

155
2e/



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS
EN PACIENTES CON PADECIMIENTOS
MIELOPROLIFERATIVOS POR MEDIO DE
HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A
CONSUELO SALAS LABADIA



DIRECTOR DE TESIS: M. en C. PATRICIA PEREZ VERA

MEXICO, D. F.



1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

266137



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.

**DETECCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN PACIENTES
CON PADECIMIENTOS MIELOPROLIFERATIVOS POR MEDIO DE
HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"DETECCION DE ALTERACIONES CROMOSOMICAS EN PACIENTES CON PADECIMIENTOS MIELOPROLIFERATIVOS POR MEDIO DE HIBRIDACION IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)"

realizado por SALAS LABADIA CONSUELO

con número de cuenta 9158591-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

M. en C. PATRICIA PEREZ VERA.

Propietario

MED. CIR. ALESSANDRA CARNEVALE CANTONI.

Propietario

BIOL. BERTHA MOLINA ALVAREZ.

Suplente

M. en C. MA. GUADALUPE ORDAZ TELLEZ.

Suplente

BIOL. LAURA GOMEZ LAGUNA.

DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ
Consejo Departamental de Biología

Edna M. Suárez D.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

[Handwritten signatures and notes]
Carnevale
Bertha Molina Alvarez
Suarez
Laura M.

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos. Departamento de Genética Humana en el Instituto Nacional de Pediatría.

Agradezco profundamente a todas las personas que con su apoyo, hicieron posible la realización de este trabajo de tesis.

ABREVIATURAS

ATRA	Ácido Trans-Retinoico
DAPI	Cloruro de diaminofenilindol
FAB	Grupo Francés Americano Británico
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con Fluorescencia
Ig	Inmunoglobulinas
Kb	Kilo-bases
kD	kilo-daltones
LAL	Leucemia Aguda Linfoblástica
LANL	Leucemia Aguda No-Linfoblástica
LGC	Leucemia Granulocítica Crónica
LPA	Leucemia Promielocítica Aguda
µg	Microgramos
ml	Mililitros
min	Minutos
Ph+	Cromosoma Filadelfia positivo
2Ph+	Doble cromosoma Filadelfia positivo
PML	Gen de la leucemia promielocítica aguda
RARα	Gen receptor del ácido trans-retinoico
SMD	Síndrome Mielodisplásico
t(9;22)	Translocación 9;22
TCR	Receptores de células T

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. Definición	2
2. Epidemiología de las leucemias	3
3. Clasificación de las leucemias	3
3.1. Leucemias agudas	3
3.1.1. Leucemias agudas linfoblásticas	3
3.1.2. Leucemias agudas no linfoblásticas	3
3.2. Leucemias crónicas	4
4. Alteraciones cromosómicas en leucemias	4
5. Características de la leucemia promielocítica aguda (LPA)	7
5.1. Características clínicas y de laboratorio	7
5.2. Características citogenéticas y moleculares	8
5.3. Metodologías para el diagnóstico de la t(15;17)	9
6. Características de la leucemia granulocítica crónica (LGC)	9
6.1. Características clínicas y de laboratorio	9
6.2. Características citogenéticas y moleculares	10
6.3. Metodologías para el diagnóstico de la t(9;22)	11
7. Desórdenes mieloproliferativos asociados con alteraciones numéricas	11
8. Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (FISH)	12
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
III. JUSTIFICACIÓN	13
IV. OBJETIVOS	14
V. HIPÓTESIS	14
VI. METODOLOGÍA	15
1. Población de estudio	15
2. Técnica directa para el estudio citogenético en médula ósea	16
3. Metodología de FISH	16
Pretratamiento y Desnaturalización	16
Hibridación	16
Detección y Amplificación	17

4. Análisis de resultados	18
VII. RESULTADOS	19
1. Pacientes diagnosticados con LPA	19
2. Pacientes diagnosticados con LGC	20
3. Pacientes diagnosticados con otros padecimientos mieloproliferativos	21
IX. DISCUSIÓN	22
1. Pacientes con leucemia promielocítica aguda	22
2. Pacientes con leucemia granulocítica crónica	24
3. Pacientes con otros padecimientos mieloproliferativos	26
X. CONCLUSIONES	28
XI. FIGURAS Y CUADROS	
Figura 1	29
Figura 2	30
Figura 3	31
Cuadro 1	32
Cuadro 2	33
Figura 4	34
Figura 5	35
Figura 6	36
Cuadro 3	37
Cuadro 4	38
Cuadro 5	39
Figura 7	40
Figura 8	41
Cuadro 6	42
XII. BIBLIOGRAFÍA	43

RESUMEN

Las alteraciones cromosómicas de las células de los pacientes con leucemia son de importancia, ya que se relacionan con la evolución de la enfermedad; sin embargo, la mala calidad en la morfología de los cromosomas y el bajo índice mitótico dificulta el estudio citogenético. El método de FISH permite el análisis en interfase de cientos de células, identifica alteraciones numéricas mediante el uso de sondas alfa-satélite y detecta translocaciones como la t(9;22) y la t(15;17) por medio de la búsqueda de los genes M-bcr/abl y PML/RAR respectivamente. El presente trabajo tiene como objetivos: a) Detectar alteraciones numéricas y estructurales en pacientes en edad pediátrica con padecimientos mieloproliferativos, en los que no fué posible realizar el análisis por citogenética clásica; b) Combinar los resultados obtenidos por FISH con los del estudio citogenético para obtener un diagnóstico final. Se analizaron células de médula ósea de 4 pacientes con leucemia granulocítica crónica (LGC) con la sonda M-bcr/abl, 6 con leucemia promielocítica aguda (LPA) con la sonda PML/RAR y 4 con otro tipo de padecimientos mieloproliferativos, 2 de ellos con número cromosómico de 47 y otros dos con 45 cromosomas, en los cuales se utilizaron las sondas alfa-satélite de los cromosomas 8 y 7 respectivamente, así como sondas de tinción completa para los cromosomas 2,4,5,11. Se analizaron en ciego 200 células para detectar fusión génica y 1000 células para detectar aneuploidía por cada individuo. Los valores basales se obtuvieron en los linfocitos de un individuo con cariotipo normal. Los pacientes con LGC presentaron fusión M-bcr/abl en más del 90% de sus células, tanto al momento del diagnóstico como durante el tratamiento; un paciente con viraje a fase aguda mostró fusión en el 85% de las células analizadas. Los pacientes con LPA estudiados al diagnóstico mostraron fusión PML/RAR en 66% al 87% de las células y en recaída del 38% al 69%. En los pacientes estudiados con la sonda del cromosoma 8, el 95% de las células fueron trisómicas y los pacientes analizados con el cromosoma 7 mostraron monosomía en más del 90% de las células analizadas. Los valores basales para fusión génica y aneuploidía encontrados para cada sonda coinciden con los descritos en la literatura. En conclusión, el método de FISH permite confirmar el diagnóstico citogenético o bien, obtener un resultado en aquellos casos en los que el estudio cromosómico convencional no sea concluyente.

INTRODUCCIÓN

1. Definición

La leucemia es un tipo de cáncer que se presenta cuando ocurren fallas en la proliferación y en la diferenciación del proceso normal de hematopoyesis, dando como resultado un crecimiento sin control de células precursoras inmaduras de la serie linfóide y mieloide. Las leucemias se originan cuando las células normales sufren alteraciones en moléculas importantes, que intervienen en la proliferación y maduración, como lo son los factores de crecimiento y sus receptores, los factores de transcripción o las proteínas reguladoras del ciclo celular (Hagemeijer, 1992).

2. Epidemiología de las leucemias

El Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México de 1996, ha estimado que en el bienio correspondiente a 1993-1994, la incidencia de leucemia se presentó con un ligero predominio en el sexo masculino, el cual alcanzó el 53.1%, en relación con el sexo femenino que ocupó el 46.8% del total de los casos. Este tipo de cáncer afecta principalmente a personas entre los 0 y 14 años de edad, de hecho este grupo representa el 27.9% de todos los pacientes diagnosticados con leucemia. En los individuos menores de 15 años la leucemia que se presenta con mayor frecuencia es la leucemia aguda linfoblástica (LAL), que constituye el 75% de los casos con leucemia y aproximadamente el 20% presenta leucemia aguda no linfoblástica (LANL), la mayoría de estos pacientes son niños de un año o menores. Se ha descrito recientemente que entre las LANL, la leucemia promielocítica aguda (LPA-M3) es el subtipo que se diagnostica con mayor frecuencia en individuos de origen latino en comparación con pacientes de otros grupos étnicos (Douer et al., 1996). Las leucemias crónicas se presentan con mayor frecuencia en individuos que se encuentran entre los 40 y 60 años de edad y ocasionalmente en menores de 30 años. De este tipo de padecimientos, la leucemia granulocítica crónica (LGC) es la más frecuente y representa del 2% al 5% del total de casos de leucemia en edad pediátrica (Salas, 1988; Spiers, 1995; Lampkin et al., 1988).

3. Clasificación de las leucemias

Las leucemias se dividen en dos grandes grupos:

3.1. Leucemias Agudas: Se caracterizan por presentar acumulación de células inmaduras o blastos en médula ósea, su proliferación celular es acelerada y son de evolución rápida. Dependiendo de la estirpe celular involucrada, las leucemias agudas pueden ser:

3.1.1.) Leucemias Agudas Linfoblásticas (LAL): Se deben a la proliferación de células inmaduras de la serie linfóide. Las LAL tienen características heterogéneas que han sido reveladas por estudios citomorfológicos e inmunológicos. Basado en esto, el grupo Francés Americano Británico (FAB) distingue tres categorías, conocidas como L1, L2 y L3. Esta clasificación está determinada por características citomorfológicas como tamaño y forma del núcleo y de la cromatina, número de vacuolas y la relación de tamaño entre el núcleo y el citoplasma. Desde el punto de vista inmunológico se definen linajes celulares mediante marcadores citoplasmáticos y de superficie, que permiten identificar células B, T, o células precursoras y ayudan a establecer diversos estados de diferenciación en este tipo de leucemia (Andreef,1992; Clare y Hansen,1994).

3.1.2.) Leucemias Agudas No Linfoblásticas (LANL): Se caracterizan por la acumulación de blastos de la serie mieloide en la médula ósea. De acuerdo a criterios citomorfológicos que atienden a rasgos característicos de los tipos celulares de la serie mieloide y a su grado de diferenciación, la FAB las divide en los siguientes subtipos (Clare y Hansen,1994):

- M0 M1 Leucemia mieloide aguda sin diferenciación
- M2 Leucemia mieloide aguda con diferenciación.
- M3 Leucemia promielocítica aguda.
- M4 Leucemia Mielomonocítica Aguda
- M5 Leucemia Monocítica Aguda
- M6 Eritroleucemia
- M7 Leucemia Megacariocítica

3.2. Leucemias Crónicas: Se caracterizan por el aumento de células maduras en la sangre periférica y en la médula ósea. Las leucemias crónicas a diferencia de las agudas son de evolución lenta, ya que el estado crónico de la enfermedad puede durar desde 3 hasta 20 años. El tipo de leucemia más común dentro de este grupo es la leucemia granulocítica crónica (LGC) (Salas,1988).

4. Alteraciones cromosómicas en leucemias

Las aberraciones cromosómicas, numéricas o estructurales, que se asocian con algún tipo de leucemia, no se presentan aleatoriamente y son resultado de una mutación celular somática. Dichas aberraciones únicamente se presentan en las células leucémicas, lo cual apoya la hipótesis del origen clonal de las leucemias (Salas,1988; Clare y Hansen,1994).

El estudio cromosómico con bandas G ha sido utilizado como una herramienta importante en la caracterización de las leucemias; proporciona información sobre el diagnóstico y el pronóstico del paciente, así como para la evolución de la enfermedad (Clare y Hansen, 1994; Swiger y Tucker,1996).

El análisis citogenético puede corroborar el diagnóstico obtenido a partir de datos citomorfológicos y del inmunofenotipo; además puede orientar acerca del pronóstico del paciente, que junto con otros rasgos clínicos como la edad al momento del diagnóstico y la cuenta leucocitaria inicial, se pueden considerar factores importantes con valor pronóstico. Con todos los datos anteriores es posible establecer un régimen terapéutico adecuado para el paciente (Salas,1988; Bonilla et al.,1993).

Entre las alteraciones cromosómicas que se presentan en las leucemias, existen aberraciones estructurales representadas por translocaciones, deleciones, inserciones y amplificaciones, así como alteraciones numéricas que se caracterizan principalmente por la pérdida o ganancia de cromosomas completos (Solomon et al.,1991).

En algunas leucemias se han identificado translocaciones específicas, como la t(9;22) de la LGC, a partir de la cual se han podido localizar genes que se relacionan con los rasgos característicos de esta leucemia, todo esto como resultado de la descripción de los puntos de ruptura involucrados en la translocación. Dos clases de genes se han visto implicados en el proceso carcinogénico:

a) Los proto-oncogenes, sus productos génicos actúan a diversos niveles como puede ser enviando información de algún receptor localizado en el exterior de la célula, hacia factores de transcripción nucleares que determinan los estados del ciclo celular y los grados de diferenciación celular. Estos pueden ser activados por inserciones, translocaciones o amplificaciones. A continuación se mencionan algunos ejemplos donde se presentan estos mecanismos:

- En muchas líneas celulares tumorales se presentan regiones de **amplificación génica**, donde se localizan oncogenes u otros genes relacionados a ellos. Un ejemplo de oncogen amplificado es *n-myc*, asociado con la presencia de neuroblastoma (Lewin,1990).

- Algunos proto-oncogenes pueden activarse como resultado de algún evento que cambie su expresión pero no su secuencia codificadora. Esto puede producirse como resultado de una **inserción**. Un oncogén activado de esta manera es *c-myc*, en el cual, se presentan niveles de expresión incrementados (Lewin,1990).

- Las **translocaciones** son otro evento que puede producir la activación de un proto-oncogen como resultado de su desregulación, interfiriendo en la función de secuencias promotoras, principalmente de inmunoglobulinas (Ig) y receptores de células T (TCR). Dichas translocaciones pueden dar como resultado un gen híbrido donde los exones de uno de los genes se unen a los exones del otro gen (Lewin,1990). Un ejemplo claro es la t(15;17) de la LPA donde el gen *PML* en el cromosoma 15 se fusiona con el gen *RAR α* en el cromosoma 17 y la t(9;22) de la LGC donde se produce la fusión del gen *c-abl* en el cromosoma 9 con el gen *bcr* en el cromosoma 22, ambas resultado de una translocación recíproca (Clare y Hansen,1994).

b) Los Genes supresores de tumor, los cuales se necesitan para la función normal de la célula y su ausencia causa el proceso tumoral. Un mecanismo por el cual se pueden perder los genes supresores son las **deleciones**. La proteína p53 es un ejemplo importante de un producto codificado por un gen de este tipo (Lewin,1990).

En cuanto a las **aberraciones cromosómicas numéricas**, éstas se han visto implicadas en varios tipos de LAL y en síndromes mielodisplásicos.

Las aberraciones numéricas producen la pérdida de material cromosómico específico, ya sea por la falta de un cromosoma completo, como en las monosomías, o por la pérdida de casi un complemento cromosómico como sucede en ciertos tipos de LAL, que dan como resultado cariotipos hipodiploides. Las alteraciones numéricas pueden producirse también por la ganancia de material cromosómico y pueden ir desde trisomías presentes en las LANL y en síndromes mielodisplásicos, hasta la presencia de hiperdiploidías con cuentas cromosómicas con más de 50 cromosomas que se presentan en los pacientes con LAL.(Clare y Hansen,1994; Solomon et al.,1991).

Algunas de las alteraciones cromosómicas mencionadas anteriormente tienen valor pronóstico dentro de la evolución de la enfermedad. En el caso de la LGC, la presencia de alteraciones secundarias como una doble t(9;22), trisomía 8 y el isocromosoma 17q, anticipan la aparición de una crisis blástica de la leucemia donde los pacientes generalmente tienen una mala respuesta al tratamiento. En los síndromes mielodisplásicos, los pacientes con aberraciones clonales como trisomías y monosomías como la del cromosoma 7, tienen un mal pronóstico (Clare y Hansen,1994).

El análisis citogenético ha mostrado ser una herramienta importante para establecer el diagnóstico y el pronóstico del paciente, sin embargo la citogenética clásica tiene algunas limitaciones que pueden resolverse mediante el uso del método de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH). Con el uso de sondas de DNA que detectan alteraciones tanto numéricas como estructurales, se pueden complementar los resultados obtenidos por citogenética convencional, sirviendo de apoyo para establecer un diagnóstico definitivo. Al poder aumentar el número de células analizables con respecto a la citogenética clásica, se puede tener un seguimiento durante la remisión y recaída de la enfermedad (Swiger y Tucker,1996; Anastasi,1993).

Con el objeto de demostrar los beneficios que pueden obtenerse al utilizar la metodología de FISH y complementar los resultados del estudio citogenético en pacientes en los que el estudio cromosómico no fue concluyente, en el presente trabajo, se concentrará la atención en el estudio de la LPA y LGC, de las cuales se tienen disponibles sondas de DNA para realizar FISH y poder identificar las translocaciones características de estos tipos de leucemia, así como de otros padecimientos mieloproliferativos caracterizados por monosomías y trisomías, las cuales pueden ser detectadas con sondas centroméricas específicas. La combinación de los métodos de citogenética convencional y FISH podrían proporcionar un diagnóstico preciso de los pacientes estudiados, así como un marcador de la neoplasia que pudiera utilizarse en el seguimiento de estos tipos de leucemia.

Por otro lado, el estudio de estas enfermedades mieloproliferativas, resulta ser importante porque se presentan con baja frecuencia en edad pediátrica (Salas,1988).

5. Características de la LPA

5.1. Características Clínicas y de Laboratorio

Este tipo de leucemia presenta rasgos biológicos y clínicos muy particulares. El tipo celular predominante en los pacientes con LPA, son los promielocitos hipergranulares, caracterizados por presentar "bastones de Auer" en su citoplasma, los cuales son una fusión anormal de gránulos azurófilos. Los bastones son un rasgo distintivo de ciertas variantes de LANL y varían en cantidad y tamaño conforme al grado de diferenciación celular. Según la clasificación de la FAB se distinguen dos formas de LPA: 1) La forma hipergranular (LPA FAB M3), y 2) la forma hipogranular (LPA M3 variante) (Salas,1988; Schoch et al.,1996).

En este grupo de pacientes las características clínicas son, la presencia de coagulación intravascular diseminada, hipofibrinogenemia (reducción de fibrinógeno, factor indispensable en el proceso de la coagulación), deficiencia del factor V de la coagulación y trombocitopenia (Lampkin et al.,1988).

Actualmente los pacientes son tratados con ácido trans-retinoico (ATRA), que es un agente que permite la restauración de la hematopoyesis mediante la inducción de una diferenciación terminal y apoptosis; induce la represión de factores que son producidos por las células leucémicas y que influyen negativamente sobre el proceso hematopoyético normal, produciendo la remisión completa en un 80% a un 90% de los casos y una sobrevida que puede ir de un mes a dos años. Se refiere que el tratamiento con ATRA seguido de quimioterapia, incrementa el número de pacientes que alcanzan la remisión y reduce las recaídas (Clare y Hansen,1994; Rohini et al,1996; Grignani et al.,1994).

5.2. Características Citogenéticas y Moleculares

El estudio citogenético ha sido muy importante en la evaluación clínica de los pacientes con estos tipos de leucemia; ya que se ha demostrado que tiene valor en el diagnóstico, pronóstico y en el asesoramiento terapéutico del paciente (Clare y Hansen,1994). Algunas leucemias presentan translocaciones específicas que las caracterizan, por ejemplo la LANL-M2 que citogenéticamente presenta la t(8;21) (Mitelman,1991).

Las dos variedades de LPA mencionadas anteriormente, se asocian citogenéticamente con la t(15;17)(q22;q12) que se ha encontrado en el 90% al 100% de los casos con esta enfermedad (Clare y Hansen,1994). Se considera que los pacientes que presentan este rearrreglo tienen un pronóstico considerado como intermedio o favorable, si se le compara con otras categorías de alteraciones citogenéticas como las hipodiploidías (Schoch et al.,1996 ; Bernácer et al., 1985).

A nivel molecular, la translocación produce una fusión entre el gen de la leucemia promielocítica (*PML*) y el gen receptor del ácido retinoico (*RAR α*), localizados en los cromosomas 15 y 17 respectivamente. La proteína *RAR α* silvestre, pertenece a la familia de receptores hormonales que participan en procesos de desarrollo y diferenciación. Al gen *PML*, originalmente se le llamó gen *MYL*, y actúa como factor de transcripción. El punto de ruptura sobre el gen *PML* puede encontrarse en tres regiones diferentes; del 90% al 95% de los casos se distribuyen entre el intrón 6 (*bcr1*) y el intrón 3 (*bcr3*); el 5% a 10% restante, se localiza dentro del exón 6 (*bcr2*). En las formas *bcr1* y *bcr3*, la región 5' de los intrones 6 ó 3 dentro del gen *PML*, se fusionan con la región 3' del intrón 2 del gen *RAR α* , de esta manera se forma el producto *PML/RAR α* localizado en el cromosoma 15 derivativo, que produce la aparición de los dos rasgos más importantes de la LPA, el bloqueo en el proceso de diferenciación y la alta sensibilidad al ácido retinoico, lo cual se relaciona con la evolución de la enfermedad (Douer et al.,1996; Grignani et al.,1994; Frankel, 1993) (Fig.1).

5.3. Metodologías para el diagnóstico de la t(15;17)

El estudio citogenético convencional permite detectar la t(15;17) en el 70% al 80% de los casos, debido a que existen limitaciones metodológicas en el análisis de cromosomas, como son el bajo índice mitótico y la mala calidad en la morfología de los cromosomas (Mancini et al.,1995).

El uso del método de FISH ofrece la posibilidad de incrementar la sensibilidad del estudio citogenético, mediante la identificación de los genes involucrados en la translocación, tanto en células en metafase como en interfase, aumentando así el número de células analizables. El análisis de la LPA por el método de FISH, se ha llevado a cabo con el uso de sondas de secuencia única para los genes *PML* y *RAR α* y ha sido útil en la detección de la fusión génica (Mancini et al.,1995).

6. Características de la LGC

6.1. Características Clínicas y de Laboratorio

Los pacientes con LGC se caracterizan por presentar leucocitosis causada por la proliferación de formas mieloides maduras, incluyendo neutrófilos y monocitos. A nivel clínico, los rasgos característicos son la presencia de esplenomegalia y anemia (Spiers,1995).

En cuanto a la evolución de la enfermedad, la LGC se divide en dos fases una crónica y una aguda. La fase crónica se caracteriza por presentar células maduras mieloides con morfología y función normales, las cuales pueden ser tratadas fácilmente con quimioterapia. La duración media de esta fase es de aproximadamente 3 años, después de los cuales la biología de esta enfermedad se torna más agresiva y avanza a la fase aguda o crisis blástica. En esta etapa las células progenitoras de la médula ósea pierden su habilidad para diferenciarse, lo que resulta en la acumulación de blastos indiferenciados y resistentes al tratamiento, por lo que su duración es de dos a tres meses con el posterior fallecimiento del paciente (Salas,1988).

El tratamiento administrado a los pacientes estudiados en el presente trabajo fue con busulfán. Otro método terapéutico utilizado es el trasplante de médula ósea, que parece ser efectivo para el control de la enfermedad a largo plazo (Giralt et al.,1995).

6.2. Características Citogenéticas y Moleculares

A nivel citogenético, el 95% de los pacientes con este tipo de leucemia presentan la t(9;22)(q34;q11). Al cromosoma 22, producto de este rearrreglo, se le conoce como cromosoma Filadelfia (Ph+). Aproximadamente en el 5% de los pacientes se pueden presentar translocaciones complejas que involucran tres o más cromosomas, además del 9 y el 22. Se ha observado que del 10% al 15% de los casos, pueden presentar translocaciones submicroscópicas que no son evidentes con el análisis citogenético convencional (Dewald y Wright,1995 ; Heim y Mitelman,1987).

La t(9;22) produce a nivel molecular la fusión de los genes *abl* y *M-bcr*, que se localizan en los cromosomas 9 y 22, respectivamente. El gen *abl* en su forma normal, codifica para una proteína de 145 kD, la cual puede expresarse en una gran variedad de líneas celulares, entre ellas, células derivadas de médula ósea o de timo. El gen *bcr* en su forma normal está constituido por 20 exones, cuando se presenta la translocación, el punto de ruptura dentro del gen ocurre en un segmento que contiene los exones del 1 al 10 u 11; los exones 10 y 11 están localizados dentro de una región de 5.8 Kb. El segmento producido como resultado de la ruptura se une al extremo 3' del gen *c-abl*, que contiene los exones 1a ó 2 hasta el exón 11, lo que da como resultado la formación de un gen híbrido *bcr/abl* que produce un RNAm que mide 8.5 Kb y que codifica para una proteína de 210 kD con una actividad tirosina-cinasa alterada y que es característica de la LGC (Cannistra,1990) (Fig.2).

Durante la crisis blástica de la enfermedad aparecen alteraciones cromosómicas secundarias como la trisomía 8, el isocromosoma 17q y doble cromosoma Ph+; en menor proporción se presenta trisomía 19 y 21, que se relacionan con el curso agresivo de la leucemia (Clare y Hansen,1994, Bernstein,1988).

6.3. Metodologías para el diagnóstico de la t(9;22)

El método de FISH permite la detección de la fusión de los genes *abl* y *M-bcr*, mediante el uso de sondas alfa satélite y de tinción completa, es posible identificar cromosomas involucrados en rearrreglos complejos y en alteraciones secundarias relacionadas con la evolución de la enfermedad. Por medio de esta técnica, se pueden analizar alteraciones que no son detectadas con los métodos citogenéticos convencionales, por ejemplo en el caso de la presencia de translocaciones crípticas que pueden dar como resultado un cromosoma Ph+ o doble cromosoma Ph+, que no son evidentes con los métodos de citogenética clásica (Sullivan et al.,1995).

7. Desórdenes mieloproliferativos asociados con alteraciones numéricas.

Las alteraciones numéricas encontradas con mayor frecuencia en los pacientes con enfermedades mieloproliferativas son la trisomía 8 y la monosomía 7. La trisomía 8 se presenta en la médula ósea de los pacientes con síndromes mielodisplásicos o con LANL; se ha encontrado que no es exclusiva de este tipo de enfermedades, ya que está presente en el 10.2% de los individuos con desórdenes hematológicos malignos como alteración primaria y en LGC como alteración secundaria (Dewald y Wright,1995; Jenkins et al.,1992; Daghistani et al.,1990).

Mediante la metodología de FISH con sondas alfa satélite, se ha podido detectar al cromosoma 8, que con la citogenética clásica, en ocasiones, no se podía identificar debido a la dificultad de poder encontrar un número adecuado de metafases para el análisis cromosómico (Jenkins et al.,1992).

La monosomía 7 se encuentra frecuentemente en estados preleucémicos y en LANL, se presenta generalmente en individuos entre 5 meses y 8 años de edad, y puede anticipar la aparición de una leucemia aguda. Generalmente se asocia con un mal pronóstico y muerte temprana. Al igual que con las alteraciones cromosómicas mencionadas anteriormente, el FISH puede ser utilizado en el diagnóstico citogenético de este tipo de pacientes (Dewald y Wright,1995; Daghistani et al.,1990).

8. Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH)

El método de FISH ha demostrado ser una herramienta muy importante dentro del análisis citogenético. Se basa en el apareamiento de una sonda de DNA que tiene una secuencia de bases complementaria, con secuencias de DNA "problema" que se encuentra en las células que presentan una alteración. Para que esto se pueda llevar a cabo, se requiere que tanto la sonda como el DNA problema sean tratados con un proceso de desnaturalización, durante el cual se desestabilizan los puentes de hidrógeno que se encuentran entre los pares de bases dando como resultado la separación de la doble hebra de DNA. Posteriormente se continúa con un proceso de hibridación, que permite la formación de moléculas híbridas estables entre las hebras sencillas de la sonda y del DNA problema (Swiger y Tucker,1996).

La detección de la sonda que ha hibridado con el DNA blanco es por medio de haptenos incorporados en la sonda de DNA como la biotina y la digoxigenina. Estas moléculas se detectan con el uso de anticuerpos, los cuales se encuentran conjugados con un fluorocromo que puede ser fluoresceína, rodamina o rojo texas. Por último, se utiliza una contratinción para la observación e identificación de cromosomas en metafase o núcleos en interfase. El análisis se realiza con un microscopio equipado con fluorescencia y la presencia de hibridación positiva con una sonda de DNA sobre una muestra problema, aparecerá como una señal fluorescente (Swiger y Tucker,1996; Döhner et al.,1995) (Fig. 3).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El análisis cromosómico convencional de las células de pacientes leucémicos, se utiliza como un método de apoyo en el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad. Sin embargo este estudio se encuentra limitado por una serie de dificultades como las que se describen a continuación: a) se requiere de células en división, lo cual disminuye el número de células que pueden ser analizadas ya que excluye a las que se encuentran en interfase; b) el índice mitótico es bajo, debido a que no se utilizan agentes mitogénicos con el fin de evitar la proliferación de las células normales de la médula ósea; c) las metafases que se obtienen presentan cromosomas de mala calidad, lo que dificulta su análisis (Anastasi,1993).

JUSTIFICACIÓN

La metodología de FISH permite el estudio de muestras de células tanto en metafase como en interfase, lo cual incrementa el número de células analizadas y proporciona un dato más real, acerca de la proporción de las clonas con alteraciones cromosómicas presentes en los pacientes en los que el estudio cromosómico no sea concluyente. También permite identificar específicamente cromosomas, centrómeros o genes sin que influyan la calidad del material cromosómico ni el índice mitótico.

El estudio de FISH es una herramienta de apoyo al estudio citogenético convencional, que permite caracterizar más fácilmente aneuploidías, rearrreglos estructurales complejos, así como marcadores cromosómicos. La combinación de ambos estudios aporta mayor número de datos desde el punto de vista citogenético, que pueden ser útiles en la evaluación de los pacientes con enfermedades mieloproliferativas y en el diagnóstico preciso de la enfermedad, lo que marcará el seguimiento que debe tener cada paciente (Swiger y Tucker,1996; Anastasi,1993; Sullivan et al.,1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El análisis cromosómico convencional de las células de pacientes leucémicos, se utiliza como un método de apoyo en el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad. Sin embargo este estudio se encuentra limitado por una serie de dificultades como las que se describen a continuación: a) se requiere de células en división, lo cual disminuye el número de células que pueden ser analizadas ya que excluye a las que se encuentran en interfase; b) el índice mitótico es bajo, debido a que no se utilizan agentes mitogénicos con el fin de evitar la proliferación de las células normales de la médula ósea; c) las metafases que se obtienen presentan cromosomas de mala calidad, lo que dificulta su análisis (Anastasi,1993).

JUSTIFICACIÓN

La metodología de FISH permite el estudio de muestras de células tanto en metafase como en interfase, lo cual incrementa el número de células analizadas y proporciona un dato más real, acerca de la proporción de las clonas con alteraciones cromosómicas presentes en los pacientes en los que el estudio cromosómico no sea concluyente. También permite identificar específicamente cromosomas, centrómeros o genes sin que influyan la calidad del material cromosómico ni el índice mitótico.

El estudio de FISH es una herramienta de apoyo al estudio citogenético convencional, que permite caracterizar más fácilmente aneuploidías, rearrreglos estructurales complejos, así como marcadores cromosómicos. La combinación de ambos estudios aporta mayor número de datos desde el punto de vista citogenético, que pueden ser útiles en la evaluación de los pacientes con enfermedades mieloproliferativas y en el diagnóstico preciso de la enfermedad, lo que marcará el seguimiento que debe tener cada paciente (Swiger y Tucker,1996; Anastasi,1993; Sullivan et al.,1995).

OBJETIVOS

- Detectar alteraciones numéricas y estructurales en pacientes pediátricos con padecimientos mieloproliferativos, en los que el análisis por citogenética clásica no fue concluyente.
- Combinar los resultados obtenidos por FISH con los del estudio citogenético para obtener un diagnóstico final.

HIPÓTESIS

- Con la metodología de FISH se pueden analizar alteraciones numéricas y estructurales, ya que identifica con precisión dichas alteraciones en un mayor número de células ya sea en metafase o en interfase. Por lo tanto, en combinación con el estudio cromosómico, permite obtener un diagnóstico final.

OBJETIVOS

- Detectar alteraciones numéricas y estructurales en pacientes pediátricos con padecimientos mieloproliferativos, en los que el análisis por citogenética clásica no fue concluyente.
- Combinar los resultados obtenidos por FISH con los del estudio citogenético para obtener un diagnóstico final.

HIPÓTESIS

- Con la metodología de FISH se pueden analizar alteraciones numéricas y estructurales, ya que identifica con precisión dichas alteraciones en un mayor número de células ya sea en metafase o en interfase. Por lo tanto, en combinación con el estudio cromosómico, permite obtener un diagnóstico final.

METODOLOGÍA

1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se estudiaron 14 pacientes con el objeto de ofrecerles un diagnóstico final por medio de la combinación del estudio citogenético con el de FISH. Los pacientes fueron captados entre 1995 y 1996, de los cuales 6 presentaron LPA, los pacientes LPA1, LPA2, LPA3 y LPA4, fueron estudiados al diagnóstico, el paciente LPA5 se estudió durante la recaída y el paciente LPA6 durante la remisión; 4 pacientes se diagnosticaron como LGC, de ellos, los pacientes LGC1 y LGC2 se estudiaron al momento del diagnóstico, LGC1 en fase crónica y LGC2 en crisis blástica con un diagnóstico diferencial entre metaplasia mieloide y LGC; los pacientes LGC3 y LGC4 restantes, se encontraban en tratamiento, uno en fase crónica y el último presentaba un viraje a LANL-M2. Los últimos 4 pacientes presentaban otros desórdenes mieloproliferativos, el paciente PM1 presentó síndrome mielodisplásico (SMD), el paciente PM2 no tenía diagnóstico preciso por lo que el diagnóstico diferencial se hizo entre síndrome mielodisplásico y LGC variedad juvenil; el paciente PM3 fue diagnosticado con LANL-M6, que además presentaba síndrome de Down y el paciente PM4 como LANL-M7. Todos los pacientes se encontraban en edad pediátrica y se atendían en los servicios de Oncología o Hematología del Instituto Nacional de Pediatría (Cuadros 1 y 2).

Los estudios cromosómicos y de FISH se realizaron en células de médula ósea obtenidas por aspiración, las muestras se procesaron por técnica directa para obtener metafases y posteriormente se llevó a cabo el estudio con FISH. Las metodologías utilizadas se describen a continuación:

2. TÉCNICA DIRECTA PARA EL ESTUDIO CITOGENÉTICO EN MÉDULA ÓSEA

En 7ml de medio RPMI 1640 (GIBCO) suplementado con suero fetal de bovino al 20% (Hyclone), se agregaron 0.5ml de médula ósea heparinizada y 0.2ml de colcemida (GIBCO) [10 μ g/ml], se incubó a 37°C durante 30min y se centrifugó durante 10min a 1500 RPM; se retiró el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular. La muestra se resuspendió en solución hipotónica de KCL 0.075M a 37°C durante 60min. Se agregaron 0.5ml de fijador (metanol-ácido acético 3:1) y se resuspendió. Se centrifugó durante 10min para quitar el sobrenadante y obtener el paquete celular. Posteriormente se hicieron varios lavados con fijador hasta que las células quedaran completamente limpias. Se hicieron preparaciones y se procesaron para obtener bandas G (BG) con los métodos habituales. El análisis cromosómico se llevó a cabo de acuerdo con los criterios del ISCN de 1995.

3. METODOLOGÍA DE FISH

La metodología se basó en las especificaciones recomendadas por la casa comercial que provee las sondas (ONCOR, 1996).

PRETRATAMIENTO Y DESNATURALIZACIÓN

Se hicieron preparaciones por goteo y se dejaron secar al aire, posteriormente se trataron en solución salina de citrato de sodio (2xSSC) (ONCOR) a 37°C durante 30min. Se deshidrataron por 2min en etanol (MERCK) al 70%, 80% y 95%, se dejaron secar al aire. Las preparaciones se desnaturalizaron en una solución de formamida/2xSSC (ONCOR) al 70% durante 2min a 72°C. Se deshidrataron durante 2min en etanol frío al 70%, 80% y 95% y se dejaron secar al aire.

HIBRIDACIÓN

En este trabajo se utilizó un juego de sondas de secuencia única para la t(15;17) y la t(9;22), así como las sondas alfa-satélite para los cromosomas 7 y 8 y sondas de tinción completa para los cromosomas 2, 4, 5 y 11. Para las sondas de secuencia única se agregaron directamente 10 μ l de la sonda sobre la preparación con la muestra. Para las sondas α -satélite se mezclaron 1.5 μ l de la sonda con 30 μ l de una solución de Hybrisol VI (formamida/2xSSC al 50%) (ONCOR), se desnaturalizaron durante 5min

a 72°C y se colocaron a 4°C hasta su uso. Se agregó un volumen final de 31.5µl de la sonda sobre la preparación.

Para las sondas de tinción completa, se tomaron 10µl de sonda, se desnaturalizaron a 72°C durante 10min y posteriormente se colocaron a 37°C por lo menos durante media hora para su prealineación.

En todos los casos se colocó un cubreobjetos sobre cada preparación y se selló con goma para incubarla en una cámara húmeda durante 24 h a 37°C.

DETECCIÓN Y AMPLIFICACIÓN

Se quitó el cubreobjetos y las láminas se lavaron a 72°C durante 5min en 2xSSC, para sondas de secuencia única y tinción completa, y en 0.25xSSC para sondas α-satélite. Se dejaron en un detergente 1xPBD (ONCOR) hasta su detección.

En las sondas de secuencia única para la t(15;17) y t(9;22), los puntos de ruptura 15q22 y 22q11 se encontraban marcados con biotina y el 17q12 y 9q34 con digoxigenina. Las sondas α-satélite y de tinción completa estaban marcadas con digoxigenina.

Las sondas de secuencia única se detectaron siguiendo la metodología para doble color, para la cual se agregaron 60µl del fluorocromo rojo texas conjugado con avidina; para amplificar la señal se agregaron 60µl del anticuerpo antiavidina y el posterior marcaje con el fluorocromo.

Tanto el fluorocromo como el anticuerpo, se incubaron a 37°C durante 30min y en cada cambio las láminas se lavaron en 1xPBD 3/2min.

Para detectar la sonda marcada con digoxigenina, se agregaron 60µl de fluoresceína conjugada con anti-digoxigenina; para su amplificación, se agregaron 60µl del anticuerpo "rabbit anti-sheep" y 60µl del fluorocromo fluoresceína "anti rabbit" a 37°C durante 30min cada uno, las láminas se lavaron entre cada cambio en 1xPBD 3/2min.

Las sondas α-satélite y de tinción completa marcadas con digoxigenina, se detectaron siguiendo los pasos para un solo color que se describieron anteriormente para la detección de sondas de secuencia única .

Las preparaciones se tiñeron con 10µl de cloruro de diaminofenilindol (DAPI) para sondas a doble color y con yoduro de propidio para las sondas marcadas con un solo color.

Las células se analizaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BH-2) con filtro de triple banda (DAPI-fluoresceína-rojo texas) con un objetivo de 100x.

Todas las muestras se analizaron en forma ciega en láminas codificadas por un sujeto ajeno al estudio. El número de células analizadas por paciente fue de 200 núcleos cuando se analizaron las translocaciones y de 1,000 núcleos para las sondas α -satélite. Para las sondas de tinción completa, el número de metafases que se estudió, fue variable dependiendo del índice mitótico que presentara la muestra.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la identificación de la t(15;17) y de la t(9;22), los genes se detectaron con un sistema de doble color con el que se obtuvieron tres diferentes colores: rojo para los locus 17q12 y 22q11, verde para los locus 15q22 y 9q34 y contratinción azul.

Se considera que una señal es positiva cuando se observa un dominio fluorescente, ya sea en un núcleo en interfase o en ambas cromátidas de un cromosoma. Una célula normal en interfase, muestra cuatro señales visiblemente separadas: dos señales rojas y dos señales verdes distribuidas al azar dentro del núcleo.

Una célula con la translocación muestra tres señales visiblemente separadas: una señal verde, una roja y una señal amarilla, representando dicha translocación (ONCOR Cat.,1996) (Figs. 4 y 5).

Para los cromosomas 7 y 8, se utilizaron sondas que hibridan con regiones altamente repetidas de DNA alfoide que están localizadas en el centrómero. En una célula normal, se observan dos señales visiblemente separadas; en una célula monosómica se observa sólo una señal y en una célula trisómica se observan tres señales (Anastasi,1993; ONCOR Cat.,1996) (Fig. 6).

Los cromosomas analizados con sondas para tinción completa fueron el 2, 4, 5 y 11. En una célula normal se observan dos señales separadas cubriendo el cromosoma completo, en una célula con una translocación se observa un cromosoma totalmente teñido y un cromosoma parcialmente teñido; puede observarse una tercera señal si la translocación es balanceada (ONCOR Cat.,1996).

Para los estudios de fusión génica y de aneuploidías se obtuvieron valores basales para cada sonda utilizada en el estudio, los cuales representan el valor a partir del cual una población celular puede considerarse como anormal. Los valores basales se obtuvieron de linfocitos de un individuo sano con cariotipo normal, mediante la siguiente fórmula:

**VALOR BASAL DE FUSIÓN = * PROMEDIO±3(DESVIACIÓN ESTANDAR)= $\bar{X} \pm 3(DE)$
GÉNICA O ANEUPLOIDÍA**

Donde el * promedio se obtiene de los valores observados en células control (Schad y Dewald,1995).

RESULTADOS

PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON LPA

En los pacientes LPA2, LPA3, LPA5 y LPA6 se realizó el estudio por citogenética convencional y en los pacientes LPA1 y LPA4 no se obtuvieron cromosomas para el análisis; en los pacientes LPA2 y LPA5 se buscó corroborar la presencia de la $t(15;17)$ ya que el estudio con bandas G mostró un cromosoma 15q+. En los pacientes LPA3 y LPA6, únicamente se había encontrado una línea celular normal. El estudio con FISH reveló en los 6 pacientes la $t(15;17)$, en los casos LPA1 al LPA5, el porcentaje de células con fusión que representa la translocación, va del 69.5% al 87.5%; en el paciente LPA6 se observa un porcentaje de células con fusión del 38%, que es bajo en comparación con los otros pacientes, debido a que se encontraba en remisión. Por medio de una prueba estadística de χ^2 de Pearson, se observó que los porcentajes de fusión génica de los pacientes son significativamente mayores que el valor basal de fusión obtenido de 3 ensayos en células control, que fue del 4.5%.

Al combinar los resultados de ambos estudios, se obtuvo que los pacientes LPA1 y LPA4, no analizables por citogenética, presentaron con FISH la $t(15;17)$; en los casos LPA2 y LPA5 se corroboró la presencia de la translocación y en los pacientes que únicamente mostraron una línea normal, el estudio con FISH reveló la translocación. En el paciente LPA5 se sospechó por citogenética clásica de la participación de los cromosomas 2 y 4 dentro de dos translocaciones balanceadas diferentes, debido a esto, se realizó el estudio de FISH con sondas de tinción completa

**VALOR BASAL DE FUSIÓN = * PROMEDIO±3(DESVIACIÓN ESTANDAR)= $\bar{X} \pm 3(DE)$
GÉNICA O ANEUPLOIDÍA**

Donde el * promedio se obtiene de los valores observados en células control (Schad y Dewald,1995).

RESULTADOS

PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON LPA

En los pacientes LPA2, LPA3, LPA5 y LPA6 se realizó el estudio por citogenética convencional y en los pacientes LPA1 y LPA4 no se obtuvieron cromosomas para el análisis; en los pacientes LPA2 y LPA5 se buscó corroborar la presencia de la $t(15;17)$ ya que el estudio con bandas G mostró un cromosoma 15q+. En los pacientes LPA3 y LPA6, únicamente se había encontrado una línea celular normal. El estudio con FISH reveló en los 6 pacientes la $t(15;17)$, en los casos LPA1 al LPA5, el porcentaje de células con fusión que representa la translocación, va del 69.5% al 87.5%; en el paciente LPA6 se observa un porcentaje de células con fusión del 38%, que es bajo en comparación con los otros pacientes, debido a que se encontraba en remisión. Por medio de una prueba estadística de χ^2 de Pearson, se observó que los porcentajes de fusión génica de los pacientes son significativamente mayores que el valor basal de fusión obtenido de 3 ensayos en células control, que fue del 4.5%.

Al combinar los resultados de ambos estudios, se obtuvo que los pacientes LPA1 y LPA4, no analizables por citogenética, presentaron con FISH la $t(15;17)$; en los casos LPA2 y LPA5 se corroboró la presencia de la translocación y en los pacientes que únicamente mostraron una línea normal, el estudio con FISH reveló la translocación. En el paciente LPA5 se sospechó por citogenética clásica de la participación de los cromosomas 2 y 4 dentro de dos translocaciones balanceadas diferentes, debido a esto, se realizó el estudio de FISH con sondas de tinción completa

para dichos cromosomas; mediante este método se confirmó que estaban involucrados ya que se encontraron 3 señales positivas para ambos cromosomas (Cuadro 3).

PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON LGC

El paciente LGC1 mostró con el estudio por citogenética convencional una probable translocación compleja en la que se involucraban 3 cromosomas, con el estudio de FISH se confirmó la participación de los cromosomas 9 y 22 con los puntos de ruptura característicos sobre los genes *M-bcr/abl* y además se detectó con una sonda de tinción completa para el cromosoma 11, que éste también participaba en dicha translocación (Cuadros 4 y 5).

En los casos LGC2 y LGC4 que se encontraban en la fase blástica, se buscó identificar la presencia del doble cromosoma Ph+, que es característico de esta etapa de la enfermedad. En el paciente LGC2, se identificaron 3 líneas celulares, una normal, una con un cromosoma Ph+ que se presentó en el 35.1% y otra donde se identificó doble cromosoma Ph+ en el 57.4% de las células; en el mismo paciente se encontraron además los cromosomas 8 y 19 extras con el estudio de BG. El paciente LGC4 además mostró una translocación que involucraba al cromosoma 11 y a un cromosoma semejante a los del grupo B, que no pudo ser identificado con certeza por citogenética clásica. La sonda utilizada para detectar al cromosoma en cuestión fue de tinción completa para el cromosoma 5, y se pudo observar una señal positiva, con la cual se identificó la t(5;11) además de la t(9;22) y se descartó la presencia del doble cromosoma Ph+. Este hallazgo contrasta con los datos de la literatura, que indican que una de las translocaciones observadas en la LANL-M2, hacia la cual viró el paciente, es la t(7;11) y no la t(5;11), que fue la que se encontró en este paciente (Mitelman,1991). El paciente LGC3 no pudo ser analizado por citogenética clásica, sin embargo, con FISH se obtuvo un resultado positivo del estudio, el cromosoma Ph+ se observó en el 97.5% de sus células (Cuadros 4 y 5) (Figs. 7 y 8).

El estudio con FISH mostró en los pacientes LGC1, LGC3 y LGC4, que el porcentaje de células con fusión va del 85% al 97.5% y en el paciente LGC2 es del 35.1%, esto se debió a que se encontró doble cromosoma Ph+ con un porcentaje de 57.4% de las células. Por medio de χ^2 estos valores mostraron ser significativamente más altos que el valor basal de fusión génica, el cual fue del 6%. (Cuadros 4 y 5).

PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON OTROS PADECIMIENTOS MIELOPROLIFERATIVOS

Los pacientes PM1 Y PM2 se estudiaron por citogenética convencional y se encontró un cariotipo con 45 cromosomas que mostraba monosomía para un cromosoma del grupo C, los datos de la literatura sugirieron que el cromosoma faltante pudiera ser el 7, por lo que se realizó FISH con la sonda α -satélite para dicho cromosoma y se detectó monosomía 7 en ambos pacientes, en el 90.2% y el 91.3% de sus células respectivamente, estos valores, al compararlos con la prueba de χ^2 , mostraron ser significativamente mayores que el valor basal de aneuploidía obtenido que fue del 4.8%. Con el resultado de ambos estudios, se corrobora la línea celular monosómica para el cromosoma 7 (Dewald y Wright, 1995; Daghistani et al., 1990) (Cuadro 6).

El paciente PM3 con trisomía 21 constitutiva, presentó además, una línea celular con 48 cromosomas, donde se observaba un cromosoma supernumerario del grupo C. En el paciente PM4 se encontró un cariotipo con 47 cromosomas, que al igual que el caso anterior, tenía un cromosoma supernumerario del grupo C. En la literatura se refiere que el cromosoma que se involucra con mayor frecuencia en padecimientos mieloproliferativos representados por trisomías, es el cromosoma 8 por lo que se realizó FISH con la sonda α -satélite para este cromosoma. Se encontró que el porcentaje de células con 3 señales, es decir, con trisomía 8, fue del 95% para el paciente PM3 y del 95.2% para el paciente PM4. Por medio de la prueba de χ^2 , estos valores fueron mayores que el valor basal para trisomía que fue de 0.60% (Jenkins et al., 1992; Marshall et al., 1996) (Cuadro 6).

DISCUSIÓN

PACIENTES CON LEUCEMIA PROMIELOCÍTICA AGUDA

En los pacientes con LPA, la técnica de FISH permitió corroborar y detectar la t(15;17). Para los pacientes LPA1 y LPA4, los cuales no se pudieron analizar por citogenética convencional, el método de FISH hizo evidente la translocación en el 75% y en el 87.5% de las células analizadas. En los pacientes LPA3 y LPA6, al realizar el estudio citogenético únicamente se encontró una línea celular normal, sin embargo, por medio del FISH se detectó una línea celular anormal con la translocación, en el paciente LPA3 en el 86% de las células y en el paciente LPA6 en el 38%; en este último caso (LPA6) la translocación se observó en un porcentaje más bajo con respecto a los otros pacientes, debido a que se encontraba en la etapa de remisión de la enfermedad, donde se presenta una repoblación con células normales; sin embargo este resultado hacía sospechar de una probable recaída del paciente, la cual ocurrió meses después de haber sido obtenida la muestra estudiada. Este dato es relevante ya que demuestra que el método de FISH en interfase fue más sensible en la detección de células leucémicas que el estudio citomorfológico y el de citogenética convencional, los cuales apoyaban que el paciente se encontraba en remisión.

Una de las causas por las cuales en algunos casos el estudio citogenético únicamente muestra una línea celular normal, es la presencia de translocaciones submicroscópicas que no son detectadas por medio de BG (Bernstein, 1988; Clare y Hansen, 1994). Otro aspecto que puede influir en el resultado citogenético es la falta de proliferación de las células anormales, ya que pueden presentarse subpoblaciones que se encuentren en la fase G₀ del ciclo celular, debido a que los cultivos de células de los cuales se obtiene el cariotipo no se estimulan con mitógenos y por lo tanto el número de metafases analizadas es muy bajo, del orden de decenas; en contraste, el número de interfases que pueden ser analizadas con el método de FISH es del orden de cientos (Clare y Hansen, 1994).

En el paciente LPA2 se encontró citogenéticamente un cromosoma 15q+ y por medio del FISH se detectó la participación del cromosoma 17 en la t(15;17). En el paciente LPA5 por medio de FISH con sondas de secuencia única y de tinción completa, se pudo corroborar la presencia de la t(15;17), así como, la participación de los cromosomas 2 y 4 en dos translocaciones independientes. Los cambios secundarios en el cariotipo de este paciente están relacionados con el curso de la enfermedad, ya que fue analizado durante un evento de recaída. Los rearrreglos secundarios se han

referido en pacientes que presentan recaída y/o falla terapéutica; el caso de este paciente corresponde a lo descrito en la literatura ya que durante su evolución recayó 2 veces (Bernácer et al, 1985).

En un estudio realizado en 50 pacientes con LPA-M3, de los cuales 47 se estudiaron al momento del diagnóstico y 3 casos durante la recaída, se encontró que en 17 de los 47 pacientes, así como en los 3 casos en recaída se presentaron alteraciones cromosómicas secundarias diferentes a la t(15;17). La alteración más común fue la trisomía 8 y el isocromosoma de brazos largos del cromosoma 17; se refiere que las alteraciones cromosómicas que involucran los cromosomas 2 y 4 no son frecuentes dentro del grupo de alteraciones secundarias. Sin embargo, en ninguno de los casos referidos se encontró una influencia negativa en cuanto al pronóstico del paciente como resultado de la presencia de alteraciones secundarias diferentes a la t(15;17) (Schoch et al.,1996).

En este tipo de estudios es necesario realizar el análisis en células control de individuos normales, por la posibilidad que existe de encontrar 2 señales superpuestas dentro del núcleo. Por datos de la literatura, se sabe que en células de médula ósea de donadores sanos, la distancia mínima entre los genes *ABL* y *BCR* dentro del núcleo es de 0 a 0.5 μ m en el 17% de los núcleos analizados y de 0 a 1 μ m en el 47.5%; esto significa que los genes *ABL* y *BCR* están localizados en una región de 2 μ m del mismo lado dentro del núcleo lo que podría favorecer el contacto entre ellos. Esta proximidad puede ser causada por la proyección que dan los genes situados uno sobre otro dentro del mismo plano (Lukásová. et al,1997).

Los valores basales de fusión génica obtenidos de 3 ensayos en un individuo sano con cariotipo normal, se compararon con los valores obtenidos de los pacientes y permitieron establecer el límite a partir del cual un individuo puede considerarse anormal por presentar la fusión génica *PML/RAR α* .

Todos los pacientes con LPA presentaron un porcentaje de células con fusión génica significativamente mayor que el valor basal de fusión obtenido en células control que fue del 4.5%. Por lo tanto, todos los individuos con valores basales de fusión génica por encima del 4.5% podrían considerarse como anormales, lo que podría ser utilizado para alertar al médico tratante, para que se lleve a cabo un seguimiento más cercano del paciente.

Es importante mencionar que el valor basal de fusión obtenido para los pacientes con algún tipo de leucemia, debe ser utilizado de manera estricta en ciertas ocasiones, por ejemplo, para detectar enfermedad mínima residual; ya que la presencia de una población muy pequeña de células leucémicas, puede estar anticipando una probable recaída del paciente, en este caso el análisis, se lleva a cabo en un mayor número de células (2,000 células) y siempre se utiliza un control negativo que es un individuo sano, y un control positivo que es un individuo que citogenéticamente presenta la

t(15;17); tomando en cuenta estas características, el paciente con enfermedad mínima residual deberá mostrar un porcentaje de células con fusión que rebase el 4.5% (Andreef,1992).

Los valores basales de fusión génica obtenidos en este estudio coinciden con los datos de la literatura, ya que en trabajos realizados por otros autores se muestran valores del 4.6% con un intervalo que va del 1.0% hasta 7.0%, utilizando sondas de secuencia única (Schad et al,1994).

En este estudio se utilizó el criterio más estricto para la identificación de fusiones génicas, en el cual se considera positiva una fusión cuando las 2 señales, una verde y una roja, están completamente fusionadas y no se considera positiva cuando las señales están muy cercanas.

PACIENTES CON LEUCEMIA GRANULOCÍTICA CRÓNICA

En la LGC el método de FISH permitió corroborar la presencia de la t(9;22), del doble cromosoma Ph+ y de alteraciones cromosómicas secundarias. En el paciente LGC1, se encontró una translocación compleja que no fue resuelta por la citogenética convencional y por medio de FISH se confirmó la presencia de la t(9;22), así como la participación del cromosoma 11 en dicho rearrreglo complejo.

Alrededor del 5% de los pacientes con LGC presentan translocaciones complejas que involucran 3 ó más cromosomas. Se ha informado que las translocaciones complejas más comunes, involucran a los cromosomas 1, 3 y 10. El pronóstico para los pacientes que portan una translocación compleja se ha referido que es el mismo que el que tienen los pacientes con la t(9;22) clásica (Dewald et al, 1993; Sullivan et al,1995).

En el paciente LGC2 se sospechó por citogenética convencional la presencia de doble cromosoma Ph+ y de otras alteraciones cromosómicas como las trisomías 8 y 19. Por medio del método de FISH se corroboró la presencia de 2Ph+. Las alteraciones cromosómicas secundarias que presentó el paciente, se refieren en la literatura como características de una crisis blástica. El diagnóstico de este paciente no era preciso cuando se le realizó el estudio, los datos clínicos y de laboratorio indicaban un diagnóstico diferencial entre metaplasia mieloide y LGC, sin embargo, los datos citogenéticos orientan a que se clasifique como la crisis blástica de una LGC. Por otro lado, la evolución clásica de la LGC comienza con la presencia de una fase crónica, la cual se torna aguda a lo largo de meses o años de tratamiento, sin embargo, este paciente mostró desde el momento del diagnóstico un cariotipo que sugería la presencia de crisis blástica, lo cual lo llevó a fallecer en poco tiempo. Este hallazgo es poco frecuente en este tipo de leucemia y aún más en un paciente en edad pediátrica (Salas,1988). El

poder establecer un diagnóstico preciso tiene implicaciones importantes en el tratamiento que se le da al paciente, lo que se relaciona directamente con la evolución de la enfermedad y el pronóstico. En pacientes con LGC variedad adulta en la fase crónica, el tratamiento administrado debe ser busulfán, mientras que para la crisis blástica, el tratamiento no está bien establecido; lo mismo sucede para la metaplasia mieloide donde no se tiene un régimen terapéutico preciso.

El paciente LGC3 no fue analizado citogenéticamente debido a que no se obtuvieron metafases, el método de FISH hizo evidente la presencia de la t(9;22). Este paciente se estudió durante el tratamiento, sin embargo, al comparar los resultados obtenidos con el método de FISH que muestran un 90% de positividad para el cromosoma Ph, con datos de la literatura para poder conocer el grado de remisión del paciente, se observa que se encuentra en un nivel de remisión mínima. (Dewald y Wright, 1995).

En el paciente LGC4 se encontró por medio de citogenética clásica la t(9;22) y otra translocación donde aparentemente participaban los cromosomas 5 y 11, sin embargo no se precisó por la mala calidad de los cromosomas. El estudio con FISH corroboró la presencia de la translocación característica y detectó la t(5;11). Es importante mencionar que el paciente presentaba un viraje a LANL-M2; una de las alteraciones que se han asociado con este subtipo de leucemia es la t(7;11), la cual en este paciente, no se pudo detectar debido a la mala calidad cromosómica, ya que no fue posible precisar si el cromosoma 7 estaba involucrado. El estudio de FISH mostró que el cromosoma 5 era el que participaba en la translocación. Por lo tanto se asume que este paciente presenta una variante de dicha translocación, donde en lugar de participar el cromosoma 7 se encuentra al cromosoma 5. Se ha referido que en el punto de ruptura 11p15 se encuentra uno de los genes de la familia Hox, el gen HOXA9 que está involucrado en procesos de diferenciación de células mieloides, y como resultado de su fusión con el gen NUP98 sobre el cromosoma 7, se produce una inhibición de la diferenciación terminal en las células sanguíneas afectadas (Boncinelli, 1997). La t(7;11) se refiere como poco frecuente aunque es una alteración recurrente en esta enfermedad y se presenta preferentemente en población oriental adulta. Se han encontrado algunas variantes en las que participan los cromosomas 1 y 6, sin embargo la variante con la participación del cromosoma 5 que presentó el paciente de este estudio no se encuentra referida en la literatura (Huang et al., 1997; Mitelman, 1991).

En todos los pacientes los valores basales de fusión génica fueron significativamente mayores que el valor basal obtenido de 2 ensayos en un individuo normal, el cual fue del 6%. De esta manera, todos los individuos con valores de fusión génica por arriba del 6% se consideraron como individuos que presentaban la translocación. Los valores basales obtenidos en este estudio están dentro de los valores que se reportan en la literatura (Dewald et al., 1993). En los pacientes estudiados con LGC el

método de FISH pudo ser utilizado para corroborar el diagnóstico y poder dar un seguimiento al paciente durante la evolución de la enfermedad.

Es importante mencionar que un paciente con diagnóstico de LGC, presenta aproximadamente el 95% de células con el cromosoma Ph+, debido a esto, y al porcentaje de células con fusión que pueden presentarse en pacientes con niveles de remisión mínima, es importante dar un límite estricto al valor de corte a partir del cual un individuo se puede considerar anormal (Dewald y Wright, 1995; Herm y Mitelman, 1987).

PACIENTES CON OTROS PADECIMIENTOS MIELOPROLIFERATIVOS

En los pacientes PM1 y PM2 que se clasificaron dentro del grupo de padecimientos mieloproliferativos, se realizó el estudio con FISH para corroborar que la monosomía se debía a la ausencia del cromosoma 7. El paciente PM1 fue diagnosticado con SMD, estos pacientes tienen una supervivencia entre 12 y 48 meses y en algunos casos de 10 años o más; el paciente PM2 presentó un diagnóstico diferencial entre SMD y LGC variedad juvenil. El estudio citogenético y de FISH apoyaron en el paciente PM2, el diagnóstico de LGC variedad juvenil, con un pronóstico de supervivencia menor que los pacientes con SMD. Como se mencionó anteriormente, los pacientes con LGC son tratados con busulfán o con trasplante de médula ósea, mientras que los pacientes que presentan SMD, aún no tienen un régimen terapéutico bien caracterizado (Mecucci y Van den Berghe, 1992).

En los pacientes PM3 y PM4, el FISH permitió corroborar la presencia de trisomía para el cromosoma 8 (Dewald y Wright, 1995).

En los pacientes con monosomía 7, los valores de aneuploidía fueron significativamente mayores que los valores basales de aneuploidía para monosomía obtenidos en células control que fue del 4.8%. Para los pacientes con trisomía 8, los valores basales de aneuploidía fueron mayores que el valor basal para trisomía obtenido de células control que fue del 0.6%. Los valores basales de aneuploidía obtenidos en nuestro estudio coinciden con los reportados en la literatura para sondas α -satélite que van del 1% al 15% y se puede observar que son cercanos a los encontrados por los autores que sugieren utilizar 2 sondas simultáneas con el objeto de disminuir el valor de corte. (Lichter et al., 1996).

En el Instituto Nacional de Pediatría se han estudiado citogenéticamente pacientes con diversos padecimientos mieloproliferativos; el 63% de todos los pacientes, fue resuelto utilizando únicamente

citogenética convencional con BG. En el 32% de los casos se pudo obtener mayor información sobre ellos con la realización de FISH además del estudio con BG y en el 5% de los pacientes el FISH se requirió para diagnosticar al paciente, ya sea por la mala calidad cromosómica o por el bajo índice mitótico de la muestra de médula ósea.

Los pacientes estudiados en este trabajo representan: parte del 32% de los casos en los cuales se obtuvo mayor información al realizar el método de FISH y el 5% donde únicamente con FISH se obtuvo el diagnóstico. Estos resultados indican que el método de FISH es una herramienta importante en la evaluación inicial de los diversos padecimientos mieloproliferativos.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos, muestran que el método de FISH es una herramienta útil y de apoyo al estudio citogenético, en la detección de los rearrreglos presentes en pacientes con diversos padecimientos mieloproliferativos, por lo que puede ser utilizado en el monitoreo en las diferentes etapas de la enfermedad, esto crea la posibilidad de dar seguimiento al paciente durante su evolución, independientemente de que esté bajo tratamiento y de que las células no se encuentren en proliferación. Con esto se podrá establecer un régimen terapéutico más adecuado y se podrá seguir la respuesta de los pacientes a los diferentes tratamientos.

En algunos padecimientos mieloproliferativos se dificulta obtener el diagnóstico definitivo, ya que presentan características citomorfológicas y clínicas en común. El diagnóstico preciso es importante para poder establecer el manejo y el tratamiento adecuado, así como para establecer el pronóstico del paciente.

Por lo tanto la metodología de FISH complementa el análisis cromosómico de muestras de pacientes con diversos padecimientos mieloproliferativos. En todos los casos estudiados en este trabajo, el método de FISH corroboró los hallazgos obtenidos del estudio citogenético, en algunos casos hizo evidente una línea celular anormal que no se había detectado citogenéticamente y proporcionó junto con el estudio cromosómico convencional un diagnóstico final para el paciente.

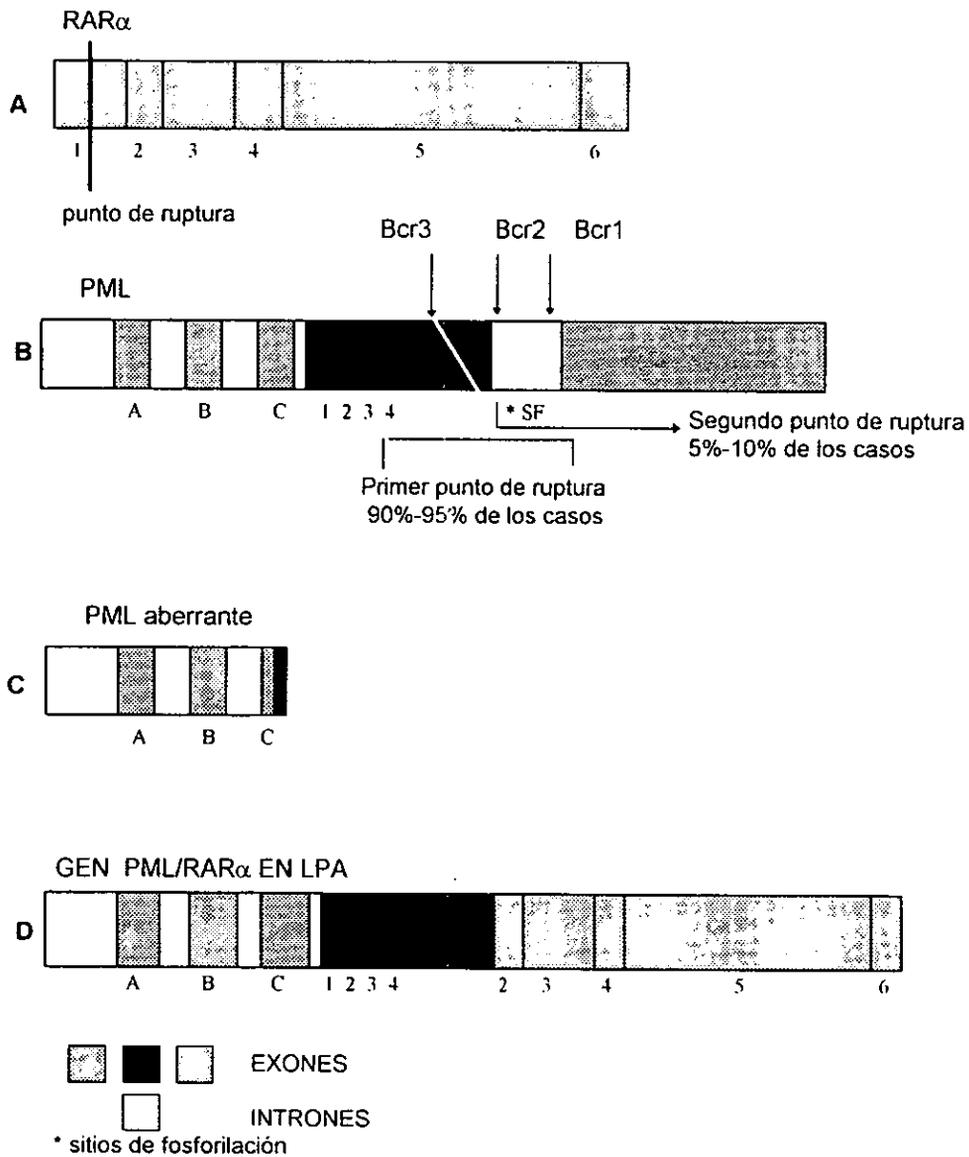


FIG.1. Características moleculares de la t(15;17)

Los puntos de ruptura en el gen RAR α están entre el exón 1 y 2, y en el gen PML son puntos de ruptura alternativos (A y B). Como resultado de la ruptura, se origina un PML aberrante, resultado de la ruptura entre la región Bcr3 y Bcr1 y se produce el gen fusionado PML/RAR α característico de la LPA (C y D). (Tomado y modificado de Grignani et al., 1994).

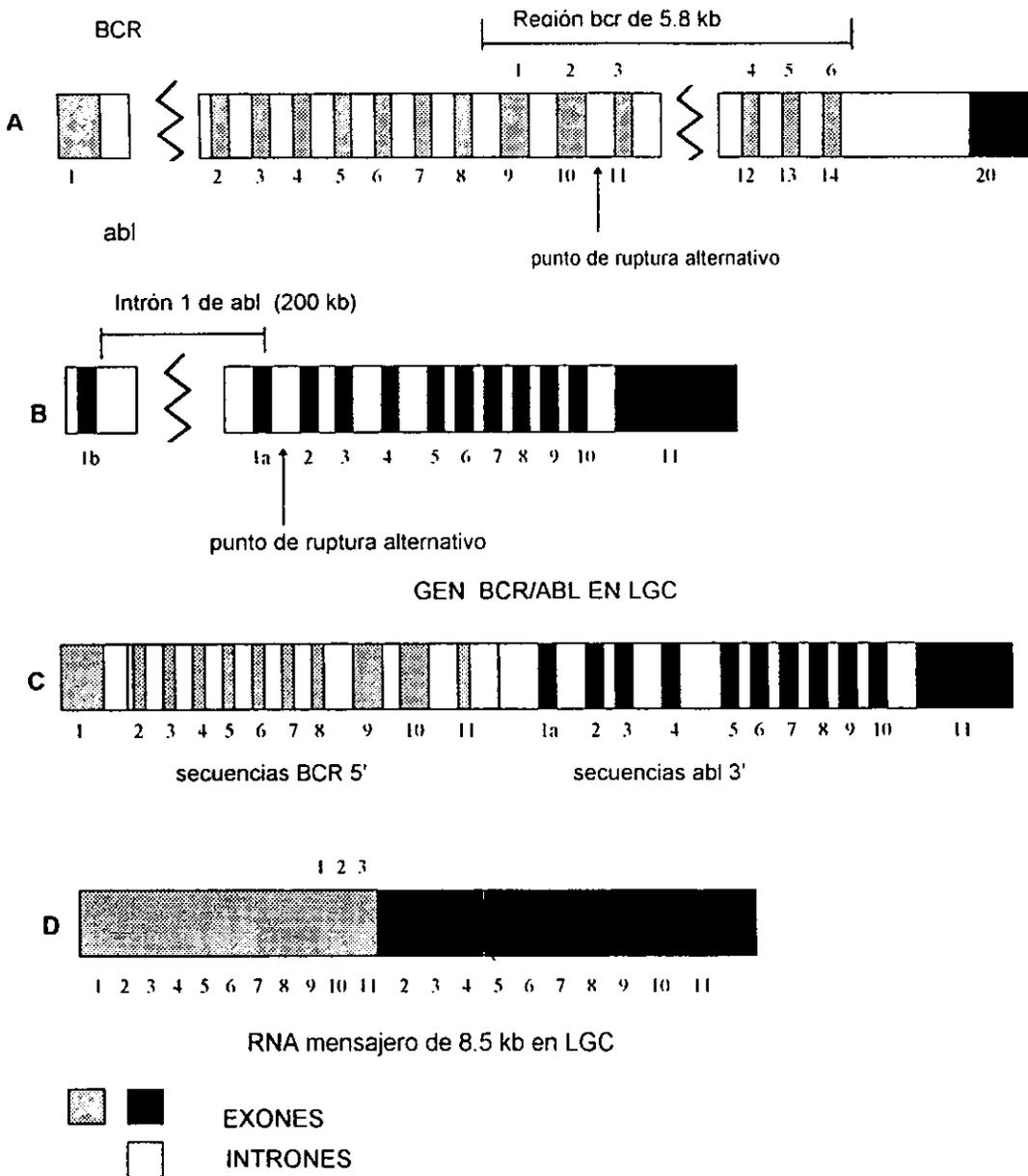


FIG.2. Características moleculares de la t(9;22)

El punto de ruptura en el gen bcr ocurre en una región de 5.8kb (A). En el gen c-abl, el punto de ruptura se encuentra entre los exones 1a y 1b (B). Como resultado de las rupturas, se produce una fusión entre el gen bcr que contiene los exones del 1 al 11 y el gen c-abl que tiene los exones 1a hasta el 11 que produce la aparición del gen fusionado BCR/ABL (C). El producto final es un RNA mensajero de 8.5kb característico de la LGC (D). (Tomado y modificado de Cannistra,1990).

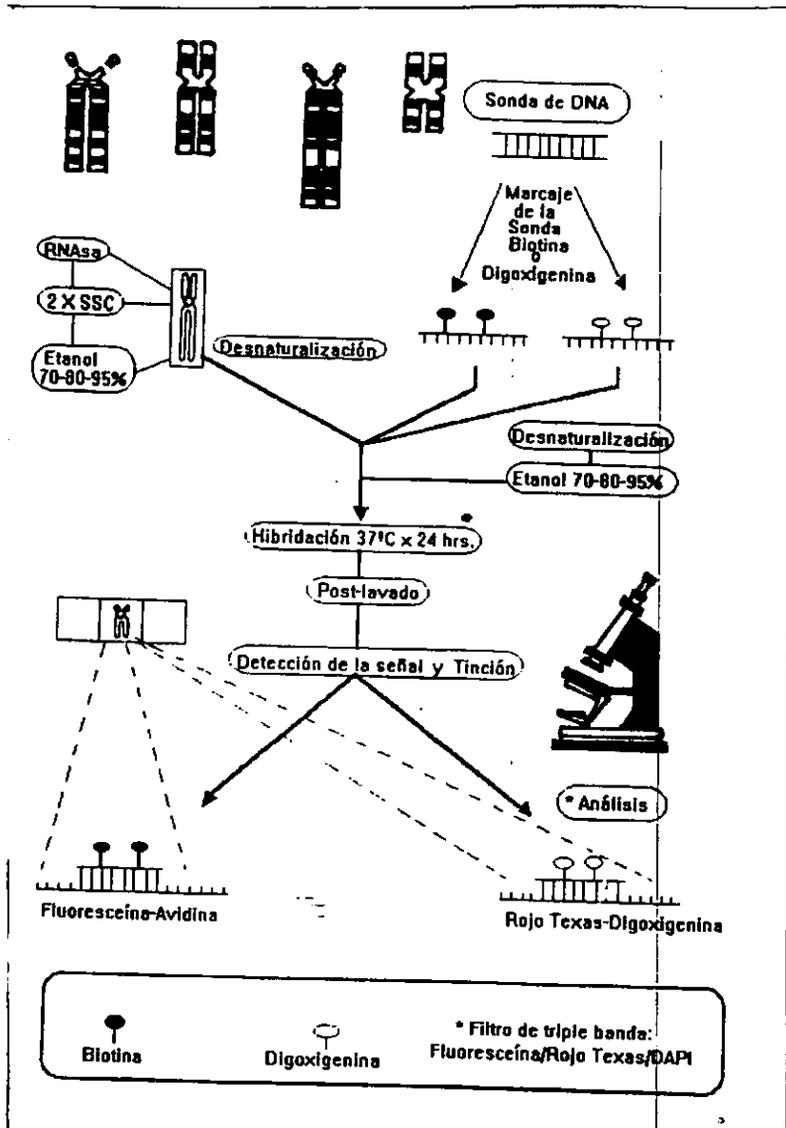


FIG.3. Esquema de la metodología de FISH

A) Desnaturalización del DNA problema; B) Desnaturalización de la sonda de DNA; C) Hibridación del DNA problema con la sonda; D) Detección de la señal y tinción; E) Análisis al microscopio.

Cuadro 1. Características clínicas y de laboratorio de pacientes con leucemia promielocítica aguda

PACIENTE	MOMENTO EN QUE SE REALIZÓ EL ESTUDIO	LEUCOCITOS / BLASTOS mm ³ /%
LPA1	DIAGNÓSTICO	2.600/63
LPA2	DIAGNÓSTICO	4.800/32
LPA3	DIAGNÓSTICO	2.800/6
LPA4	DIAGNÓSTICO	8.100/92
LPA5	RECALDA	2.100/10
LAP6	REMISIÓN	1.400/8

Cuadro 2. Características clínicas y de laboratorio de pacientes con leucemia granulocítica crónica y con otros padecimientos mieloproliferativos.

PACIENTE	MOMENTO EN QUE SE REALIZÓ EL ESTUDIO	LEUCOCITOS / BLASTOS mm ³ / %
LGC	LGC1 AL DIAGNÓSTICO (FASE CRONICA)	247,000/ 12
	LGC2 AL DIAGNÓSTICO (CRISIS BLASTICA)	320,000/ 65
	LGC3 EN TRATAMIENTO (FASE CRÓNICA)	97,100/ 0
	LGC4 EN TRATAMIENTO (VIRAJE A LAM-M2)	27,900 / 90
PADECIMIENTOS MIELOPROLIFERATIVOS	PM1 DIAGNÓSTICO (SMD)	26,000/ 2
	PM2 NO CONCLUYÓ TRATAMIENTO (SMD vs.LGC var.JUVENIL)	230,000/ 11
	PM3 DIAGNÓSTICO (LAM-M7)	16,100/ 17
	PM4 DIAGNÓSTICO (LAM-M6)	10,400/ 25

Var.=variedad

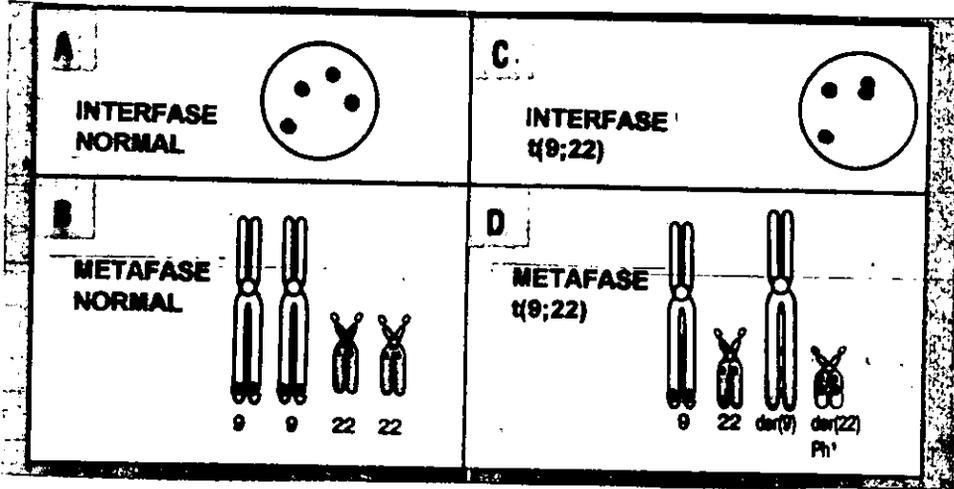


FIG.4. Esquema representativo del análisis con FISH para la sonda de secuencia única *M-bcr/abl*

Núcleos y cromosomas marcados con la sonda *M-bcr/abl*: A) Núcleo normal con 4 señales separadas, 2 señales verdes y 2 rojas; B) Cromosomas normales, una señal verde en cada cromátida de un par de cromosomas; C) Núcleo con la translocación, una señal verde y una roja separadas y una señal roja y verde fusionadas representando la translocación; D) Cromosomas con la translocación, 2 cromosomas normales con una señal verde o roja en cada cromátida y un cromosoma derivativo con un par de señales de diferente color en cada cromátida. (Tomado y modificado de ONCOR Appligene. Catalogue, 1996).

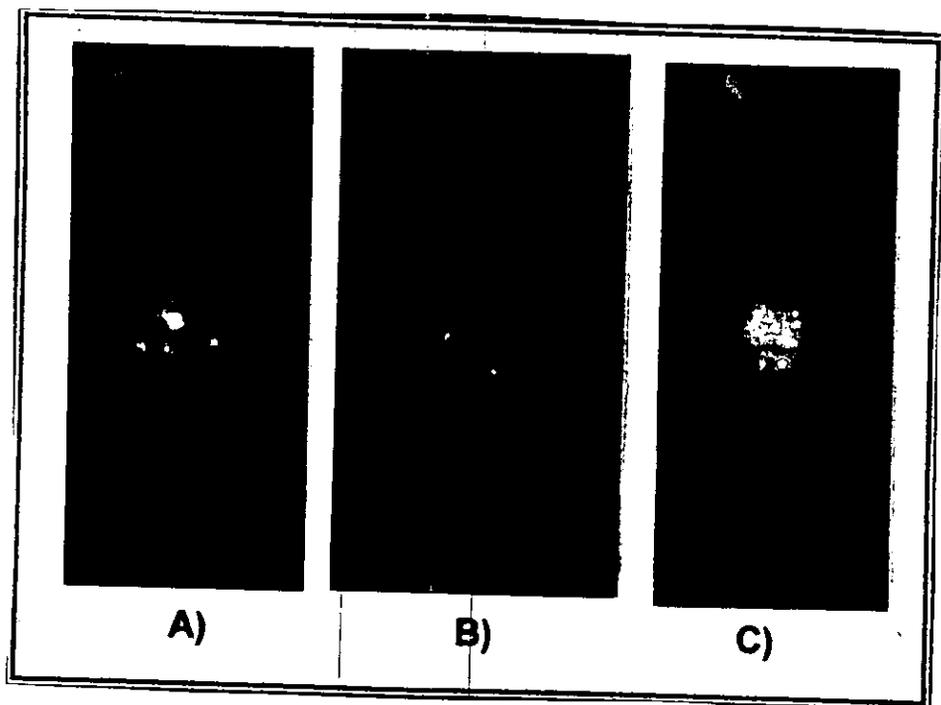


FIG.5. Fotografía representativa de la t(9;22) con la sonda *M-bcr/abl*

Núcleos marcados con la sonda *M-bcr/abl*: A) Núcleo normal con 4 señales separadas, 2 señales verdes y 2 rojas; B) Núcleo con la translocación con 3 señales, una señal verde, una roja y una señal amarilla que representa la translocación; C) Núcleo con 4 señales, una señal verde, una roja y 2 señales amarillas que representan un doble cromosoma Ph⁺.

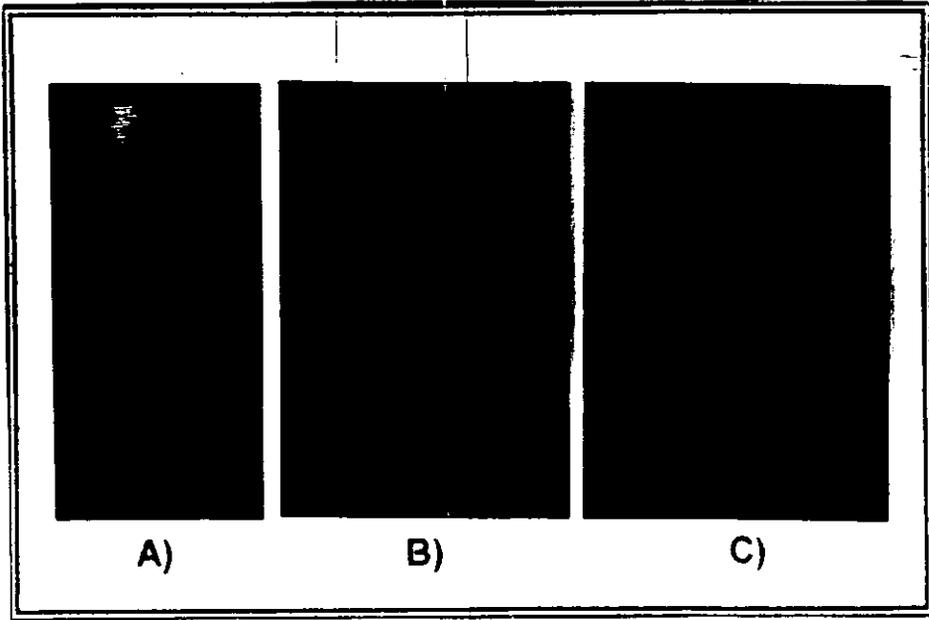


FIG.6. Fotografía representativa de las señales obtenidas con la sonda α -satélite.

Núcleos marcados con la sonda α -satélite: A) Núcleo normal con 2 señales separadas; B) Núcleo con una señal representando una monosomía; C) Núcleo con 3 señales que representa una célula trisómica.

Cuadro 3. Resultados del estudio con citogenética convencional y FISH con la sonda PML/RAR α en pacientes con leucemia promielocítica aguda.

PACIENTE	CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	CÉLULAS SIN FUSIÓN CON FISH	CÉLULAS CON FUSIÓN CON FISH	RESULTADOS DE AMBOS ESTUDIOS
LPA1*	NO ANALIZABLE	25.0%	75.0%**	t(15;17)
LPA2	46,XX,215q+ [5]	19.0%	81.0%**	46,XX,t(15;17)
LPA3	46,XY [11]	14.0%	86.0%**	46,XY/t(15;17)
LPA4	NO ANALIZABLE	12.5%	87.5%**	t(15;17)
LPA5	46,XX [5] /46,XX,t(15;17), ?t(2q;?),?t(4q;?) [12]	30.5%	69.5%**	46,XX/46,XX,t(15;17), t(2q;?),t(4q;?)
LPA6	46,XY [3]	62.0%	38.0%**	46,XY/t(15;17)

Valor basal de fusión génica obtenido de 3 ensayos en células control(MEDIA \pm 3(DE)=4.5%

** Diferencia significativa con respecto al valor basal de fusión génica p<0.001. χ^2 de Pearson

* Estudio en menos de 200 células

[] Total de metafases analizadas por citogenética convencional por línea celular detectada

Cuadro 4. Resultados del estudio con citogenética convencional y FISH con la sonda M-bcr/abl en pacientes con leucemia granulocítica crónica

PACIENTE	CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	CÉLULAS SIN Ph+ CON FISH	CÉLULAS CON Ph+ CON FISH	CÉLULAS CON 2Ph+ CON FISH	RESULTADO DE AMBOS ESTUDIOS
LG C1	46,XY, ?t(9;11;22) [13]	4.5%	95.0%**	0.5%	46,XY,t(9;11;22)
LG C2*	46,XY[1]/48,XY,+8,+19,t(9;22)[1] / 49,XY,+8,+19,t(9;22),?+der(22)[22]	7.4%	35.1%**	57.4%**	46,XY/48,XY,+8,+19,t(9;22)/49,XY,+8,+19,t(9;22),+der(22)
LG C3	NO ANALIZABLE (cariotipo prev.Ph ⁺)	2.0%	97.5%**	0.5%	t(9;22)
LG C4	46,XX,t(9;22)/46,XX,t(9;22),t(9;22)[5] (? 2Ph ⁺)	14.0%	85.0%**	1.0%	46,XX,t(9;22)/46,XX,t(9;22),t(9;22),

Valor basal de fusión génica de 2 ensayos en células control (MEDIA±3(DE)=6%

**Diferencia significativa con respecto al valor basal de fusión génica $p < 0.001$, χ^2 de Pearson

* Estudio en menos de 200 células

[] Número total de metafases analizadas por citogenética convencional por línea celular detectada prev.=previo

Cuadro 5. Resultados de los estudios con citogenética convencional y FISH con sondas de tinción completa para los cromosomas 11 y 5 en pacientes con leucemia granulocítica crónica

PACIENTE	CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	CÉLULAS CON SEÑAL CON FISH	RESULTADO
LGC1	46,XY,7t(9;11;22) [13]	Sonda para el cromosoma 11 3 señales en 6* metafases	46,XY,t(9;11;22)
LGC2	46,XX,t(9;22)/46,XX, t(9;22),t(7;5;11) [5]	Sonda para el cromosoma 5 3 señales en 5* metafases	46,XX,t(9;22)/46,XX, t(9;22),t(5;11)

[] Número total de metafases analizadas con citogenética convencional por línea celular detectada

* Total de metafases analizadas con FISH



Pedro Morales Hernandez

170399

46,XY,-13,-15,-8,-19

+9;22

Instituto
Nacional
de Pediatría

DIVISION DE INVESTIGACION EN GENETICA HUMANA.

79

FIG.7. Cariotipo del paciente LGC2, en crisis blástica de la enfermedad, con fórmula cromosómica:

46,XY, +8, t(9;22), -13, -15, +19

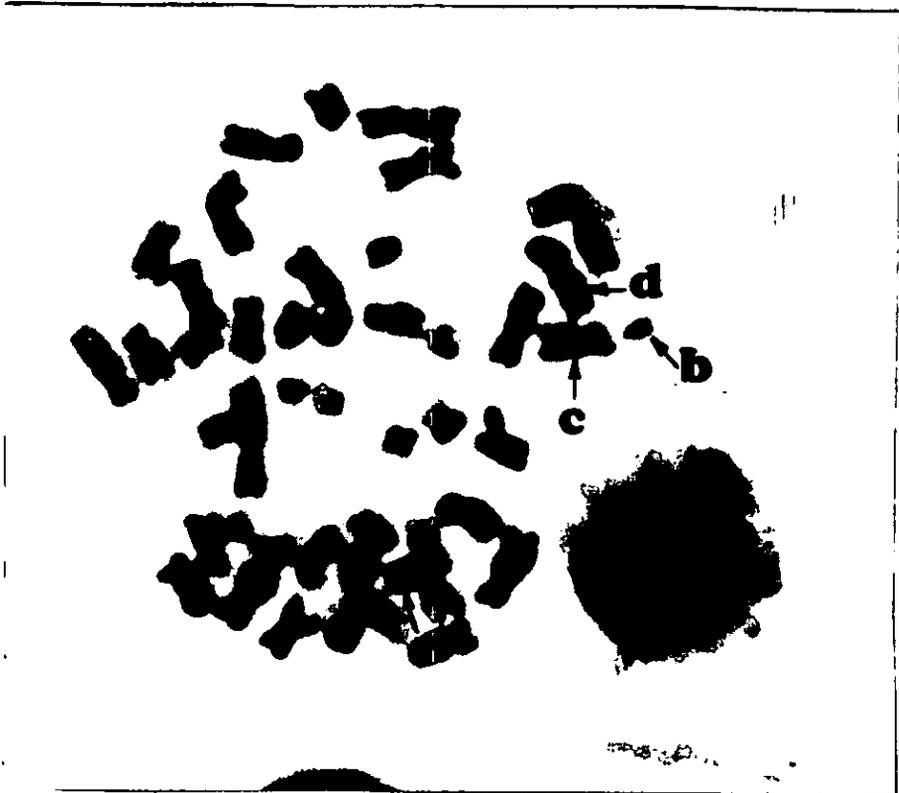


FIG.8. Metafase con bandas G del paciente LGC4 que muestra las translocaciones t(9;22) y t(5;11):

A) Derivativo 9; B) Derivativo 22; C) Derivativo 5; D) Derivativo 11.

Cuadro 6. Resultados del estudio con citogenética convencional y FISH con las sondas α -satélite para los cromosomas 7 y 8 en pacientes con padecimientos mieloproliferativos.

PACIENTES	CITOGENÉTICA CONVENCIONAL	CÉLULAS CON 2 SEÑALES CON FISH	CÉLULAS CON 1 SEÑAL CON FISH	CÉLULAS CON 3 SEÑALES CON FISH	RESULTADO DE AMBOS ESTUDIOS
α -satélite cromosoma 7					
PM1	45,XY,-C [3]	9.7%	90.2%**	0.1%	45,XY,-7
PM2	45,XY,-C [3]	8.7%	91.3%**	0	45,XY,-7
$Vb^M=4.8\%$ $Vb^T=3.2\%$					
α -satélite cromosoma 8					
PM3	47,XY+21c/ 48,XY,+C,+21c[15]	5.0%	0	95.0%**	47,XY,+21c/48,XY,+8,+21c
PM4	46,XX [6]/47,XX,+C [6]	4.5%	0.2%	95.2%**	46,XX,/47,XX,+8
$Vb^M=8.3\%$ $Vb^T=0.6\%$					

Vb^M = valor basal para monosomía 7 y 8

Vb^T = valor basal para trisomía 7 y 8

**Diferencia significativa con respecto al valor basal de aneuploidía $p<0.001$, χ^2 de Pearson

| | Número total de metafases analizadas por citogenética convencional por línea celular detectada

BIBLIOGRAFÍA

1. Anastasi, J. Fluorescence *in situ* hybridization in leukemia. *Ann NY Acad Sci* 1993, 214-224.
2. Andreef, M. Biological characterization and therapy monitoring of leukemia. *Acad Press. Londres* 1992, 231-266.
3. Bernácer, B M., Sánchez, F J., Vecilla, R C y Lillo, L M. Leucemias agudas linfoblásticas. *Hematología* 11 1985, 59-76.
4. Bernstein, R. Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. *Semin Hematol* 1988 25: 20-34.
5. Boncinelli, E. Homeobox genes and disease. *Curr Opin Genet Dev* 1997, 7: 331-337.
6. Bonilla, M., Rivera, L R., Meza, C. Clasificación de las leucemias. *Criterios Pediátricos. Instituto Nacional de Pediatría* 1993, 9: 65-67.
7. Cannistra, S.A. Chronic myelogenous leukemia as a model for the genetic basis of cancer. *Hematol/Oncol Clin North Am* 1990, 4:337-357.
8. Clare, N. y Hansen, K. Cytogenetics in the diagnosis of hematologic malignancies. *Hematol/Oncol Clin North Am* 1994, 8:785-807.
9. Daghistani, D., Toledano, S R. y Curless, R. Monosomy 7 syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 1990, 44: 263-269.
10. Dewald, G W. y Wright P I. Chromosome abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Semin Oncol* 1995, 22:341-354.
11. Dewald, G W., Schad, C R., Christensen, E R., Tiede, A L., Zinsmeister, A R., Spurbeck, J L., Thibodcau, S N y Jalal, S M. The application of fluorescent *in situ* hybridization to detect *Mbc abl* fusion in variant Ph chromosome in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet* 1993, 71: 7-14.
12. Döhner, H., Stilgenbauer, S., Fischer, K., Schröder, M., Bentz, M. y Lichter, P. Diagnosis and monitoring of chromosome aberrations in hematological malignancies by fluorescence *in situ* hybridization. *Stem Cells* 1995, 13(suppl 3): 76-82.
13. Douer, D., Preston-Martin, S., Chang, E., Nichols, P W., Watkins, K J. y Levine, AM. High frequency of acute promyelocytic leukemia among Latinos with acute myeloid leukemia. *Blood* 1996, 87: 308-313.
14. Frankel, R.S. Acute promyelocytic leukemia. *Hematol/Oncol Pediatr Clin North Am.* 1993, 7:123-128.
15. Giralt, S., Kantarjian, H. y Talpaz, M. Treatment of chronic myelogenous leukemia. *Semin Oncol* 1995, 22: 396-404.
16. Grignani, F., Fagioli, M., Alcalay, M., Longo, L., Pandolfi, P P., Donti, E., Biondi, A., Lo Coco, F., Grignani, F y Pelicci, G P. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994, 83: 10-25.
17. Hagemeijer, A. Leukemia. Normal and malignant hemopoiesis. *Cytogenet Oncogene* 1992, 6(suppl 4): 16-18.
18. Herm, S. y Mitelman, F. *Cancer cytogenet.* Nueva York. Alan R. Liss Inc 1987.
19. Huang, S Y., Tang, j., Liang, Y J., Wang, C H., Chen, Y C y Tien, S F. Clinical, haematological and molecular studies in patients with chromosome translocation t(7:11): a study of four Chinese patients in Taiwan. *Br J Haematol* 1997 96: 682-687.
20. ISCN. An international system of human cytogenetic nomenclature. Recommendation of the International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature. *Cytogenet Cell Genet* 1995.

21. Jenkins. R., Le Beau, M M., Kraker, W J, Borell, T J., Stalboerger, P G., Davis, E M., Penland, L., Fernald, A., Espinosa III R., Schaid, D J., Noel, P, y Dewald, G W. Fluorescence *in situ* hybridization: A sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood* 1992. 79: 3307-3315.
22. Lamplkin, B C., Lange, B, y Bernstein, I. Biologic characteristics and treatment of acute nonlymphocytic leukemia in children. *Pediatr Clin North Am* 1988, 35: 743-762.
23. Lewin, B. *Genes IV*. Oxford University Press, New York 1990.
24. Lichter, P., Fischer, K., Joos, S., Fink, T, Baudis, M., Potkul, R K., Ohl S., Solinas-Toldo, S., Weber, R., Stilgenbauer, S., Bentz, M, y Döhner, M. Efficacy of current molecular cytogenetic protocols for the diagnosis of chromosome aberrations in tumor specimens. *Cytokin Mol Ther* 1996. 2: 163-170.
25. Lukášová, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Kjeronská, J., Rýznar, L., Horáková, J., Krahulcová, E y Homeck, G. Localisation and distance between ABL and BCR genes in interphase nuclei of bone marrow cells of control donors and patients with chronic myeloid leukaemia. *Hum Genet* 1997, 100: 525-535.
26. Mancini, M., Nanni, M., Cedrone, M., Diverio, D., Avvisati, G., Riccioni, R., De Cuiis, M R., Fenu, S, y Alimena, G. Combined cytogenetic, FISH and molecular analysis in acute promyelocytic leukemia at diagnosis and in complete remission. *Br J Haematol* 1995, 91: 878-884.
27. Marshall, R R., Murphy, M., Kirkland, D J y Bentley, K S. Fluorescence *in situ* hybridization with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutat Res* 1996, 372: 233-245.
28. Mecucci, C y Van den Berghe, H. Cytogenetics. *Hematol/Oncol Clin North Am* 1992. 6:523-541.
29. Mitelman, F. *Catalog of chromosome aberrations in cancer*. Wiley-liss 1991. 842.
30. ONCOR. *Chromosome in situ hybridization Manual* 1996.
31. ONCOR. *Appligene. Catalogue* 1996.1197.
32. *Registro Histopatológico de neoplasias en México*. Bienio 1993-1994. Dirección general de Epidemiología 1996. 67-70.
33. Rohini, C., Vyas, R C., Frankel, S R, Agbor, P., Miller, W M., Warrell, R P, y Hittelman, W N. Probing the pathobiology of response to All-trans Retinoic Acid in acute promyelocytic leukemia: Premature chromosome condensation/Fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Blood* 1996. 87: 218-226.
34. Salas, M. *Neoplasias malignas en los niños*. Interamericana. México 1988.
35. Schad, C, y Dewald, G. Building a new clinical test for fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Cytogenet* 1995, 21. 2-5.
36. Schad, C., Manson, C A., Paietta, E., Casper, J., Jalal, S M, y Dewald, G. Efficacy of fluorescence *in situ* hybridization for detecting PML/RARA gene fusion in treated and untreated acute promyelocytic leukemia. *Mayo Clin Proc* 1994, 69: 1047-1053.
37. Schoch, C., Haase, D., Haferlach, T., Freund, M., Link, H., Lengfelder, E., Löffler, H., Büchner, T, y Fonatsch, C. Incidence and implication of additional chromosome aberrations in acute promyelocytic leukemia with translocation (15:17) (q22;q21): a report on 50 patients. *Br J Haematol* 1996, 94: 493-500.
38. Solomon, E., Borrow, J., Goddard, A D. ⁴⁴Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991, 254: 1153-1160.

39. Spiers, A S D. Clinical manifestations of chronic granulocytic leukemia. *Semin Oncol* 1995, 22: 380-395.
40. Swiger, R R. y Tucker, J D. Fluorescence *in situ* hybridization: A brief review. *Environ Mol Mutagen* 1996, 27: 245-254.
41. Sullivan, B A., Schiffer, C A., Patil, S R., Hulseberg, D., Leana-Cox, J. Y Schwartz, S. Application of FISH to complex chromosomal rearrangements associated with chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1995, 82: 93-99.