan anomalías estructurales. Se han encontrado inmunofenotipos pre-B temprano, pre-B y T, y la morfología por lo general es L1 (41).

Hipodiploidía 30-40 cromosomas.

Los cromosomas 1,19,21,22 y X o Y son de los que casi siempre se retienen 2 copias y una copia de los cromosomas 3,7,13,16,17. Puede haber varias líneas celulares que en ocasiones presentan anomalías estructurales. Se encuentra frecuentemente en células con inmunofenotipo pre-B temprano y morfología L1 (41).

Hipodiploidía 41-45 cromosomas.

Algunos casos con hipodiploidía 41-45 cromosomas muestran alteraciones estructurales y presentan múltiples líneas celulares. Los cromosomas que más frecuentemente se pierden son: 3,5,7,8,9,10,12,14 y 20 (41).

Las características clínicas de pacientes con LLA o hipodiploidía 30-40 o hipodiploidía 41-45 son similares, excepto que los pacientes con hipodiploidía 30-40 son niños de aproximadamente 10 años, en cambio la hipodiploidía 41-45 se

diagnóstica en edades más tempranas. Se ha encontrado con frecuencia en células pre-B tempranas y morfología L1. La respuesta a la terapia es pobre aún cuando la quimioterapia sea agresiva o se realice trasplante de médula ósea (37,41.).

Casi tetraploidía.

Es muy raro encontrar esta hiperdiploidía (1% en niños con LLA), por lo que el pronóstico es inseguro. En estudios recientes usando citogenética y citometría de flujo se encontraron dos pacientes con casi tetraploidía. El número modal de cromosomas estaba en el rango de 82 a 94. Se encontraron hasta 5 copias del cromosoma 21. Se ha relacionado con morfología L2 e inmunofenotipo de células T. la edad media de los pacientes es de 8 años al diagnosticarse (51).

Diploidía

No se ha relacionado directamente con una morfología de LLA. Sin embargo, se ha encontrado una mayor incidencia en LLA-T (37). El porcentaje de casos con cariotipo aparentemente normal (diploidía) es variable. Hoy en día más casos se han reportado con pseudodiploidía que diploidía, gracias a las técnicas de alta resolución y biología molecular que ayudan a detectar aberraciones cromosómicas más pequeñas, que con técnicas estándares no se alcanzaban a detectar. En cuanto al pronóstico

se considera como intermedio y debe basarse en datos clínicos y/o moleculares (37,40).

3.2.1.2-Anormalidades Estructurales.

En varios estudios citogenéticos en LLA se han descrito más de 15 anormalidades estructurales diferentes como eventos primarios, encontrándose t(1:19)(q23;p13), t(4:11)(q21;q23), t(9:22)(q34;q11), t(8:14)(q24;q11), t(10:14)(q24;q11), t(11:14)(p13;q11) y del (6q) entre las más frecuentes (41). Algunas de estas aberraciones se asocian con un inmunofenotipo y una morfología distintivos (41). Así la t(4:11) es una de las más comunes (1.6 a 11% en niños y 5.9 a 8% en adultos), junto con la t(1:19) (5% a 6%) (31,34) y la t(9:22) encontrada en 2.3% a 5% de los casos pediátricos (25).

Pseudodiploidía.

Estos pacientes tienen 46 cromosomas pero presentan rearrreglos estructurales. Se encuentra aproximadamente en 40% de los pacientes con LLA. La pseudodiploidía en blastos leucémicos es asociado con la enfermedad de "bulky", conteo alto de glóbulos blancos en sangre periférica, y elevada concentración de deshidrogenasa láctica en suero. La respuesta a la terapia en este grupo es extremadamente pobre. La quimioterapia debe ser múltiple, con excepción de algunas translocaciones (37,52,53).

t(1:19) (q23;p13)

En 1983 Carroll y cols. reportaron algunos casos de LLA de células pre-B (positivos a Ig de citoplasma y negativos a Ig de superficie) que presentaban t(1:19) (54).

En 1984 Williams y cols (55). describieron la asociación de anomalías que implican a los cromosomas 1 y 19 con inmunofenotipo pre-B en LLA.

Esta aberración está asociada con fenotipo de células pre-B en LLA y las células usualmente tienen morfología L1. Inicialmente no se sabía con certeza si el rearrreglo afectaba a 19p ó a 19q, ahora se sabe que el rompimiento ocurre en el brazo corto y se ha localizado en la subbanda 19p13.3. (37).

Esta translocación es común en niños con leucemia, con una incidencia de 5 a 6% (12). Se asocia con un fenotipo de células pre-B, sin embargo, en algunas ocasiones se ha encontrado en células tempranas pre B y células de línea T. Se ha observado que es más frecuente en niños con bajo número de linfocitos, CALLA positivos y fracaso temprano en el tratamiento (38).

Este rearrreglo puede ocurrir de dos formas: translocación balanceada (25%) ó no balanceada, t(1:19)(q23;p13).-19.+der(19) t(1:19) (75%) respectivamente (37). Shikano y cols.(50) reportaron en 1986 que esta translocación predecía un mal pronóstico, lo cual no fue confirmado. Secker Walker y cols. (56) reportaron 44 niños y 22 adultos con este rearrreglo, llegando a la conclusión de que los pacientes con translocación

no balanceada tienen mejor pronóstico que los pacientes con la translocación balanceada (56).

En la t(1;19) se produce la fusión de los genes E2A/PBX1. Mellentin en 1989 (43) mapeó el gen E2A en la región 19p13.2-p13.3 el cual incluye dos factores de amplificación ("enhancer") de inmunoglobulinas E12 y E47. Mientras que PBX1 (también PRL, células pre-B leucémicas) es un gen homeótico (homeobox) mapeado en la región 1q23 y del que aún se desconoce su función (44). El rearreglo da como resultado la síntesis de un transcrito más largo que el mensajero normal de E2A, del cual se desconoce su actividad (37,40).

Se ha postulado que la fusión de los genes E2A/PBX1, actúa como oncogen por lo que la proteína quimérica contribuiría al desarrollo de la LLA por alteración en la expresión del gen PBX1 y como consecuencia de la homeoproteína PRL (40).

t(4;11) (q21;23)

Este rearreglo fue descrito por primera vez por Oshimura en 1977 (57) y posteriormente por Van der Berghe en 1979 (58). La frecuencia reportada para esta translocación es 1.6 % a 11% en niños (59,60) y 5% a 8% en adultos (61). De los casos con LLA, se ha asociado preferentemente al sexo femenino (63%) y edad menor de un año (60%). Clínicamente cursa con cuadros muy agresivos con hiperleucocitosis, alto porcentaje de blastos en sangre periférica, hepatoesplenomegalia y/o linfadenopatías, con

infiltración a SNC (31,60,62). Esta translocación es asociada a un muy mal pronóstico. Pueden lograr una remisión completa pero la duración es menor a 4 meses. Cuando se presenta como anomalía única la sobrevida es de 7 a 12 meses, pero cuando se asocia con otros rearrreglos (translocaciones e hiperdiploidia con más de 50 cromosomas) el pronóstico mejora (58,63).

Se asocia a morfología L1 ó L2 del FAB e inmunofenotipo de células pre-B. Sin embargo, el origen de las células blásticas ha sido muy discutido ya que se han presentado evidencias de que las células presentan características de diferenciación hacia las líneas linfoides y mieloides (59,63).

La región 11q23 ha sido implicada en otras translocaciones, con cromosomas variables que incluyen 1p32, 4q21, y 19p13 en LLA y 1q21, 2p21, 6q23, 9p22, 10p11, 17q25 y 19p13 en LMA especialmente en el subtipo M5. La translocación más común en niños es la t(4;11) (q21;q23) y es asociada a LLA (64,65,66).

En 11q23 se ha localizado el gen HRX también llamado MLL (leucemia de linaje mixto) o LLA-1. En niños es común la translocación 11q23 y tiene mal pronóstico a pesar de la intensa quimioterapia (60,67).

Las alteraciones moleculares del gen HRX se han asociado a fracaso temprano en el tratamiento y un mal pronóstico. Por lo tanto niños con anomalías moleculares en el gen HRX representan un grupo con tasa alta de mortalidad (37,69).

Se debe hacer notar que el análisis citogenético sólo detecta 36% de los reareglos del gen HRX por lo que es importante realizar el análisis molecular en los pacientes pediátricos con LLA y mal pronóstico para poder detectar algún rearrreglo del gen (37). Esto se puede hacer mediante hibridación DNA-DNA tipo "Southern" o con Hibridación In_Situ Fluorescente (FISH) que permite detectar una delección de 600 a 700 Kb. ó la región del punto de ruptura del gen (60,62).

t(9;22)(q34;q11) Cromosoma Philadelphia (Ph+)

El cromosoma marcador 22q fue descrito por Nowell y Hungerford en 1960 (28). La translocación (9:22) (q34;q11) se demostró más adelante con las técnicas de bandedo. Originalmente sólo se asociaba con leucemia mieloide crónica (LMC), sin embargo, también se encuentra en pacientes con LLA (40). La incidencia de Ph+ en pacientes con LLA es de 3-6% en niños, mientras que en adultos aumenta a 15-25% (40).

En cuanto a la clínica, los pacientes con LLA Ph+ tienen una edad media de 9.6 años, alto número de leucocitos, gran porcentaje de blastos y alta incidencia de infiltración a SNC (37,39). Se presenta principalmente en LLA-L2, en cuanto a su inmunofenotipo 75% son de células pre-B tempranas, 16% de células pre-B y 9% de células T (37).

A nivel molecular, la t(9;22) une dos genes específicos, produciendo así un gen híbrido que codifica para una proteína con propiedades únicas. La región del cromosoma 22 implicada en el rearrreglo es conocida como bcr, "breakpoint cluster región" es decir región de agrupamiento de rupturas. En el cromosoma 9 se encuentra el protooncogen c-abl que es el homólogo celular normal del gen transformante del virus de la leucemia murina de Abelson (v-abl) (69).

La formación del cromosoma Ph a nivel molecular implica el movimiento del protooncogen c-abl a la porción 5' de la región bcr. Se considera que la región bcr activa al protooncogen c-abl al formarse un gen quimérico (69).

El punto de ruptura del cromosoma 9 ocurre sobre una secuencia de 200 Kb ó más. Los puntos de ruptura en el gen bcr, ocurren en una secuencia relativamente corta de aproximadamente 5.8 Kb. El producto del gen híbrido es una proteína de 210 KD (el gen normal abl codifica para una proteína de 145 KD), la cual se encuentra presente en 95% de los pacientes con LMC y en 30% de los que tienen LLA (69).

La proteína del gen bcr-abl tiene actividad de tirosinasa, pero a diferencia de la proteína normal de abl, esta proteína presenta una actividad enzimática intensificada y localización citoplásmica (69).

Aproximadamente 15% de las LLA tienen Ph + sin embargo, sólo la mitad tienen un defecto molecular similar al de las LMC, la otra mitad tiene otros rearrreglos de la región bcr y expresión bcr-abl de una proteína anormal, la p190, que también tiene una actividad incrementada de tirosinincinasa y fenotipo agudo (70,71).

El gen abl-bcr encontrado en la LLA Ph- se observó que se encuentra presente en 100% de los casos Ph+ indicando que el rearrreglo es más común en p190. Además se observó la presencia de dos tipos diferentes de secuencias (1b-e2 y 1q-e2) en las cuales se predice que codifica para dos proteínas diferentes, una de 890 aa (1b-e2) y otra de 871 aa (1a-e2) éstas tendrían el doble de tamaño en comparación con la proteína p210 (70,71).

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

Estas translocaciones se encuentran en pacientes con LLA-L3, inmunofenotipo de células B, clínicamente incluyen masas linfomatosas extramedulares en el abdomen ó en cabeza y cuello, afectación frecuentemente del SNC y los nervios craneales, e hiperuricemia con insuficiencia renal aguda a causa de nefropatía por ácido úrico. Una hipótesis razonable es que la leucemia aguda de células B representa una forma diseminada del linfoma de Burkitt. Estos padecimientos tienen en común características citogenéticas, moleculares, inmunológicas, citológicas y clínicas (2).

Estas translocaciones se han encontrado en LLA-L3 y en linfomas Burkitt. Estas translocaciones se presentan en leucemias de células B en 85 a 90% de los casos. La t(8:14) es la más común, 75 a 85% de los casos de LLA-L3, constituyendo las t(2:8) y t(8:22) el restante 10 a 15% (2).

Las tres translocaciones muestran en común el punto de ruptura en el 8, en la banda 8q24, lugar donde se encuentra ubicado el oncogen c-myc (el oncogen humano homólogo al del virus de la mielocitomatosis aviaria). El oncogen c-myc consta de tres exones interrumpidos por dos intrones. El primer exón en el extremo 5' tiene un codón de terminación y por lo tanto no se traduce a proteína. El segundo y tercer exones se transcriben a RNA mensajero y se traducen a una proteína con propiedades de unión a DNA (70).

Los otros tres cromosomas 2, 14 y 22 poseen genes de inmunoglobulinas localizados precisamente en los puntos de ruptura que caracterizan a las translocaciones antes mencionadas. En el cromosoma 14 se encuentran los genes para las cadenas pesadas, en el 22 para las cadenas ligeras lambda y en el 2 para las cadenas ligeras kappa (37)

En la translocación predominante t(8:14), el locus c-myc es translocado al cromosoma 14, adyacente a las secuencias de codificación para la región constante de las cadenas pesadas de inmunoglobulinas. Las secuencias de codificación de la región variable de las cadenas pesadas de inmunoglobulina se translocan

recíprocamente al extremo distal del cromosoma 8. En las translocaciones variantes, el gen c-myc permanece en el cromosoma 8 y las porciones respectivas de los genes de cadenas ligeras se translocan a este cromosoma (37).

En los últimos años se han acumulado una gran serie de experimentos que determinan que los miembros de la familia myc actúan como factores de transcripción, capaces de activar la transcripción de genes implicados en el crecimiento y diferenciación celular (71).

t(17:19)(q22:p13).

Esta translocación ha sido asociada con Leucemia de inmunofenotipo pre-B temprano y coagulación intravascular diseminada. De esta translocación resulta un transcrito quimérico producto de la fusión del gen E2A con el gen del factor de leucemia hepático (HLF) recientemente descubierto en el cromosoma 17 y que codifica para una proteína análoga a las previamente identificadas como factores de transcripción que contienen un cierre de leucina. Este gen regula la expresión de los estadios específicos del desarrollo. Al ser interrumpido el gen HLF por la t(17:19) se produce la fusión de la región básica del dominio de cierre de Leucina con el dominio transactivador del gen E2A, lo cual parece ser el evento que induce la leucemia.

El pronóstico de los pacientes con la t(17:19) parece ser incierto debido al limitado número de casos identificados (1X) (37).

t(1:14)(p32-p34;q11).

Esta translocación se observa en 3X de los pacientes con LLA e inmunofenotipo de células T. Molecularmente se unen los genes TAL1 (SCL1/TCL5) en el cromosoma 1 con el gen TCRA/5 en el cromosoma 14. La proteína que surge de la traducción del gen TAL1 ó SCL1, contiene secuencias que producen un motivo (dominio) de hélice-asa-hélice, de unión a DNA. Esta familia de proteínas está implicada en el control del crecimiento y diferenciación celular. Además se ha detectado una deleción del cromosoma 1 que incluye al gen SCL y aún llamado SIL (de locus que interrumpe a SCL). La deleción ocurre en 15 a 26% de los pacientes con LLA-T. Esta deleción no se puede detectar citogenéticamente, pero si haciendo un análisis molecular por Hibridación in Situ ó PCR (37).

Algunos investigadores especulan si la deleción del gen SIL/SCL contribuye a la transformación maligna de manera similar a la t(1:14), que también interrumpe la regulación de la región SIL/SCL. Por lo tanto la alteración de TAL1, en cualquiera de los dos casos, ya sea por translocación ó deleción representa una alteración genética asociada con leucemia de células T (37).

Anormalidades en 9p.

La deleción o translocación balanceada del brazo corto del cromosoma 9 incluye las bandas 9p21 y 9p22, y se han reportado en 7 a 14% de los pacientes pediátricos con LLA (72). Kowalozky y Sandberg (73) fueron los primeros en reportar pacientes con LLA y deleción parcial del brazo corto o monosomía parcial del cromosoma 9. Ellos sugieren que esta anomalía se asocia con LLA-T, alto porcentaje de células leucémicas y mal pronóstico. Chilcote y cols (74), subsecuentemente reportaron un análisis en niños y adolescentes con LLAT y anomalías en 9p, relacionando los cambios cromosómicos con presentación "linfomatosa" y con porcentaje elevado de células tumorales concentradas en los nódulos linfáticos y en el bazo (38).

Translocación y deleción 12p

En la actualidad se reconoce que las translocaciones ó deleciones que incluyen el brazo corto del cromosoma 12 se encuentran entre las anomalías genéticas más comunmente identificadas en la LLA de la infancia. Se encuentran translocaciones en 6% de los casos y otro 4% tienen deleciones simples de 12p. Las translocaciones tienen frecuentemente como punto de ruptura la banda 12p12 y pueden participar otros cromosomas en rearrreglos balanceados ó no de DNA. Más de 90% de estos casos tienen un inmunofenotipo pre-B y la mayor parte de los blastos son CALLA+ (2,37).

3.2.2 Anormalidades cromosómicas en LMA.

La LMA se diagnóstica con mayor frecuencia en adultos que en niños. En niños menores de 15 años representa cerca de 17% de los casos de leucemia. En contraste con la LLA, la LMA de la infancia no presenta una incidencia máxima durante los primeros años de vida (1,75,76).

Aproximadamente 67% de los pacientes con LMA tienen anormalidades cromosómicas en sus células de médula ósea en el momento del diagnóstico (77).

Entre los rearrreglos cromosómicos específicos de la LMA y sus subtipos, se encuentran: $t(8:21)(q22;q22)$ en M2, $t(15:17)(q22;q11)$ en M3, e $inv(16)(p13;q22)$ en M4 (75,76).

3.2.2.1 Anormalidades Numéricas.

Las anormalidades más frecuentes en cuanto a número son la ganancia del cromosoma 8 (13%) ó la pérdida del cromosoma 7 (9%). Estas se observan en la mayoría de los subtipos de LMA, variando su frecuencia. Sin embargo es importante aclarar que rara vez se presentan como rearrreglo primario (77).

En un estudio de 354 pacientes con pérdida ó ganancia de cromosomas el que con mayor frecuencia estaba supernumerario fue el 8 y los que se perdieron más frecuentemente fueron el 7 y el 5. La ganancia de cualquiera de éstos dos últimos cromosomas es raro observarla (77,78).

La pérdida de los cromosomas Y (siguiente en frecuencia) ó X ocurre a menudo en asociación con la t(8;21) (77,78).

El cromosoma 16 en ningún caso estuvo de más, así como el cromosoma 1 nunca se perdió (78).

3.2.2.2 Anormalidades Estructurales.

Las translocaciones y deleciones son los rearrreglos más frecuentemente observados. El cromosoma más frecuentemente implicado en rearrreglos es el 17, a menudo se observa como t(15;17) (79).

Los rearrreglos de los cromosomas 8,15 y 21 siguen en frecuencia y resultan en 2 translocaciones específicas: t(8;21) y t(15;17). Otras alteraciones encontradas son del (5q) ó rearrreglos de 11q e inv 4 (79).

t(8;21)(q22;q22).

En 1973 Rowley fue la primera en describir la translocación balanceada entre el cromosoma 8 y el cromosoma 21, t(8;21)(q22;q22) (80).

Esta translocación se observa en 10% de las LMA (5) revisiones anteriores muestran que se presenta frecuentemente en niños, aproximadamente en 17% (5).

La aberración se presenta sólo en monocitos y células granulocíticas por lo que se restringe al subgrupo M2 del FAB y ocasionalmente se asocia con M1 o M3 (56).

Esta translocación muy pocas veces se ve en pacientes con otros subtipos morfológicos y en un estudio realizado en casos pediátricos se ha visto predominantemente en niños mayores de 4 años. Los pacientes con esta translocación tuvieron un índice de inducción a la remisión más alto que aquéllos con morfología M2, y carencia de la translocación (75% contra 49%), no obstante la supervivencia promedio fue menor de 1 año en ambos grupos. Los protooncogenes *c-mas* del cromosoma 8 y *c-ets-2* del cromosoma 21 han sido localizados cerca de los puntos de ruptura, por lo que pudieran estar implicadas en la patogénesis de esta enfermedad (70).

t(15;17)(q22;q11)

Este rearrreglo estructural implica los brazos largos de los cromosomas 15 y 17 y se encuentra en leucemia promielocítica aguda (LPA), subgrupo M3 del FAB. Esta anomalía cromosómica es patognomónica de LPA y nunca se ha demostrado en otro tipo de neoplasias (76,81).

Este rearrreglo fue reconocido por primera vez por Rowley y cols. (81), sin embargo por muchos años la precisión de los puntos de ruptura de esta translocación fue controversial. El rearrreglo fue definido inicialmente como t(15;17)(q22;q22); sin embargo el punto real de ruptura en el cromosoma 17 es en q11.

Los pacientes con LMA-M3 con t(15:17) suelen presentar coagulación intravascular diseminada, que complica el tratamiento inicial (75).

En el punto de ruptura del cromosoma 17 se ha localizado el gen que codifica para el receptor alfa del ácido retinoico (RARA) y el gen PLM en el cromosoma 15 (82).

Esta traslocación recíproca balaceada conduce a la unión de los genes PLM/RARA y la recíproca RARA/PLM. El rearrreglo más común es PLM/RARA que se expresa en 100% de los casos de LPA, mientras que el segundo se expresa en sólo 70 a 80% de los casos (82).

Se ha comprobado in vitro que el producto quimérico de los genes PLM/RARA bloquea la diferenciación de la línea celular de los promielocitos y promueve el crecimiento celular por inhibición de la muerte celular por apoptosis (82).

Rearreglos Estructurales del cromosoma 16.

La asociación entre cambios estructurales del cromosoma 16q y eosinofilia en médula ósea fue reportada por Arthur y Bloomfield en 1983 (83). Ellos describieron cinco casos (tres con M2 y dos con M4) cuyos eosinófilos de médula ósea se encontraban significativamente aumentados (8-54%): todos los pacientes tuvieron una deleción del brazo largo del cromosoma 16 [del(16)(q22)] (83). Le Beau y cols (1983), no sólo confirmaron estos datos sino que también asociaron los rearrreglos en 16q con la presencia de eosinófilos anormales (88). En su reporte 18

pacientes con diferenciación mielomonocítica (M4) y eosinofilia, presentaron una inversión pericéntrica del cromosoma 16, [inv(16)(p13;q22)] (84).

La correlación entre los eosinófilos anormales y los rearrreglos estructurales del cromosoma 16 fue confirmada en el Cuarto Taller de Cromosomas en Leucemia (TICL) al encontrarlos en 40% de los pacientes con M4 con más de 5% de eosinófilos (85). A partir de aquí surge un nuevo subgrupo específico de LMA ya que el punto de ruptura es el mismo en las deleciones e inversiones (16q22). Esto sugiere que la existencia de un punto crítico en los rearrreglos del cromosoma 16 (83,84).

Otros autores han reportado translocaciones variantes que implican la banda 16q22 y otros segmentos del cromosoma como 16p13 (86). Sin embargo la inv(16)(p13;q22) sigue siendo el rearrreglo más común asociado a M4. Constituye 5% de todos los casos de LMA citogenéticamente anormales (86). Se consideran anomalías variantes la del(16)(q22), la t(16;16)(p13;q22) y las translocaciones entre 16q22 y otros cromosomas. Como cambio cromosómico adicional a estos rearrreglos, solo se ha reportado trisomía 8 (87,88).

Testa y cols. sugieren que la transformación maligna puede ocurrir en una célula madre multipotencial capaz de diferenciarse hacia las líneas neutrofílicas, monocíticas y eosinofílicas. Por lo que es lógico el hallazgo de inv(16) en leucemias tipo M2, M4 y M5b y probablemente esto también explique la eosinofilia (86).

El mecanismo molecular relacionado con este rearrreglo ha sido estudiado por Le Beau y cols.(1985)(89). Utilizando técnicas de hibridación in situ, encontraron que la familia de genes para la metalotionina (MT) se localiza en 16q22. La función de estos genes es la de proveer a las células de Zn en cantidades específicas, según sea la diferenciación hacia la línea granulocítica o monocítica, ya que los eosinófilos y granulocitos maduros tienen un alto contenido de Zn (93). Cualquiera que sea el rearrreglo en 16q22 interfiere con las funciones normales de los genes MT desencadenando el proceso leucémico (89).

Los pacientes con anomalías estructurales del cromosoma 16 tienen una buena respuesta a la terapia, remisión completa en un alto porcentaje y una supervivencia larga (26 a 35 meses). Sin embargo, se ha visto que estos pacientes tienen una infiltración en el Sistema Nervioso Central que les produce un tumor intracraneal, lo que empeora su pronóstico (90).

Rearreglos estructurales en el cromosoma 11.

Las alteraciones estructurales en 11q son relativamente comunes en la Leucemia Monocítica Aguda M5, sobre todo en el tipo "A" o leucemia monoblástica, la cual es más frecuente en niños que en adultos. Su incidencia en M5 tipo "B" o leucemia monocítica bien diferenciada es baja en niños y prácticamente nula en adultos (91). Las aberraciones en 11q son principalmente translocaciones

con diferentes cromosomas, sin embargo, también se han reportado algunas deleciones. El punto de ruptura principalmente es 11q23-24 aunque puede presentarse en 11q13-14 (88).

En el T1CL se reportaron aberraciones en 11q principalmente en pacientes con M5 tipo "A". Sin embargo también se encontraron estas aberraciones en pacientes con M4 y M2 (84). Aproximadamente 22% de los pacientes con M5 presentan una aberración implicando 11q (89). También se han registrado casos de M1, M4 y M6 con una $t(2:11)(p21;q23)$ (92) y casos de M4 altamente indiferenciada con una $t(4:11)(q21;q23)$ y que previamente se habían diagnosticado como LLA, debido a que dicha translocación afecta probablemente una célula madre pluripotencial (91).

De todos los los rearrreglos en LMA que implican 11q23 el que mejor se ha estudiado, por la cantidad de casos reportados es la $t(9:11)$ en M5(92).

El pronóstico de los pacientes con estas alteraciones es variable y depende de que cromosomas están relacionados con el rearrreglo. Se consideran de alto riesgo los que presentan $t(9:11)$, $t(11:17)$ y $t(10:11)$ ya que no entran en remisión con la terapia convencional. Los otros rearrreglos de 11q se asocian con un pronóstico intermedio, la mayoría de los pacientes entran en remisión completa en corto tiempo y tienen una sobrevida promedio de 9 meses (93).

CAPITULO 4

PRONOSTICO Y TRATAMIENTO DE PACIENTES PEDIATRICOS CON LEUCEMIA ACUDA.

El pronóstico de los pacientes pediátricos con leucemia aguda depende en primer termino del tipo celular implicado en la misma. siendo evidente en la actualidad que el pronóstico más favorable se produce en las leucemias linfoblásticas (1).

En este tipo de pacientes se ha podido establecer que existen una serie de factores, que tienen una evidente utilidad para identificar los grupos de pacientes con distinto pronóstico, con la finalidad de ajustar el tratamiento adecuado a cada grupo de riesgo Tablas 10 y 11 (21).

4.1 LLA

Con los tratamientos actuales de quimioterapia con múltiples fármacos y profilaxis de las recidivas en el SNC, en 95% de los pacientes de menos de 15 años se obtiene remisión, con la desaparición de las manifestaciones clínicas y biológicas. De ellos, entre 60 y 70% se mantienen durante más de 5 años en esta situación (79,94).

4.1.1 Factores pronósticos

EDAD. Destaca en primer lugar la diferencia en el pronóstico en relación con la edad.. la edad de 2 a 10 años es la de mejor pronóstico, seguida por la de 1 a 2 años y 10 a 30 años: en

último lugar, con una probabilidad de supervivencia inferior a 20%. quedan los menores de 1 año (79,94).

CUENTA DE LEUCOCITOS. Junto a la edad, el factor pronóstico más importante es la cifra inicial de leucocitos. El pronóstico guarda relación inversa con el nivel de leucocitos antes de iniciar el tratamiento. Aunque es una variable continua, se suelen tomar como criterio de alto riesgo las cifras por encima de 50.000 leucocitos/ml en niños (79,95).

VICEROMEGALIA. La presentación linfadenomatosa con viceromegalias superior a 5 cm bajo reborde costal, adenomegalias superiores a 3 cm, masas mediastínicas, tumoraciones ó infiltraciones de órganos (testículos, piel riñón), también implica un mayor riesgo de recaídas (2,3).

INFILTRACION A SNC. Cerca de 5% de los pacientes presenta infiltración a SNC al momento del diagnóstico, lo cual implica mal pronóstico (79,95).

DESHIDROGENASA LACTICA (DHL). La deshidrogenasa láctica se encuentra en todos los tejidos. Los glóbulos rojos y blancos contienen grandes cantidades de DHL. Cuando se encuentra elevada esta enzima, nos indica que el paciente presenta enfermedad activa. En las enfermedades malignas, cabe encontrar aumentos considerables, en especial si existe mucha metastasis, en cuyo caso se han encontrado cifras incluso superiores a 10.000 U/ml (95).

T A B L A 10.

Factores pronósticos en la leucemia linfoblástica aguda infantil (21).

Factores	Favorable	Desfavorable
Edad	2 a 7 años	<2 y > 10 años
Sexo	Femenino	Masculino
Leucocitos	>10.000/ml	>50.000/ml
Adenopatías	Ausentes	Presentes
Hepatoesple- nomegalias	Ausente a moderada	Notable
Infiltración a SNC	Ausente	Presente
Masa mediastínica	Ausente	Presente
Morfología del FAB	L1	L2, L3
Inmunofenotipo	B común (CD10)	T, B, Nulo.
DHL	Baja	Elevada
Citogenética	Hiperdiploidia >50 cromosomas	Hipodiploidias, t(9;22).t(8;14). t(4;11).t(1;19).
Receptores de glucocorticoides	Número elevado	Número escaso
Respuesta al tratamiento de inducción (día 14)	MO 5X blastos	MO 25X blastos

TABLA 11
ALTERACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES EN LLA (17)

REARREGLO CROMOSOMICO	FRECUENCIA: x	FAB	INMUNO-FENOTIPO	REMISION: x	S.V. (m)	GENES IMPLICADOS	PRODUCTO PROTEICO
t(9:22)(q34;q11)	5	L1/L2	pre-B	54	12	abl/ber	p190 Tc
t(1:19)(q23;p13)	6	L1	pre-b	<50	12	pcl/e2a	F.Transc/HB
t(11:19)(q23;p13)	<1	L1/L2	pre-b	<50	<12	hrx/enl	PQ/unión DNA
t(17:19)(q23;p13)	<1	L1/L2	pre-b	<50	6	hlf/e2a	F.Transc/ZIP
t(4:11)(q21;q23)	2	L1/L2	mixto	69	7	af4/hrx	F.Transc/ZF
t(8:14)(q24;q32)	2	L3	-B	60	5	myc/igh	PQ/HLH
t(8:22)(q24;q11)	<1	L3	-B	60	5	myc/IgL	PQ/HLH
t(2:8)(p11;q24)	<1	L3	-B	60	5	Igk/myc	PQ/HLH
t(1:14)(p32;q11)	<1	L1/L2	-T	?	?	tall/ter a	?/HLH
t(8:14)(q34;q11)	<1	L1/L2	-T	53	9	myc/ter a	PQ/HLH
t(10:14)(q24;q11)	?	L1/L2	-T	?	?	hox11/terd	?/HB
t(11:14)(p15;q11)	?	L1/L2	-T	?	?	Rhom1/terd	?/LIM
t(11:14)(p13;q11)	?	L1/L2	-T	?	?	Rhom2/terd	?/LIM
t(7:19)(q35;p13)	<1	L1/L2	-T	<50	5-12	terB/ly11	?/HLH

FENOTIPO INMUNOLOGICO. Tiene también importancia para el pronóstico. El análisis de amplias series de niños ha permitido la siguiente escala, de mejor a peor pronóstico: B-comun (CD10), B-inmaduro CALLA-, pre-B, T.nulo y B (79,95).

SUBTIPO MORFOLOGICO. El subtipo favorable es L1 seguido por la L2, y de mal pronóstico la L3 (79,95).

SEXO. Los varones padecen mayor número de recaídas. Esta diferencia se explica, al menos parcialmente, por el riesgo de infiltración testicular (79,95).

HALLAZGOS CITOGENETICOS. El estudio citogenético juega un papel importante en el rol de la leucemogénesis. Estudios de rupturas cosómicas en leucemia han sido asociados a anomalías citogenéticas que comprenden genes importantes en la patogenia de la leucemia. Análisis de cambios estructurales en protooncogenes y genes tumor supresor son importantes en la transformación maligna (37).

El pronóstico de las anomalías citogenéticas en LLA ya está bien establecido (Tabla 2). Las hiperdiploidias de más de 50 cromosomas tienen un significado favorable, si no van acompañadas de traslocaciones, las hiperdiploidias con 47 a 50 cromosomas están asociadas a un pronóstico intermedio, en tanto que las hipodiploidias señalan un mayor riesgo de recaída (37,38).

Los pacientes con pseudodiploidia principalmente con t(4;11), t(1;19), t(9;22), t(8;14), y rearrreglos que implican a los

cromosomas 14q, 12p, 9p, y 7q son de mal pronóstico, sobrevidas menores a un año y un bajo porcentaje adquiere remisión completa. Sólo la del(6q) se considera de pronóstico intermedio (38).

En los pacientes que se encuentran en remisión, la presencia de alteraciones cromosómicas secundarias será indicativa de recaída aún cuando no se presente sintomatología clínica (37,38).

Así bien hay que recordar que las alteraciones citogenéticas deben de relacionarse con los datos clínicos para poder dar un mejor pronóstico al paciente, y poder elegir el tratamiento adecuado, por ejemplo: Hiperdiploidia con más de 50 cromosomas es asociada con inmunofenotipo de células pre-B tempranas, expresión del antígeno CD10, bajo número de leucocitos, niveles bajos de DHL en suero, y edad entre 2 y 10 años, por lo tanto es asociado a buen pronóstico. Al contrario encontramos que los pacientes con casi tetraploidia presentan inmunofenotipo de células T, y edad de mayor de 10 años por lo que presentan alto riesgo (1,2).

Finalmente un factor pronóstico importante es la rapidez de la respuesta al tratamiento de inducción. Los pacientes que a los 14 días de inicio del tratamiento no presentan blastos en sangre periférica y presentan menos de 5% en médula ósea evolucionan mejor que aquéllos en los que hay persistencia de blastos, aunque éstos alcanzan la remisión a las 4 ó 5 semanas de tratamiento. Por el contrario, aquellos pacientes con más de 25%

de blastos en el aspirado de médula ósea después de 14 días de tratamiento, deben de ser considerados como de alto riesgo (95,96).

La evaluación de los factores mencionados se utiliza para identificar categorías de pronóstico e identificar grupos de mayor o menor riesgo de recaida (38,96).

4.1.2. Tratamiento.

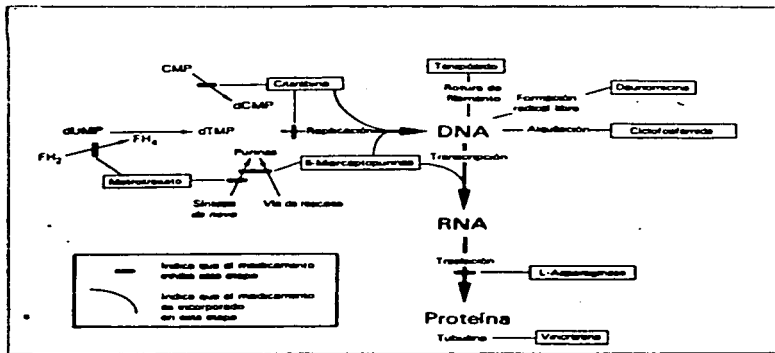
Quimioterapia

La quimioterapia nace y se desarrolla como consecuencia de la ineficacia de las medidas exclusivamente locales, incluso de las más radicales, en el control sistémico de la enfermedad. La mayor parte de los procesos malignos que afectan al niño y al adolescente, ya presentan en el momento del diagnóstico enfermedad microscópica diseminada, susceptible de ser curada solamente con la aplicación de tratamientos sistémicos.

La mayor parte de los citostáticos actúan afectando la síntesis o función del DNA de células en fase de proliferación ó en fases inmediatamente previas a ésta, pero sin lesionar células en fase de reposo (97) (figura 2).

Farmacológicamente, la acción de los citostáticos guarda relación con la concentración de la droga y con el tiempo de exposición a esta. De acuerdo con su actividad en el ciclo

Figura 3: Mecanismos de acción de los fármacos antileucémicos de mayor uso. FH2, dihidrofolato (factor inactivo); FH4, tetrahidrofolato (cofactor activo); dUMP, desoxiuridina monofosfato.



celular. los medicamentos se clasifican en no-ciclodependientes (incluyen aquéllos que actúan independientemente del momento biológico en el que se encuentra la célula), ciclo dependientes (incluyen medicamentos que actúan en células que se encuentran en diferentes fases del ciclo celular, G1, S, G2, M) y fase dependientes (incluyen medicamentos que actúan exclusivamente sobre células en una fase específica del ciclo celular) (97).

El tratamiento comprende tres fases: una de inducción a la remisión o de citorreducción rápida, otra de profilaxis de las recidivas en SNC y finalmente, una fase de quimioterapia de continuación o de mantenimiento: ésta última tiene por objeto eliminar las células leucémicas residuales en fase G₀ que vayan entrando en ciclo celular. A estas fases se añade, al menos en los grupos de alto riesgo, un tratamiento de consolidación precoz (79).

Grupo de riesgo

Se utilizan tratamientos diferentes para los distintos grupos de riesgo. Los criterios para la asignación de los pacientes a uno u otro grupo de riesgo son variables, dependiendo de los datos clínicos y de laboratorio encontrados al ser diagnosticada la leucemia (79).

Tratamiento de inducción.

Pretende obtener en un plazo relativamente corto, de 4 a 5 semanas, una situación de remisión completa. En los protocolos actuales esta fase del tratamiento es, en general común para los distintos grupos de riesgo, e incluye la administración de 4 citostáticos (prednisona o prednisolona, vincristina, asparagina y daunorrubicina) a lo largo de 4 semanas. A ellos puede unirse ciclofosfamida al final de este periodo (21,97).

Además, algunos protocolos incluyen en esta fase una de dos dosis de quimioterapia por vía intratecal para el tratamiento de SNC. Con el tratamiento descrito, entre 95 y 98% de los pacientes alcanzan la remisión completa (RC). Como ya se mencionó también, tiene importancia pronóstica la reacción inicial ante el tratamiento (79).

Tratamiento sobre SNC.

Desde 1970 el tratamiento convencional ha venido siendo la combinación de irradiación holocraneal (entre 18 y 24 Gy) y 5 ó 6 dosis intratecales de metrotexate, administradas inmediatamente después de alcanzar la remisión. Mediante este tratamiento se consiguió disminuir la tasa de infiltración a SNC desde 40-50% hasta menos de 10%. No obstante, las secuencias neurotóxicas y sobre las funciones intelectuales, atribuibles a los efectos aditivos de ambos tratamientos, y la potencialidad

oncogénica de la irradiación llevaron a la búsqueda de métodos alternativos que excluyeran el empleo de irradiación craneal (79,21).

Se ha comprobado que la administración intratecal de al menos 10 dosis de metotrexate (MTX) combinado con arabinósido de citosina (ARA-C), con la adición de hidrocortisona (HC) o sin ella, tiene una eficacia similar a la del tratamiento con irradiación. Al menos en los pacientes de bajo y mediano riesgo (79).

También el MTX a dosis altas, administrado por vía intravenosa, ha sido empleado con la misma finalidad. La tendencia actual es la de no utilizar la irradiación craneal salvo en el grupo de pacientes de alto riesgo. En algunos pacientes se combina la administración de 3 dosis de MTX (3g/m² en infusión de 24 horas) con sendas infusiones intratecales de un combinado de MTX, ARA-C e HC, además arabinósido de citosina en dosis altas (1g/m² en infusiones de 3 horas, 4 dosis), también asociado a una inyección intratecal (79).

Durante esta fase que sigue a la inicial de inducción, se añade a estos últimos protocolos terapéuticos, mercaptopurina oral en la medida en la que el grado de depresión medular lo permita (97).

El número de infusiones de quimioterapia intratecal es variable: desde 10 en el curso de los primeros 6 meses, hasta 15 o más dosis, a lo largo de 1 a 2 años. A los pacientes de alto riesgo se les sigue administrando el tratamiento combinado (con

irradiación holocraneal). Por lo general, se administran al menos 6 dosis de quimioterapia intratecal, que se inician temprano, y se retrasa la aplicación de radioterapia (entre 18 y 24 Gy) hasta después del tratamiento de consolidación (97).

Tratamiento de consolidación e intensificación.

Tras las dos fases anteriores del tratamiento, los pacientes del grupo de bajo riesgo pueden pasar a la quimioterapia de continuación o mantenimiento (79).

En el grupo de alto riesgo se considera necesario un tratamiento de refuerzo o consolidación. Este puede tener características similares a las del tratamiento de inducción o introducir nuevos fármacos como el tenipósido o el AEA-C. En otros esquemas se prefiere dar intensificación más corta intercalada con el tratamiento de inducción (79,97).

Quimioterapia de continuación o de mantenimiento.

Es común a todos los grupos de riesgo y consiste generalmente en la administración de mercaptopurina en dosis diarias y MTX en dosis semanales durante un periodo comprendido entre 18 y 24 meses. Las dosis iniciales suelen ser de 60 mg/ml de mercaptopurina y 15 mg/m² de metrotexate, adaptándose posteriormente en función de los niveles de leucocitos, granulocitos y plaquetas (21,79).

Duración del Tratamiento.

Con los actuales protocolos de quimioterapia inicial intensiva o de intensificación sucesiva, no parece necesario prolongar la quimioterapia de mantenimiento más allá de 2 años. La duración total del tratamiento oscila, según los distintos planes, entre 2 y 3 años. Aproximadamente, 10% de los pacientes recaen durante el año siguiente a la suspensión del tratamiento, y entre 3 y 5% en el curso del segundo año (79).

Posteriormente, la tasa anual de recaídas es inferior a 2%. Transcurridos 4 años desde la suspensión de la quimioterapia, la presentación de recaídas es excepcional. Los varones recaen en mayor proporción después de la suspensión del tratamiento; la diferencia, en buena parte, obedece a la presencia de recidivas testiculares (79).

Resultados.

Con los tratamientos actuales, entre 65 y 70% de los niños aquejados de LLA alcanzan una sobrevida sin recaída, que en la mayoría de los casos es equivalente a curación definitiva de la enfermedad. La intensificación de la quimioterapia ha tenido efectos positivos, especialmente en los pacientes con variedades de alto riesgo (31,79).

4.1.3 Trasplante de médula osea (TMO).

El trasplante de médula osea es un procedimiento de utilización creciente en pacientes con procesos neoplásicos. Empleado al principio indiscriminadamente y por lo general en situación de enfermedad avanzada o terminal, a lo largo del pasado decenio se ha ido perfeccionándose la técnica, y sobre todo, han ido estableciéndose con más precisión sus indicaciones. Paralelamente se ha profundizado en el conocimiento y prevención de sus complicaciones y efectos secundarios a mediano y largo plazo (98). Ya en los años 50 se iniciaron los trasplantes en pacientes con leucemia, si bien fue en el decenio siguiente cuando el conocimiento más amplio del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA) permitió identificar posibles donantes sanos para la práctica del trasplante. La médula ósea es el órgano más afectado por los agentes antineoplásicos, si pueden evitarse los efectos tóxicos sobre ella, las dosis de estos agentes pueden incrementarse para obtener un efecto terapéutico mayor (99,100).

La infusión de médula osea al enfermo tras aplicarle radioterapia corporal total, quimioterapia intensiva o ambas, puede evitar sus efectos abrasivos (100).

Existen tres modalidades de trasplante: en el denominado singénico se aplica al enfermo médula ósea proveniente de un hermano gemelo idéntico; en el trasplante autólogo la TMO utilizada para la reinfusión procede del propio enfermo. En

estos dos tipos de trasplante no existen diferencias genéticas ni antigénicas entre la médula injertada y el receptor. El tercer tipo de trasplante es el alogénico, en el cual un donante genéticamente no idéntico al receptor proporciona el injerto medular (100,101).

Como es lógico el trasplante alogénico es poco frecuente en la práctica clínica. El alogénico ha sido el más utilizado, si bien, en los últimos años el autólogo está adquiriendo un gran incremento (101).

El TMO en primera remisión ha sido recomendado por especialistas en trasplantes, como una forma apropiada de tratamiento para los niños con LLA de alto riesgo (101).

No obstante las mejoras, en el tratamiento de LLA en la infancia algunos grupos de niños mantienen un alto riesgo de recaída. La cuenta de leucocitos, la edad, ciertas traslocaciones cromosómicas son factores importantes para predecir la recaída, sin embargo, la cuenta de leucocitos es el determinante más confiable y seguro en el pronóstico del paciente. Los avances en el tratamiento de la LLA de alto riesgo han implicado usualmente incrementos en la intensidad de la quimioterapia, pero la alternativa de altas dosis de quimioterapia/radioterapia y el trasplante alogénico de médula ósea han representado el mejor resultado en la obtención de la remisión (101).

En conclusión el TMO es un buen método para lograr la remisión en niños con LLA de alto riesgo, el problema es encontrar un donador HLA-compatibles, para evitar la respuesta inmunológica de rechazo (huesped-donador) (101).

4.2 LMA.

El objetivo del tratamiento de la LMA infantil es obtener una remisión completa sostenida y, de ser posible la curación del niño (21.102).

4.2.1 Tratamiento

El paso inicial es conseguir una remisión completa, que se define por la ausencia de signos y síntomas clínicos atribuibles a la leucemia, por la ausencia de blastos en la sangre periférica y por la presencia de menos de 5% de blastos en la médula ósea con una celularidad normal (102).

Una vez conseguida la remisión completa se intenta mantenerla, para lo cual se administra una quimioterapia continuada o, en caso de que existan donantes compatibles, se procede a un trasplante de médula ósea (21.102).

El tratamiento inicial del niño en que se ha diagnosticado LMA debe dirigirse a estabilizar su situación clínica. Si el enfermo está sangrando o tiene una trombopenia severa ($<20,000/mm$)

deberan administrarse plaquetas con objeto de mantenerlas en $>20.000/mm$ (5,21,102).

Si existen datos a favor de una coagulación intravascular diseminada (CID), deberá tratarse con plasma fresco congelado que aporte factores de coagulación y plaquetas. En la LMA M3 y M5 hay quien recomienda el empleo profiláctico de heparina, 500/kg cada 6 horas. El fibrinógeno debe comenzar a ascender dentro de las 24 horas siguientes a la iniciación del tratamiento con heparina. Si no es así la dosis debe doblarse. Es importante recordar que cuando se ha hecho el diagnóstico de una CID no se deben administrar transfusiones de plaquetas hasta después de iniciado el tratamiento con heparina, para evitar agravar la coagulopatía (102).

Inducción a la remisión

El empleo de dos drogas es más eficaz que el de una sola, el tratamiento de inducción debe dirigirse a la obtención de una aplasia medular severa. Los regímenes de quimioterapia más efectivos asocian antraciclina y arabinósido de citosina (ara-C). En general se administra ara-C en infusión continua o dos veces al día durante 7 días, y la antraciclina durante los 3 primeros días (102).

Utilizando ara-C y antraciclina en sus diversas combinaciones, el índice de remisiones completas se acerca al 75-80% de los niños.

El tratamiento de inducción es extremadamente mielosupresor, por lo que deben tomarse todas las medidas de soporte posible para mantener al enfermo durante el periodo de aplasia medular, es previsible una toxicidad gastrointestinal (náuseas, vómitos, mucositis) y hepática, así como alopecia (21.102).

Tratamiento de consolidación.

La inducción a la remisión consigue en general disminuir la masa leucémica presente en el momento del diagnóstico. Sin un tratamiento adicional, más de 90% de los enfermos recese al cabo de un año (14.21.).

Este tratamiento adicional podría consistir en un tratamiento de mantenimiento poco mielosupresor, un tratamiento de consolidación similar al de inducción o un tratamiento de intensificación consistente en el empleo de las mismas drogas que para la inducción, pero en dosis más altas y alternando con otras drogas no utilizadas previamente para evitar la resistencia cruzada (14.21.102).

La necesidad de un tratamiento de consolidación o de intensificación en los adultos es aún objeto de discusión. Sin embargo, su indicación parece establecida en niños. Weinstein y col (102), diseñaron un protocolo (VAPA) en el que se utilizó quimioterapia secuencial después de la remisión. El 74% de los niños alcanzaron la remisión completa, y el 45% de ellos la mantenían al cabo de 5 años (14.102).

4.2.2 Trasplante de médula ósea.

La LMA es uno de los procesos en los que se ha debatido más la indicación de trasplante de médula ósea (100).

Actualmente el TMO alogénico se plantea en esta enfermedad como el tratamiento de elección una vez conseguida la RC. En tal situación, los datos de centros como Fred Hutchinson (Seattle) y los de otros equipos indican un 20% de recaídas postrasplante a los 5 años, y una sobrevida libre de enfermedades de 55 a 70% frente a una de 30 ó 40% en los tratados sólo con quimioterapia (100).

La indicación del trasplante de médula ósea autólogo en la LMA del niño se ha reservado hasta ahora a aquellos casos en los que se produce una recaída o que tienen un mal pronóstico en el momento del diagnóstico (100).

CAPITULO 5
MATERIAL Y METODOS

5.1 Material Biológico

Para la realización de esta tesis se estudiaron 20 muestras de pacientes pediátricos con Leucemia Aguda recibidas en el Servicio de Genética del Hospital General de México S.Sa. entre 1990 y 1993, previamente clasificados por los criterios morfológicos y citoquímicos del FAB (103).

Se trabajó con muestras de médula ósea y/o sangre periférica de cada paciente. El cultivo de sangre periférica se realizó por la técnica habitual(104). Las muestras de médula ósea se procesaron por técnica directa y/o cultivo de 48 a 72 horas, sin estimulación con fitohemaaglutinina. Las muestras de sangre periférica en todos los casos se sembraron, con y sin estimulación con fitohemaaglutinina. Todos los casos fueron bandeados con técnica de bandas GTG (105). Las alteraciones cromosómicas se reportan de acuerdo a la nomenclatura del ISCN, considerando una clona anormal cuando se observan al menos dos células pseudodiploides ó hiperdiploides, ó tres células hipodiploides con la misma alteración. La presencia de una clona normal se establece por la observación de al menos una célula sin alteración. En sangre periférica, el cultivo debe ser sin estimulación para considerar la existencia de una clona normal.

5.2 CARIOTIPO DE MEDULA OSEA(103)

- 1.-Agregar 0.5 a 1.0 ml de aspirado de médula ósea heparinizado a un tubo cónico, el cual lleva 9 ml KCl 0.075M mas 0.5 ml de tripsina-EDTA al 25% mas 0.5 ml de colchicina a una concentración final de 0.08 μ g/ml.
- 2.-Esta suspensión de células se incuba a 37° C durante 1 hora, después de transcurrido el tiempo se centrifuga a 3.000 rpm durante 5 minutos.
- 3.-Decantar el sobrenadante y resuspender el botón, fijar en metanol-ácido acético 3:1 fresco y frío, dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 4.-Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos y resuspender otra vez en fijador, repetir los cambios de 5 a 10 veces según se requiera.
- 5.-Las preparaciones se hacen goteando la suspensión de células a una altura variable dependiendo de la dispersión y concentración de las células sobre el portaobjetos, cuando sea necesario las preparaciones se pasan por la flama para obtener mejores resultados. Se tiñen con Giemsa (3 ml de Giemsa mas 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) durante 3 a 5 minutos.
- 6.- Se observan al microscopio y se analizan.
- 7.-Se hacen laminillas para someterlas a bandas GTG.

5.3 CARIOTIPO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (104).

- 1.- Las muestras de sangre se toman en condiciones estériles con jeringa heparinizada.
- 2.- Colocar 0.5 ml de de sangre en 5 ml de medio de cultivo McCoy 5a suplementado con suero fetal de ternera (0.5ml) y antibióticos (penicilina 1000 U/ml/estreptomicina 275 mg/ml). Las muestras se trabajan por duplicado adicionando solo a uno de los frascos el mitógeno (fitohemaglutinina PHA).
- 3.- Incubar a 37° C durante 76.5 hrs. Adicionar 0.5ml de solución de colchicina al 0.02% - incubar a 37° C por 1.5 hrs.
- 4.- El cultivo se transfiere a tubos curvos y se centrifugan a 3.000 rpm durante 5 min.
- 5.- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón. Agregar 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M) a 37° C agitando en el vortex. Dejar reposar durante 30 minutos a 37° C.
- 6.- Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos decantar el sobrenadante y agregar gota a gota y agitando en el vortex 5ml de fijador recién preparado y frío (metanol-acido acético 3:1). Dejar reposar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 7.- Centrifugar a 3.000 rpm durante 5 minutos decantar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de fijador. Repetir esta operación cuantas veces sea necesario hasta obtener un botón blanco y un sobrenadante claro (5 veces aproximadamente).
- 8.- Para hacer las preparaciones decantar el sobrenadante y adicionar aproximadamente 10 gotas de fijador para

reasuspender. Tomar con la pipeta pasteur y gotear desde una altura variable dependiendo de la morfología de las metafases, sobre la laminilla perfectamente limpia y desengrasada. Dejar secar al aire.

9.- Teñir con Giemsa durante 3-5 minutos lavar con agua corriente y dejar secar.

10.- Observar al microscopio, si las metafases están muy cerradas se pueden abrir haciendo las laminillas desde una altura mayor o dando mas cambios de fijador. En ocasiones es necesario hacer las laminillas a la flama (sobre portaobjetos bañado en alcohol al 70% y pasando por la flama para secar). Si por el contrario las metafases están muy abiertas, es posible refrigerar el boton para que se cierran las mitosis durante toda la noche y posteriormente hacer las laminillas.

5.4 BANDAS GTG (105).

Las bandas G son consideradas como un tipo de bandeo positivo, son estructuras constituidas por heterocromatina intercalar que comprenden cerca de 50% de las cromátidas, se reconocen por sus cualidades cromofílicas especialmente para la solución Giemsa, Wright y otros colorantes básicos. Además son relativamente resistentes al tratamiento con calor y a la digestión con enzimas proteolíticas, urea y detergentes.

1.-Las preparaciones cromosómicas se dejan envejecer durante una semana. Se colocan las laminillas por aproximadamente 10" o mas

según cada caso en una solución que contiene 3 ml de solución de tripsina al 1% + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8 a 37°. se lavan con solución salina isotónica y posteriormente en agua corriente, se tiñe con Giemsa (5 ml de colorante de Giemsa mas 45 ml de buffer de fosfatos pH 6.9) un minuto y se secan al aire.

Se observan las laminillas al microscopio y se localizan metafases en donde estén bien bandeados los cromosomas y estén bien abiertas las metafases para facilitar su análisis. Algunas veces el estudio se facilita recurriendo a la fotografía.

Solución de tripsina al 1%

Se disuelve un gramo de tripsina en 100 ml de amortiguador de fosfatos 0.01M pH 6.8 libre de calcio y magnesio. Agitar durante 5 ó 6 horas, filtrar y fraccionar en alícuotas pequeñas (de 5-10 ml) guardar en el congelador.

Solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8.

KH ₂ PO ₄	6.63 g
Na ₂ HPO ₄	2.56 g
H ₂ O DESTILADA	1000 ml

Técnica de alta resolución.

Con esta técnica se obtienen cromosomas más elongados permitiendo tener un número mayor de bandas y mejor definición, por lo que facilitan el análisis de microdeleciones y translocaciones.

- 1.- Tomar la sangre en condiciones estériles, con jeringa heparinizada.
 - 2.- Para cada muestra se utilizan dos tubos de polipropileno con 7-8 gotas de sangre en 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado (0.5 ml de suero fetal bovino (10%) + 0.2 de fitohemaglutinina y antibióticos).
 - 3.- Incubar durante 72 horas a 37° C. se adiciona metotrexate a una concentración final de 10^{-7} M (10 μ l de una solución de 10^{-5} M a cada 5 ml de muestra).
- Se mezcla bien para inducir la sincronía, se incuba a 37°C por 17 horas.
- 5.- Centrifugar a 3.500 rpm durante 5 minutos decantar el sobrenadante y adicionar 5 ml de solución Hank y resuspender las células en condiciones estériles. Repetir el lavado.
 - 6.- Decantar el sobrenadante y adicionar 5 ml de medio RPMI 1640 y BrdU (100 U1) incubar a 37°C durante 5 horas.
 - 7.- Adicionar colchicina al 0.02% a una concentración final de 50 μ l por cada 5 ml de medio.
 - 8.- Dejar incubar a 37° C durante 5 minutos.

- 9.- Centrifugar a 3.500 rpm 5 minutos. Decantar el sobrenadante y adicionar 5 ml de solución salina hipotónica (KCl 0.0375 M) se incuba a 37°C por 30 minutos.
- 10.- Centrifugar los tubos a 3.500 rpm por 5 minutos, decantar y fijar las células con fijador recién preparado y frío (metanol absoluto-ácido acético glacial 3:1) adicionarlo gota a gota con una pipeta Pasteur agitando en el vortex para evitar precipitar la muestra. Dejar reposar la muestra durante 30 minutos.
- 11.- Repetir esta operación cuantas veces sea necesario para obtener un botón blanco y un sobrenadante transparente (aproximadamente 4 a 5 lavados).
- 12.- Para hacer las preparaciones decantar el sobrenadante y adicionar aproximadamente 10 gotas de fijador para resuspender. Tomar con una pipeta Pasteur y dejar caer de 2 a 3 gotas sobre cada laminilla. Dejar secar al aire.
- Teñir con Giemsa durante 5 minutos (3 ml de Giemsa más 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8). Lavar con agua común y dejar secar.
- 13.- Revisar al microscopio.
- 14.- Hacer laminillas para bandas GTG.

CAPITULO 6

RESULTADOS

Se analizaron 20 pacientes pediátricos con diagnóstico de Leucemia Aguda, 10 masculinos (50%) y 10 femeninas (50%), con rango de edad entre 2 meses y 15 años, predominando los pacientes de 15 años (5 casos, 25%).

El diagnóstico morfológico fue: LLA en 15 pacientes (75%) de los cuales 10 (66.6%) presentaban L2 y 5 (33.3%) L1. En 4 pacientes el diagnóstico fue LMA de 4 tipos, 2 (50%) fueron M1, uno M3 y otro M5. Un paciente fue diagnosticado como ARMB-T que evolucionó a LMA secundaria (LMA2) (Gráfica 1).

Los datos clínicos de los pacientes al realizarse el diagnóstico tomados en cuenta para este estudio fueron: edad, sexo, cuenta de leucocitos, diagnóstico del FAB, y tipo de tratamiento. Se presentan en las tablas 12 y 13.

El riesgo clínico para los pacientes con LLA se estableció tomando en cuenta los siguientes factores: edad (2 a 7 años bajo riesgo), sexo (femenino bajo riesgo), cuenta de leucocitos ($<10,000/ml$ favorable) y morfología del FAB (L1 bajo riesgo).

La remisión completa se estableció cuando el paciente estaba clínicamente asintomático. En 13 pacientes (65%) se observó la remisión completa. 2 fallecieron (10%) sin respuesta al tratamiento y en 5 se desconoce su evolución.

La sobrevida de los pacientes se determinó, a partir del momento en que fueron diagnosticados, hasta el momento en que se concluyó este estudio. El rango de sobrevida observado fué de 3 a 20 meses.

De los estudios citogenéticos obtenidos, 12 se realizaron en sangre periférica estimulada y 8 en médula ósea sin estimulación. Solo en 3 pacientes se realizó el estudio con técnica de alta resolución.

En el cariotipo inicial todos los pacientes presentan clones anormales (95%), excepto uno que presentó cariotipo normal (5%), predominando los rearrreglos estructurales (60%) sobre los numéricos (40%) Gráfica 2.

De los rearrreglos estructurales encontrados cada paciente presentó diferente alteración, predominando las translocaciones (85%). En cuanto a los rearrreglos numéricos encontrados, 4 (57%) fueron hiperdiploidía de 47 a 50 cromosomas, 2 (28%) presentaron hipodiploidía de 45 cromosomas y sólo uno 1 (14.4%) presentó hiperdiploidía de >50 cromosomas (Gráficas 3).

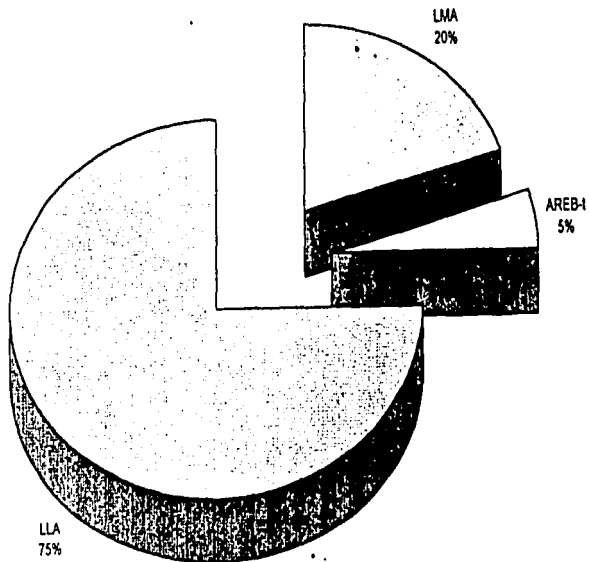
Además de la clona anormal, 13 pacientes presentaron clona normal. 4 en médula ósea y el resto en sangre periférica estimulada. También se pudo observar que en 13 casos sólo hubo alteración primaria y en los 6 casos restantes se observaron alteraciones secundarias.

En las fotos 1, 2 y 3 se muestran algunas de las alteraciones citogenéticas encontradas en nuestros pacientes.

El riesgo final para cada paciente fué determinado en base a la alteración cromosómica primaria en el cariotipo inicial, clasificándose en bajo riesgo aquéllos que presentaban sólo anomalías numéricas, exceptuando la hipodiploidía y como alto riesgo a los pacientes con uno ó varios rearrreglos estructurales y/o hipodiploidía.

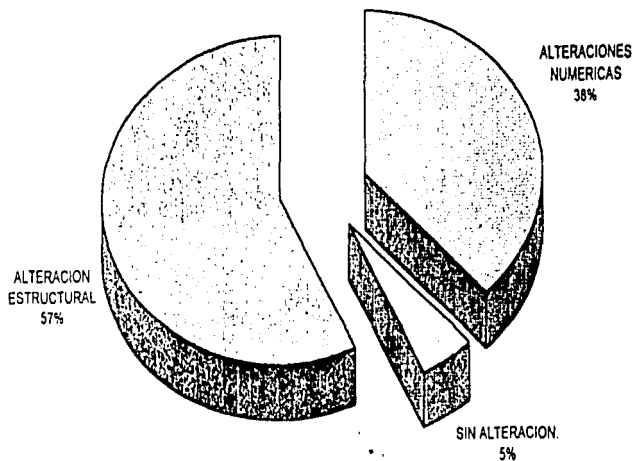
Gráfica No.1

DIAGNOSTICO DEL FAB EN LA.



Gráfica No.2

ALTERACIONES ENCONTRADAS EN PACIENTES
PEDIATRICOS CON LA.



ANORMALIDADES NUMERICAS EN PACIENTES PEDIATRICOS CON LLA.

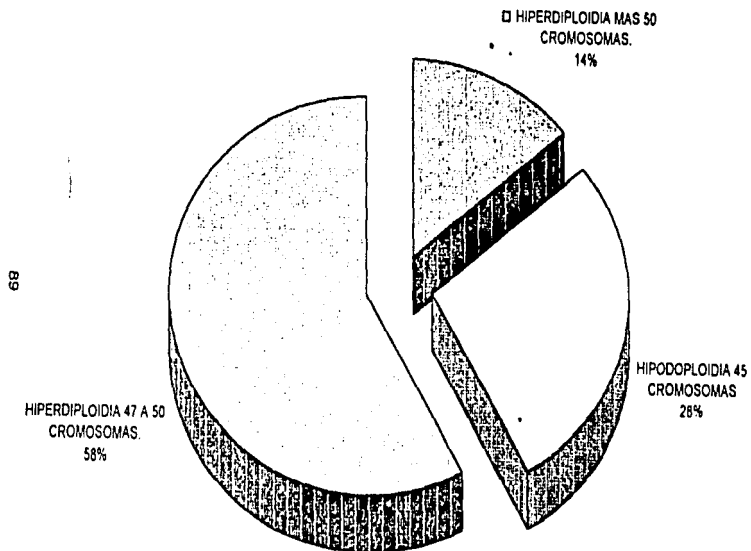


TABLA 12

DATOS CLINICOS Y CITOGENETICOS DE PACIENTES PEDIATRICOS CON LLA

No Caso Edad/Sexo	Dx. FAB	Leuc/ml	Riesgo Clinico	Trat. Resp.Trat.	S.V. (m)	Mat/FCR NN/AA/AN	Cariotipo
1/3F	L1	7,400	Bajo	O P D/RC	>8	MO 7/NN	46,XX
2/8M	L1	5,500	Intermedio	O P D/RC	7	SPe 5/AN	46,XY,Hyperdiploidia (47-50)
3/12M	L1	6,000	Intermedio	O P A/RC	>13	SPe 17/AN	46,XY,Hyperdiploidia (47-50)
4/10F	L1	4,000	Bajo	O P/RC	>20	SPe 12/AN	46,XX,46,XX,del(6)(q21-34) Hyperdiploidia (>50)
5/14F	L1	4,300	Intermedio	?	>5	SPe 8/AN	46,XX,46,XX,t(1;19)(q21,p13)
*6/13M	L2	17,400	Alto	O G A M/RC	>6	MO 11/AA	46,XY,t(7;12)(q24,q21), inv(4)(q21q34),del(6)(q21)
7/12M	L2	2,800	Intermedio	?	?	MO 8/AN	45,XY,Hyperdiploidia (40-49)
8/15M	L2	2,500	Intermedio	P V C/RC	>4	SPe 16/AN	46,XX,Hyperdiploidia (47-50) (+8,-21)
9/13F	L2	3,100	Bajo	P A G F/RC	>17	MO 10/AN	46,XX,Hyperdiploidia (>50)
*13/6F C	L2	79,500	Alto	O P A J/RC	>4	SPe 20/AN	47,XX,+21/ 47,XX,+21,t(6;12)(q21,p11)
11/15M	L2	18,000	Alto	A O M/RC	>4	SPe 20/AN	46,XY,46,XY,t(9;22)(q34,q11)
12/15M	L2	69,000	Alto	Ai A +SR	+	MO 10/AN	46,XY,45,XY,-7
15/9F	L2	214,000	Alto	O P +SR	+	SPe 13/AN	46,XX,46,XX,t(2;4)(p11,q21)
14/13F	L2	5,000	Intermedio	O P/RC	?	SPe 8/AA	Hyperdiploidia (47-50) (+13,+18)
15/11F	L2	20,000	Alto	?RC	?	SPe 10/AA	46,XY,t(1;5)(p36,q13),t(8;11)(q24,p13)

*Antecedentes de predisposición, C Six Down, +Fallido, RC remisión completa, SR, en respuesta, O. Oncovir, P. productivo, A. Altruista, M. metástasis, Ai = A.C. G. general, Al. alérgico, V. virótica, Ac. F. & f. físico, MO. médula ósea, SP. sangre periférica, NN. células normales, AN. células normales y anormales, AA. células anormales, ç. Alta resolución

TABLA 13

DATOS CLINICOS Y CITOGENETICOS DE PACIENTES PEDIATRICOS CON LMA

No. Caso Edad/Sexo	Dx. FAB	Trat. Resp. Trat.	S.V. (m)	Mai/Cel NN/AN/AA	Cariotipo
16/7M	M2	VAPAL/RC	3	MO/12/AN	46,XY,(46,XY),(8,21)(q22,q21)
17/9:F	M2	VPAr/RC	?	MO/8-AA	46,XX,(8,21)(q22,q21)
*18/6F	M3	Ar A.C/RC	4	SPe/24-AA	46,XX,(15,17)(q22,q21) 46,XX,(15,17)(q22,q21),(17q)
19/15M	M5	Ar P/RC	?	SPe/10/AN	46,XY/ 46,XY,del(4)(q21-34),inv(16)(p13q22)
20/2m/M	AREB-1 LMAg	OPV?	?	MO/11/AN	46,XY:45,XY,-7/ 48,XY,-9,+14,+22,-mar

RC remisión completa, V vincristina, A adriamicina, P prednisona, Ar Arca, Ar Aza-C, C citarabina, *Antecedentes de predisposición, MO médula ósea, SPe sangre periférica estimulada, NN células normales, AN células normales y anormales, AA células anormales, ϕ alta resolución

Foto 1: Cariotipo del caso No 5 46.XX.t(1:19)(q21:p13).



Foto 2. Cariotipo del caso 15
46.XY.t(1:5)(p36;q13).t(8:11)(q24;p15)

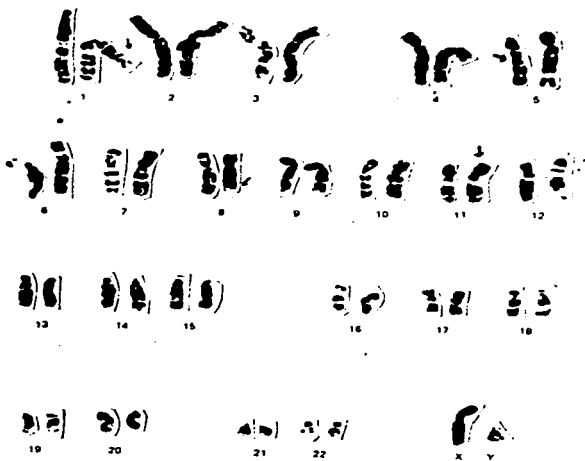
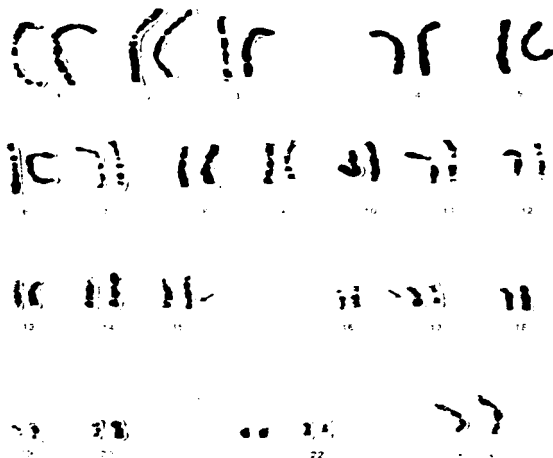


Foto 3. Cariotipo del caso 18: 46,XX,t(15:17)(q22;q21)



CAPITULO 7
DISCUSION Y CONCLUSIONES

En la bibliografía se reporta que, de los pacientes pediátricos con leucemia, la mayoría presentan Leucemia Linfocítica Aguda (2). en este estudio encontramos que 15 pacientes (75%) presentaron LLA y sólo 4 (20%) presentaron LMA, lo cual está de acuerdo con lo reportado.

También se ha visto que de las LLA los tipos más frecuentemente encontrados son LLA-L1 y LLA-L2 y rara vez se encuentra LLA-L3. en el presente estudio solo tuvimos pacientes con LLA-L1 (26.7%) y LLA-L2 (73.3%). En la literatura L1 es mas frecuente que L2 (2).

En cuanto a los datos citogenéticos, se ha encontrado que aproximadamente 70 a 94% de los pacientes con LA presentan anomalías en el cariotipo, predominando los rearrreglos estructurales (mas de 50%) (41). En este estudio encontramos que 95% presentó alteraciones cromosómicas, 60% estructurales y 40% numéricas. Sólo un paciente tuvo cariotipo normal.

En 14 pacientes se observaron líneas normales en su cariotipo, sin embargo, sólo 5 tienen valor pronóstico por ser encontradas en médula ósea, las demás fueron detectadas en sangre periférica estimulada por lo que no se pueden considerar.

En dos casos (5. y 18) los métodos de alta resolución revelaron la presencia de alteraciones cromosómicas no detectadas por técnica habitual (t(11:19)(q21:p13) y t(15:17)(q22q21).i(17q) respectivamente), reafirmando la necesidad de utilizar esta metodología como rutina en leucemias.

De acuerdo a lo reportado por Secker-Walker y colaboradores (42), los niños con hiperdiploidia de 50 cromosomas como alteración primaria en el cariotipo de células leucémicas, tiene un pronóstico relativamente favorable y en aquellos con hiperdiploidia con menos cromosomas, muestran un pronóstico menos favorable (43,44). En nuestro estudio encontramos a un paciente (caso 9) con hiperdiploidia 50 cromosomas, el cual presentó morfología L2, alcanzó remisión completa y tiene >17 meses de sobrevida, lo cual nos indica un riesgo bajo tanto clínico como citogenético, ya que además de la clona anormal tiene células normales, lo que predice un buen pronóstico.

En cuanto a la hiperdiploidia 47-50 cromosomas se encuentra reportado que 10 a 15% de los casos diagnosticados como LLA en niños la presenta y tiene un pronóstico intermedio al compararlo con otro tipo de ploidias. Se ha visto que principalmente se encuentran 47-48 cromosomas, observándose que generalmente los cromosomas adicionales pueden ser : 8, 10, 21 y X (39). En este estudio encontramos 4 casos (casos 2, 3, 8 y 14) con

hiperdiploidía 47-50 cromosomas, en dos de ellos se encontraron 48 cromosomas, observándose como cromosomas adicionales, +8 y +21 en el caso 8 y +13 y +18 en el caso 14. El caso 8 comprueba lo reportado en la bibliografía ya que los cromosomas adicionales eran el 8 y el 21. En cuanto la morfología de los fueron L1 (casos 2 y 3) y de los L2 (casos 5 y 14). El promedio de leucocitos fué de 4.750 y los pacientes fueron tratados con quimioterapia combinando prednisona con otros medicamentos. Los 4 pacientes alcanzaron la remisión completa. En los casos 8 y 3 la sobrevida fue 24 y 13 meses respectivamente, de los otros dos casos se desconocen estos datos. El riesgo clínico fue intermedio para estos pacientes, al igual que el citogenético. En los 4 pacientes se detectó clona normal pero en todos ellos el análisis fue realizado en sangre periférica estimulada por lo que no puede considerarse para el pronóstico.

Entre las diferentes anomalías estructurales reportadas en la literatura como eventos primarios en LIA, se encuentran, t(1;9)(q23;p13), t(9;22)(q34;q11) y del t(6)(q) entre las más comunes (41). Estas anomalías también las encontramos en este estudio y a continuación se describen.

En el caso 4 tenemos a un paciente femenino de 10 años de edad con diagnóstico del FAB L1 y 4000 leuc/ml, por lo que el riesgo clínico se considera como bajo. Alcanzó remisión completa y

hasta el cierre de este estudio tenía más de 20 meses de sobrevida. En el estudio citogenético encontramos tres líneas celulares: una normal, 46,XX la cual no puede considerarse por haberse encontrado en muestra de sangre periférica estimulada con fitohemaglutinina, otra línea celular mostró del(6)(q) y la tercera línea celular presentaba hiperdiploidía de 50 cromosomas. Aun cuando se podría considerar de alto riesgo por presentar alteración estructural y alteración secundaria, se considera de bajo riesgo, ya que se ha considerado de pronóstico intermedio a la del(6)(q), con buena respuesta al tratamiento. Además la hiperdiploidía 50 cromosomas es considerada de riesgo bajo (42), lo cual mejora el pronóstico de la paciente.

El caso 5 es un paciente femenino de 14 años de edad con diagnóstico del FAB L1 y 4300 leucocitos/ml por lo que su riesgo clínico es considerado intermedio. Presenta clona normal, la cual no se considera para el pronóstico puesto que el estudio fue realizado en sangre periférica estimulada, además presenta t(1:19)(q23:p13) la cual tiene un pronóstico controversial. Algunos investigadores la consideran de alto riesgo (41), sin embargo, Raymond (35) sugiere que la sobrevida de estos pacientes pueden mejorar con tratamientos intensivos. Nuestro paciente integró R.C. y tiene más de 5 meses de sobrevida, sin embargo, se desconoce el esquema de tratamiento (Foto 1).

En el caso 6 se trata de un paciente masculino de 15 años, inicialmente diagnosticado como L2 con t(2:12), inv(4q), del(6q) y que presentó infiltración ganglionar. Se clasificó clínicamente como linfoma linfoblástico y se consideró con un riesgo clínico alto. La presencia de una alteración cromosómica poco frecuente correlaciona con este riesgo, además de presentar alteraciones estructurales secundarias que empeoran el pronóstico.

El caso 10 se trata de una niña de 6 años de edad con síndrome de Down y L2 con t(8:12), quien al momento del estudio se encontraba en primera recaída. En este caso el riesgo clínico se considera alto, puesto que tiene el factor de predisposición por ser un paciente con trisomía 21, además de tener un rearrreglo estructural considerado de mal pronóstico. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la paciente integra su remisión con quimioterapia (OPAL) y lleva 4 meses asintomática.

El caso 11 es un paciente masculino de 15 años de edad con L1a-L2 y una cuenta de leucocitos de 18900/ml. Su riesgo clínico fue considerado como alto y coincidió con la alteración cromosómica, t(9:22)(q34;q11), que es considerada de mal pronóstico ya que estos pacientes tienen una alta incidencia de infiltración a SNC (36.39%). El paciente lleva 4 meses en remisión.

En los casos 12 y 13 los pacientes clínicamente de alto riesgo, presentaron monosomía 7 y t(2:4) respectivamente, ambos fallecieron durante la inducción a la remisión.

El caso 15 es un paciente femenino de 11 años de edad, con 20.000 leucocitos/ml, un riesgo clínico alto, se desconoce el tratamiento pero se sabe que alcanzó la remisión completa. En cuanto a cariotipo se encontró 46.XY.t(1:5)(p36;q13),t(8:11)(q24;p15). Este caso se considera de alto riesgo ya que presenta alteración estructural secundaria, además de que las dos alteraciones son consideradas de mal pronóstico (Foto 2).

En cuanto a la LMA, está reportado en la bibliografía que es poco frecuente encontrarla en pacientes pediátricos, siendo el pronóstico desfavorable (17). En nuestro estudio encontramos 4 pacientes (20%) con LMA.

Se ha reportado en la bibliografía la translocación balanceada entre el cromosoma 8 y el cromosoma 21 t(8:21)(q22;q21) en 10% de las LMA. Ésta se presenta frecuentemente en niños, aproximadamente 17% (5). La aberración sólo se encuentra en monocitos y células granulocíticas por lo que se restringe al subgrupo M2 del FAB y ocasionalmente se asocia con M1 (56). En nuestro estudio encontramos 2 pacientes con LMA M2 y t(8:21)

(q22;q21) (casos 16 y 17) los dos pacientes entraron a remisión completa, de un paciente la sobrevida es 23 meses (caso 16) y del otro se ignora el dato.

En el caso 18 se trata de una paciente con leucemia promielocítica aguda (M3) y sarcoma granulocítico con t(15;17) 4 i(17q), que logró remisión completa con sobrevida de 4 meses, es interesante señalar que la paciente fue producto gemelar monocigótico y su gemela falleció por la misma neoplasia, lo cual ejemplifica la predisposición familiar en este caso (Foto 3).

El caso 20, paciente de 2 meses de edad que inicialmente fue diagnosticado como AREB-T, evolucionó a LMA y presentó 3 líneas celulares, 45,XY,-7/46,XY/hiperdiploidia 47-48 cromosomas en muestra de médula ósea. En este caso la presencia de monosomía 7 en la AREB-T se correlaciona con un alto riesgo, de evolución a LMA secundaria, lo cual ocurrió en nuestro paciente.

En el presente estudio podemos concluir que existe una correlación entre los rearrreglos cromosómicos y los criterios de riesgo clínico en LLA. Los pacientes de riesgo clínico alto generalmente presentaron alteraciones consideradas de mal pronóstico: t(9;22), t(2;12), t(6;12), t(2;4) t(1;5) y las de

riesgo clínico intermedio presentaron: monosomía 7, trisomía 8 y 21, mientras que los de menor riesgo clínico tuvieron alteraciones numéricas de pronóstico bueno.

La detección de anomalías cromosómicas en pacientes pediátricos con leucemia aguda es un auxiliar importante en el diagnóstico de estos padecimientos. El estudio citogenético debe ser considerado en la elección del tratamiento y en la evaluación del riesgo y pronóstico de los pacientes así como en su seguimiento.

CAPITULO 8
Bibliografía

- 1.- Negia JP, Robinson LL. "Epidemiología de las leucemias agudas de la infancia" En Clínicas Pediátricas de Norteamérica Poplack DG Nueva editorial Interamericana. 41: 727-746 1988.
- 2.-Look T. "Citogenética de la leucemia de la infancia: consecuencias clínicas y biológicas" en Clínicas Pediátricas de Norteamérica. Leucemia. Poplack DG. 4. 775-790. 1988
- 3.-Miller EJ. "Laboratory Medicine Hematology" 6th ed. Masby Company London. 714-726. 1982
- 4.- Head ED, Downing EJ. "Pathology and Immunology of leukemia" Current opion on Oncology. 4: 14-22. 1992
- 5.-Lenvell BS, Thorup OA. "Leucemia en Hematología Clínica".Cuarta Edición. Mexico D.F 1978.
- 6.- McKenzie SB."Aspectos generales y clasificación de la leucemia aguda en Hematología Clínica". Manual Moderno.Mexico D.F. 314-330. 1991
- 7.-Greaves M. "A Natural History for Pediatric Acute Leukemia" Blood: 82:4 1043-1051 1993
- 8.- Catovsky D, Matute E. "The classification of acute Leukaemia" Leukemia 4: 14-23. 1991
- 9.-Gutierrez EM. "Leucemias" Manual del Servicio de Hematología Hospitl General de Mexico S.S.S. 1-24. 1986

- 10.-Behnett JM. y cols: "Proposals for the Classification of the acute Leukemias". Br. Haematol.33:451. 1976.
- 11.-Ruiz AG."Leucemias Agudas" Clinicas Médicas Mexicanas. 1:1.10-18 1987
- 12.- Rapaport I. "Introducción a la Hematología". 2a. ed. Salvat Barcelona España. 287-316. 1988
- 13.-Mackenzie GB. "Leucemia Aguda en Hematología Clínica". Manual Moderno Mexico D.F. 331-347. 1991
- 14.-Riehm H. fechert H. Lameert F. "Acute Lymphoblastic Leukemia" En: Cancer in Children. Voute P. Berret A. Bloom JH 2a Ed Springer Verlag Berlin 191-198 1986
- 15.-Freeman A. Nadler L. "Cell Surface Markers in Hematologic Malignancies". Seminars in Oncology 14:199-212 1987.
- 16.-Koch RR. Gale RB."Acute Leukemia in Hematology". Figueroa W.G. John Wiley and Sons. San Francisco USA. 197-214. 1981
- 17.-Heim S. "Cytogenetic Analysis in the Diagnosis of Leukemia". Cancer 1791-1792. 1992
- 18.-Pui C-H Hancock M. "Clinical Significance of CD34 Expression in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia". Blood 82:3 889-894. 1993
- 19.-Pui C-H Behm F. "Clinical and Biologic of Immunologic Studies in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia". Blood 82 2 (July 15). 343-362.1993
- 20.-Heim S. Mitelman F. "Cancer Cytogenetics". Alan R. Liss. New York. 140-173. 1987

- 21.-Fernandez D. Donat J."Leucemia Agudas Infantiles Tratado de Medicina Práctica. 2736-2746.1988
- 22.-Heim S. Bekassy A. Garwicz S. Heldup J. "Bone Marrow Karyotype in 94 Children with acute Leukemia". Eur J. Haematol 44:227.1990.
- 23.-Boveri T." Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren Gustav Fisher". Jena. 1914.
- 24.-Barch MJ." The ACF Cytogenetics Laboratory Manual. 2s.e.Ed. Raven Press. LTD. New York.1990
- 25.-Crist W. Carroll A. Shuster J. Jackson J. "Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome". A pediatric Oncology Group Study. Blood 76:985. 1990.
- 26.-Tjio JH. Levan A." The chromosome number of man". Hereditas. 42:1-6. 1956.
- 27.-Moorhead PS. Nowell PC. "Chromosome preparations of leukocyte cultures from human peripheral blood". Exp. Cell Res. 1960.
- 28.-Nowell PC. Hungerford LN. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132:1197. 1960
- 29.-Rowley JD." A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining". Nature 243:290-292. 1973
- 30.-Caspersson T. Zech L. Nobel Symposium 23. Chromosome Identification. Academic Press. New York and London. 1973.

- 31.-Nowell PC. "Biology and Disease: Cancer, Chromosomes and Genes". Laboratory Investigation 69(4):407-417. 1992.
- 32.-Paris Conf. 1971. "Standardization in Human Cytogenetics In: Birth defects": Natl Found. March of Dimes. New York 8:1256-1537. 1972.
- 33.-ISNC : "An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.In: Birth Defects. Natl Found. March of Dimes. New York 1:14. 1978.
- 34.-Salamanca F. "Nomenclatura de los Cromosomas normales y anormales". en Citogenética Humana. Medica Panamericana. México D.F. 63,74 1988.
- 35.-Heston WE. "The Genetic Aspect of Human Cancer". Adv. Cancer Res. 23:1. 1976.
- 36.-Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia (1980) "Chromosomal Abnormalities in Acute Lymphoblastic Leukemia". Cancer Genet Cytogenet 4:101-110 1981.
- 37.-Raimondi S. "Current Status of Cytogenetics Research in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia" Blood. 81:(9) 2237-2251.1993.
- 38.-Heim S. Mitelman F. "Cytogenetic Analays in the diagnosis of acute leukemia". Cancer suppl. 70:1701-1709. 1992.
- 39.-Sandberg A. "The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia." New York. Elsevier North. Itolland 1980.

- 40.-Pui Ch. William. M. "Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia". Blood 76:8 1449-1463. 1990.
- 41.-Arana TR. Cervantes FA. "Estudio citogenético en 22 adultos y 3 niños con leucemia linfoblástica aguda". Rev. Inv. Clin. 45:43-8. 1993.
- 42.-Secker-Walker L. Lawler E. "Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis". Br Med J 3:1459-1459 1978.
- 43.-Pui Ch. Williams A. "Hypodiploidy is associated with a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia". Blood 70:247. 1987.
- 44.-Williams A. Teilsta A. "Prognostic importance of chromosome number in 106 untreated children with acute lymphoblastic leukemia". Blood 69:994. 1982.
- 45.-Williams A. Harber J. "Chromosomal translocations play a unique role in influencing prognosis in childhood acute leukemia". Blood 68:205. 1986.
- 46.-Heinonen K. Kautonen J. "Cytogenetic Study of 105 Children with Acute Lymphoblastic Leukemia". Eur. Haematol 41:237.1988.
- 47.-Look A. Melvin E. "Aneuploidy and percentage of S-phase cells determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute leukemia". Blood 67:415. 1982.

- 48.-Berger P. Le Coniat M. "Cytogenetic studies of 44 T-cells acute lymphoblastic leukemias". *Cancer Genet Cytogenetic*. 44:69. 1990.
- 49.-Raimondi S. Pui C-H. "Trisomy 21 as the sole overquired chromosomal abnormality in children with acute lymphoblastic leukemia". *Leukemia* 6:171. 1992.
- 50.-Heim S. Bekassy AN. "Bone marrow karyotypes in 94 children with acute leukemia". *Eur J Haematol* 44:227. 1990.
- 51.-Pui C-H Carroll AJ Raimondi SC. "Near-triploid and Near-tetraploid Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood" *Bloo* 76: 590-593 1990.
- 52.-Fletcher J. Kimball V. "Prognostic implications of cytogenetic studies in an intensively treated group of children with acute lymphoblastic leukemia". *Blood* 74:2130. 1989.
- 53.-Rivera G. Raimondi S. "Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia with reinforced early treatment and rotational combination chemotherapy". *Lancet* 337:61. 1991.
- 54.-Carroll A. Crist WM. "Pre-B acute Lymphocytic Leukemia and Chromosome translocation 1:19". *Am J Hum Genet (abstr)*. 35:60. 1983.
- 55.-Williams DL. Look AT. "New chromosomal translocations correlate with specific immunophenotypes of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cell* 36:101-109 1994.

- 56.-Van der Plas DC, Hählen K. "Prognostic Significance of Karyotype at Diagnosis in Childhood Acute Lymphoblastic Anemia". *Leukemia* 6(3) 176-184. 1992.
- 57.- Oshimura M, Freeman A.I, Sandberg A. "Chromosome and an causation of human cancer and leukemia XXVI Banding Studies in acute lymphoblastic leukemia" *Cancer* 40:1161-1173. 1977.
- 58.-Vanden Berghe H, Broeckxart-Van D.G. "A new chromosome anomaly in acute lymphoblastic leukemia". *Human Genetic* 46:172-180. 1979.
- 59.-Mirro J, Kellingman G, Williams A. "Clinical and Laboratory Characteristics of Acute Leukemia with the 4:11 translocation". *Blood* 67:689. 1986.
- 60.-Rubnitz J, Link M. "Frequency and Prognostic Significance of HRX Rearrangements in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia": a Pediatric Oncology Group Study. *Blood* 84(2) 579-83. 1994.
- 61.-Hagemeyer A, Van Dongen J. "Characterization of the blast cells in acute Leukemia with translocation (4:11):Report of eight additional cases and one case with a variant translocation". *Leukemia* 1:24. 1987.
- 62.-Cherif P, Bernard O. "Hunting 11q23 deletions with Fluorecence in situ hybridization (FISH)". *Leukemia*. 8(4) 578-86. 1994.
- 63.-Schardt C, Ottman GO, Hoelzer D, Ganser A. "Acute Lymphoblastic Leukemia with the (4:11) Translocation: combined

- cytogenetic, immunological and molecular genetic analyses".
Leukemia 6:370-374 1992.
- 64.-Chen ChS, Poul HB. "Molecular Rearrangements on Chromosome
11q23 Predominate in Infant Acute Lymphoblastic Leukemia and Are
Associated with Specific Biologic Variables and Poor Outcome".
Blood, 81, 2386-2393, 1993.
- 65.-Fai C-H, Laurence S. "Clinical Characteristics and Treatment
Outcome of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with the
t(4;11)(q21;q23): A collaborative study of 40 cases". *Blood*, 77,
440-447, 1991.
- 66.-Chen S, Boehm E. "Break point clusterin in t(4;11)(q21;q23)
Acute Leukemia". *Blood*, 78, 2498-2504, 1991.
- 67.-Copelan E, McGuire, E.A. "The biology and treatment of
acute lymphoblastic leukemia in adults". *Blood* 85:5, 1151-1168,
1995.
- 68.-Shannon K. "Genetic Alterations in Leukemia:Events on a
Grand Scale" *Blood* 80:1 1-2 1992
- 69.-Dobrovic A, Peters G.B. "Molecular analysis of the
Philadelphia chromosome". *Chromosoma* 100:479-486, 1991.
- 70.-Arana RM. "Estudio citogenético en pacientes con leucemia
aguda". Tesis U.N.A.M. 1990
- 71.-DeFino R, Schreiber-Agus N. "Myc Family Oncogenes in the
development of normal and neoplastic cell." *Adv. Cancer Res.* 57:
1-45 1991

72. Smith SD. "Chromosome 9 abnormalities in childhood cell leukemia". N Engl J. Med. 315:195 1986
- 73.-Kowalozyc J, Sandberg AA: "A possible subgroup of AAL with 9p-" Cancer Genet Cytogenet 9:385 1983.
- 74.-Chilcote R. "Lymphoblastic leukemia with lymphomatous features associated with abnormalities of the short arm of Lymphomatous Features Associated with Abnormalities of the short arm of chromosome 9 N. Engl. J. Med. 310:286. 1985.
- 75.- Walker H, Smith EJ "Cytogenetics in Acute Myeloid Leukemia" Blood Reviews 8 39-50 1994
- 76.-Le Beau M. "Cytogenetic Analysis of Hematological Malignant Diseases" in "The ACF Cytogenetics Laboratory Manual," 2s ed. Raven Press, New York, 335 1991
- 77.- Fourth International workshop on Chromosomes in Leukemia. Cancer Genetic Cytogenet 7: 149 309 1984
- 78.- Samuels BI, Larson RA " Specific Chromosomal Abnormalities in Acute Non-lymphocytic Leukemia Correlate With Drug Susceptibility in Vivo. Leukemia 1:179-83 1988
- 79.-Ortega AJ. "Leucemia Aguda Linfoblastica" en Oncologia Pediatrica. Sierra Semagor, Galvo F. Ed. McGraw Hill-Interamericana. 253-269. 1992
- 80.- Rowley JD "Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in patient with acute leukemia" AnnGenet 16:109-112 1973.

- 81.-Rowley JD "15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukemia " *Lancet* 1:549-550 1977.
- 82.-Lafage Pochilatoff M, Alcalay M. "Acute Promyelocytic Leukemia cases with non reciprocal t(ML/RAR α / RAR α /FMC Fusion Genes." *Blood* 85:5. 1169-1174. 1995.
- 83.- Arthur D., Bloomfield CD "partial deletion of the arm of chromosome 16 and bone marrow eosinophilia in acute nonlymphocytic leukemia: new association" *Blood* 61:994-998 1983.
- 84.-Le Beau MM, Larson RA, Rowley JD "Association of a inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophilia in acute myelomonocytic leukemia" *N.Engl J med.* 309 639-636. 1983.
- 85.- Dela Chapelle A, Lahtiinen, K "Chromosome 16 and bone marrow eosinophilia" *N Engl J Med.* 309 1334 1983.
- 86.- Teata JE, Hogg JE, "Chromosome 16 rearrangements in acute myelomonocytic leukemia, with abnormal eosinophilia" *N Engl J Med.* 310 468-469. 1984.
- 87.- Secon MIC Cooperative Study Group. "Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of the acute myeloid leukemias" *Br. J. Haematol* 58: 487-494 1988.
- 88.- Fourt International Workshop on chromosomes in leukemia 1982 "A prospective study of acute nonlymphocytic leukemia" *Cancer Genet Cytogenet.* 11: 249-260. 1984.

- 89.- Le Beau MI, Diaz H. "Metallothionein Gene Cluster is Split by Chromosome 16 Rearrangements in Myelomonocytic Leukemia Nature 313: 709-711 1985
- 90.- Schwartz S, TjijR. "Translocation (6:9)(p23;q24) in Acute Nonlymphocytic Leukemia: a further case". Cancer Genet Cytogenet 10: 133-138 1985.
- 91.-Rowley J. Tenta. "Chromosome Abnormalities in Malignant Hematologic diseases". Adv. Cancer Res. 36: 100-146 1982
- 92.-Hagemeljer A, Hählen K. "Translocation (9:11) (p21;q23) in three cases of acute monoblastic leukemia" Cancer Genet Cytogenet 5:95-105 1982
- 93.-Abe R, Sandberg A. "Significance of Abnormalities Involving Chromosomal segments 11q23-25 in Acute Leukemia" Cancer Genet Cytogenet 13:121-127 1984.
- 94.-Chaplin, K. Acute Lymphoblastic Leukemia: Recent advances in Biology and Therapy. Blood 73:2951-2956. 1989.
- 95.- Hammond D, Sther H. "Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia" med ped Oncology 14: 124-134 1986.
- 96.- Soker-Walker L "Chromosomes and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia: a long term follow-up" Br J Haematol. 72:336-342 1989.
- 97.-Copelan, E.A, McGuire, A.E. "The Biology and Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults". Blood. 85:5. 1151-1168 1995.

98. Villa MA "trasplante de médula ósea" En oncología pediátrica Sierra S Ed. Interamericana Mc Graw-Hill Madrid 1992.
- 99.-Chessells. J.M. Bone Marrow Transplantation for high-risk childhood. Lymphoblastic Leukemia in first. Remission:experience in MRC Ukallx. The Lancet. 340:565-69. 1992.
- 100.- Beard ME "Bone marrow transplantation: Technique and current indications" NZ Med J 91:99-102 1980.
- 101.- Blaise. "allogenic or autologous bone marrow for acute lymphoblastic leukemia in first complete remission" Bone Marrow Transplant 5:712 1990.
- 102.-Lopez I. Indiano JM. "Leucemia" En oncología pediátrica Sierra S Ed. Interamericana Mc Graw-Hill Madrid 1992.
- 103-Hozier. J.C. Linquist. L.L. "Banded Karyotypes from bone marrow: a clinical useful approach. Human Genet 53:205-209.1980
- 104-Hoorhead. P.S. Nowell. P.C. Mellman. W.J. Battips. D.M. Hungerford. D.A. "Chromosome preparation of leukocytes cultures of normal human peripheral blood". Exp. Cel. 1960
- 105.-Wang H.C. Federoff. S. "Banding in human chromosomes treated with trypsin". Nature New Biol. 253:52-54 1972