

107



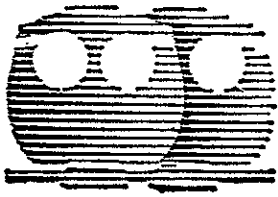
# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## SEGUIMIENTO CITOGENETICO Y MOLECULAR EN PACIENTES CON LMC TRATADOS CON INTERFERON

T E S I S  
Que para obtener el título de  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
p r e s e n t a  
ELIZABETH RUIZ SANCHEZ

203907



México, D. F. EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2000



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** Bertha Resendiz Vázquez

**VOCAL** Raúl Nieto Camacho

**SECRETARIA** Rosa María Arana Trejo

**1er SUPLENTE** Alicia Cervantes Peredo

**2do SUPLENTE** Teresa de Jesús Olivera Flores



---

Q.F.B. Rosa María Arana Trejo  
Asesor de Tesis



---

Elizabeth Ruiz Sánchez  
Sustentante

**Con todo mi amor y cariño**

**En memoria de Joel Jorge Ruiz.  
Por enseñarme lo bella que es la vida**

**A Teresa A. Sánchez Franco  
Por tu amor, apoyo y gran fortaleza**

**A mis hermanos, familiares y grandes  
amigos por su ayuda y presencia que  
hacen la vida mejor.**

**A Rosa María Arana Trejo  
por la paciencia, apoyo y ayuda brindados  
para la realización de esta Tesis.**

**A todo el personal del Servicio  
de Genética del Hospital General  
de México Ssa.**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**A la Facultad de Química.**

**A Roche y Dra Susana Kofman Alfaro  
por el financiamiento para la realización  
de este trabajo.**

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	
I ASPECTOS CLÍNICO	2
II CITOGENÉTICA	7
III BIOLOGÍA MOLECULAR	15
IV LMC EN POBLACION PEDIÁTRICA	21
V TRATAMIENTO DE LA LMC	24
VI MONITOREO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LMC	37
3. OBJETIVOS	42
4. MATERIAL Y MÉTODOS	43
5. RESULTADOS	54
6. DISCUSIÓN	58
7. CONCLUSIONES	61
8. BIBLIOGRAFIA	71

# 1. INTRODUCCIÓN

El cáncer representa uno de los principales retos de salud pública, siendo las Leucemias de los principales y la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) la más frecuente en adultos.

La LMC es una neoplasia hematológica que se caracteriza por presentar una alteración citogenética llamada cromosoma Filadelfia ( $Ph^1$ ), resultado de una translocación recíproca  $t(9;22)(q34.1;q11.2)$ . Este rearrreglo fusiona el oncogen *c-abl* localizado en 9q34 con el gen *bcr* en el cromosoma 22q11. El resultado de la fusión es un híbrido *bcr/abl* que tiene un mRNA de 8.5Kb y una proteína de 210Kd (p210) con una actividad tirosina cinasa mayor que su contraparte p145 del gen *c-abl* normal.

La Citogenética y la Biología Molecular son herramientas útiles en el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la LMC, ambas herramientas son de gran utilidad para evaluar la eficacia de diferentes tratamientos en la LMC y han permitido conocer mejor los mecanismos de leucemogénesis de esta enfermedad. Esto ha llevado a la utilización de nuevas estrategias terapéuticas, con una mayor especificidad para las células leucémicas, presentando no solo un efecto paliativo, sino produciendo un cambio en el curso clínico de la enfermedad.

La terapia convencional de la LMC en fase crónica, con agentes tales como Busulfán o Hidroxiurea suele ser eficaz para el control de las manifestaciones clínicas pero sin lograr modificaciones en la presencia del  $Ph^1$ . La terapia a base de Interferón  $\alpha$  ( $INF\alpha$ ) solo o combinado con quimioterapia logra remisión hematológica más prolongada y llega a suprimir la clona portadora de cromosoma  $Ph^1$ .

Este trabajo de Tesis presenta el seguimiento citogenético y molecular de 23 pacientes con LMC de *novo* tratados con  $INF\alpha 2A$  para evaluar su efectividad, basándose en la hipótesis: el tratamiento con  $INF\alpha 2A$  en pacientes con LMC, es capaz de inducir y mantener una respuesta hematológica, citogenética y molecular, mejorando así la supervivencia. Además se compara la respuesta al  $INF\alpha 2A$  en función de la edad (entre 18 adultos y 6 niños), grupo de riesgo, tipo de rearrreglo molecular y se analiza su influencia en el trasplante de médula ósea.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **I ASPECTOS CLÍNICOS**

#### **Generalidades**

Las leucemias constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias derivadas de la transformación maligna de las células hematopoyéticas. Se clasifican de acuerdo con el tipo celular implicado en mieloides o linfoides y según el curso clínico de la enfermedad en agudas o crónicas <sup>(1,2)</sup>

El término agudo y crónico se refiere al estado de maduración de las células leucémicas y a la velocidad con la que se desarrollan síntomas, signos y complicaciones. Las leucemias agudas se caracterizan por la presencia de células indiferenciadas y una evolución rápida de la enfermedad, sobre todo en pacientes no tratados. El término crónico implica por lo menos inicialmente, presencia de leucocitos diferenciados, un curso clínico relativamente indolente y una evolución prolongada, aunque en algunos subtipos el pronóstico es más severo y el curso clínico más rápido <sup>(1,3,4)</sup>.

Los efectos frecuentes de la leucemia son la aparición de infecciones, la anemia grave y la tendencia a hemorragia provocada por la trombocitopenia. Estos efectos son el resultado de la proliferación de las células leucémicas principalmente en la médula ósea y en los tejidos linfoides, donde interfieren con la inmunidad y con la hematopoyesis normal. Finalmente estas células emigran a la periferia e infiltran órganos como bazo, ganglios linfáticos, hígado, regiones vasculares especiales, hueso y otros tejidos provocando dolor, tendencia a fracturas óseas o destrucción tisular <sup>(4)</sup>.

Las leucemias a diferencia de otros tipos de cáncer presentan anomalías citogenéticas primarias específicas, que han ayudado a clasificarlas. Además, se presentan cambios citogenéticos secundarios observados cuando la enfermedad progresa aún cuando clínicamente el paciente permanezca estable; es por esto que los estudios citogenéticos son de gran utilidad en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de estos pacientes. Actualmente se utilizan también estudios de Biología Molecular que tienen una mayor sensibilidad por lo que ha mejorado el diagnóstico, seguimiento y entendimiento de los mecanismos de la leucemogénesis <sup>(5,6)</sup>.



## Definición

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa clonal que surge de la transformación maligna de una célula madre pluripotencial (*stem cell*) y junto con la Policitemia Vera es considerada una de las entidades diagnósticas más uniformes y mejor definidas dentro del grupo de enfermedades mieloproliferativas <sup>(2,6)</sup>.

El origen en la célula primitiva y la naturaleza clonal de esta enfermedad se ha demostrado mediante estudios de sistemas genéticos polimórficos tales como el de Glucosa 6- fosfato deshidrogenasa (G6PD) y Adenilato Cinasa (AC) en mujeres mosaico para inactivación del X, en quienes se demuestra la presencia de un solo alelo en la célula neoplásica <sup>(1,2)</sup>.

## Características

La LMC constituye aproximadamente 7-15% de las leucemias en adultos, con una frecuencia de 1-2 casos por cada 100,000 individuos al año, puede desarrollarse en cualquier edad, predominantemente entre los 45 a 55 años y es poco frecuente antes de los 10 años. Existe una mayor incidencia en hombres que en mujeres (1.4-2.2), sin que exista una diferencia en el curso clínico para ambos géneros <sup>(5,7)</sup>.

La enfermedad se caracteriza por esplenomegalia marcada, elevación considerable del recuento leucocitario y acumulación de granulocitos maduros e inmaduros. La presencia de síntomas es proporcional con la elevación leucocitaria, siendo los más frecuentes la fatiga, anorexia, pérdida de peso, malestar abdominal, anemia, hemorragias, esplenomegalia y hepatomegalia. La basofilia, típica de todos los trastornos mieloproliferativos, puede ser notable. Se encuentran diversas anormalidades bioquímicas, como la elevación de los valores séricos de la vitamina B12 y transcobalamina; la fosfatasa alcalina está marcadamente reducida y existe hiperuricemia debido al incremento del metabolismo celular. Se han descrito otras anormalidades incluyendo elevación de los niveles del factor de crecimiento hematopoyético, interleucina 1, factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) o decremento en los niveles del inhibidor de mielopoyesis, así como de prostaglandina E2. La medula ósea se encuentra hiper celular (75-90%) y la fibrosis medular se incrementa con la progresión de la enfermedad <sup>(8,9,10)</sup>.

Tabla 1. Modelos pronósticos para pacientes con LMC.

Referencia	Características pronósticas adversas	Modelo de clasificación
Cervantes <sup>(11)</sup>	bazo >0 cm bajo el margen costal higado >0 cm bajo el margen costal blastos en médula ósea >=1%	Estado 1: 0-1 factor Estado 2: >2 factores.
Sokal et al <sup>(12)</sup>	Edad Blastos en sangre periférica Tamaño del bazo Cuenta de plaquetas Ecuación = $\exp(0.0119(\text{edad}-43.4)+0.0345(\text{bazo}-7.51)+0.188 [(cuenta\ de\ plaquetas-1.72)+0.088 (\text{bazo}-2.58)])$	Riesgo bajo: < 0.8 Riesgo intermedio: 0.8-1.2 Riesgo alto: >1.2
Kantarjian et al <sup>(7,13)</sup>	Fase Crónica Edad >60 años Bazo $\geq$ 10cm Blastos $\geq$ 3% en sangre o 5% en médula Basófilos $\geq$ 7% en sangre o 3% en médula Plaquetas $\geq$ 700 X 10 <sup>9</sup> L  Fase acelerada Evolución citogenética Blastos en sange periférica $\geq$ 15% Blastos + Promielocitos $\geq$ 30% en sangre Basofilos $\geq$ 20% en sangre Plaquetas < 100 X 10 <sup>9</sup> /L	Estadio 1: 0 a 1 características Estadio 2: 2 características Estadio 3: $\geq$ 3 características  Estadio 4 : $\geq$ 1 de las características de fase acelerada

# I CITOGENÉTICA DE LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

## CROMOSOMA FILADELFIA

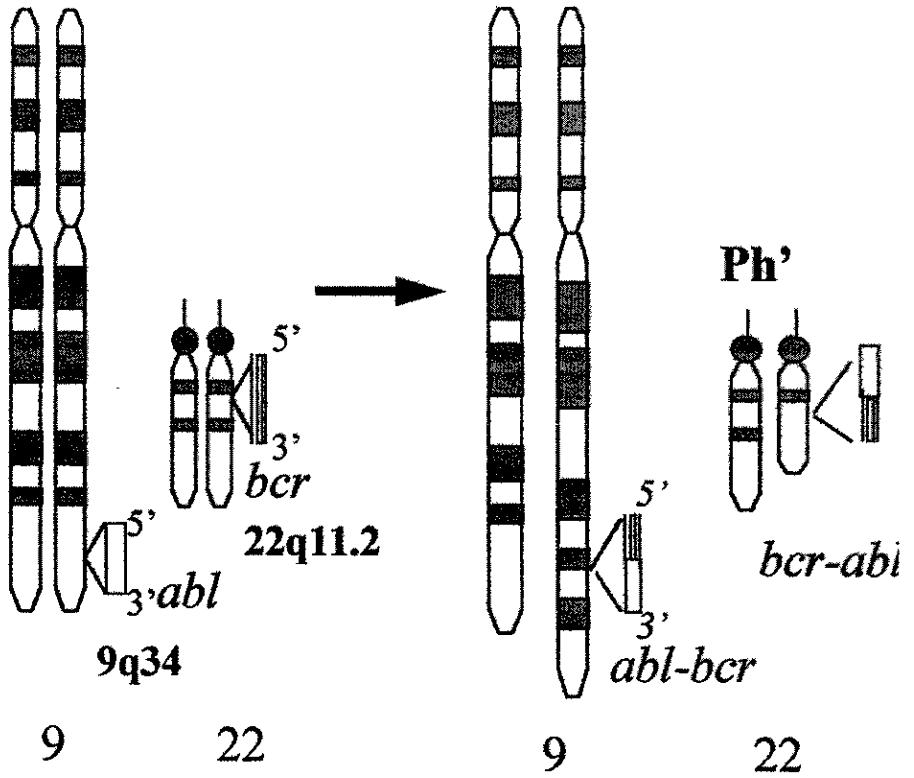
En 1960, Nowell y Hungerford<sup>(15)</sup>, reportaron la primera alteración citogenética estable asociada a un cáncer humano, observaron un cromosoma del grupo G muy pequeño en células de pacientes con LMC. Este marcador, fue llamado cromosoma Filadelfia (Ph<sup>1</sup>) en honor del lugar de su descubrimiento, aún cuando no se sabía si se trataba de un cromosoma 21 o 22, o si se debía a una translocación o una deleción. Durante estos años, antes de la introducción de las técnicas de bandeo, se pensó que el origen más probable del Ph<sup>1</sup> era una deleción simple del cromosoma 22<sup>(16,17)</sup>.

Con ayuda de técnicas de bandeo Rowley<sup>(18)</sup> observó que el cromosoma Ph<sup>1</sup> correspondía a un cromosoma 22 y que no se trataba de una deleción, sino de una translocación entre la región proximal de 22q y de 9q. Por medio de técnicas de alta resolución se han localizado los puntos de ruptura del rearrreglo en las sub-bandas 9q34.1 y 22q11.2<sup>(16,19)</sup>. (Figura 1)

El cromosoma Ph<sup>1</sup>, producto de la translocación recíproca y balanceada, se detecta en el 95% de los pacientes con LMC *de novo* y constituye la alteración más característica de la enfermedad, por encontrarse en el 100% de las células de médula ósea. Desde su descubrimiento el cromosoma Ph<sup>1</sup> ha sido de gran importancia por la relación entre aberraciones cromosómicas específicas y cáncer, no solo como auxiliar diagnóstico, sino para conocer el mecanismo de su formación y su relación con el desarrollo de la enfermedad. Se ha cuestionado si la translocación es el evento primario en el proceso leucémico o es la consecuencia de este proceso<sup>(5,20)</sup>.

La presencia del cromosoma Ph<sup>1</sup> a nivel de la serie eritrocitaria, megacariocítica, granulocítica, monocítica y de algunos precursores linfocitarios, indica que la LMC constituye una alteración clonal de la célula pluripotencial. La proliferación de la serie mieloide en la fase crónica representa una interrogante debido al origen clonal de la enfermedad<sup>(7,20)</sup>.

**Figura 1. t(9;22)(q34,q11)**



Configuración normal de los cromosomas 9 y 22

Rearreglo cromosómico 9 (9q+ y 22 (Ph'))

En la mayoría de los casos el  $Ph^1$  representa una translocación simple; sin embargo en 5% de los pacientes se pueden observar formas variantes o formas atípicas de la translocación. En el mismo año en que la  $t(9;22)$  fue descrita, se observó la primer forma variante del rearrreglo, desde entonces se han documentado más de 300 variantes, todos los cromosomas han sido implicados en estas variantes, con excepción del cromosoma Y (17,21).

Anteriormente estas variantes se clasificaban en simples y complejas, las primeras mostraban una translocación entre el cromosoma 22 y otro cromosoma diferente del 9 y las segundas involucraban tres o más cromosomas, incluyendo al 9 y 22. Pero en 1984 Prakash<sup>(22)</sup> con técnicas de alta resolución y bandas R reportó que las variantes simples son complejas, ya que siempre involucran al cromosoma 9. Esto fue confirmado con hibridación *in situ*; por lo tanto, todas las variantes simples involucran más cromosomas, pero siempre al 9 y 22. En estas variantes se puede observar un cromosoma 9 normal, debido a que el punto de ruptura del tercer cromosoma implicado generalmente ocurre en una banda clara subterminal (G negativa), similar a la del cromosoma 9 implicada en el  $Ph^1$ . No se ha observado preferencia por algún cromosoma en estas translocaciones variantes, ni tampoco se ha encontrado una relación entre los puntos de ruptura de todos estos cromosomas con sitios frágiles, localización de oncogenes o puntos de ruptura consistente con otras neoplasias. Lo anterior podría explicar que estas variantes son indistinguibles clínicamente de la LMC  $Ph^+$ , no alteran el curso natural de la enfermedad y no existe diferencia en la respuesta al tratamiento (16,21).

Existe otro tipo de LMC en función del cromosoma  $Ph^1$ , la LMC  $Ph^1$  negativa ( $Ph^1^-$ ) en un 5-10% de los pacientes, en la que se encuentra un conjunto de entidades heterogéneas. Dentro de este grupo existen pacientes con características clínicas y hematológicas idénticas a la LMC  $Ph^1$ , donde la translocación no es detectada por métodos citogenéticos pero si por moleculares, el pronóstico de estos pacientes es similar al de los pacientes que muestran el cromosoma  $Ph^1$ . El resto de los casos, que no presentan rearrreglo a nivel molecular ( $Ph^1^-$ ) presentan características clínicas, hematológicas y curso clínico diferente a la LMC  $Ph^1$ . Su pronóstico es pobre y pueden presentar diversas alteraciones citogenéticas, por lo cual se clasifican como desódones mieloproliferativos

diferentes a la LMC. <sup>(21,22)</sup>

Aunque el diagnóstico de LMC generalmente puede realizarse solamente con los datos clínicos y hematológicos, algunas veces el diagnóstico diferencial con otras neoplasias de médula ósea y reacciones leucemoides es difícil, por lo cual la presencia del cromosoma Ph<sup>1</sup> es de gran ayuda para definir la LMC. Así, la identificación de este marcador confirma el diagnóstico de LMC, sin embargo, la ausencia del Ph<sup>1</sup> no la excluye a menos que el rearreglo molecular sea negativo <sup>(20,23)</sup>.

Es importante señalar que el cromosoma Ph<sup>1</sup> no es exclusivo de la LMC, este marcador se presenta también en la leucemia mieloide aguda (LMA) y leucemia linfocítica aguda (LLA), este cromosoma es citogenéticamente idéntico al presente en la LMC, pero molecularmente presentan diferencias. La LLA Ph<sup>1+</sup> es más frecuente en adultos (25-30%) que en niños (3-5%). En la LMA, cuando se presenta el cromosoma Ph<sup>1</sup> resulta difícil diferenciar si se trata de una LMA *de novo* o de una LMC en crisis blástica de tipo mielode, cuya fase crónica ha pasado inadvertida. Resulta de gran importancia diferenciar las Leucemias Agudas Ph<sup>1+</sup> de la LMC, ya que el pronóstico, tratamiento y seguimiento es diferente, así la LLA Ph<sup>1+</sup> es de mal pronóstico y durante el tratamiento con terapia convencional se pueden lograr remisiones citogenéticas <sup>(24,25,26)</sup>.

## CITOGÉNÉTICA DE LA FASE CRÓNICA

El marcador Ph<sup>1</sup> y su relación con la evolución clínica de LMC proporciona un modelo para el estudio de las bases genéticas del desarrollo del cáncer. La presencia de anomalías cromosómicas adicionales no aleatorias en clones Ph<sup>1</sup> positivas durante la progresión de la LMC, apoyan el concepto de alteraciones genéticas primarias y secundarias en la evolución de la carcinogénesis <sup>(5)</sup>.

En la gran mayoría de los pacientes en fase crónica (95%), el cromosoma Ph<sup>1</sup> está presente en todas las células al diagnóstico y persiste aun cuando se obtenga la remisión clínica y hematológica con terapia convencional. Esto contrasta con la leucemia aguda Ph<sup>1+</sup>, en la cual la remisión citogenética se observa normalmente cuando el paciente responde favorablemente a la quimioterapia <sup>(21)</sup>.

El patrón citogenético más frecuente en la fase crónica es la presencia de un solo cromosoma Ph<sup>1</sup>, sin embargo, se pueden encontrar los siguientes eventos<sup>(20,23)</sup>:

1. Mosaico de células Ph<sup>1</sup> y células normales, observado generalmente al diagnóstico y con tendencia a desaparecer durante el curso de la enfermedad. La presencia de mosaico ha sido asociada a una mayor supervivencia y mejor respuesta terapéutica.
2. La presencia de la t(8;21).
3. Anomalías estructurales secundarias o cambios numéricos (hipodiploidías o hiperdiploidías). Alteraciones citogenéticas secundarias al Ph<sup>1</sup> estables durante la fase crónica que identifican a los pacientes dentro del grupo de alto riesgo, asociados a un mal pronóstico y con mayor riesgo de transformación blástica.

## **CITOGÉNÉTICA DE LA FASE ACELERADA**

Durante la progresión de la LMC se presentan anomalías citogenéticas secundarias, aún antes de presentarse datos clínicos, por lo que estas anomalías se toman como parte de los parámetros que definen a la fase acelerada, ayudando a identificar a pacientes con alto riesgo de llegar a crisis blástica y definir así la terapia adecuada<sup>(21)</sup>

Dentro de las anomalías citogenéticas secundarias es importante identificar aquellas que son inestables, las cuales no tienen significado pronóstico. La desaparición de tales clonas y surgimiento de otras clonas anormales, es consistente con la hipótesis que establece que los cambios secundarios inicialmente se producen al azar, y sólo son estables cuando confiere una ventaja a la célula.<sup>(23,24)</sup>

## **CITOGÉNÉTICA DE LA FASE BLÁSTICA**

En la fase aguda del 70 al 80% de los casos cursan con alteraciones cromosómicas secundarias estables, estos cambios pueden presentarse antes de la progresión de la enfermedad y en general se asocian con manifestaciones clínicas de fase acelerada, por lo que se consideran como una característica de esta etapa y una manifestación de la transformación de la enfermedad<sup>(21)</sup>.

Mitelman en 1976 propone el término de ruta mayor y menor para la evolución cromosómica de la LMC. Dentro de la ruta mayor se encuentra la adquisición de un segundo cromosoma Ph<sup>1</sup>, trisomía 8 e isocromosoma 17 [i(17q)], y con menor frecuencia la trisomía 19, trisomía 21, hipodiploidías e hiperdiploidías (Figura 2). En muchos casos, más de una alteración cromosómica secundaria se encuentran en los pacientes en fase blástica, en promedio cada paciente presenta 3 alteraciones adicionales al Ph<sup>1(22,23)</sup>.

Se han reportado anomalías características asociadas a transformación mieloide o linfoide. Aproximadamente el 70% de las transformaciones blásticas son de naturaleza mieloide y las anomalías citogenéticas secundarias características son duplicación del Ph<sup>1</sup>, +8, i(17q), +19, -Y, hipodiploidías e hiperdiploidías. En las transformaciones linfoides las anomalías características son + Ph<sup>1</sup>, +21, -Y e hipodiploidías<sup>(20)</sup>.

**Duplicación de cromosoma Ph<sup>1</sup>.** Esta alteración se presenta en un 14 % de los casos y se observa frecuentemente junto con otras anomalías, pero es raro asociarla con i(17q). Es el resultado de una duplicación del Ph<sup>1</sup> y no de una segunda translocación. La duplicación de dosis por la presencia de dos copias de Ph<sup>1</sup> no ha sido establecida, ya que se piensa que este segundo cromosoma permanece inactivo<sup>(20)</sup>.

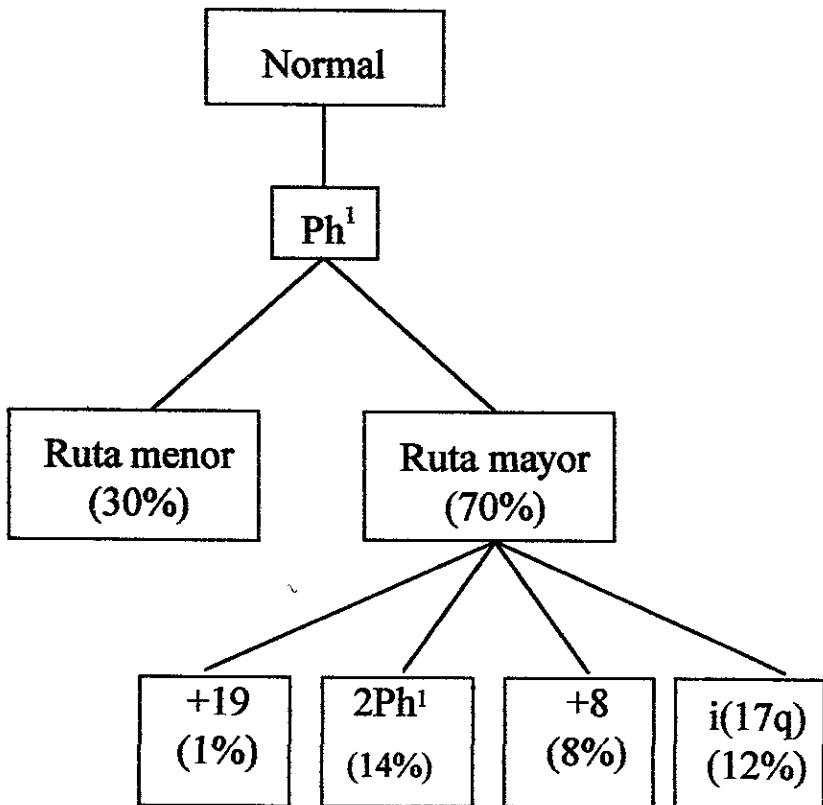
**Trisomía 8:** se presenta en el 8 % de los casos y es el cambio más específico para transformación mieloide. Esta anomalía se produce después de la aparición del segundo Ph<sup>1</sup> e i(17q). Al menos 2 oncogenes *mos* y *c-mic*, se localizan en 8q y se piensa que la sobre dosis de estos oncogenes contribuye al mecanismo de progresión<sup>(24)</sup>.

**Isocromosoma (17q):** Es el principal indicador de la progresión de la enfermedad y su presencia representa un mal pronóstico. La ausencia del gen tumor supresor p53, localizado en 17p, ha sido relacionada con la progresión de la enfermedad<sup>(27)</sup>.

Con la introducción del manejo de Interferón para estos pacientes los análisis citogenéticos han sido más frecuentes (cada 3,4 o 6 meses), contrario a los establecido anteriormente, donde el análisis citogenético se realizaba solamente ante la presencia de manifestaciones de la fase acelerada. Estos estudios han podido establecer más claramente que tipo de alteraciones cromosómicas secundarias son más frecuentes y su significado como factores pronósticos<sup>(28,29)</sup>.



**Figura 2. Ruta mayor y menor para la evolución citogenética de la LMC**



+9: Trisomía 9

2 Ph<sup>1</sup> : Duplicación del Ph<sup>1</sup>

+ 8: Trisomía 8

i(17q): Isocromosoma 17q

Hoy en día el término Evolución Citogenética Clonal (ECC) se refiere a la presencia o desarrollo de anomalías cromosómicas adicionales al cromosoma Ph<sup>1</sup>, estas excluyen variantes del Ph<sup>1</sup> y alteraciones constitucionales. La ECC posee un significado pronóstico para la LMC relacionado con el tipo de alteraciones, el tiempo en que se desarrollan, su frecuencia en las metafases y la presencia de otras características de la fase acelerada. Basado en esto se han agrupado a los pacientes en grupos de riesgo. La alteración citogenética que posee mayor factor pronóstico es la presencia del i(17q), así como la complejidad de la clona. Dentro del grupo de menor riesgo se encuentran aquellos pacientes que no presenten anomalías del cromosoma 17 y tengan un porcentaje menor a 16% de metafases anormales y un intervalo de evolución menor de 24 meses. En este grupo la supervivencia media es de 54 meses. Por otro lado, para el grupo de mayor riesgo se toma en cuenta a pacientes con alteraciones en el cromosoma 17, porcentaje de metafases anormales mayor al 36 % y un intervalo de evolución menor de 6 meses, observándose una sobrevida de 6 meses <sup>(28)</sup>.

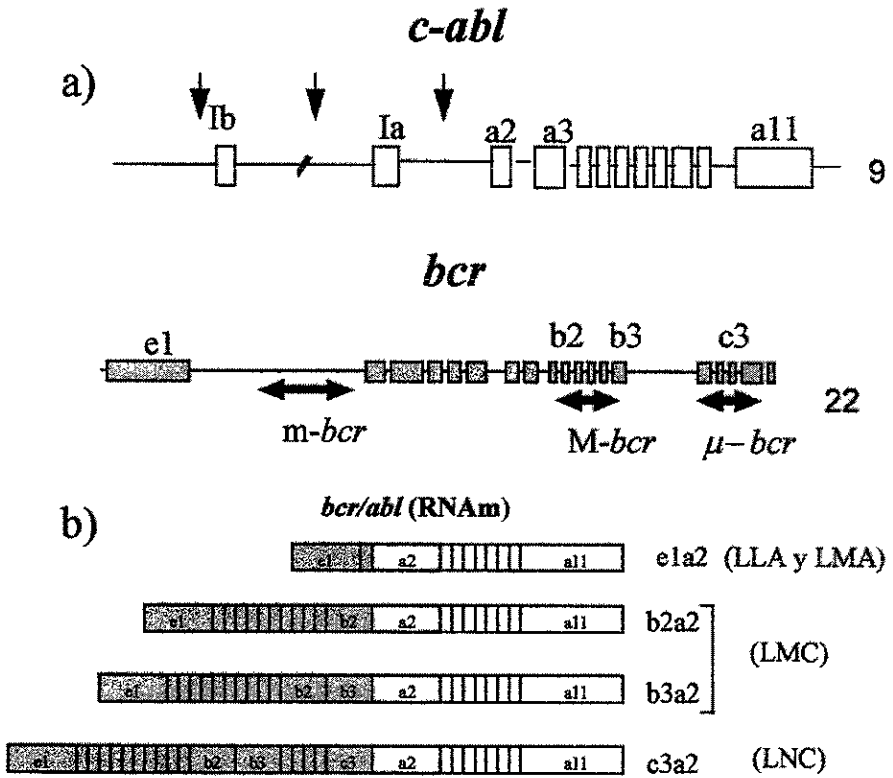
### III BIOLÓGÍA MOLECULAR DEL Ph<sup>1</sup>

En la t(9;22) dos *oncogenes* fueron mapeados en los cromosomas involucrados, el *c-abl* en el cromosoma 9 y *c-sis* para el cromosoma 22. El oncogen *c-abl* es el homólogo normal del oncogen del virus de la Leucemia Murina de Abelson (VLMu-A), un virus que puede causar leucemia en células pre-B de ratón; *c-sis* es el homólogo normal del gen transformante del virus de sarcoma en simios. Dada la relación entre LMC y la t(9;22) fue importante determinar si *c-abl* y *c-sis* estaban involucrados. Pruebas moleculares demostraron que ambos *oncogenes* son recíprocamente intercambiados como resultado de la translocación, sin embargo *c-sis* no participa en la patogénesis de la enfermedad y *c-abl* es fusionado a otro gen en 22q, al gen *bcr*<sup>(30,31)</sup>. (Figura 3a)

#### EL GEN *c-abl*.

El gen *c-abl* es el homólogo normal al gen *v-abl*. Este gen se ha encontrado en todos los vertebrados y su conservación filogenética es tan amplia que se ha identificado en *Drosophila melanogaster*, sugiriendo así que el gen *c-abl* participa en procesos metabólicos esenciales. En el genoma humano *c-abl* se encuentra en el cromosoma 9, en la banda q34<sup>(24)</sup>. El *c-abl* clonado abarca aproximadamente 230Kb (kilobases) y esta formado por 11 exones, siendo alternativos los dos primeros, los exones Ia y Ib. Estos exones alternativos están separados por intrones extremadamente largos, aproximadamente de 175Kb, que carecen de secuencias TATA y CAAT, y conteniendo regiones ricas en secuencias GC con múltiples repeticiones GCGGGC. Estas regiones han sido identificadas como posibles secuencias de unión a factores que regulan transcripción. El exón Ia se encuentra a 19Kb del exon 2, mientras que el Ib está localizado a más de 200Kb del exón 2. Como resultado de esta configuración genómica, dos ácido ribonucleicos mensajeros (RNAm) se transcriben, uno de 6 Kb formado por los exones Ia al 11 y el otro de 7Kb constituido por la unión del exón Ib con el exón 2 al 11. El hecho que el exón 2 de *c-abl* permita el intercambio de diferentes segmentos de DNA, le confiere el potencial de fusionarse con otras secuencias diferentes y posiblemente activarse<sup>(31,32)</sup>.

**Figura 3. Genes involucrados en la t(9;22)**



a) Esquema de los genes involucrados en la t(9;22). Se representan los exones con rectángulos, los intrones con línea verticales y los puntos de ruptura con flechas verticales para el gen *abl* y flechas horizontales para el gen *bcr*.

b) Los transcritos de gen híbrido *bcr/abl* (RNAm). Los diferentes RNAm dependen del punto de ruptura en el gen *bcr*. El punto de ruptura en la LMC se produce en la región principal (*M-bcr*), los transcritos resultantes son *b2a2* y *b3a2*, dependiendo de la presencia del exón *b3* en el híbrido. En la LLA y LMA el punto de ruptura se encuentra en la región menor (*m-bcr*), mientras que para la Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC) en la región  $\mu$ -*bcr*.

Un solo producto proteico del gen *c-abl* normal ha sido identificado, con un peso de 145Kd, llamado P145<sup>abl</sup> y perteneciente a la familia de las cinasas de tirosina, enzimas que catalizan la transferencia de un grupo fosfato de trifosfato de adenosina (ATP) al aminoácido de la proteína sustrato. Las enzimas con actividad de cinasa de tirosina son de gran interés, ya que se relacionan con receptores de diferentes factores de crecimiento y transducción de señales intracelulares. Sin embargo, P145<sup>abl</sup> no es un receptor de membrana y su función normal no es clara <sup>(32)</sup>.

P145<sup>abl</sup> es expresada ubicuamente en vertebrados. La organización estructural de la proteína incluye, del amino al carbonilo terminal, un sitio miristéico, un dominio SH2, uno SH3, uno catalítico (cinasa de tirosina), un dominio de unión a DNA, una señal de localización nuclear y varios sitios de unión a SH3. La proteína es una cinasa nuclear, cuya actividad es altamente regulada. Se ha observado que esta cinasa es activada por agentes genotóxicos, produciendo una detención del crecimiento celular seguida de apoptosis. Se piensa que la fusión del gen *c-abl* con *bcr* en *bcr/abl* resulta en una desregulación de la actividad cinasa <sup>(32,33,34)</sup>.

## **EL gen *bcr***

El gen *bcr* abarca cerca de 70 Kb distribuidos en 23 exones, largas secuencias de intrónicas y un promotor que carece de cajas TATA o CAAT. Se transcriben 2 RNAm de 4.5 y 6.7 Kb que son ubicuos en fibroblastos, células mieloides y linfoides. El producto de la traducción de este gen es una proteína de 160 Kd, no parece ser un receptor de membrana y su papel en la hematopoyesis normal aún no está bien definido <sup>(30,31)</sup>.

P160 contiene 121 aminoácidos y posee al menos tres actividades diferentes: una actividad cinasa de serina/treonina intrínseca a las secuencias codificadas por el primer exón, un dominio SH2 de unión a núcleo y una actividad GTPasa asociada con su secuencia amino terminal; estas actividades indican que P160 participa activamente en la vía de transducción de señales <sup>(35)</sup>.

## CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA t(9;22)(q34;q11)

El punto de ruptura en *c-abl* ocurre dentro de las regiones intrónicas, entre los exones 1a y 1b, o entre los exones 1a y 2. Esta región abarca aproximadamente 300 Kb de largo<sup>(32)</sup>. (Figura 3a)

En la LMC, los rompimientos en el gen *bcr* se localizan en una área muy pequeña de 5.8 Kb conocida como región principal de agrupación de rompimiento (M-bcr, mayor breakpoint region), esta región abarca los exones b1 al b5 (también llamados exones 12 al 16). La mayoría de los pacientes tienen puntos de ruptura entre los exones b2 y b3 o entre b3 o b4<sup>(33,36)</sup>.

Como resultado del intercambio recíproco entre los cromosomas 9 y 22, los exones a2 al 11 del gen *c-abl*, pudiendo estar presente el exón 1a y/o 1b, son trasladados al cromosoma 22 para fusionarse con la secuencia 5' del gen *bcr*. Por otro lado en el cromosoma 9 permanece la parte 3' del gen *bcr* que se fusiona con la porción restante del gen *c-abl*<sup>(34,35)</sup>. De esta forma y dependiendo del punto de ruptura en *bcr* se producen dos tipos del gen fusionado *bcr/abl*: b2a2 y b3a2. Ambas formas se transcriben en un RNAm de 8.5 Kb que produce una proteína quimérica de 210 kd llamada p210<sup>*bcr/abl*</sup>. La mayoría de los pacientes expresan uno u otro tipo de rearrreglo b2a2 o b3a2, pero en 5% de los casos se puede observar ambas formas debido a un procesamiento alternativo (splicing) del RNAm<sup>(33,36)</sup>.

Como se ha mencionado la presencia del cromosoma Ph<sup>1</sup> no es exclusiva de la LMC, este marcador también se presenta en otros tipos de Leucemias, produciendo híbridos *bcr/abl*, cuya diferencia radica en el punto de ruptura en el gen *bcr*. Así, para las LLA y LMA el punto de ruptura en el cromosoma 22 se localiza más hacia el extremo 5' del M-bcr. Este segmento se ha denominado región menor de agrupamiento (m-bcr), implicando la unión a *c-abl* del exón e1 de *bcr*. Esto genera un gen híbrido e19a2 de *bcr/abl* que se traduce en una proteína de fusión más pequeña de 190 Kd, denominada p190<sup>*bcr/abl*</sup>. Un tercer punto de ruptura ha sido descrito en el extremo 3' de la región M-bcr entre los exones e19 y e20 en una región que ha sido denominada micro-*bcr* [ $\mu$ -*bcr*]. El producto

de la fusión e19a2 es una proteína de 230 kd llamada p230<sup>bcr/abl</sup>. Este híbrido es característico de la Leucemia Neutrofílica Crónica (LNC) <sup>(36,37)</sup>. (Figura 3b)

Se han realizado estudios para determinar si existe alguna diferencia en las características clínicas, pronóstico y respuesta a tratamiento en función del tipo de transcrito que se presente en la LMC (b2a2 o b3a2), así algunos reportes indican una mayor incidencia de trombocitopenia en pacientes con un híbrido del tipo b3a2; mientras que para los que poseen el rearreglo b2a2 se ha reportado una fase crónica más prolongada y mejor respuesta al interferón; sin embargo estos estudios no han sido corroborados estadísticamente <sup>(38,39)</sup>.

### El gen *bcr/abl* y la proteína p210<sup>bcr/abl</sup>

P210<sup>bcr/abl</sup> contiene 1096 aminoácidos codificados por *c-abl* fusionados a 927 o 902 aminoácidos codificados por *bcr*, dependiendo de la presencia del exón b3 de *bcr*. La proteína posee una actividad de cinasa de tirosina mayor que su contraparte normal P145<sup>abl</sup>, cuya actividad normal se altera como consecuencia de su unión con *bcr*. Otra diferencia importante entre estas dos proteínas se encuentra en su ubicación, mientras p210<sup>bcr/abl</sup> es una enzima citoplasmática, P145<sup>abl</sup> es una enzima nuclear <sup>(31,40)</sup>.

Análisis mutacionales han identificado varios dominios in p210<sup>bcr/abl</sup> los cuales son esenciales para la transformación celular. Los correspondientes al gen *abl* son los dominios SH1 (cinasa de tirosina), SH2 y de unión a actina; la porción del *bcr* contenida en el híbrido es una tirosina en posición 177 y una secuencia rica en treoninas/tirosinas. Su estructura le confiere un alto potencial de autofosforilación, lo que le permite interactuar con un gran número de sustratos. La consecuencia biológica de estas múltiples interacciones lleva al desarrollo de independencia de los factores de crecimiento, un efecto antiapoptótico y propiedades de adhesión celular alterada <sup>(41,42)</sup>.

El mecanismo de activación involucra al menos tres proteínas adaptadoras (Grb2, SH2 y CRKL) cada una de las cuales forma un complejo con p210<sup>bcr/abl</sup>. Estos adaptadores acoplan la activación de Ras (mediante la unión con GTP). Así, Ras por medio de un conjunto de señales de transducción produce un efecto antiapoptosis y una

activación de los genes de transcripción <sup>(43,44,45)</sup>.

La unión p210<sup>bcr/abl</sup> a Paxillin (una fosfotirosina de 68 Kd) lleva a la unión del proto-oncogen *p120CBL* y a la asociación con una actina citoplasmática. Estas asociaciones llevan a la alteración del citoesqueleto y al incremento en la capacidad de adhesión de las células leucémica<sup>(42)</sup>.

## **EL GEN *abl/bcr***

El gen quimérico *abl/bcr*, recíproco de *bcr/abl* presente en el cromosoma 9, se expresa en sólo dos terceras partes de los pacientes con LMC. Se han identificado RNAm del tipo *abl-b3* y *abl-b4* (conteniendo generalmente el exón Ib), estos mensajeros podrían codificar para una proteína de 379 a 414 aminoácidos. La formación de esta proteína, su posible función y participación en la patogénesis de la enfermedad son desconocida. En las células leucémicas la expresión del gen *bcr-abl*, no suprime la expresión de los transcritos normales *bcr*, *abl*, ni del gen quimérico *abl-bcr* <sup>(46,47)</sup>.



## IV LMC EN NIÑOS [POBLACIÓN PEDIÁTRICA]

Un 5% de los casos con LMC son pacientes pediátricos, este grupo puede ser dividido en tres categorías <sup>(48)</sup>:

1. LMC del tipo del adulto, caracterizada por la presencia del cromosoma Ph' y/o el rearreglo *bcr/abl*. Comparte las mismas características de laboratorio, curso clínico y respuesta al tratamiento con la LMC en adultos, se presenta generalmente en niños mayores de 4 años.

2. LMC familiar, relacionada con desórdenes mieloproliferativos de índole familiar, cuya incidencia es baja.

3. LMC del tipo juvenil (LMCj)

La LMCj representa el 2% de las leucemias en niños, afecta principalmente a menores de 4 años, nunca en neonatos, por lo cual no se considera como una enfermedad congénita. Existe una mayor predisposición en varones que en mujeres. Se considera un desorden clonal, con supresión de la hematopoyesis normal y proliferación de células monocíticas y macrófagos neoplásicos mediada por TNF-A, GM-CSF y posiblemente otras citocinas como IL1a. A diferencia de la LMC del tipo del adulto no se presenta cromosoma Ph'+ y/o rearreglo molecular *bcr/abl*. La enfermedad presenta una evolución desfavorable con un promedio de 10 meses de supervivencia y una respuesta terapéutica pobre <sup>(49,50)</sup>.

Las manifestaciones clínicas y datos de laboratorio son muy variadas, entre los más comunes están fiebre, malestar general, palidez, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia y erupción eritematosa descamante. Existe una alta morbilidad debido a la supresión de la hematopoyesis normal o a la infiltración de monocitos dentro de tejido pulmonar, gastrointestinal u otros que conduce a hemorragia y/o disfunción de órganos; la transformación blástica ocurre en menos de 20% de los casos <sup>(50)</sup>.

Entre los datos de laboratorio que comparte con la LMC del adulto se encuentran leucocitosis (en la LMCj es  $< 10^9/L$ ), fosfatasa alcalina disminuida y eosinofilia. Mientras que difiere de la LMC del adulto por la monocitosis, trombocitopenia, ausencia del

antígeno I, disminución de hemoglobina A, aumento de Hemoglobina fetal y algunos elementos característicos de la eritropoyesis fetal como son glóbulos rojos nucleados y niveles G6PD, anhidrasa carbónica, como la falta de basofilia. El cultivo de células *in vitro* presenta una proliferación de colonias monocíticas en ausencia de factores de crecimiento y una alta sensibilidad de las células progenitoras por el factor de crecimiento de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) <sup>(51,52)</sup>.

El diagnóstico es difícil por la gran heterogeneidad clínica, así como por su similitud en las manifestaciones clínicas con infecciones virales y otros desórdenes mieloproliferativos (ya que la proliferación mielomonocítica es morfológicamente normal) <sup>(53)</sup>.

Entre los criterios diagnósticos utilizados se encuentran <sup>(49)</sup>:

1. Leucocitosis con monocitosis absoluta (>450/ $\mu$ l)
2. La presencia de células mieloides inmaduras en sangre periférica.
3. Menos del 25% de blástos en médula ósea.
4. Estudio negativo para infecciones virales (CMV, rubéola, EBV)
5. Ausencia del cromosoma Ph' y del rearrreglo molecular *bcr/abl*.

El estudio citogenético es importante para establecer el diagnóstico, principalmente para excluir la presencia del cromosoma Ph<sup>1</sup>. La LMCj en la mayoría de los casos presenta un cariotipo normal, sin embargo algunos pacientes muestran algunas anomalías citogenéticas, como la monosomía 7 y la del(13)(q14), pero sin resultados consistentes <sup>(5,54)</sup>.

El diagnóstico diferencial debe realizarse con la LMC del tipo del adulto, diversos síndromes mielodisplásicos e infecciones virales. Existe una gran similitud entre la LMCj y la leucemia mielomonocítica crónica, por lo que diversos autores sugieren que se trata de la misma entidad. Por otra parte entre la LMCj y el síndrome de monosomía 7 existe controversia por definir si se trata de la misma enfermedad, ya que los dos son padecimientos casi exclusivos de niños, con predominancia en varones, cursan con trombocitopenia, esplenomegalia y un pronóstico pobre. Sin embargo, existen evidencias

que muestran que son enfermedades diferentes, así el síndrome de monosomía 7 forma parte de un conjunto de entidades asociadas con la deleción del cromosoma 7, mientras que la LMCj es un desorden mieloproliferativo donde la monosomía 7 es la anomalía citogenética que puede presentarse al diagnóstico o durante la progresión de la enfermedad <sup>(54,55)</sup>.

La respuesta al tratamiento con terapia convencional para LMC del tipo del adulto no muestra buena respuesta, mientras que el uso de INF $\alpha$ 2A solamente muestra en algunos casos una respuesta hematológica parcial. Se emplea comúnmente arabinosido de citosina (Ara-C) solo o con 6-mercaptopurina, obteniéndose en general pobres resultados. El ácido retinoico puede ser útil para inducir una respuesta clínica y de laboratorio prolongada, en especial antes de realizar un trasplante de médula ósea. Este último se considera la única alternativa posible para la cura de esta enfermedad <sup>(56,57,58)</sup>.

Existen diversas hipótesis para comprender el mecanismo carcinogénico de esta enfermedad, en general los principales son:

1. Genes localizados en el cromosoma 7 que contribuyen a la regulación del crecimiento mieloide, así la deleción o pérdida de este cromosoma altera funciones de genes tumor supresor <sup>(54)</sup>.

2. Mutaciones en el gen *c-ras* han sido identificadas en diversos pacientes con LMCj <sup>(49)</sup>.

3. Aproximadamente 10-15% de los casos con LMCj deben ser asociados con la neurofibromatosis tipo I (NF-I), enfermedad autosómica dominante. El gen NF-I se localiza en el cromosoma (17)(q11.2) y codifica para la proteína neurofibrina que regula la actividad biológica de *p21ras*, actuando como un gen tumor supresor; así la mutación del único alelo funcional para el gen NF-I en la neurofibromatosis lleva a la desregulación de *c-ras* <sup>(54,57)</sup>.

4. En la deleción 13(q14), se pierde el gen tumor supresor *RBI*, que funciona como un regulador negativo de ciclo celular por lo que su ausencia puede contribuir a la patogénesis de la neoplasia <sup>(58)</sup>.

## V TRATAMIENTO DE LA LMC

### MONOTERAPIA

La terapia de la LMC continúa siendo insatisfactoria, aunque tanto radioterapia como quimioterapia han mostrado eficacia en la fase crónica de la enfermedad, no alteran su curso clínico y su objetivo es solo como tratamiento paliativo. En general, los síntomas y signos clínicos se relacionan directamente con el recuento leucocitario; tratando de mantener  $<50,000/\text{ml}$  para asegurar que el paciente permanezca asintomático. No se consigue una remisión verdadera porque la clona  $\text{Ph}^1$  positivo persiste; los intentos de reducir o eliminar esta población con quimioterapia intensiva no producen curación y sólo han conseguido una modesta mejoría en la duración de la supervivencia<sup>(59,60)</sup>.

**Busulfán.** El busulfán (myleran, un ácido sulfónico) es un agente alquilante, que actúa inhibiendo la síntesis de DNA, ejerce su efecto primordialmente a nivel de la célula tallo primitiva, y por lo tanto su efecto es más prolongado. Es evidente la depresión selectiva de la granulopoyesis. Con dosis altas del fármaco también puede haber supresión de plaquetas y elementos eritroides, y en algunos pacientes surge pancitopenia intensa y duradera. Al parecer la acción citotóxica no abarca los tejidos linfoides ni el epitelio gastrointestinal. Por vía oral se absorbe adecuadamente, y tiene una vida media en la sangre de dos a tres horas. Prácticamente todo el fármaco se excreta por la orina en la forma de ácido metanosulfónico<sup>(61)</sup>.

Se obtienen largos periodos de control hematológico y su costo es relativamente bajo, haciéndolo atractivo cuando el factor económico es importante. Debe realizarse un monitoreo cuidadoso del recuento leucocitario, dado que toda sobredosificación puede llevar a una intensa pancitopenia. Se observa remisión clínica en 85 a 98% de los pacientes después del primer ciclo de tratamiento y produce remisiones largas definidas por el control de la leucocitosis, trombocitosis y reducción de síntomas<sup>(61,62)</sup>.

La dosis de busulfán es usualmente de 2-4 mg/m<sup>2</sup>/d, útil para reducir la leucocitosis en un 50%, posteriormente la dosis se reduce a la mitad y se interrumpe cuando la cuenta de blancos está por debajo de 20,000/ml. Es restituida cuando se incrementa por arriba de 50,000/ml. El descenso de células blancas se observa entre los 10-14 días de iniciado el tratamiento, la respuesta plaquetaria sigue dentro de las 2 a 6 semanas y la regresión de la esplenomegalia toma varios meses. Con este medicamento persiste la clona maligna Ph<sup>1+</sup> (persistencia del cromosoma Ph<sup>1</sup> en 100% de las metafases); por ello no cabe considerar que se alcanza una remisión auténtica, que implicaría el resurgimiento de una célula pluripotencial normal<sup>(60,61)</sup>.

La terapia de mantenimiento es variable, alternando periodos de monitoreo leucocitario sin tratamiento, con dosis bajas o moderadas de busulfán y ocasionalmente es necesario reinducir la remisión con dosis similares a las utilizadas en el inicio de la enfermedad<sup>(8,60)</sup>.

Los efectos tóxicos principales del busulfán dependen de sus propiedades mielosupresoras, y un peligro puede ser la pancitopenia y trombocitopenia duradera en un 5-10% de los pacientes. Pocas veces retorna la celularidad medular a lo normal y se han señalado casos ocasionales de náuseas, vómito, diarrea, impotencia, esterilidad, amenorreas y malformaciones fetales; además el busulfán es leucemógeno<sup>(59,60)</sup>.

**Hidroxurea.** La hidroxurea inhibe específicamente la síntesis de DNA al actuar sobre la enzima ribonucleótido reductasa, requerida para la síntesis de deoxinucleótidos. El fármaco actúa en la fase S del ciclo celular, deteniéndolo en la interfase G1 - S. Este fármaco es preferido por muchos a causa de su menor toxicidad con relación al busulfán. Tiene un rápido efecto en la reducción de glóbulos blancos (menor de 24 horas). No produce supresión prolongada en médula ósea, y cuando se sobredosisa la médula ósea tiende a recuperarse rápidamente<sup>(61)</sup>.

La administración de dosis orales iniciales es de 1-2 mg/m<sup>2</sup>/d, y esta dosis se ajusta para mantener una cuenta de glóbulos blancos de 10,000 - 20,000/mm<sup>3</sup>. Como consecuencia de la breve duración de su efecto, el tratamiento debe mantenerse de forma

continua, con la administración de este fármaco se logra solo remisión hematológica pero no citogenética. La vida media del fármaco es de unas dos horas, cruza fácilmente la barrera hematoencefálica y cerca del 80% del fármaco se excreta por la orina en un término de 12 horas<sup>(60,61)</sup>.

El principal efecto tóxico es la depresión hematopoyética, que incluye leucopenia, anemia megaloblástica y a veces trombocitopenia; el restablecimiento de la médula ósea es rápido cuando se interrumpe el uso del fármaco durante unos días. Otras reacciones adversas son perturbaciones gastrointestinales y reacciones dermatológicas leves; con menor frecuencia se observan estomatitis, alopecia y manifestaciones neurológicas<sup>(61)</sup>.

## OTRAS MODALIDADES TERAPÉUTICAS

La **irradiación esplénica** tiene un papel secundario en el tratamiento con una dosis de 6 - 10 Gy (600-1000 rad) administrados en fracciones diarias de 0.25 - 2 Gy/d. La radioterapia puede controlar la leucocitosis y la esplenomegalia durante varios meses, pero la enfermedad se vuelve resistente tras varios ciclos de irradiación. Puede emplearse en casos de LMC refractaria o en pacientes en fase terminal con esplenomegalia pronunciada<sup>(8,59)</sup>.

La **esplenectomía** puede eliminar las molestias abdominales y mejorar la trombocitopenia y las necesidades postransfusión cuando la esplenomegalia no puede controlarse con quimioterapia o radioterapia. No existen pruebas de que la esplenectomía durante la fase crónica desempeñe un papel significativo en el control de la enfermedad. A causa de los riesgos quirúrgicos, el aumento de la incidencia de trombocitosis postquirúrgica y la posibilidad de fenómenos hemorrágicos, no se recomienda la esplenectomía rutinaria, sólo debe considerarse en pacientes que presenten complicaciones relacionadas con el bazo, tales como la esplenomegalia dolorosa, el infarto esplénico y las citopenias con requerimientos transfusionales repetidos secundarios a hiperesplenismo<sup>(60)</sup>.

La **Leucoféresis** consigue una mejoría de la sintomatología, pero no logra prolongación en la fase crónica de la enfermedad. Por otro lado, esta forma de tratamiento resulta costosa en tiempo y dinero. La leucoféresis se utiliza en mujeres gestantes afectadas de LMC, para evitar las consecuencias de los posibles efectos teratogénicos de la quimioterapia<sup>(8,61)</sup>.

El tratamiento con fósforo radiactivo, irradiación esplénica, leucoféresis y la esplenectomía en la LMC solo conceden alivio asintomático y mejoran la calidad de vida del paciente en fase crónica. Aunque todavía se utilizan para problemas individuales han sido ampliamente remplazadas por quimioterapia convencional. En la actualidad las modalidades terapéuticas convencionales que más frecuentemente se emplean se basan en los agentes citotóxicos busulfán e Hidroxiurea<sup>(62)</sup>.

#### **Tratamiento durante la fase de transformación blástica.**

En alrededor del 50% de los pacientes que sufren la transformación linfoblástica puede obtenerse una buena respuesta a la quimioterapia. El intento de inducción de la remisión se efectúa con vincristina y prednisona, igual que en la LLA. La duración de la remisión y la supervivencia suelen ser cortas. En pacientes con transformación mieloblástica, el tratamiento es mediante arabinósido de citosina e hidroxiurea que pueden producir remisiones, pero la supervivencia suele ser corta<sup>(62)</sup>.

**Quimioterapia intensiva.** Los esquemas terapéuticos son similares a los utilizados en las leucemias aguda, con inclusión de citarabina y 6-tioguanina o combinadas con L-asparaginasa, o daunorrubicina, citarabina, vincristina y prednisona con rubidazona o ciclofosfamida, y doxorubicina, vincristina, citarabina y 6-tioguanina. Estas permiten la reducción del Ph' (hasta en 35%), sin embargo este efecto es solo transitorio (seis a ocho meses)<sup>(60,62)</sup>.

## INTERFERON

El interferón (INF) fue descubierto por Issacs y Lindemm en 1957. Su nombre proviene de su habilidad por interferir ataques subsecuentes de virus a células blanco. Los interferones constituyen una grupo de glicoproteínas sintetizadas por células eucariontes como respuesta a virus, antígenos o mitógenos. Poseen actividad biológica pleiotrópica, entre las que se incluyen un efecto antiproliferativo, inmunomodulador, antiviral e inductor de la diferenciación. Los INFs humanos se clasifican en función de sus diferentes fuentes de producción, secuencia de aminoácidos, propiedades bioquímicas y antigénicas en tres grupos: Interferon-alfa ( $\text{INF}\alpha$ ), Interferon-beta ( $\text{INF}\beta$ ) e Interferon-gama ( $\text{INF-}\gamma$ )<sup>(62,63)</sup>.

Se dividen en dos clases principales: la clase I agrupa al  $\text{INF}\alpha$  y  $\text{INF}\beta$ ; cuyos genes se localizan en el cromosoma nueve y poseen una homología del 25% en aminoácidos, son estables en medio ácido, comparten un receptor en común y son sintetizados por leucocitos y fibroblastos respectivamente. En contraste, la clase II o  $\text{INF}\gamma$ , es labil en medio ácido, es una molécula estructuralmente diferente a la anterior, con un receptor específico, producido por linfocitos T y cuyo gen se localiza en el cromosoma seis<sup>(62,64)</sup>.

## RECEPTORES DE INTERFERON

Los receptores para INFs tipo I y II comprenden a la familia de receptores de citocina clase II. Contienen regiones conservadas de cisteína, tirosina, triptofano y prolina. Poseen una única subunidad múltiple. Estos receptores carecen de actividad de cinasa, en su lugar se encuentran asociados en su dominio citoplasmático con la familia de proteínas cinasas Janus (Jacks)<sup>(65)</sup>.

El receptor de los INF tipo I se compone de dos subunidades:  $\text{INFR1}$ , una glicoproteína de 515 aminoácidos y  $\text{INFR2}$ , el componente de unión al ligando, se presenta en diferentes isoformas (la forma funcional es una glicoproteína de 515 aminoácidos). Los genes para estas dos subunidades se localizan en el cromosoma 21 y



se asocian con las proteínas Jacks, TyK2 y Jak1 . A diferencia del INF tipo I, el INF tipo II se une a su receptor en forma de dímero. Este receptor esta formado por dos subunidades: INF $\gamma$  R1 y INF $\gamma$  R2, codificadas por los genes localizados en los cromosoma 6 y 21, respectivamente. Las proteínas Jack asociadas a las subunidades INF $\gamma$ R1 y INF $\gamma$ R2 son Jak1 y Jak2, respectivamente. En ambos tipos de receptores, la oligomerización del receptor depende de su unión al ligando (INF) y es un paso esencial en su activación. Esta unión desencadena un conjunto de transducción de señales que se transmiten en cascada <sup>(65,66)</sup>.

## TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES POR INF.

Los INF ejercen su efecto por su unión al receptor en la superficie celular, desencadenando un conjunto de transducción de señales que llegan al núcleo y permiten la expresión de un conjunto genes (ISGs, genes estimulados por INF). La expresión de estos ISGs es mediada por la fosforilación de tirosina dentro de un sistema llamado Jack-Stat, proporcionando así la gran variedad de efectos biológicos del interferón. Este sistema participa en la transducción de señales de otras citocinas como las interleucinas, factores de crecimiento y de hormonas<sup>(65,67)</sup>.

La unión del INF al receptor lleva a un cambio conformacional del receptor, esto produce la autofosforilación de unas proteínas asociadas al receptor (una cinasa de la familia Janus (Jaks). Las Jacks activadas fosforilan tirosinas específicas de cada una de las subunidades del receptor, estas fosforilaciones permiten la unión al receptor de una familia de proteínas citoplasmáticas (Stats) que son entonces fosforiladas por las Jaks, permitiendo la formación de dímeros Stat. Estos dímeros se unen con una proteína p48 para formar el complejo ISG factor 3; tanto Stat como p48 poseen sitios de unión a DNA (SH2 y SH3). El complejo llega al núcleo y reconoce secuencias altamente conservadas, llamadas elementos de respuesta al estímulo del INF (ISRE) en el caso del INF tipo I y sitios GAS para el tipo II, estas secuencias forman parte de los promotores de los ISGs. Los mecanismos de atenuación de este conjunto de transducción de señales no son entendidos claramente, pero diferentes estudios señalan la participación de enzimas fosfatasas. Aunque los INF tipo I comparten el mismo receptor, existen

diferencias en su afinidad, determinando así los diferentes efectos biológicos entre estos INF. Estas diferencias son de gran importancia para su uso terapéutico<sup>(65,66)</sup>.

### **Utilización clínica del INF $\alpha$**

Los INFs fueron las primeras citocinas aprobadas para uso clínico. Se utilizan en el tratamiento de enfermedades virales y en un amplio número de tumores sólidos y neoplasias hematológicas Tabla 2<sup>(66,67)</sup>.

**Tabla 2 Neoplasias humanas tratadas con INFs**

<p><b>Desórdenes Linfoproliferativos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Leucemia Mieloide Crónica</li><li>Leucemia de células peludas</li><li>Linfoma nodular</li><li>Linfoma de células T</li><li>Mieloma Múltiple</li></ul> <p><b>Tumores sólidos</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>Carcinoma renal</li><li>Melanoma maligno</li><li>Sarcoma de Kaposi</li><li>Cáncer en ovario</li><li>Cáncer de Vejiga</li></ul>
---

Los INF $\alpha$  para uso clínico son obtenidos por tres diferentes vías: 1. Mediante estimulación con virus u otros inductores sobre células humanas, leucocitos o cultivo de células linfoblásticas [INF $\alpha$ N1y INF $\alpha$ N2]. 2 Utilizando técnicas de Ingeniería genética.

Los INF recombinantes, utilizados en la clínica son rINF $\alpha$ 2a, rINF $\alpha$ 2b e rINF $\alpha$ 2c, que difieren entre si sólo por un aminoácido. 3 Una molécula de INF $\alpha$  obtenida por medio de un gen sintético con las secuencias consenso más frecuentes en los diferentes subtipos de INF $\alpha$ , designado INF consenso <sup>(68,69)</sup>.

Resulta importante identificar el tipo de INF y su preparación debido a que estos diferentes INF $\alpha$  no comparten las mismas propiedades para su uso clínico. Así los rINF $\alpha$  permiten una amplia utilización de esta citocina en el campo clínico, proporcionando ventajas importantes como una mayor producción, baja incidencia de formación de anticuerpos neutralizantes, una rápida interacción con el receptor (*in vitro*) y una mayor estimulación de la actividad NK <sup>(67,70)</sup>.

### **Mecanismos antitumorales del INF $\alpha$**

El mecanismo antitumoral del INF $\alpha$  puede estar mediado por su actividad citostática directa (reducción de la proliferación celular) mediante modulación de oncogenes (*c-myc*, *N-ras*, *c-scr*, *p53*, *c-fos*, *RB*). Los INFs deben ser directamente citotóxicos llevando a la lisis celular o bien producir indirectamente su efecto antitumoral por modulación de la respuesta inmune (aumento en la superficie celular de antígenos asociados a tumores o inducción de anticuerpos contra células neoplásicas, aumento de citotoxicidad tumoral por macrófagos, células NK y linfocitos T). La reducción de angiogénesis inducida por tumores y la inducción a la diferenciación de células neoplásicas deben sumarse a los efectos del INF en las neoplasias humanas <sup>(66,70)</sup>.

Otros mecanismos antitumorales del INF se encuentran <sup>(71)</sup>.

1. La corrección en la expresión de un antígeno relacionado con la activación de linfocitos T, que se encuentra defectuoso en las células leucémicas de LMC.
2. Restauración de la adhesión normal de células progenitoras en la médula ósea, por corrección de la expresión y función de la integrina  $\beta$ 1.
3. Inhibición del factor transcripcional E2F, que se une a los promotores de una gran variedad de factores de crecimiento.

## INF $\alpha$ en el tratamiento de lmc

Apartir de 1983, Talpaz<sup>(72)</sup> inició el reporte de sus trabajos en LMC con INF $\alpha$ , desde entonces diferentes reportes han confirmado el efecto selectivo del INF sobre las células leucémicas; este efecto es observado en la supresión de la clona Ph<sup>1</sup>. Esta disminución de la carga tumoral proporciona una mayor duración de la fase crónica, con lo cual este fármaco no solamente ayuda a la desaparición de los síntomas de la enfermedad, sino modifica su curso natural (Tabla 3). A pesar de lo anterior, todos los casos progresan a fase blástica<sup>(73,74)</sup>.

Tabla 3 Efecto de la terapia sobre la supervivencia media en la fase crónica de LMC

Terapia	Meses
Ninguna	20-31
Irradiación esplénica	28
Busulfan	53-45
Quimioterapia intensiva	36-45
Interferón	55-72

El INF proporciona remisión hematológica en un 70-80% de los casos y una respuesta citogenética mayor en un 5-27% de los pacientes tratados, basados en los criterios de respuesta al tratamiento en LMC (Tabla 4). Una respuesta citogenética mayor proporciona un aumento significativo de la supervivencia en relación a los pacientes que no obtienen esta remisión<sup>(73,74)</sup>.

Tabla 4. Criterios de respuesta al INF $\alpha$  en pacientes con LMC

Respuesta	Categoría	Criterios
Hematológica	Completa	Normalización de la cuenta de leucocitos Normalización de cuenta de plaquetas Desaparición de todos los síntomas y signos de la enfermedad
	Parcial	Normalización de cuenta leucocitaria pero persistencia de formas inmaduras o esplenomegalia.
Citogenética	Completa*	0% de evidencia del Ph <sup>1</sup>
	Parcial*	5-34% de metafases Ph <sup>1</sup>
	Menor	35-95% de metafases Ph <sup>1</sup>
	Nula	100% de metafases Ph <sup>1</sup>

\* Respuesta citogenética mayor.

El tratamiento con interferón induce una remisión hematológica prolongada y citogenética, sin embargo rara vez se obtiene la erradicación completa de la enfermedad a nivel molecular. Aunque la desaparición completa de células Ph<sup>1</sup> no parece ser necesaria para largos periodos de remisión, la respuesta al interferón debe disminuir durante la progresión de la enfermedad <sup>(6)</sup>

Algunos estudios muestran una relación dosis-respuesta en la administración de este fármaco, recomendando la dosis de 3-5 mU/m<sup>2</sup> al día o la máxima tolerada. El tratamiento es iniciado con dosis bajas y es escalonado hasta obtener la dosis recomendada. Se prefiere la administración antes de dormir y junto con acetaminofén para evitar efectos colaterales tales como fatiga, depresión e insomnio <sup>(75,76)</sup>.

En general el INF presenta grandes ventajas como son un alargamiento de la fase crónica, una buena calidad de vida y un efecto sinérgico al ser administrado junto con otros medicamento (Ara-c), sin embargo, su utilización implica un gran costo, por lo cual es necesario evaluar su efecto costo-beneficio <sup>(77,78,79)</sup>.

## **TRASPLANTE DE MEDULA ÓSEA (TMO)**

El TMO es un tratamiento cuyo objetivo es la destrucción completa de las células defectuosas o neoplásicas por quimioterapia intensiva y el restablecimiento de la función medular por medio de una médula ósea normal<sup>(80)</sup>.

Los tipos de trasplante dependiendo del injerto son tres: singénico, alogénico y autólogo. Un injerto singénico es aquel en el que el donante y el receptor son genéticamente idénticos (gemelos idénticos). Un injerto alogénico es aquel en el que el donante y el receptor tienen origen genético diferente. Un injerto medular autólogo significa la administración de quimioterapia o radioterapia para eliminar las células de médula ósea del paciente y la reposición de la propia médula del paciente previamente tratada para eliminar las células leucémicas<sup>(81,82)</sup>.

Aunque la respuesta al tratamiento mielosupresor en la fase crónica es satisfactoria, la terapéutica sólo es paliativa, y la enfermedad es invariablemente mortal. La única opción curativa es el TMO alogénico, sin embargo muestra una morbilidad sustancial y riesgo de mortalidad. El TMO autólogo tan sólo ofrece modestos beneficios para la mayoría de los pacientes, pero puede ser valioso para una minoría que no cuenta con donador adecuado<sup>(83,84)</sup>.

### **Trasplante alogénico**

El objetivo del TMO alogénico consiste en la curación de la enfermedad mediante la destrucción de la médula ósea leucémica a través del empleo de dosis letales de tratamiento quimioterapéutico, seguido de la recuperación de la hematopoyesis a partir de células normales del donante con HLA idéntico o lo más parecido al receptor<sup>(62)</sup>.

Este tratamiento se encuentra disponible sólo para adultos menores de 55 años con hermanos compatibles en el sistema HLA. Un 60% de los adultos tienen una supervivencia prolongada sin afección después del TMO y parecen estar curados. Los mejores resultados (índice de éxito de 70 a 80%) se obtienen de menores de 40 años de edad. Para pacientes jóvenes sin hermanos compatibles para donar médula, puede emplearse a donadores no relacionados HLA-compatibles. Los resultados son inferiores

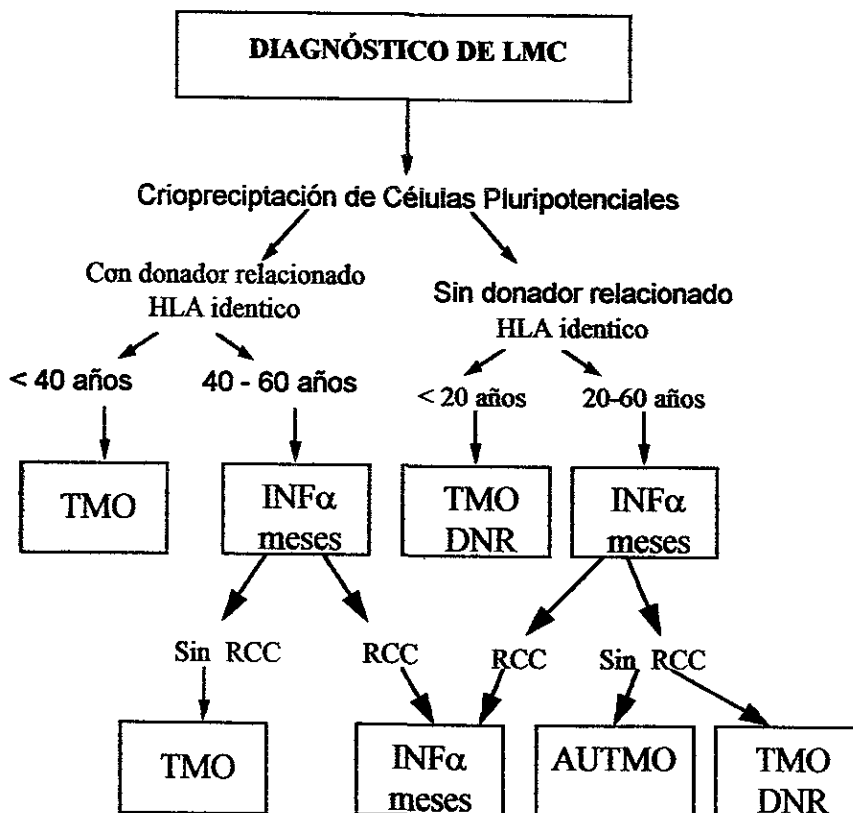
a los que se logran con trasplantes de hermanos HLA-compatibles, proporcionando un índice de curación del 30 al 50%<sup>(62,83)</sup>.

Este tipo de trasplante presenta un efecto antileucémico que consiste en la alorreactividad de las células del donador contra las células del receptor, es un mecanismo similar al que ocasiona la enfermedad injerto contra huésped. Este efecto antileucémico se aprecia en la menor incidencia de recaídas en individuos afectados por enfermedad injerto contra huésped y un aumento en la recaída en individuos con médula ósea sin células T y los TMO singénicos. Algunos factores que influye en forma negativa a este tipo de trasplante es el régimen de acondicionamiento previo al TMO, incompatibilidad ABO y seropositividad al citomegalovirus<sup>(85,86)</sup>.

El tratamiento previo al TMO con INF permanece sin ser claro, algunos reportes indican una influencia negativa cuando éste es utilizado, debido principalmente a que los antígenos del Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo II son altamente expresados por el INF. Por otro lado, otros estudios sostienen que no existe un efecto adverso y recomiendan utilizar el INF antes del TMO durante no más de un año previo al tratamiento (Figura 4). Para los pacientes que entran en recaída se recomienda un segundo trasplante, de ser posible y la administración del INF para eliminar la clona Ph<sup>1</sup><sup>(87,88)</sup>.

El momento óptimo para realizar el TMO en pacientes con LMC es en la fase crónica, debido a que los pacientes responden adecuadamente a la terapia de acondicionamiento, que erradica la clona leucémica, permite a las células tallo normales transplantadas repoblar la médula ósea del paciente. El TMO en pacientes con LMC en crisis blástica, como los de otras formas de leucemias avanzadas, ha dado lugar a un índice de curación en aproximadamente el 15% de los casos<sup>(89,90)</sup>.

**Figura 4. Estrategias en el manejo de la LMC**



TMO. Transplante de médula ósea (allogénico).

DNR. Donador no relacionado.

AUTMO. Transplante autólogo.

RCC. Respuesta citogenética mayor.

INF $\alpha$ . Interferón $\alpha$



## VI MONITOREO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL EN LMC

El término enfermedad mínima residual (EMR) se aplica a la presencia de células neoplásicas presentes una vez alcanzada la remisión clínica y disminuida la carga tumoral. El grado en la detección de células tumorales depende de la sensibilidad del método utilizado. La importancia en el monitoreo de la EMR radica en la oportuna identificación de pacientes con alto riesgo de recaída o progresión de la enfermedad<sup>(91)</sup>.

En el caso de la LMC la EMR se presenta principalmente en el tratamiento con INF y en el TMO, su monitoreo cuenta con un marcador específico de la enfermedad que es el cromosoma Ph<sup>1</sup> o el rearreglo *bcr/abl*. El análisis cuantitativo de las células leucémicas por citogenética o biología molecular permite el monitoreo de la actividad de la enfermedad, por lo que tiene un uso clínico relevante para la vigilancia de la respuesta al tratamiento y la evaluación del pronóstico. Las principales técnicas empleadas para el monitoreo de EMR son la citogenética convencional, la hibridación DNA-DNA tipo Southern (Southern blot), la hibridación in vitro con fluorescencia (FISH) y la reacción en cadena acoplada a la transcriptasa reversa (RT-PCR)<sup>(5,91)</sup>.

### CITOGENÉTICA

Las técnicas citogenéticas son las pruebas más accesible para el diagnóstico y seguimiento de la LMC. La presencia del Ph<sup>1</sup> confirma el diagnóstico, pero no lo excluye ya que este marcador es detectado en solo un 95% de los pacientes. El seguimiento citogenético permite la identificación de anormalidades secundarias, características de la fase acelerada, ayudando así a tomar decisiones terapéuticas para prevenir la fase blástica. El análisis citogenético permite una evaluación cuantitativa de la respuesta a diversos tratamientos (como son INF $\alpha$  solo o combinado con AraC, TMO), esta respuesta citogenética ha sido clasificada en función del porcentaje de células Ph<sup>1</sup> presentes y es clasificada en mayor (1-34% de células Ph<sup>1</sup>), menor (35-95%) y nula (100% de células Ph<sup>1</sup>). En el manejo con INF la presencia del Ph<sup>1</sup> en

pacientes con remisión citogenética prolongada y suspensión de INF, determinan el reinicio del INF. Así la respuesta citogenética es el estándar de oro en el seguimiento de la LMC, como un indicador pronóstico útil en las decisiones terapéuticas<sup>(20,23)</sup>.

Desafortunadamente la sensibilidad de este estudio depende del número de metafases analizadas, el cual no ha sido estandarizado debido principalmente a la dificultad de obtener células en división<sup>(92)</sup>.

## SOUTHERN BLOT

En esta técnica el DNA obtenido de la muestra en estudio es tratado mediante enzimas de restricción, los fragmentos resultantes son separados con base a sus tamaños mediante electroforesis en gel de agarosa y transferidos a una membrana de nitrocelulosa o nylon. El DNA unido a la membrana es expuesto a una sonda de DNA marcada para la hibridación de secuencias complementarias<sup>(32,92)</sup>.

La técnica requiriendo la presencia del 1-5% de células con el rearrreglo molecular, por lo cual el rearrreglo *bcr/abl* es sensible a ser detectado. Entre las ventajas de esta técnica sobre el análisis citogenético se encuentran<sup>(93)</sup>:

- La identificación del rearrreglo molecular en el 5% de los pacientes que son citogenéticamente son Ph<sup>1</sup>.
- Es independiente de la división celular, por lo cual no es necesario suspender el tratamiento del paciente.
- Puede ser utilizada la sangre periférica, permitiendo una mayor frecuencia de análisis.

Esta técnica permite una evaluación semicuantitativa del número de rearrreglos en la muestra analizada, basándose en una medición densitométrica al comparar la señal del rearrreglo y el gen normal *bcr*, obteniendo el índice de intensidad del rearrreglo (RII) que permite la estimación proporcional del número de células que llevan el rearrreglo. Sin embargo, la técnica es laboriosa, requiere grandes cantidades de muestra y no identifica si las células leucémicas son activas transcripcionalmente. Además, no identifica rearrreglos secundarios característicos de la progresión de la enfermedad<sup>(94)</sup>.

## **FISH (Hibridación *in situ* fluorescente)**

Esta técnica utiliza una sonda marcada para la hibridación DNA-DNA sobre células o tejidos para identificar una secuencia en particular, se emplea una sonda marcada con un compuesto fluorescente o haptenos que permiten su visualización directa al microscopio<sup>(93)</sup>.

La técnica es útil para el diagnóstico y monitoreo de LMC, permite la detección de aproximadamente 1% de células leucémicas. Utiliza dos diferentes sustancias fluorescentes para la identificación del gen quimérico. Entre las ventajas de esta técnica se encuentran:

- La prueba es relativamente rápida en comparación a Southern blot
- Requiere una menor cantidad de muestra
- La muestra puede ser útil aún después de largos periodos de almacenamiento a temperatura ambiente.
- Permite una evaluación cuantitativa más precisa, por lo que tiene una mayor importancia en la respuesta a tratamiento

## **RT-PCR**

Es una técnica útil para analizar el nivel de expresión de RNAm, se emplea la actividad de la transcriptasa inversa que los convierte a moléculas de cDNA para su posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa. La sensibilidad de este ensayo permite la detección de una célula con rearrreglo bcr/abl entre  $10^6$  células normales. La técnica de RT-PCR es aplicada en esta enfermedad, principalmente para el diagnóstico de enfermedad mínima residual en tratamiento con INF y TMO<sup>(93,94)</sup>.

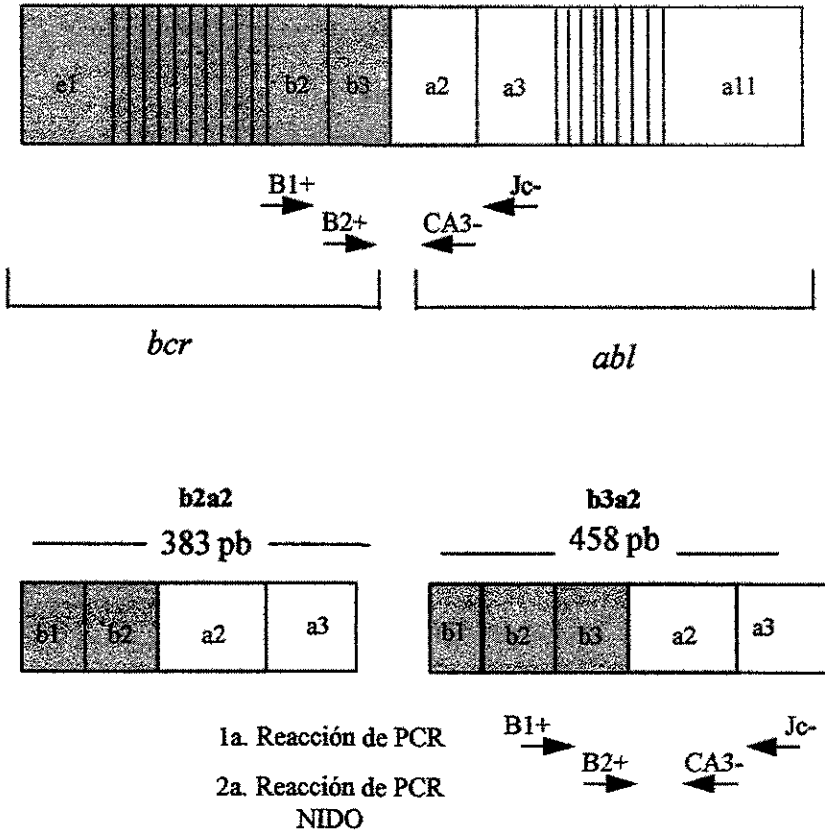
Otra aplicación importante es la identificación de los diferentes puntos de ruptura molecular involucrados en la translocación, esto puede representar un factor pronóstico de la enfermedad <sup>(39)</sup>.

Para aumentar la sensibilidad de esta técnica se emplea un PCR nido, que consiste en una segunda reacción de PCR cuyos oligonucleótidos se localizan dentro de la región que fue amplificada en una primera reacción de PCR, este método permite la amplificación de una célula cancerosa en 10<sup>9</sup> células normales <sup>(94)</sup>. (Figura 5)

El tratamiento con interferón induce una remisión hematológica y citogenética largas, sin embargo, rara vez se obtiene una erradicación completa de la enfermedad a nivel molecular. Aunque la completa desaparición de células Ph<sup>1</sup> no parece ser necesaria para largos periodos de remisión, la respuesta al INF debe decrecer durante la progresión de la enfermedad <sup>(94)</sup>.

Una nueva modalidad en esta técnica que no sólo aumenta la sensibilidad, sino que permite hacerla cuantitativa es el RT-PCR semicuantitativo, en el cual se utilizan diferentes titulaciones con un vector sintético cuyo producto de PCR es conocido y que compete por los oligonucleótidos con el rearrreglo *bcr/abl*. Esta técnica proporciona una mayor información en el seguimiento de pacientes con EMR, ya que si un paciente muestra aumento en el número de transcritos, esto es indicador de progresión <sup>(92,94)</sup>.

**Figura 5.** Localización de los oligonucleótidos en la PCR NIDO.



El producto de la segunda reacción de PCR (NIDO) es de 383 pb para *b2a2* y 485 para *b3a2*

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General:**

- Evaluar la respuesta al tratamiento con INF $\alpha$ 2A en 22 pacientes con LMC tanto para inducción de remisión como para mantenimiento, mediante el análisis citogenético y molecular del cromosoma Ph<sup>1</sup>.

#### **Objetivos Específicos**

- Comparar la respuesta terapéutica entre adultos y pacientes infantiles en el tratamiento con INF $\alpha$ 2A
- Determinar la frecuencia del tipo de rearrreglo molecular y su relación con factores pronósticos.
- Confrontar los resultados obtenidos en pacientes que recibieron INF $\alpha$  y TMO con los reportes de la literatura
- Contribuir al establecimiento de un mejor manejo terapéutico de los pacientes con LMC.
- Determinar la incidencia y porcentaje de negativización del Ph<sup>1</sup> en pacientes con LMC, mediante evaluación citogenética y por medio de estudio de biología molecular detectando el rearrreglo *bcr/abl* en forma secuencial.
- Establecer la relación entre los diferentes puntos de ruptura *bcr/abl* a nivel molecular y la respuesta al tratamiento.

### **HIPOTESIS**

- VERDADERA: El tratamiento con INF $\alpha$ 2A en pacientes con LMC es capaz de inducir y mantener una respuesta hematológica, citogenética y molecular, de esta forma mejorar la sobrevida.
- NULA: El INF $\alpha$ 2A no es capaz de inducir remisión citogenética y molecular, ni prolongar la sobrevida.
- ALTERNA: En el tratamiento convencional en LMC con quimioterapia combinada y el manejo con Interferón- $\alpha$ 2A, se obtienen los mismos resultados en cuanto a respuesta citogenética y molecular.

## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1. POBLACIÓN Y MUESTRA**

Estudio prospectivo multicéntrico, que incluye 22 pacientes con diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica de *novo*, provenientes de los diferentes servicios de Hematología en diferentes Instituciones dentro del país. Se realizó el seguimiento citogenético y molecular de los pacientes por un periodo de 6 a 17 meses.

### **4.2. CRITERIOS**

#### **4.2.1. De Inclusión**

- Diagnóstico de LMC.
- Pacientes de *novo*, SIN tratamiento previo.
- Enfermedad clínicamente en fase crónica.
- Pacientes con adecuada función hepática y renal.
- Consentimiento del pacientes (otorgado en forma verbal y/o escrita).

#### **4.2.2. No Inclusión**

- Estudio citogenético y molecular negativo para el cromosoma Ph<sup>1</sup>.
- Tratamiento previo para LMC.
- Embarazo
- Exposición previa a interferón u otras citocinas
- Enfermedad clínicamente en fase acelerada.

#### **4.2.3. De Exclusión**

- Reacción alérgica severa secundaria a interferón.
- Esplenomegalia sintomática que a juicio del tratante requiera radioterapia.
- Embarazo.
- Deseo del paciente de abandonar el tratamiento.
- Toxicidad por interferón, grado III-IV, recurrente.

### 4.3. ADMINISTRACIÓN DEL INTERFERÓN

#### 4.3.1. Inducción de Remisión.

Los pacientes iniciaron el tratamiento con Interferon  $\alpha 2A$  ( $3mU/m^2/día$ ) hasta obtener respuesta hematológica (RH). Si a los tres meses no se había obtenido RH, se administró quimioterapia estándar (busulfan o hidroxiurea) en forma conjunta con el Interferón  $\alpha 2A$ , hasta obtener RH (Tabla 4)

#### 4.3.2. Mantenimiento de la fase crónica.

Una vez obtenida la RH, se continuó con la misma dosis de inducción. Al completar 9 meses y de acuerdo a la respuesta citogenética, se modificó la dosis de Interferón  $\alpha 2A$  de la siguiente forma:

- ♦ Si se identificó algún tipo de respuesta citogenética, se incrementó en un 25%.
- ♦ Si la respuesta citogenética es nula, se incrementó en 50%.

Al completar 16 meses de tratamiento los pacientes con algún tipo de respuesta citogenética se mantuvieron en las mismas dosis de Interferón  $\alpha 2A$ , mientras que, aquéllos con respuesta nula disminuyeron la dosis a  $3mU$  cada 3er día. De acuerdo a la evolución clínica y respuesta citogenética en cada paciente se decidió en que momento se suspendía el tratamiento.

#### 4.3.3. Toxicidad al Interferón $\alpha 2A$

Al presentar toxicidad grado II se disminuyó la dosis en un 50% y se reinició al momento de su recuperación. Los pacientes con toxicidad III y IV suspendieron el Interferón  $\alpha 2A$ , se reinició con dosis al 50% y al momento de la recuperación.

#### 4.3.4. Procedimiento de Administración.

La administración fue subcutánea en zonas con abundante tejido adiposo y en forma rotatoria. Se recomienda administrarlo 2 horas antes de dormirse y utilizando acetaminofén y/o diclofenaco en caso de fiebre, malgia o artralgia. La dosis inicial será de  $3 mU/m^2$  de superficie corporal subcutánea cada 24 horas. Las dosis, reducción e incrementos dependieron de los ajustes especificados anteriormente.



#### 4.4. PROCEDIMIENTO (Figura 6 y 7)

##### 4.4.1. Material Biológico.

Se procesaron muestras de médula ósea y/o sangre periférica de pacientes con diagnóstico de LMC. Las muestras se tomaron antes de administrar el tratamiento y posteriormente entre los 6 y 17 meses.

##### 4.4.2. Cariotipo ( Anexo I, Figura 8)

Las muestras para cariotipo se procesaron por técnica directa y/o cultivos de 24, 48, 72 hrs (dependiendo del día en que fueron tomadas)<sup>(97,98)</sup>, se analizaron un mínimo de 10 metafases con bandas GTG<sup>(99)</sup> y se reportaron en base a la ISCN<sup>(100)</sup>.

##### 4.4.3. Extracción de RNA. (Anexo II, Figura 9)

La extracción se realizó por el método Fenol/Cloroformo/Isotiocianato de Guanidina en leucocitos de sangre periférica y médula ósea<sup>(96)</sup>. La valoración de la calidad del RNA se realizó por electroforesis en geles desnaturalizantes con formaldehído<sup>(101)</sup>.

##### 4.4.3. RT-PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa (RT-PCR) se realizó sobre RNAm. La detección inicial fue por RT-PCR multiple (multiplex) con amplificación del gen *bcr* normal como control de calidad del RNA y del rearrreglo *bcr/abl*, simultáneamente (Figura 10). Para incrementar la sensibilidad en la detección del rearrreglo *bcr/abl* durante el seguimiento se realizó RT-PCR nido (nested, Figura 5) detectando los rearrreglos b2a2 pb y b3a2 pb (Figura 11). En todas las muestras de seguimiento la calidad del RNA y la presencia del Ph<sup>1</sup> se evaluó primero por PCR multiple y amplificación del gen *abl* en reacción independiente<sup>(102)</sup>.

## FIGURA 6. PROCEDIMIENTO

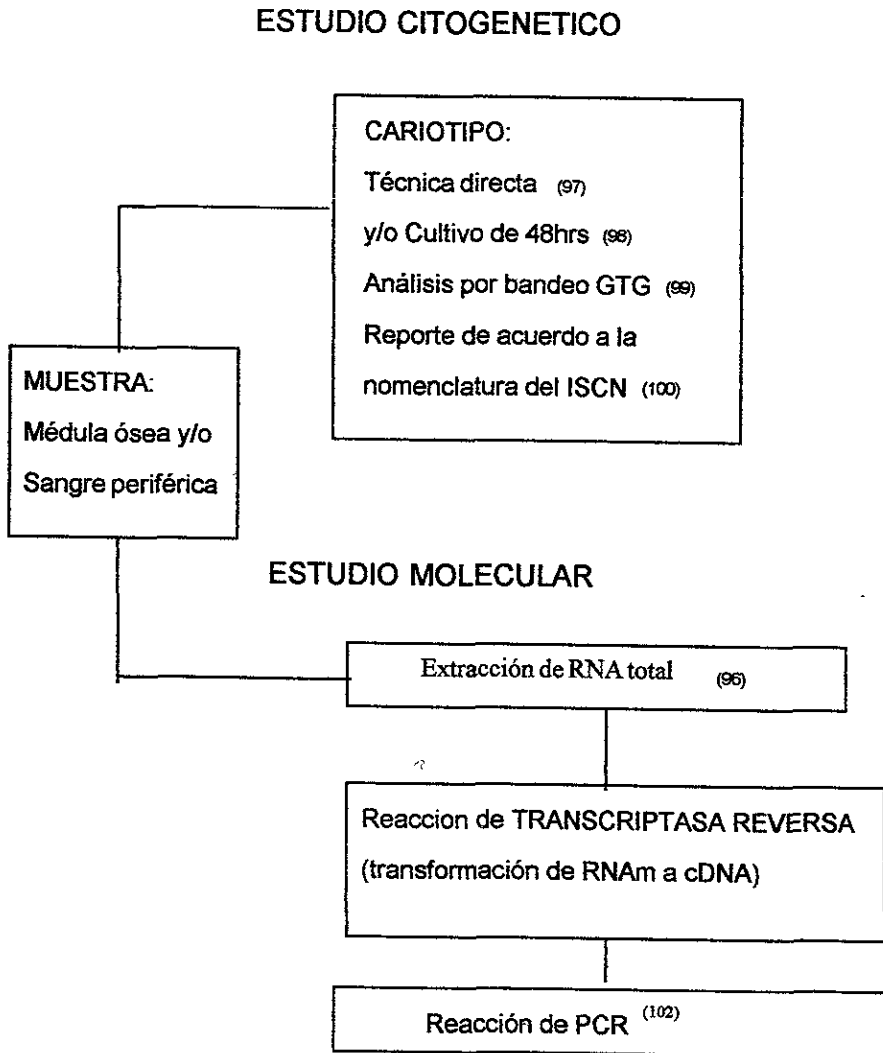
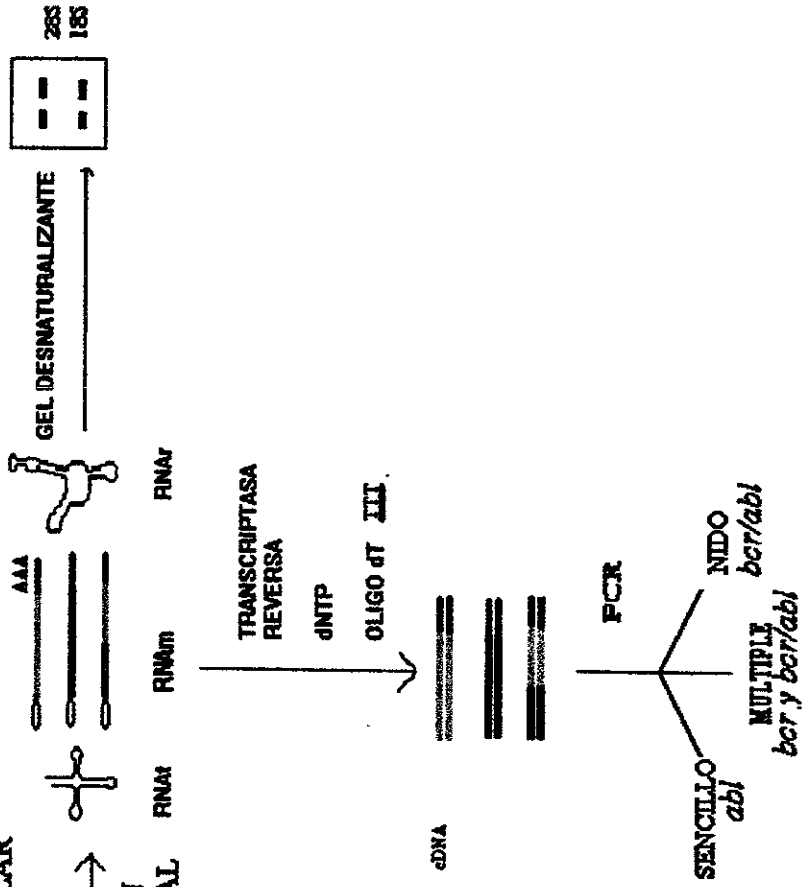


FIGURA 7. ESTUDIO MOLECULAR

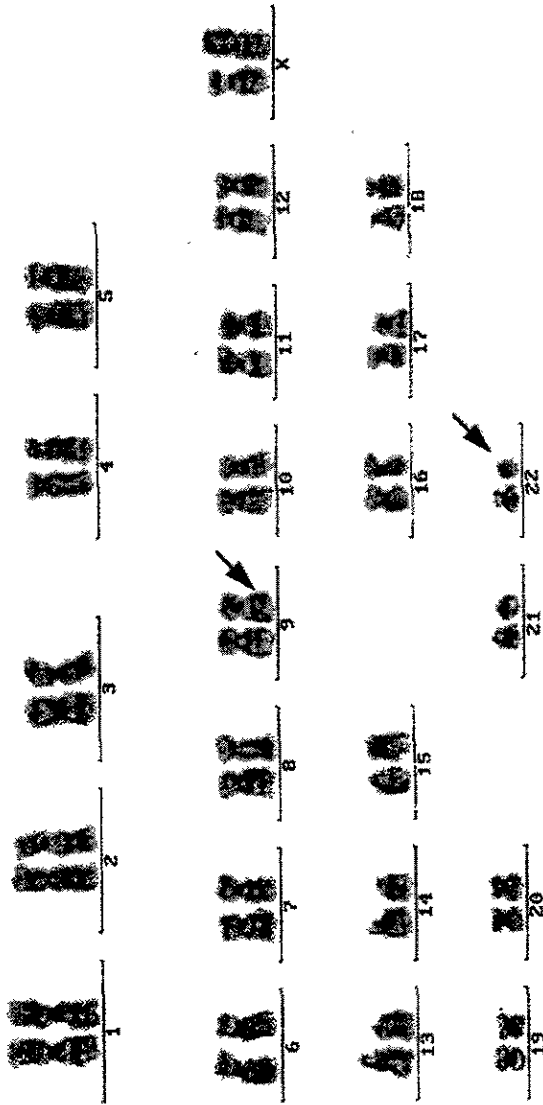


Se amplificaron los genes *abl* y *bcr* normales como controles internos. El gen *abl* se amplificó por una sola reacción de PCR (sencillo); se utilizó PCR múltiple en la amplificación simultánea del gen *bcr* y el *bcr/abl*. Para aumentar la sensibilidad del análisis el híbrido *bcr/abl* también se amplificó por PCR nido.

FIGURA 8a LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA  
46,XX,t(9;22)(q34;q11)



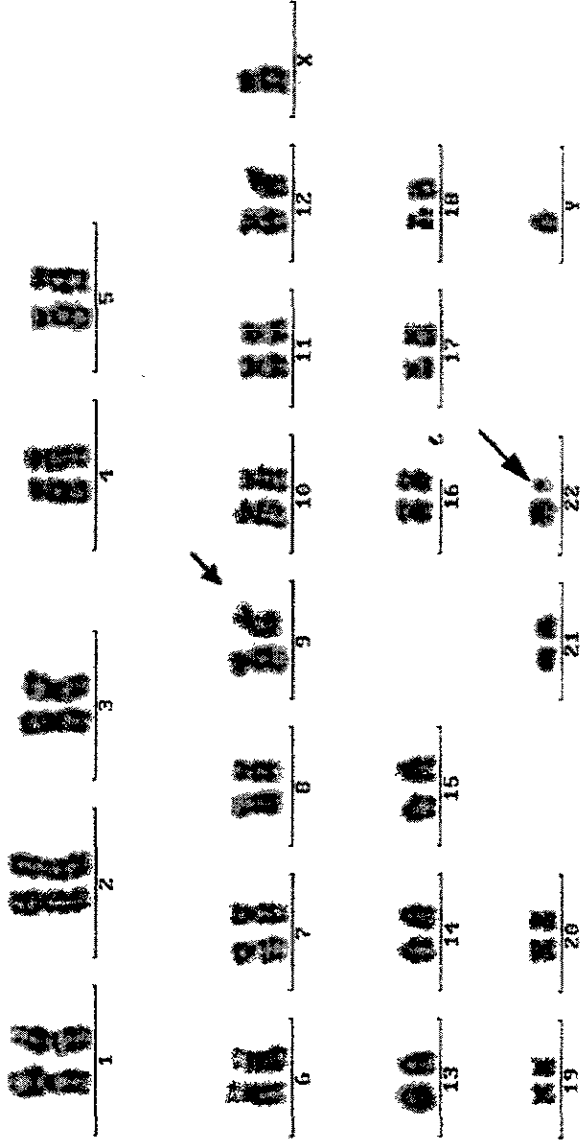
**FIGURA 8b**  
Cariotipo de médula ósea con bandeado GTG.  
**46,XX,t(9;22)(q34;q11)**



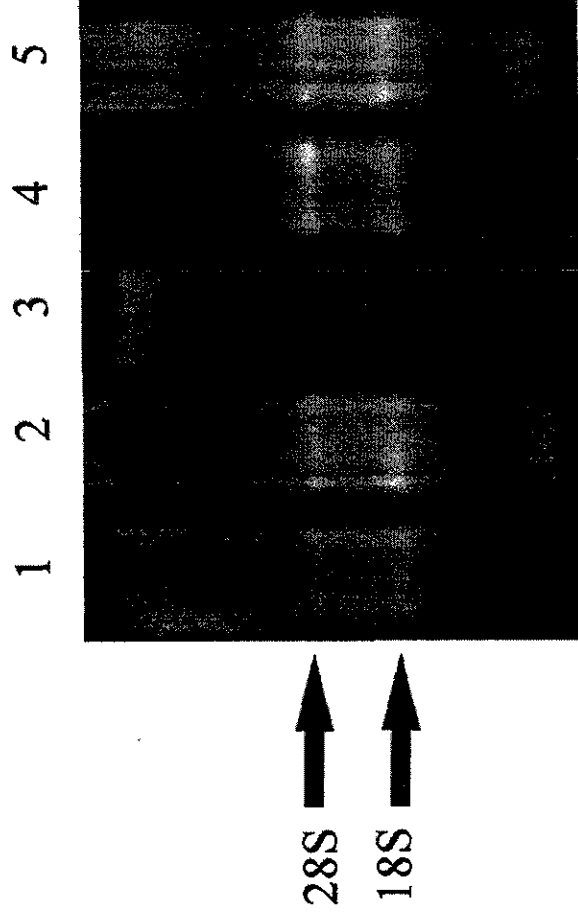
# FIGURA 8c

Cariotipo de médula ósea con bandas GTG de un individuo masculino con Leucemia Mieloide Crónica

46,XY,t(9;22)(q34;q11)

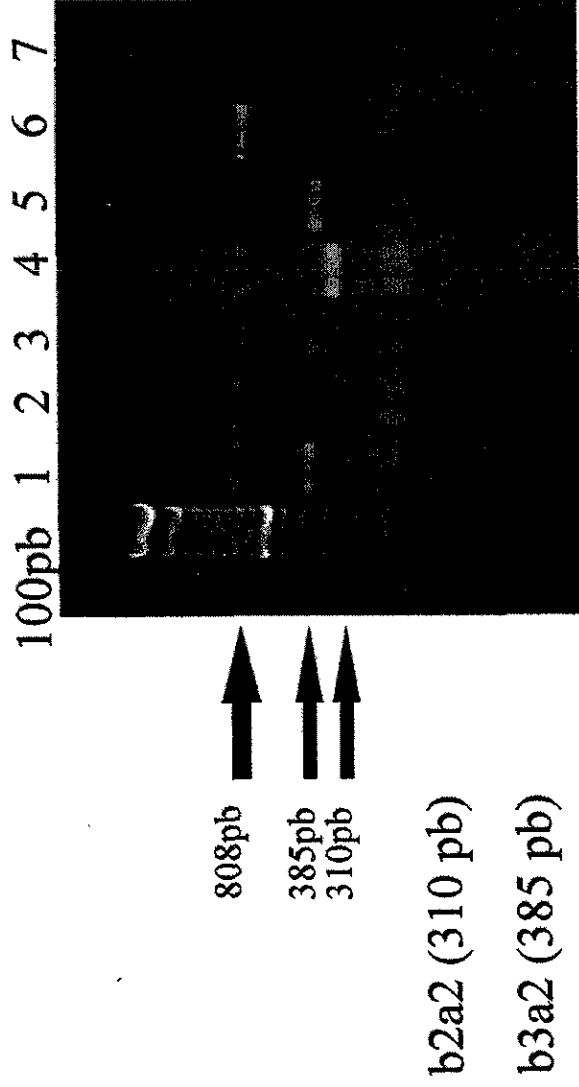


**FIGURA 9. GEL DESNATURALIZANTE**



Se observan los RNAr (28s y 18S). En el carril 3 no se obtuvo una buena calidad de RNA total al momento de la extracción, las demás muestras tienen una buena calidad.

**FIGURA 10. PCR MÚLTIPLE**

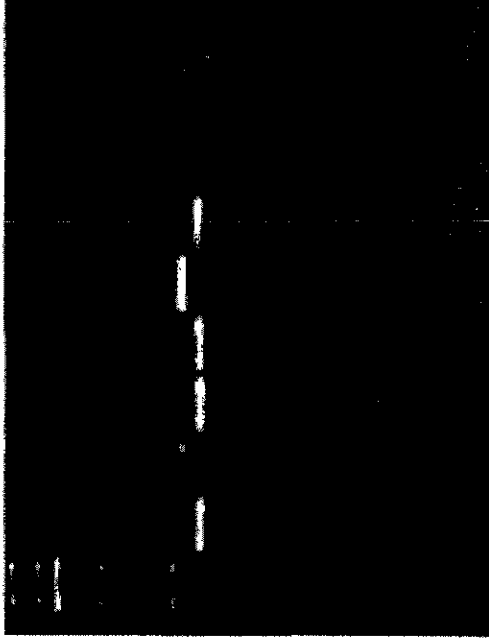


Amplificación simultanea del gen *bcr* normal y del híbrido *bcr/abl*. Carril 1: Control positivo. Carril 7: Control negativo de H<sub>2</sub>O. Carril 2 y 6 : Controles negativos de RNA (controles normales). Carril 3 a 5: pacientes con rearreglo molecular positivo ( b2a2 en el carril 4 y b2a2 en 3 y 5)



# FIGURA 11. PCR NIDO

1Kb 1 3 4 5 6 7 8 9



458pb

383pb

b3a2 (458pb)

b2a2 (383pb)

Carril 1: Control positivo. Carril 3 a 7 : pacientes con rearreglo molecular *bcrl/abl* (b2a2 en 4, 5 y 7; b3a2 en 3 y 6) Carril 8: Control negativo de RNA (control normal) . Carril 9: Control negativo de H<sub>2</sub>O.

## 5. RESULTADOS

Tabla 5. Características Clínicas, Citogenéticas, Moleculares y Seguimiento de los pacientes adultos con LMC.

Caso	Edad	Sexo	Diagnóstico		Riesgo Sokal	Seguimiento (meses)	Respuesta		Toxicidad	S.V. (meses)	Estado Actual	
			Citogenético	Molecular			Hematológica	Citogenética				Molecular
*1	17	F	t(9,22)	b2a2	Alto	9	Nula	Nula	b2a2	III	36	FB +
2	26	M	t(9,22)	b2a2	Intermedic	15	Completa	N.E.	b2a2	II	38	FC
3	34	M	t(9,22)	b2a2	Bajo	9	Completa	Completa	Negativo	Nula	60	FC
*4	38	M	t(9,22)	b2a2	Alto	9	Completa	N.E.	b2a2	Nula	60	FC
*5	40	M	t(9,22)/t(17q)	b2a2	Alto	9	Completa	Menor	b2a2	II	24	FC
6	38	M	t(9,22)	b2a2	Bajo	12	Completa	Parcial	b2a2	Nula	38	FC
7	37	F	t(9,22)	b2a2	Alto	17	Completa	Parcial	b2a2	I-II	50	FC
8	40	M	t(9,22)	b3a2	Alto	9	Completa	Nula	b3a2	Nula	36	FB
*9	17	F	t(9,22)	b3a2	Bajo	16	Parcial	Nula	b3a2	IV	24	FC
10	34	M	t(9,22)	b2a2	Alto	12	Completa	Parcial	b2a2	IV	36	FC
11	35	M	t(9,22)	b2a2	Bajo	17	Completa	Parcial	b2a2	Nula	36	FC
12	40	M	t(9,22)	b2a2	Alto	6	Completa	Menor	b2a2	Nula	25	FC
13	36	F	t(9,22)	b3a2	N.E.	15	Completa	Completa	b3a2	Nula	48	FC
14	37	F	46 XX	b2a2	Alto	7	Completa	N.E.	b2a2	Nula	18	FC
15	22	F	t(9,22)/46XX	b2a2	Bajo	9	Completa	Parcial	b2a2	II	20	TMO RC
16	32	F	t(9,22)	b2a2	Bajo	7	Completa	Completa	b2a2	I-II	36	TMO RC
17	37	M	t(9,22)	b2a2	N.E.	6	Completa	Menor	b2a2	Nula	36	TMO RC
18	35	M	t(9,22)	b3a2	N.E.	15	Completa	Completa	b3a2	I-II	42	TMO +

\* Quimioterapia, N.E. no evaluable, + Fallació, Fb fase blástica, FC fase crónica, RC Remisión completa, TMO Transplante de médula ósea.  
S.V. Supervivencia

Tabla 6. Hallazgos de Citogenética y del rearrreglo molecular de *bcr/abl* en los pacientes pediátricos con LMC al diagnóstico y durante el seguimiento.

	Edad/Sexo	Diagnóstico		Seguimientos		
		Citogenética	Molecular	Citogenética	Molecular	meses
1	14/M	t(9;22)	b2a2+	MENOR	+	9
2	14/M	t(9;22)	b2a2+	NULA	+	9
3	13/F	t(9;22)	b2a2+	NULA	+	6
4	6/M	t(9;22)	b3a2+	MENOR	+	6

Tabla 7 Respuesta Hematológica y Citogenética en los pacientes adultos.

RESPUESTA	Numero de pacientes (%)
<b>Hematológica</b>	
Completa	16 (89)
Parcial	1 (5.5)
Nula	1 (5.5)
<b>Citogenética</b>	
Mayor	10 (55.6)
Menor	3 (16.7)
Nula	3 (16.7)
S/M	2 (11)
<b>Molecular</b>	
Negativización	1 (5.3)
Rearreglo positivo	17 (94.7)

S/M Sin metafases

## 5. RESULTADOS

Se estudiaron 22 pacientes, 18 adultos y 4 niños. El rango de edad de los adultos fue de 17 a 40 años (media 34) con una distribución por sexo de 12 hombres y 7 mujeres (Tabla 5). Los niños se encontraron entre los 6 a 14 años (media 11) siendo 3 masculinos y 1 femenino (Tabla 6). Todos los casos se estudiaron al momento de ser diagnosticados como LMC en fase crónica *de novo*, sin tratamiento previo y sin antecedentes de otra neoplasia.

En el estudio citogenético realizado a los pacientes antes de la administración del tratamiento se observó t(9;22) en 17 pacientes adultos (95%) y uno con cariotipo normal (caso 14). La presencia de células normales junto con células Ph<sup>1</sup> (mosaico Ph<sup>1</sup>- / Ph<sup>1</sup>+) se observó en el paciente 15. El caso 4 mostró i(17q) como alteración secundaria al Ph<sup>1</sup>, en cada caso se contó un mínimo de 10 metafases. El rearreglo molecular *bcr/abl*, en todos los pacientes adultos fue positivo, incluyendo el que presentó cariotipo normal; en 17 casos fue del tipo b2a2 y en 5 del b3a2. Ambos grupos mostraron características clínicas similares y en los casos con rearreglo b3a2 no se observó trombocitopenia elevada como se ha reportado en otras series<sup>(38)</sup>.

En los pacientes pediátricos tanto el estudio citogenético como el molecular ayudó a diferenciar entre la LMCj y la del tipo del adulto, influyendo en la decisión terapéutica. En base al diagnóstico se decidió administrar INF $\alpha$ 2A en estos casos de LMC del adulto. La frecuencia y tipo de rearreglo molecular que presentaron estos pacientes fue el mismo que el encontrado en los adultos, predominando el rearreglo b2a2 (3 casos) sobre el b3a2 (1 caso).

Con el tratamiento con INF $\alpha$ 2A se obtuvo remisión hematológica completa en todos los pacientes pediátricos (Tabla 6) y en 16 de los 18 adultos (89%) (Tabla 7); en los 2 casos adultos restantes la respuesta hematológica fue parcial (caso 9) y nula en 1 (caso 1). La toxicidad hacia el INF $\alpha$ 2A en los pacientes adultos fue nula en 8 casos, grado I-II en 5 y III- IV en 3 casos en los que se suspendió el INF $\alpha$ 2A, en el resto no se obtuvieron los datos clínicos. Para los niños no se reportaron datos de toxicidad en ningún caso.

Durante el seguimiento citogenético realizado entre los 6 y 17 meses de iniciado el tratamiento con INFc2A, en los pacientes adultos se observó una respuesta citogenética mayor en 10 casos (55.6%): en 5 fue completa (0% células Ph<sup>1</sup>) y los otros 5 parcial (<35% células Ph<sup>1</sup>); este tipo de respuesta se obtuvo después de 9 meses de tratamiento. Una respuesta citogenética menor se obtuvo en 3 pacientes (16.7%): 1 después de 9 meses y 2 a los 6 meses de inicio del tratamiento. En cuatro pacientes no se observó ningún tipo de respuesta citogenética, en 2 la respuesta fue nula (100% células Ph<sup>1</sup>) y en los restantes no fue evaluable la respuesta citogenética. (Tabla7).

El seguimiento molecular del rearrreglo *bcr/abl* fue positivo en los 17 pacientes adultos, aun en aquellos con remisión citogenética completa y solamente en el caso 3 con 0% de células Ph<sup>1</sup>+, fue negativo el rearrreglo.

En los pacientes pediátricos la respuesta citogenética al INFc2A (Tabla 6) fue menor en 2 pacientes y nula en el resto, en comparación con los adultos no se observó respuesta mayor. El seguimiento molecular hasta los 9 meses de evolución fue positivo en todos los pacientes.

En 5 pacientes adultos se administró otro tipo de terapia adicional al INFc2A, los casos 1, 4 y 5 recibieron busulfán y el 9 busulfán e hidroxurea. Durante el seguimiento 5 pacientes fueron sometidos a TMO, 4 de estos pacientes se encuentran en remisión completa y 1 en recaída post-TMO. El estado actual de los demás pacientes es 11 en fase crónica y 2 en fase blástica. De los pacientes que se encuentran en fase crónica 8 ya han superado el promedio de supervivencia de la LMC con terapia convencional hasta en 60 meses.

Para establecer la relación entre la respuesta al INFc2A y el estado de la enfermedad, se utilizó el método de Sokal<sup>(12)</sup> clasificando a los pacientes en grupos o niveles de riesgo (Tabla 5). Se identificaron 6 pacientes con alto riesgo, 1 con riesgo intermedio, 8 con riesgo bajo y 3 más sin clasificación por datos incompletos. Los pacientes pediátricos no se clasifican en base al riesgo, debido a que la LMC del tipo del adulto con t(9;22) se considera de alto riesgo en población infantil.

## 6. DISCUSIÓN

Los 18 pacientes adultos mostraron una edad promedio menor a la reportada, no así la frecuencia mayor de hombres afectados, sin embargo se observó un mayor número de pacientes con riesgo alto.

En los niños con LMC la edad de presentación (mayores de 4 años) y la frecuencia por sexo son semejantes con lo reportado. Además en estos casos se corroboró la importancia de la citogenética y el estudio molecular para establecer el diagnóstico de LMC del adulto en pacientes pediátricos y definir la terapia adecuada.

El porcentaje de casos (95%) que presentaron t(9;22) es similar a lo establecido en la literatura, en el caso del cariotipo normal (caso 14) nos sugiere la presencia de un Ph<sup>1</sup> enmascarado, que mediante las técnicas citogenéticas no fue posible detectar; sin embargo, el estudio molecular fue positivo. Por lo anterior corroboramos que la nueva tecnología molecular ayuda a establecer el diagnóstico correcto para una buena decisión terapéutica. En cuanto al caso 15 la presencia de un mosaico nos indica que hay una clona normal residual o bien una línea celular Ph<sup>1</sup>-, la presencia de estas células normales proporcionan al paciente un mejor pronóstico, lo que podría ser relacionado con la obtención de respuesta citogenética mayor. Otro hallazgo citogenético fue el i(17q) secundario al Ph<sup>1</sup> en el caso 5, el paciente obtuvo una respuesta citogenética menor, aún con esta alteración considerada como indicativo de fase acelerada.

La detección del rearrreglo molecular en todos los pacientes muestra la mayor sensibilidad de la RT-PCR para establecer el diagnóstico y por lo tanto el manejo terapéutico temprano. Se observó una mayor frecuencia en el rearrreglo molecular del tipo b2a2, con características similares a los casos con rearrreglo b3a2, estos casos no mostraron trombocitosis como han reportado otras series<sup>(38)</sup>.

El tratamiento con INF $\alpha$ 2A tanto en los pacientes adultos como pediátricos fue capaz de inducir algún tipo de respuesta hematológica en todos los casos, con excepción de 2 casos adultos. De estos pacientes uno fue clasificado como de alto riesgo o nivel 4 y el otro como de bajo riesgo o nivel 1, ambos con un alto grado de

toxicidad al INF $\alpha$ 2A , por lo cual se interrumpió el tratamiento por un largo periodo de tiempo (Tabla 5).

La utilización de terapia adicional al INF $\alpha$ 2A en algunos casos, se debió principalmente a que los pacientes no presentaron una respuesta hematológica completa como ocurrió en el caso de los pacientes 1 y 9. En el caso 4 y 5 se administró busulfán ante la respuesta citogenética menor o la falta de datos de respuesta citogenética al INF $\alpha$ 2A después de 9 meses.

Al comparar los resultados citogenéticos con la clasificación por grupos de riesgo se encontró que 5 de 8 pacientes con riesgo bajo mostraron remisión citogenética mayor, mientras que sólo 2 de 6 con riesgo alto, en este grupo la respuesta citogenética nula fue predominante.

Otro factor que parece influir en la respuesta citogenética es la toxicidad al medicamento, así los mayoría de los pacientes que no presentaron toxicidad al INF $\alpha$ 2A mostraron una respuesta citogenética mayor. Mientras que los 3 pacientes con toxicidad grados III y IV, que interrumpieron la administración del INF $\alpha$ 2A , tuvieron una respuesta citogenética nula.

La utilización de técnicas de Biología Molecular como el RT-PCR demostró tener una mayor sensibilidad para el monitoreo de la enfermedad mínima residual, ya que durante el seguimiento todos los pacientes mostraron el rearreglo molecular *bcr/abl*, aún en aquéllos con una respuesta citogenética completa. La excepción fue el paciente 3 que se clasificó dentro del grupo de bajo riesgo, no presentó toxicidad al INF $\alpha$ 2A y su respuesta citogenética fue completa con *bcr/abl* negativo, su estado actual es de fase crónica con una supervivencia de 60 meses.

En general los pacientes que obtuvieron respuesta citogenética mayor continúan en fase crónica (Tabla 5). Mientras que los 2 pacientes con alto riesgo, respuesta citogenética nula, y alta toxicidad al INF $\alpha$ 2A están en fase blástica con supervivencia de 36 meses. En estos dos casos parecería ser que el efecto del INF $\alpha$ 2A para prolongar la duración de la fase crónica fue igual al reportado con otros medicamentos (36 meses), sin embargo, esto puede ser debido a los factores de riesgo alto de estos dos pacientes.

La mayoría de los pacientes sometidos a TMO se encuentran en remisión, lo que sugiere que el INF $\alpha$ 2A no tiene un efecto adverso cuando el transplante se realiza durante el primer año del tratamiento.



## 7. CONCLUSIONES

El INF $\alpha$ 2A fue capaz de inducir respuesta hematológica completa en un 89% de los pacientes adultos estudiados y en 100% de los niños. Una respuesta citogenética mayor se observó en 55.6% de los casos de pacientes adultos, este tipo de respuesta no se observó en los niños (solamente Respuesta Menor), aunque en estos casos hay que recordar que esta enfermedad en niños es de alto riesgo y la mejor opción terapéutica es el TMO.

En los pacientes con respuesta citogenética mayor se espera una mayor supervivencia debido a la mayor duración de la fase crónica, por retrasar la aparición de alteraciones secundarias, y postergar así la evolución hacia la fase acelerada y/o blástica.

La efectividad del INF $\alpha$ 2A parece ser influida tanto por el estado de la enfermedad, como por la toxicidad al Fármaco, y el tipo de respuesta citogenética y molecular.

**ANEXO I**  
**ANÁLISIS CITOGENÉTICO**

**1. TÉCNICA DIRECTA (MÉDULA ÓSEA)<sup>97</sup>**

**MATERIAL**

- Solución Hipotónica KCL 0.0375 M
- Colchicina 2%
- Solución de Carnoy metanol: ácido acético 3:1.

**PROCEDIMIENTO**

- Adicionar a 1ml de médula ósea con heparina 10 ml de solución hipotónica y 5 gotas de colchicina. Incubar a 37 °C por 45 minutos.
- Centrifugar a 1500 RPM y decantar
- Agregar gota a gota 5 ml de Solución de Carnoy fría y fresca. Dejar reposar 1 hora.
- Realizar lavados con el fijador y centrifugando a 3000 RPM hasta obtener un botón blanco.
- Gotear las laminillas

## **2.CULTIVO DE LINFOCITOS (TÉCNICA HABITUAL modificada) <sup>(98)</sup>.**

### **MATERIAL**

- Medio de Cultivo RPMI 1640
- Suero fetal bovino (1%)
- PHA (Fitohemaglutinina)
- Penicilina (5000 UI/ml)
- Estreptomicina (5000 ml/ml)
- L-Glutamina (200 mM)
- Colchicina 2%
- Solución Hipotónica KCL 0.075 M
- Solución de Carnoy metanol: ácido acético 3:1.

### **PROCEDIMIENTO**

- Inocular 1ml de sangre en 10 ml de medio.
- Incubar el cultivo a 37 °C por 48 o 72 horas.
- 2 h antes de las 48 o 72 horas, adicionar 0.1 ml de solución de Colchicina
- Transferir el cultivo a un tubo de centrifuga y centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos
- Decantar y mediante agitación adicionar 10 ml de solución KCL 0.075 M por 10 minutos.
- Centrifugar a 15000 rpm por 5 minutos.
- Decantar y mediante agitación adicionar 10ml de solución de Carnoy fría y fresca.
- Repetir el paso de 6 a 7 veces.
- Resuspender el paquete celular en un volumen pequeño de solución de Carnoy y gotear en una laminilla para observar al microscopio.

### **3. TÉCNICA DE BANDEO TRIPSINA-GIEMSA (GTG) <sup>(99)</sup>.**

#### **MATERIAL**

- **Buffer de fosfatos (SBF) (pH 7.0).** Disolver 8.0 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 0.92g de fosfato de sodio dibásico anhidrido ( $\text{NaHPO}_4$ ) y 0.2 g de fosfato de potasio mono básico anhidrido ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) en un litro de agua destilada.
- **Solución de Tripsina 0.005 %.** Disolver 35 mg de tripsina en 70 ml de SBF. La solución es estable aproximadamente un día.
- **Colorante Giemsa.** 2.5 ml de Giemsa más 45 ml de Buffer de Fosfatos (pH 6.8)

#### **PROCEDIMIENTO**

- Incubar las preparaciones de 20-40 segundos en la solución de Tripsina.
- Enjuagar con SBF.
- Teñir con la solución de Giemsa .
- Enjuagar con agua destilada y secar al aire.

**ANEXO II**  
**TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**1. EXTRACCIÓN DE RNA <sup>(96)</sup>.**

**MATERIAL**

• **Método de extracción : Tiocianato de Guanidina-Fenol-Cloroformo**

**Solución de lisis de Glóbulos Rojos :** Cloruro de amonio 0.155 M  
Bicarbonato de potasio 10 mM  
EDTA 0.1 mM

**Solución Desnaturalizante ( D ) :** Tiocianato de Guanidina 4 M  
Citrato de Na 25 mM pH 7.0  
Sarcosil 0.5%  
2-mercaptoetanol 0.1 M

**Acetato de sodio 0.2 M**

**Fenol pH: 4.5-5**

**Cloroformo/alcohol isoamílico** 24ml de cloroformo  
1ml de alcohol isoamílico

**Etanol 75%**

**Isopropanol**

**PROCEDIMIENTO:**

- La sangre periférica y/o medula ósea es centrifugada a 1600 RPM, posteriormente se separa el paquete de glóbulos blancos en un tubo de ensayo.
- Se inician los lavados del paquete de blancos con la solución de lisis de glóbulos rojos.
- Una vez obtenido el paquete de leucocitos, estos son lisados con la solución desnaturalizante.

- Se adiciona 1ml de solución D por cada mililitro de muestra y agitar fuertemente.
- Agregar 1ml de fenol y 1ml de cloroformo por cada mililitro de solución D, agitar durante 5 minutos. Se deja reposar por 15 minutos
- Centrifugar a 3000 RPM por 30 minutos a 4 °C.
- Separar la parte acuosa y adicionar isopropanol en un volumen idéntico al obtenido de fase acuosa.
- Centrifugar a 3000 RPM por 30 minutos a 4 °C.
- Decantar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 75%. Dejar secar
- Solubilizar en agua estéril con Dietilpirocarbonato (DEPC).

## **2. GEL DESNATURALIZANTE <sup>(101)</sup>.**

### **MATERIAL**

- MOPS buffer para electroforesis 10X (SIGMA)
- Formaldehído
- Bromuro de etidio 10mg/ml
- Buffer de carga Formaldehído-formamida-glicerol-BPB (SIGMA)
- RNA total 5µl
- Agarosa

### **PROCEDIMIENTO:**

- El gel se realiza al 0.8% de agarosa, 1X MOPS y 0.6% Formaldehído.
- Se mezcla el RNA total y el buffer de carga en una proporción de 2.1.

### 3. REACCIÓN CON TRANSCRIPTASA REVERSA (TR) <sup>(102)</sup>.

#### MATERIAL

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRACIÓN
	N	FINAL
Oligo dT (50mM)	1 $\mu$ l	2.5 $\mu$ M
Amortiguador 5X de TR	4 $\mu$ l	1X
Mezcla dNTPs (25mM de cada nucleotido)	1 $\mu$ l	500 $\mu$ M
DDT 0.1 M	1 $\mu$ l	10mM
Transcriptasa reversa (MuLV)	1 $\mu$ l	2.5 U/ $\mu$ l
1 $\mu$ g de RNA total agua/DEPC	12 $\mu$ l	
Agua lo que baste para 20 $\mu$ l	—	

#### PROCEDIMIENTO

- Se Mezclan el oligo dT, agua y el RNA. Incubar a 65 °C 15 minutos.
- Se mezclan los componentes restantes y se incuba en el termociclador a: 37 °C 60 min, 95 °C 5 min y 5 °C 5 min
- El producto se almacena a -20 °C hasta su utilización.

#### 4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)<sup>(101)</sup>.

##### MATERIAL

PCR sencillo (calidad abl) y primera reacción del PCR nido.

COMPONENTES	VOLUME	CONCENTRACIÓN
	N	FINAL
MgCL <sub>2</sub> 50mM	1 µl	2µM
Amortiguador 10X de Taq	4 µl	1X
Mezcla dNTPs (25mM de cada nucleótido)	0.8 µl	200 µM
Oligonucleótido 1	0.4 µl	400nM
Oligonucleótido 2	0.4 µl	0.4 µM
Taq DNA polimerasa	0.2 µl	1 U/µl
cDNA	3 µl	
Agua lo que baste para 50 µl	---	

##### PROCEDIMIENTO

- Ciclos de PCR: 96 °C 30 seg (Desnaturalización)  
56 °C 60 seg (Alineamiento)  
72 °C 60 seg (Extensión)

- Número de ciclos 35

Se utilizan los oligonucleótidos Ab+ y Jc- para el gen *abl* normal. Para la primera reacción el par NB1+ y Jc-.



**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

**Segunda reacción de PCR (nido).**

- 1 µl de la primera reacción
- El mismo volumen y reactivos, excepto los oligonucleótidos (usar los oligonucleótidos internos CA3- y B2+)

**PCR múltiple.**

- Se utilizan 4 oligonucleótidos en diferentes concentraciones finales.

Oligonucleótido B <sub>2</sub> B	400nM
Oligonucleótido C5e-	200nM
Oligonucleótido BCR-C	200nM
Oligonucleótido CA <sub>3</sub> -	100nM

<b>COMPONENTES</b>	<b>VOLUMEN</b>	<b>CONCENTRACIÓN FINAL</b>
MgCL <sub>2</sub> 50mM	1 µl	2µM
Buffer 10X de Taq	4 µl	1X
Mezcla dNTPs (25mM de cada nucleótido)	0.8 µl	200 µM
Taq DNA polimerasa	0.2 µl	1 U/µl
cDNA	2 µl	
Agua lo que baste para 50 µl	----	

## PROCEDIMIENTO

- Ciclos de PCR: 96 °C 30 seg (Desnaturalización)  
60 °C 60 seg (Alineamiento)  
72 °C 60 seg (Extensión)
- Número de ciclos 30

### OLIGONUCLEÓTIDOS

NOMBRE	SECUENCIA	LOCALIZACIÓN
Ab+	CTTCTGGAAAGGGGTACCTATTA	<i>abl</i> (1b)
Jc-	GGAGTGTTTCTCCAGACTGTTG	<i>abl</i> (a3)
B1+	GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA	<i>bcr</i> (b1)
B2+	TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT	<i>bcr</i> (b2)
CA3+	TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG	<i>abl</i> (a3)
B2B	ACAGaATTCCGCTGACCATCAATAAG	<i>bcr</i> (b2)
C5e-	ataggaTCCTTTGCAACCGGGTCTGAA	<i>bcr</i> (c5)
BCR-C	ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG	<i>bcr</i> (e1)

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Adamson J. (1991) Enfermedades mieloproliferativas. En: Harrison, Principios de Medicina Interna. Wilson J, Braunwald E, Isselbacher K, et al. 12ª ed. McGraw-Hill, México. pp.1810-1812 .
2. Athens J. (1993) Chronic myeloid leukemia. En: Wintrobe's Clinical Hematology. Lee T, Bithell J, Foerster J, Athens J, Lukens N. 9th de. Lea & Febiger, New York pp.1708-1728.
3. Silver R. (1990) Chronic myeloid leukemia. A perspective the clinical a biologic issue of the chronic phase. *Hematol Oncol Clin North Am.* 4:319-335.
4. Berkow R. (1994) El Manual Merck de diagnóstico y terapéutica. 9ª ed. Oceano/Centrum, Barcelona. pp.1380-1382.
5. Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, et al. (1999) Mechanisms of disease: The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 341(3):164-172.
6. Labardini-Mendez J, Cortés J, Talpaz M, Velázquez A. (1997) Leucemia Crónica. *Rev Inv Clin* 47(suppl 1):94-102.
7. Cortes J, Talpaz M, Kantarjian. (1996) Chronic Myelogenous Leukemia: A Review. *Am J Med* 100(5):555-570.
8. Cortes J, Kantarjian HM, Giralt S, Talpaz M. (1997) Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Bailliere's Clin Haematol* 10(2):227-90.
9. Savage GD, Szydlo M, Goldman J. (1997) Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral center over a 16 year period. *Br J Haematol* 96:111-116.
10. Kantarjian HM, Talpaz M, Gutterman J. (1988) Chronic myelogenous leukemia: Past, present and future. *Hematol Pathol* 2:341-367.
11. Cervantes F, Rozman C. (1982) A multivariate analysis of prognostic factors in chronic myeloid leukemia. *Blood* 60:1298-1304.
12. Sokal J, Cox E, Baccarani M, Tura S, et al. (1984) Prognostic Discrimination in "Good Risk" Chronic Granulocytic Leukemia. *Blood* 63(4):789-799.
13. Kantarjian M, Keating M, Smith T, Talpaz M. (1990) Proposal for a Simple Synthesis Prognostic Staging System in Chronic Myelogenous Leukemia. *Am J Med* 88:1-8.

14. Hasford J, Ansari H, Pfirmann M, Hehlman R, et al. (1996) Analysis and validation of prognostic factor for LMC. Bone marrow transplantation. 17, suppl 3:s49-s54.
15. Nowell PC, Hungerford DA. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 132:1497.
16. Dobrovic A, Peters G, Ford JH. (1991) Molecular analysis of the Philadelphia chromosome. Chromosoma 100:479-486.
17. Sokal J, Gomez G, Baccanari M, et al (1988): Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Ph1 chronic granulocytic leukemia. Blood 72: 294-298.
18. Rowley JD. (1973) A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. Nature 243:290-293.
19. Mohamed AN, Clarkson BD, Chaganti SK. (1986) High resolution banding of chronic myeloid leukemia chromosomes. Cancer Genet Cytogenet 20:209-222.
20. Rooney P E, Czepulkowski B A. (1990) Human cytogenetics: a practical approach. Vol II Malignancy and acquired abnormalities. 2<sup>nd</sup> ed. IRL Press. New York. pp 1-25, 60-64.
21. O'Brien S, Thall PF, Siciliano MJ. (1997) Cytogenetics of chronic myelogenous leukemia. Baillieres Clin Haematol 10(2):259-76.
22. Bernstein R. (1988) Cytogenetics of Chronic Myelogenous Leukemia. Seminars in Hematology 25(1):20-34.
23. Heim S, Mitelman F. (1987) Cancer Cytogenetics. Alan R Liss. New York. pp.41-64.
24. Cortes J, O'Brien S. (1994) Chronic myelogenous leukemia. Curr Opin Oncol 6:23-31.
25. Martinez-Climent J A. (1997) Molecular Cytogenetics of childhood hematological malignancies. Leukemia 11:1999-2021.
26. Rubnitz J, Look T (1998) Molecular Genetics of Childhood leukemia. J Pediatric Hematol Oncol 20(1):1-11.
27. Stuppia L, Calabrese G, Peila R, Guanciali-Franchi P, et al. (1997) P53 loss and point mutation are associated with suppression of apoptosis and progression of CML into myeloid blastic crisis. Cancer Genet Cytogenet 98:28-35.
28. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Rios M, et al. (1998). Suppression of cytogenetic clonal evolution with Interferon Alfa therapy in patients with Philadelphia chromosome positive

- Chronic Myelogenous Leukemia. *J Clin Oncol* 16(10):3279-85.
29. Majlis A, Smith T, Talpaz M, O'Brien S, Rios M, Kantarjian M. (1996) Significance of Cytogenetic Clonal Evolution in Chronic Myelogenous Leukemia. *J Clin Oncol* 14(1):196-203.
  30. Kurzrock R, Gutterman U (1988) The molecular genetics of Ph<sup>1</sup> positive leukemia. En: Epstein. *Mechanisms of Disease*. New Eng J Med. 319(15):990-8.
  31. Drazen O, Canaani E, Gale P. (1988) Molecular Biology of Chronic Myelogenous Leukemia. 25(1):35-49.
  32. Look T. (1996) Genes altered by chromosomal translocation in leukemias and lymphomas. En: Genetica en Medicina. Thompson M, McInnes R, Wilard H. Thompson & Thompson. 4th ed. Masson. Barcelona. pp. 125-127.
  33. Moro M, Walkenhorst J, Goga An Wittw O, Superti G. (1997) A functional screen for regulators of the c-Abl protein tyrosine kinase. *Leukemia* 11(suppl 3):313-315.
  34. Franklin I, Mills K. (2000) Chronic myeloid leukemia. En: Provan D, Gribben J. Molecular Hematology. Blackwell, New York pp. 61-74.
  35. Lu D, Liu J, Campbell M, Guo J, et al. (1993) Tyrosine phosphorylation of P160 bcr by P210 bcr/abl. *Blood* 82(4): 1257-63.
  36. Melo J. (1996) The diversity of *bcr/abl* fusion proteins and their relationship to Leukemia Phenotype. *Blood* 88(7):2375-2384.
  37. González M, Waronko A, García -Sanz R, Toiron Y, et al. (1999) t(9;22) with the *bcr/abl* P210 fusion gene. En: Dongen J, Macintyne E, Gabert J, Delabesse, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberration in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 13:1901-28.
  38. Kwong Y. (1996) Association between b3a2 *bcr/abl* fusion and chronic myeloid leukemia with thrombocytopenic onset: fortuitous or real?. *Leukemia* 3:617-618.
  39. Colleoni G, Costa F, Griognollo C, Silva R, et al. (1996) Prognostic significance of *bcr/abl* rearrangement in chronic myeloid leukemia. *Braz J Med Biol Res* 29(10):1307-10.
  40. Gordon M. (1996) Review: Cellular and molecular mechanisms in chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 95:10-20.
  41. Clarkson B, Strife A, Wisniewski D, Lambek C, Carpino N. (1997). New understanding of

- the pathogenesis of CML: a phenotype of early neoplasia. *Leukemia* 11:1404-1428.
42. Salgia R, Li J, Ewaniuk D, Pear W, et al. (1997) *bcr/abl* induces multiples abnormalities of cytoskeletal function. *J Clin Invest* 100 (1):46-57.
  43. Melo L. (1996) The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 10:751-756.
  44. Skorski T, Wlodarski P, Daheron L, Salomoni P, et al. (1998) *bcr/abl*-mediated leukemogenesis requires the activity of GTP-binding protein Rac. *Proc Natl Acad Sci* 95:11858-62.
  45. Guerrasio A, Serra A, Gottardi E, Cilloni D, et al. (1997) Molecular events in chronic myeloid leukemia progression. *Leukemia* 11(suppl3):519-521.
  46. Melo J, Gordon D, Cross P, Goldman. (1993) The *abl/bcr* fusion gene es expressed in chronic myeloid leukemia. *Blood* 81 (1): 158-165.
  47. Diamond J, Golman J, Melo J. (1995) *bcr-abl*, *abl/bcr*, *bcr* y *abl* genes are alll expressed in individual granulocyte macrophage colony forming unit colonies derived from blood of patienrs with CML. *Blood* 85 (8): 2171-2175.
  48. Hess J, Zutter M, Castleberry R, Emmmanuel P. (1996) Juvenil choric myelogenous Leukemia. *A J C P* 105:238-248.
  49. Cjingtto P, Javier R, William M. (1995) Biology and treatment of infant leukemia. *Leukemia* 9:762-765.
  50. Busque L, Gilliland G, Prchal J, Weinstein J, Sokol J, et al. (1995) Clonality in Juvenile chronic myelogeneos leukemia. *Blood* 85(1):21-30.
  51. Argarwal B, Gulvady A, Joshi K, Khemani S, Currimbhoy Z. (1995) Juvenil chonic myelogenous leukemia: Therapeutic trial with Interferon Alpha 2 $\beta$ . *Indian Pediatrics* 32:1002-1004.
  52. Lapidot T, Grunberger T, Vormoor J, Estrov Z, et al. (1996) Identification of human juvenil chronic myelogenous Leukemia Stem Cells capable of initiating the disease in primary and secondary SCID mice. *Blood* 88: 2655-2664.
  53. Miles D, Freedman M, Stephens K, Pallavicini M, et al.(1996) Patterns of hematopoietic lineage involvement in children with neurifibromatosis type 1 and malignant myeloid disorders. *Blood* 88: 4314- 4320
  54. Luna-Fineman S, Shannon K, Lange B. (1995) Childhood monosomy 7: Epidemiology,

- biology, and mechanistic implications. *Blood* 85: 1985-99.
55. Chown S, Potter M, Cornish J, Goulden P, et al. (1996) Matched and mismatched donor bone marrow transplantation for juvenile chronic myeloid leukemia. *Br J Hematol* 93:674-676.
  56. Castlenerry R, Zuckerman K, Cohn S, Strauss L, et al. (1994) A pilot study of isotretinoin in the treatment of juvenile chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 331(25):1680-84.
  57. Maris J M , Wiersma S, Mahgoub N, Thompson P, et al. (1997) Monosomy 7 myelodysplastic syndrome and other secondary malignant neoplasms in children with neurofibromatosis Type 1. *Cancer* 79: 1438-46.
  58. Pastore C, Nomdedeu J, Volpe G, Guerrasio A, et al. (1995) Genetic analysis of chromosome 13 deletion in *bcr/abl* negative chronic myeloproliferative disorders. *Genes, Chromosomes and Cancer* 14:106-11.
  59. Guilhot F. (1994) The role of interferon in the treatment of chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Nouv Rev Fr Hematol* 36(suppl1).539-546.
  60. Talpaz M, Kantarjian HM, Kurzrock R, Gutterman J. (1988) Therapy of chronic myelogenous leukemia: Chemotherapy and Interferons. *Seminars in Hematology* 25(1):62-73.
  61. Gilman G A, Hardman J, Limbird L, Molinoff P, Ruddon R. (1996) Las bases Farmacológicas de la terapeutica. 9ª ed. Mc-Graw Hill Interamericana, México Vol I pp 1318,1350 .
  62. Solver R, Woolf S, Hehlmann R, Appelbaum F, Anderson A, et al (1999) An evidence based analysis of effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon and allogenic bone marrow transplantation in treating the Chronic phase of Chronic myeloid Leukemia. *Develop for the American Society of Hematology Blood*: 94(5):1517-36.
  63. Lengfelder E, Hehlmann R. (1996) Intensive combination chemotherapy in treatment of CML. *Bone Marrow Transplant* 17(Suppl 3):s55-s57.
  64. Melo J. (1999) Chronic myelogenous leukemia. "Insights into the molecular pathophysiology of chronic myelogenous leukemia: Therapeutic strategies?". *Seminars in hematology. American Society of Hematology* pp 143-151.
  65. Pestka S. (1997) The Interferon receptors. *Seminars in Oncology* 24(suppl 9):s9-18 .

66. Herberman R. (1997) Effect of Interferons on immune function. *Seminars in Oncology* 24 (Suppl 9):s9-78 - s9-80.
67. Bordens R, Grossberg S, Trotta P, Nagabhushan L. (1997) Molecular and biologic characterization of recombinant interferon- $\alpha$ 2b. *Seminars in Oncology* 24(Suppl 9):s9-41 - s9-51.
68. Pfeffer L. (1997) Biologic activities of natural and synthetic type I Interferon. *Seminars in Oncology* 24(Suppl 9): s9-63 - s9-96.
69. Finter N. (1996). The naming of beta- and alpha-interferons. *The Lancet* 348:348-349.
70. Furukawa Y, Iwase. (1997) Antileukemic effect of Interferon- $\alpha$  is mediated through down-modulation of E2F activity. *Leukemia* 11 (suppl 3):446-448.
71. Williams B, Haque J.(1997) Interacting pathways of interferon signaling. *Seminars in Oncology* 24(Suppl 9):s9-70 - s9-77.
72. Silver R, Woolf S, Hehlman R, Appelbaum F, Anderson A, et al (1999). An evidence-based analysis of effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon, and Allogenic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia. Developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94 (5): 1517-1536.
73. Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Rios M, et al. (1998). Suppression of cytogenetic clonal evolution with Interferon  $\alpha$  therapy in patients with philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 16(10):3279-3285.
74. Kantarjian M, O'Brien, Anderlini P, Talpaz M. (1996) Treatment of chronic myelogenous Leukemia: current status and investigational options. *Blood* 87(8):3069-81.
75. Kantarjian H, Smith T, O'Brien S, Beran M, et al. (1995) Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to Interferon- $\alpha$  therapy. *Ann Intern Med.* 122:254-261.
76. Goldman J. (1997) Chronic myeloid leukemia: New strategies for cure. *Hematology, Education Program American Society of Hematology, California* , pp. 5-9.
77. Tura S, Rosti G, Vivo A, Bonifazi F, et al. (1998) Long-term follow-up of Italian trial of Interferon- $\alpha$  versus conventional chemotherapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* 92(5):1541-1548.



78. Hehlman R, Willw A, Heimpel H, Hasford, et al. (1997). Randomized Studies with interferon in chronic myelogenous leukemia (CML) and comparative molecular aspects. *Leukemia* 11(suppl 3):506-511.
79. Messori A. (1998) Cost-effectiveness of interferon in chronic myeloid leukemia: Analysis of four clinical studies. *Ann Oncol* 9:389-396.
80. Gale R, Hehlman R, Zhang M, Hasford J, et al. (1998) Survival with Bone Marrow Transplantation versus Hydroxyurea or Interferon for Chronic Myelogenous Leukemia. *Blood* 91(5):1810-1819.
81. Donal T. (1999) Bone Marrow Transplant. *Seminars in Hematology*. 6(4):95-103.
82. Golman JM (1996) Autografting for CML - Overview and perspectives. *Bone Marrow Transplant* 17(suppl 3):s71-s74.
83. Santos G. (1990) Bone marrow transplantation in hematologic malignancies. *Cancer* 65(3):786-790.
84. Frassoni F, Giordano D, Podesta M, Piaggio G. (1996) Autografting Ph-negative blood precursor cells in chronic myeloid leukemia. *Bone marrow transplantation* 17(suppl 3):s59-s62.
85. Trigg M. (1996) What is the merit of an alternative bone marrow transplant? *Bone Marrow Transplantation* 18 (Suppl 3):s28-s32.
86. Sosa R, Joachim H, Sobrevilla P. (1997) Trasplante de médula ósea. *Rev Inv Clin* 48(Suppl 1):75-81.
87. Beelen D, Graeven U, Elmaagacli H, Niederle N, et al. (1995) Prolonged administration of Interferon a in patients with chronic phase Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia before allogeneic bone marrow transplantation may adversely affect transplant outcome. *Blood* 85(10):2981-90.
88. Tomás JF, Lopez L, Requena M, Aguilar R, et al. (1998) Absence of influence of prior treatment with interferon on the outcome of allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant* 22:47-51.
89. Hasford J, Ansari H, Pflrman M, Hehlmann (1996) Analysis and validation of prognostic factors for CML. *Bone Marrow Transplant* 17(suppl 3):s49-s54
90. Sawyers C. (1999) Medical progress: chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med*

340(17):1330-1340.

91. Lion T. (1996) Monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia: methodological approaches and clinical aspects. *Leukemia* 10:896-906.
92. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, et al. (1996) Quantitative molecular methods to monitor the response of CML patients to interferon- $\alpha$ . *Bone marrow Transplant* 17 (Supl 3):s41-s44.
93. Hirsch-Ginsberg C. (1998) Detection of minimal residual disease: relevance for diagnosis and treatment of human malignancies. *Annu Rev Med* 49:111-122.
94. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, et al. (1997) Monitoring the efficiency of Interferon- $\alpha$  therapy in Chronic Myelogenous Leukemia (CML) patients by competitive polymerase chain reaction. *Leukemia* 11(Suppl 3):541-544.
95. Kidd V, Lion T. (1997) Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia* 11:871-881.
96. Chomczynsky P, Sacchi N. (1987) Single Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-157
97. Hozier JC, Linquist LL. Banded karyotypes from bone marrow: a clinical useful approach. *Humman Genet* 1980, 53:205-9
98. Verman E, Babu A. (1995) Human Chromosomes principles and techiques. 2 ed. McGrawHill, New York p.p 8-15.
99. Wang HC, Fedoroff S. Banding in human chromosome treated with trypsin. *Nature New Biol* 1972, 253:52-4
100. ISCN. An international sistem for human chomosome nomenclature (1995). Mitelman F. Karge. California USA, 1994
101. Ambrook J, Fritsch A, Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp.7.1-7.83.
102. Cross N. (1996) Detection of bcr/abl in hematological malignancies by RT-PCR. En: Cotter F. Molecular diagnosis of cancer. Human Press, New Jersey pp 25-36.