



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

DETECCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS POR
MEDIO DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL Y
MOLECULAR EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA DE
PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA
(LLA).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

DIANA LORENA CALDERÓN PIZAÑA

DIRECTOR: M en C. MÓNICA SIERRA MARTÍNEZ



Facultad de Estudios
Superiores Zaragoza

MAYO DE 2006



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.

DEDICATORIAS

A mi familia ya que sin su amor y su apoyo no hubiera sido posible culminar este gran sueño.

A ti papá por ser un gran ejemplo a seguir, por ser una persona dedicada, responsable y sobre todo llena de amor. Gracias por motivarme, por apoyar mis decisiones y sobre todo por esta gran oportunidad de saber que tan maravillosa es la vida.

A ti mamá por ser una gran mujer, por estar conmigo en todo momento, por escucharme y por los buenos consejos, pero sobre todo por que estas siempre tan pendiente de mi. Gracias por ayudarme a cumplir mis metas.

A mi hermana Yamilet porque la quiero tanto, aun que ella sabe que de pronto diferimos en ideas.

A mi hermano Antonio por ser tan inquieto, por esa chispa que lo caracteriza y por ser tan buen hermano.

A mi hermanita Polet por ser muy importante en mi vida, por su espíritu de lucha, por sus ganas de salir adelante, pero sobre todo por llenarme de amor y de satisfacciones.

A mi abuelita Reyna por ser un ejemplo de fortaleza, por ser la pieza principal que forma nuestra familia, por quererme tanto y por confiar en mí. Gracias abuelita por ser tan linda.

A mi tía Isabel por esa gran lección de luchar por la vida, por cumplir esa gran promesa que alguna vez hicimos de no dejarnos vencer y por demostrarme que no importa que tan difícil sea, lo importante es hacerlo con todo el amor y con la plena convicción de que todo saldrá bien. Gracias por estar conmigo.

A mi tío Ricardo por sentirse tan orgulloso de mí, por estar siempre pendiente de todo lo que hago y por querer que siempre salga adelante.

A mis primos Hugo y Fabiola por quererme, respetarme y apoyarme, pero también por verme como a una hermana más.

A mi sobrina Nicole por todas esas sonrisas que me llenan de ternura, por ser una linda niña y por quererme tanto como yo a ti.

A mi sobrino Daniel, aunque ya no está conmigo se que me cuida y me bendice desde donde él está. Gracias por esa muestra de amor que nos diste.

A ti mi amor por ser parte de este triunfo. Gracias por estar siempre dispuesto a dar todo sin esperar nada a cambio, por esa paciencia que te caracteriza y que te hace ser una persona maravillosa. Gracias amor por quererme, cuidarme y respetarme. Sobre todo gracias por que me has enseñado a ser más paciente y a hacer las cosas de la mejor manera posible. Eres un gran ejemplo a seguir y una persona de la cual me siento muy orgullosa.

Con cariño

Diana

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Dolores Vergara por brindarme la oportunidad de trabajar en el área de Genética a su cargo, por compartir conmigo sus conocimientos y experiencias. Sobre todo por su amistad, por los gratos momentos y por los logros alcanzados. Gracias.

A la Dra. Sonia Chávez por ser una excelente persona, por transmitirme sus conocimientos, por ese carisma y su buena vibra que hace que todo se torne tan agradable. A la Q.B.P. Elvia García por ser una gran amiga, incondicional en todo momento, por ser tan dedicada y por preocuparse tanto. Mil gracias por todo el apoyo que a lo largo de este tiempo me has brindado. Al Biól. Enrique Molina por formar parte de este equipo de trabajo y por ser tan buena onda.

A la Biól. Karen Nieto Martínez del Hospital General por la toma de fotografías electrónicas de FISH y por ser una excelente persona.

A la M en C. Mónica Sierra por haber aceptado dirigir mi tesis. Por invitarme a participar en tan importante proyecto y por todos los conocimientos que a través del tiempo he adquirido gracias a ti. Gracias sobre todo por esa amistad tan sincera.

A los miembros del jurado: Biól. Carlos Martínez Montoya, a la Biól. Cristina Alvarado Domínguez, a la Dra. Elia Roldan Reyes y al Dr. Jorge Flavio Mendoza Rincón por el valioso tiempo que dedicaron a la revisión de esta tesis, por sus comentarios y observaciones que ayudaron a la elaboración de un mejor trabajo.

A mis mejores amigos: Ma. Del Carmen Rebolgar, Rodrigo Cobos, Arturo Chirino, Sara Anzures, Teresa Rueda, Luis Valencia, Lizbeth Álvarez por los buenos momentos que hemos compartido.

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA	2
EPIDEMIOLOGÍA	2
ETIOLOGÍA	2
CUADRO CLÍNICO	3
TRATAMIENTO	4
ETAPAS DEL TRATAMIENTO	4
CLASIFICACIÓN	6
CITOMORFOLÓGICA	6
INMUNOFENOTÍPICA	7
FACTORES PRONÓSTICO	9
ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	11
ALTERACIONES NUMÉRICAS	11
ALTERACIONES ESTRUCTURALES	14
MÉTODOS ALTERNATIVOS PARA LA DETECCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS	23
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
OBJETIVO GENERAL	29
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
POBLACIÓN DE ESTUDIO	30
CRITERIOS DE INCLUSIÓN	30
CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	30
METODOLOGÍAS	31
ESTUDIO CITOGENÉTICO	31
ESTUDIO MOLECULAR	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS	68

RESUMEN

En el presente estudio se analizaron 50 muestras de pacientes con diagnóstico de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) de los subtipos L₁ y L₂, que acudieron al Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México durante los años 2002 al 2004, el estudio citogenético (EC) se realizó en muestras de médula ósea, analizándolas por medio de bandas G, los cariotipos se reportaron de acuerdo a los criterios del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 1995). En los casos donde el resultado del EC no se obtuvo, fue incompleto o normal, se aplicó la técnica de Hibridación *in situ* con Fluorescencia (FISH), utilizando las sondas de secuencia única *BCR/ABL* con señal extra (ES) para identificar la t(9;22), en pacientes >17 años o con Ph⁺ observada previamente por citogenética convencional y la sonda de secuencia única *TEL/AML1* con señal extra (ES) para identificar la t(12;21), la cual se aplicó en los pacientes <17 años (Vysis Inc., Downwrs Grove, IL, USA).

Se obtuvo el resultado del EC en el 74% (37/50) de los casos; donde 20/37 fueron cariotipo normal y 17/37 presentaron un cariotipo alterado. Dentro de los cariotipos alterados; 7 casos presentaron alteraciones cromosómicas de tipo numérico y 10 casos de tipo estructural, siendo las alteraciones más frecuentes la tetraploidía (92 cromosomas) y la t(9;22) o cromosoma filadelfia (Ph⁺).

El análisis con la sonda *BCR/ABL* (ES) mostró que 8/23 resultaron con alteraciones en los genes *BCR* y/o *ABL*, de los cuales 7/23 presentaron la fusión génica *BCR/ABL* o cromosoma Filadelfia (Ph⁺); 5/7 presentaron además de la fusión *BCR/ABL* deleciones en los loci *BCR* y/o *ABL*. En la leucemia granulocítica crónica (LGC) las deleciones en éstos genes, se han reportado con una frecuencia del 12.5% y asociadas a un pronóstico favorable sin embargo, en este estudio se observó una frecuencia mayor (71%) a lo reportado por la literatura mundial, aunque el pronóstico no se sabe con certeza.

El análisis con la sonda *TEL/AML1* (ES) mostró 4/19 de los casos presentaron alteraciones en los genes *TEL* y/o *AML1*, de los cuales 1/4 fue positivo a la fusión génica *TEL/AML1* o t(12;21) y 3/4 presentaron las ganancias de los loci *TEL* y/o *AML1*, pero sin la fusión.

La FISH es una técnica útil para este tipo de padecimientos ya que permitió recuperar el resultado en el 16% de los casos aunque también mostró limitaciones ya que en aquellos pacientes que resultaron negativos tanto para la t(9;22) como para la t(12;21), pudo estar asociada otra alteración no analizada con este tipo de sondas.

INTRODUCCIÓN

LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA

La Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) es una patología neoplásica del sistema hematopoyético, que se caracteriza por la proliferación no regulada de las células progenitoras linfoides de estirpe B o T en diversas etapas de diferenciación (Lorna *et al.*, 1993; Cortes y Kantarjian, 1995; Slavutsky, 1999; McKenzie, 2000).

EPIDEMIOLOGÍA

El diagnóstico de LLA es más frecuente en la infancia observándose en el 80% de los pacientes, predominantemente en edades entre los 3 y 5 años. También puede presentarse en el 20% de los casos de pacientes en edad adulta generalmente menores de los 30 años (Ruiz-Argüelles y San-Miguel, 1996; Slavutsky, 1999).

ETIOLOGÍA

El origen de la LLA no está bien establecido, pero se ha asociado a factores genéticos, parentales y ambientales.

Dentro de los factores genéticos se ha observado que los familiares de pacientes con leucemia tienen un riesgo cuatro veces mayor de presentar la enfermedad comparado con la población en general (Schmitt y Degos, 1978; Cortes y Kantarjian, 1995). De igual forma ocurre con algunos síndromes genéticos asociados con leucemia como en el caso de la trisomía 21 (síndrome de Down), la cual se presenta en cerca del 2% de los casos de LLA en edad pediátrica (Robinson *et al.*, 1984; Whitlock *et al.*, 2005).

En cuanto a los factores parentales se dice que la progenie de madres mayores de 35 años, que han tenido previamente pérdidas fetales y/o hijos que presentaron incremento en el peso tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Dailing *et al.*, 1984; Kaye *et al.*, 1991).

Finalmente factores ambientales como la exposición a la radiación y la exposición a agentes químicos como es el benceno, se han asociado fuertemente con un riesgo alto de desarrollar leucemia (Stewart y Kneale, 1970; Rinsky *et al.*, 1987).

CUADRO CLÍNICO

Los síntomas en la LLA son muy variados, por una parte pueden existir solo manifestaciones inespecíficas como malestar general, astenia (fatiga física), adinamia (debilidad muscular), anorexia (falta de apetito) y pérdida de peso; además pueden estar presentes palidez de tegumentos (cambios de coloración en la piel), petequias (manchas pequeñas en la piel), púrpura, sangrado, fiebre e infección, como consecuencia de la falla en la médula ósea por la falta de producción de elementos eritroides, plaquetarios y granulocíticos (Peing *et al.*, 1981; Henderson, 1990; McKenzie, 2000).

En la LLA también puede haber manifestaciones tardías más específicas y severas como la hipertensión endocraneana (caracterizada por náusea, vómito, fotofobia, cefalea), la cual es causada por la infiltración de células blásticas al sistema nervioso central; dentro de estas manifestaciones también puede verse agrandamiento e infiltración de órganos; cuando los pacientes con LLA muestran infiltración a otros órganos se puede observar linfadenopatía (crecimiento en ganglios linfáticos) y/o hepatomegalia (crecimiento en hígado) y esplenomegalia (crecimiento del bazo) (Rapaport, 1986; Cortes y Kantarjian, 1995).

TRATAMIENTO

El mayor índice de cura en la LLA se ha atribuido en gran medida al desarrollo efectivo de regímenes de tratamiento multidroga dependiendo del tipo de paciente (Pui y Evans, 1998), con ello se ha observado que los niños con LLA responden de manera más favorable a la quimioterapia, siendo en ellos la tasa de cura del 85%, sin embargo; en los adultos aunque el 75% alcanzan la remisión completa, sólo del 20 al 40% de ellos son "curados" (Cortes y Kantarjian, 1995).

ETAPAS DEL TRATAMIENTO

Inducción a la Remisión

En ésta fase se pretende destruir la mayoría de las células neoplásicas y recuperar la hematopoyesis normal y como consecuencia el bienestar del paciente (Remisión completa RC) (Ruíz-Argüelles, 1994). El régimen de inducción tanto en niños como en adultos incluye la administración de un glucocorticoide (prednisona o dexametasona), L-Asparginasa, vincristina, y daunorrubicina, esta fase dura alrededor de 27 días. En ésta etapa el rango de los pacientes que alcanzan la remisión completa es del 97-99% en niños y en adultos del 75-90% (Cortes y Kantarjian, 1995; Pui y Evans, 1998; Kosaka *et al.*, 2004; Brüggemann *et al.*, 2006).

Tratamiento al Sistema Nervioso Central (SNC)

La infiltración al SNC se presenta sólo en el 5% de los niños y adultos. Estos pacientes requieren de un tratamiento dirigido al SNC por que pueden presentar infiltración hacia algunos sitios denominados santuarios, en donde el tratamiento habitual no es suficiente. En ésta etapa se suministra metotrexate, hidrocortisona y Arabinosido de citosina (Ara C) por vía intratecal (Ruíz-Argüelles, 1994; Cortes y

Kantarjian, 1995; Pui y Evans, 1998). El tratamiento al SNC puede iniciarse en la primera semana de inducción, hasta completar cuatro ciclos.

Consolidación

El objetivo en ésta etapa es destruir las células residuales que han sobrevivido a la etapa previa empleando medicamentos que puedan destruir las células en reposo o fuera del ciclo (G_0) (Ruíz-Argüelles, 1994), para lo cual una vez que se ha alcanzado la RC (% de blastos menor al 5%) aproximadamente en el día 28, se procede a aplicar el tratamiento de consolidación, el cual consiste en la administración de etopósido y Ara C por un periodo de tres semanas que incluyen la primera, segunda y tercera consolidación (Pui y Evans, 1998; Brüggemann et al., 2006).

Intensificación

En esta etapa se administran altas dosis de metotrexate durante tres semanas. Esta etapa comprende la primera, segunda y tercera intensificación en las cuales las dosis de metotrexate son variadas y van desde 1000mg hasta 5000mg (Cortes y Kantarjian, 1995; Pui y Evans, 1998; Kosaka *et al.*, 2004; Brüggemann et al., 2006).

Mantenimiento

El objetivo en la etapa de mantenimiento es destruir los últimos vestigios de leucemia residual (Ruíz-Argüelles, 1994) y consiste en la administración prolongada de la combinación 8 medicamentos como etopósido+citarabina, 6-mercaptopurina+ metotrexate, metotrexate+ Ara C, dexametasona+ vincristina+ L-Asparginasa y altas dosis de metotrexate. El tratamiento debe durar 3 años y no menos (Evans *et al.*, 1986; Kosaka *et al.*, 2004; Brüggemann et al., 2006).

Transplante

El transplante puede ser de tipo alogénico, en donde la médula ósea es donada por hermanos histocompatibles, o de tipo autólogo en donde el donador es el mismo paciente cuando ha alcanzado la etapa de remisión. El transplante es tomado como una alternativa de tratamiento, en aquellos pacientes que presenten $t(9;22)$ o $t(1;19)$ que son de mal pronóstico y que predicen recaídas tempranas; en aquellos pacientes que no responden al tratamiento de inducción y en los pacientes que tienen una recaída después de una segunda inducción (Pui y Evans, 1998).

CLASIFICACIÓN

CITOMORFOLÓGICA

La clasificación propuesta por el grupo Francés-Americano-Británico (FAB) identifica tres subtipos de LLA (L_1 , L_2 y L_3), con base en la morfología y heterogeneidad de los linfoblastos de la médula ósea (Heim y Mitelman, 1995; Cortes y Kantarjian, 1995; McKenzie, 2000):

LLA L_1 : Este subtipo muestra células pequeñas con cromatina nuclear heterogénea, núcleo regular con o sin nucléolo. Es el más común en niños y puede verse en el 85% de los casos, mientras que en los adultos sólo se observa en el 30% y parece tener mejor pronóstico.

LLA L_2 : Muestra células grandes con mayor heterogeneidad en cuanto a tamaño y a la distribución de la cromatina nuclear, la forma del nucléolo es irregular y puede presentar uno o dos nucléolos. Este subtipo se encuentra con mayor frecuencia en adultos afectando del 60-70% de todos los casos, mientras que en niños sólo se observa en menos del 15% y su pronóstico es desfavorable.

LLA L₃: Presenta células grandes y homogéneas con cromatina nuclear finamente punteada, nucléolo regular prominente y citoplasma vacuolado. Este es el subtipo más raro de la LLA y se presenta tanto en niños como en adultos en menos del 5% de todos los casos y es de muy mal pronóstico (Heim y Mitelman, 1995; Cortes y Kantarjian, 1995; McKenzie, 2000).

INMUNOFENOTÍPICA

Esta clasificación de la LLA está basada en la expresión de los antígenos B o T y en la maduración de la célula leucémica, y reconoce cuatro subtipos inmunitarios:

LLA-B

La estirpe de células B incluye inmunoglobulinas de superficie de membrana (sIg) e inmunoglobulinas citoplásmicas (cIg) y se presenta en el 60 al 70% de los adultos. Las células de estirpe B están clasificadas por el estadio de maduración del más primitivo al más aberrante en:

- Pre-pre B
- Pre-B temprana o común
- Pre-B
- B-madura

En la LLA pre-pre-B, se puede identificar el marcador temprano de la célula B denominado CD₁₉, así como el rearreglo de los genes de la inmunoglobulina. La LLA pre-B temprana o común se identifica por la presencia del antígeno CALLA (CD₁₀⁺) y el marcador temprano de la célula B denominado CD₂₄, este inmunofenotipo es más frecuente en niños y se asocia con un buen pronóstico. La LLA pre-B y la LLA B madura se identifican con los antígenos de superficie del linfocito B

antes mencionados, además del antígeno CD₂₀ que aparece en la célula B más diferenciada, también se puede identificar la inmunoglobulina citoplásmica o de membrana (Secker-Walker, 1997; McKenzie, 2000).

LLA-T

La estirpe de células T se define por la expresión de células leucémicas de línea T, asociadas a los marcadores CD₂, CD₇ y TdT. Esta estirpe se identifica en el 25 % de los pacientes adultos y en el 15% de los casos en niños. La LLA-T se clasifica en:

- Precursor temprano T
- T-madura

Esta estirpe se ha relacionado con una mala respuesta al tratamiento y con una supervivencia menor a un año (Slavutsky, 1999; McKenzie, 2000).

LLA nula

En este caso, las células no expresan antígenos T o B y se presentan sólo en el 10% de los pacientes adultos, los cuales alcanzan la remisión completa hasta en el 75% de los casos y su sobrevida es aproximadamente de un año (McKenzie, 2000).

LLA bifenotípica

La LLA bifenotípica, coexpresa antígenos asociados a la estirpe linfoide y mieloide, puede presentarse en el 3% de los casos y es de pronóstico desfavorable (Copelan y McGuire, 1995; McKenzie, 2000).

FACTORES PRONÓSTICO

En la LLA existen factores pronóstico o de riesgo que influyen en la respuesta al tratamiento y en la supervivencia de los pacientes tales como: la edad, la cuenta de leucocitos (CL), el sexo, el subtipo citomorfológico, el inmunofenotipo y el estudio citogenético.

Edad

La edad es un fuerte indicador de pronóstico ya que los niños menores de un año tienen un riesgo alto de falla al tratamiento a diferencia de los niños entre 1 y 9 años, los cuales responden de manera más favorable, mientras que en los adultos el pronóstico es adverso (Smith *et al.*, 1996; Secker-Walker, 1997).

Cuenta de leucocitos (CL)

Las CL menores de $10 \times 10^9/L$ se encuentran asociadas con un buen pronóstico, mientras que las CL por arriba de $50 \times 10^9/L$ predicen un curso desfavorable en ésta enfermedad (Smith *et al.*, 1996; Secker-Walker, 1997).

Sexo

El pronóstico para las mujeres con LLA es significativamente mejor que el de los varones, ya que los varones suelen estar asociados con infiltración testicular y con recaídas tempranas, así como con un periodo de supervivencia más corto comparado con el de las mujeres (Chessells, 1995; Pui *et al.*, 1999).

Subtipo citomorfológico

El subtipo L₁ característico de la población pediátrica se ha asociado fuertemente con inmunofenotipo pre-B, con un buen pronóstico, una buena respuesta al tratamiento y la tasa de curación más alta, en tanto

que el subtipo L₂ es de mal pronóstico ya que se encuentra asociado a pacientes adultos con CL altas e inmunofenotipo de células T. Finalmente el subtipo L₃ se ha asociado a un peor pronóstico (Heim y Mitelman, 1995; Smith *et al.*, 1996).

Inmunofenotipo

El antígeno CALLA (CD₁₀⁺) que se expresa en el subtipo pre-B temprana, se asocia con una buena evolución, mientras que los subtipos con CD₁₀ negativo están asociados con un pronóstico adverso (Reaman *et al.*, 1999).

Estudio citogenético

El estudio citogenético es un factor clave en el entendimiento de la LLA, ya que permite visualizar las alteraciones cromosómicas que están fuertemente vinculadas con la evolución de la enfermedad (Slavutsky, 1999).

Finalmente todos los factores antes mencionados, permiten clasificar adecuadamente a los pacientes con LLA en dos grupos de riesgo: habitual o alto. Los pacientes de grupo de riesgo alto suelen recibir un tratamiento más intensivo, mientras que los pacientes de grupo de riesgo habitual suelen recibir una quimioterapia más atenuada, de la misma eficacia, pero con toxicidad mínima. De ésta manera se pueden establecer esquemas terapéuticos apropiados para mejorar la vida de los pacientes con este tipo de enfermedad (Westbrook, 1997).

ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

El estudio citogenético se considera de gran importancia ya que ha revelado la presencia de alteraciones cromosómicas que aportan información valiosa para poder establecer el diagnóstico y pronóstico, duración de la remisión y supervivencia de los pacientes, logrando establecer con ello un tratamiento adecuado (Faderl *et al.*, 1998; Heim y Mitelman, 1995; McKenzie, 2000).

Las alteraciones cromosómicas en la LLA pueden ser de tipo numérico o de tipo estructural o bien la combinación de las dos (Secker-Walker, 1997).

ALTERACIONES NUMÉRICAS

Las alteraciones de tipo numérico se refieren al número de cromosomas (ploidía) que contienen las células de una población leucémica (ISCN, 1995).

En la LLA los pacientes son clasificados de acuerdo al número de ploidía que presenten y pueden ser: diploides (46 cromosomas), hipodiploides (<46 cromosomas),seudodiploides (46 cromosomas con alteraciones numéricas y estructurales), con hiperdiploidía alta (>50 cromosomas), con hiperdiploidía baja (47-50 cromosomas) y los cercanos a la triploidía y tetraploidía (68-92 cromosomas).

Todos estos cambios en el número cromosómico se han relacionado fuertemente con el pronóstico en los pacientes con LLA (Cuadro 1), como puede verse a continuación:

Cuadro 1. Frecuencia con que se presentan las alteraciones de tipo numérico en la LLA y su valor pronóstico

Anormalidad	ADULTOS		NIÑOS	
	Frecuencia	Pronóstico	Frecuencia	Pronóstico
Ninguna (cariotipo normal)	15-36%	Intermedio-Bueno	31-40%	Intermedio-Bueno
Cercano a la haploidía	Raro	Se desconoce	<1%	Mal pronóstico
Hipodiploidía	4-9%	Mal pronóstico	6%	Intermedio-Malo
Seudodiploidía	31-50%	Mal pronóstico	18-26%	Intermedio
Hiperdiploidía baja	10-15%	Bueno	10-11%	Intermedio
Hiperdiploidía alta	2-11%	Bueno	23-26%	Bueno
Cercano a la triploidía	3%	Mal pronóstico	No se tiene la frecuencia	Bueno
Cercano a la tetraploidía	2%	Excelente	No se tiene la frecuencia	Adverso

Tomado de Mrózek *et al.*, 2004**Cariotipo normal o diploide (46 cromosomas)**

Para considerar que un cariotipo sea normal se deben analizar un mínimo de 20 metafases ya que con esto se tiene el 90% de certeza de descartar la presencia de una clona alterada; hasta en el 40% de los pacientes con LLA se han identificado cariotipos normales, los cuales se han asociado a un pronóstico intermedio en ambos grupos de edad (Secker-Walker, 1990). Esta incidencia es alta tal vez por que algunos cariotipos normales pueden tener alteraciones crípticas como la t(12;21) que no es posible identificar por citogenética convencional, pero que al ser detectadas por citogenética molecular disminuyen la frecuencia de los cariotipos normales (Raimondi, 1993; Secker-Walker, 1997).

Hipodiploidía (<46 cromosomas)

La hipodiploidía se define como la pérdida de uno o más cromosomas, ésta alteración es poco común ya que sólo se presenta del 4 al 9% en los pacientes adultos y les confiere un pronóstico intermedio, en tanto que en niños su frecuencia va del 6 al 9% y es de buen pronóstico (Pui *et al.*, 1990; Callen *et al.*, 1989).

Seudodiploidía

Los casos con 46 cromosomas asociados a alteraciones numéricas y/o estructurales sonseudodiploides. Cerca del 90% de estas clonas presentan cambios estructurales, con mayor frecuencia translocaciones como la t(4;11) ó la t(9;22) y deleciones. En niños laseudodiploidía se puede presentar del 18 al 26% de los casos y en adultos del 31 al 50%; ésta alteración se ha asociado a mal pronóstico sobre todo en adultos en donde puede verse la t(4;11) y la t(9;22) (Secker-Walker, 1997).

Hiperdiploidía

Los cariotipos hiperdiploides se caracterizan por la ganancia de uno o más cromosomas y se presentan del 16 al 23% de los adultos y en el 23 al 42% en los niños (Onodera *et al.*, 1992; Secker-Walker, 1997).

Hiperdiploidía baja de 47-50 cromosomas

La incidencia de la hiperdiploidía baja es del 10 al 15% tanto en niños como en adultos; en estas clonas las ganancias cromosómicas que pueden estar presentes son 21, X, 8, y 10, también pueden observarse cambios estructurales que incluyen a 1q, 6q, 12p y 19p; el pronóstico en niños es intermedio mientras que en adultos es bueno (Raimondi *et al.*, 1992; Secker-Walker, 1997).

Hiperdiploidía alta de 51-68 cromosomas

La hiperdiploidía alta presenta un número modal de 51 a 68 cromosomas y los cromosomas frecuentemente ganados son; 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, 21 y X, pero también pueden observarse con una menor frecuencia el 1, 2, 3, 12 y 16 (Charrin *et al.*, 2004). Típicamente los cromosomas ganados se presentan en tres copias (trisómicos) no obstante el cromosoma 21 a diferencia de los anteriores es tetrasómico (Onodera *et al.*, 1992). La hiperdiploidía alta (51-68 cromosomas) se correlaciona fuertemente con factores de buen pronóstico, incluyendo edades entre 3 y 7 años, cuenta de leucocitos menores a $10 \times 10^9/L$, subtipo L_1 , antígeno CD_{10}^+ e inmunofenotipo pre-B temprano; aproximadamente el 85% de los niños con este tipo de ploidía son curados (Pui *et al.*, 1988; Onodera *et al.*, 1992; Ito *et al.*, 1999).

Triploidía y tetraploidía (69-92 cromosomas)

Las clonas con más de 69 cromosomas son raras en la LLA en ambos grupos de edad. Los casos cercanos a la triploidía (de 69-73 cromosomas) se presentan con una frecuencia muy baja en niños (0.03%), pero se ha encontrado en el 3% de los adultos. Los casos cercanos a la tetraploidía (de 82-94 cromosomas) tienen una incidencia de alrededor del 1% en niños y del 2% en adultos. Estos casos suelen estar asociados a la línea T sin embargo, se les ha asociado a un excelente pronóstico (Pui *et al.*, 1990; Secker-Walker, 1997).

ALTERACIONES ESTRUCTURALES

Las alteraciones de tipo estructural como su nombre lo indica son alteraciones que afectan a la estructura del cromosoma; estas alteraciones se producen cuando hay una ruptura de cromosomas y el proceso de reparación da como consecuencia una pérdida estructural o recombinaciones anormales (McKenzie, 2000).

Dichas alteraciones se han observado tanto en niños como en adultos con LLA, las translocaciones recurrentes y con valor pronóstico son: la t(9;22), t(4;11), t(1;19), t(12;21), t(10,14), aunque existen otras alteraciones con menor frecuencia (Look *et al.*, 1982; Faderl *et al.*, 1998; Mrózek *et al.*, 2004). También se han identificado alteraciones secundarias que indican la evolución de la enfermedad, como deleciones en el brazo corto de los cromosomas 9 y 12 [del(9p) y del(12p)], deleciones en el brazo largo de los cromosomas 5, 6 y 7 [del(5q), del(6q) y del(7q)] y trisomía 8, las cuales también son importantes para establecer el pronóstico de la enfermedad (Mrózek *et al.*, 2004).

En el cuadro 2 se muestra la relación de frecuencia con que se presentan dichas alteraciones cromosómicas, así como el pronóstico de cada una de ellas tanto en niños como en adultos (Mrózek *et al.*, 2004).

Translocación t(1;19)(q23;p13)

La translocación t(1;19) tiene una incidencia en niños del 4-5% y en adultos del 2-5% (Cortes y Kantarjian, 1995; Slavutsky, 1999; Mrózek *et al.*, 2004), se asocia con inmunofenotipo pre-B y es de mal pronóstico. A nivel molecular ésta translocación resulta de la fusión del gen *E2A* que se encuentra en 19p13 con el gen *PBX* localizado en 1q23, lo que determina la formación de una proteína quimérica que actúa en la transformación maligna de las células pre-B o sus progenitoras (Cortes y Kantarjian, 1995; Slavutsky, 1999).

Translocación t(4;11)(q21;q23)

La t(4;11) es una alteración asociada a un muy mal pronóstico en ambos grupos de edad, su frecuencia es del 2% en niños y del 3-7% en adultos (Mrózek *et al.*, 2004). Desde el punto de vista molecular participa el gen *MLL* ubicado en 11q23 y el gen *AF4* localizado en 4q21,

generando el gen quimérico *MLL/AF4* (Cortes y Kantarjian, 1995; Slavutsky, 1999).

Cuadro 2. Frecuencia con que se presentan las alteraciones estructurales en la LLA y su valor pronóstico

ADULTOS			NIÑOS	
Anormalidad	Frecuencia	Pronóstico	Frecuencia	Pronóstico
t(9;22)(q34;q11.2)	11-29%	Mal pronóstico	2-6%	Mal pronóstico
t(4;11)(q21;q23)	3-7%	Mal pronóstico	2%	Mal pronóstico
t(1;19)(q23;p13.3)	2-5%	Mal pronóstico	4-5%	Excelente
t(12;21)(p13;q22)	0-3%	Se desconoce	20-25%	Bueno
del(9p)	6-30%	Intermedio	7-11%	Adverso
del(12p)	4-6%	Favorable/ desfavorable	7-9%	Sin pronóstico
del(6q)	3-16%	Sin pronóstico	6-9%	Sin pronóstico
del(7p), del(7q) y monosomía 7	6-11%	Mal pronóstico	4%	Adverso
del(5q)	<2%	Sin pronóstico	1%	Adverso
+8	10-12%	Mal pronóstico	2%	Se desconoce
14q11	5-7%	Excelente	3-4%	Se desconoce
t(10;14)(q24;q11)	2-3%	Excelente	17-22%	Sin pronóstico

Tomado de Mrózek *et al.*, 2004

Translocación t(10;14)(q24;q11)

Alrededor de un tercio de los pacientes con LLA-T presentan una translocación que involucra uno de los receptores de genes de la línea T (TCR), resultado de la sobre-expresión de un gen yuxtapuesto a un TCR, el rearreglo TCR más común en la LLA es la t(10;14)(q24;q11.2), resultado de la sobreexpresión del gen *HOX₁₁* y se presenta con una

frecuencia del 2-3% en niños y en adultos del 17-22%, ésta translocación parece ser la primera alteración asociada con un pronóstico favorable en niños, aunque en adultos se desconoce su pronóstico (Mrózek *et al.*, 2004).

Translocación t(12;21)(p13;q22)

La t(12;21) es la alteración más frecuente del subtipo-B de la LLA, se observa en el 25% de los pacientes en edad pediátrica y en <3% en los pacientes adultos (Shurtleff *et al.*, 1995; Cayado *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2004) y se ha asociado fuertemente a un buen pronóstico (Romana *et al.*, 1995; Seeger *et al.*, 2001; Van der Burg *et al.*, 2004). Esta alteración no puede ser detectada por citogenética convencional sólo es posible diagnosticarla con facilidad por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), utilizando los genes *TEL* (12p13) y *AML1* (21q22) marcados con distintos fluorocromos.

Aspectos moleculares de la t(12;21)

TEL

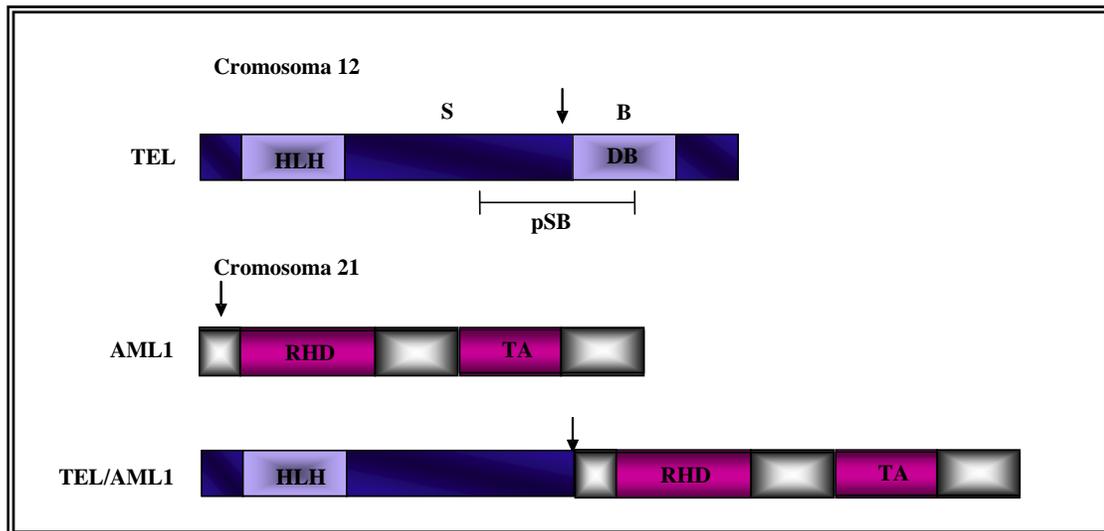
El gen *TEL* localizado en la región telomérica del cromosoma 12 en la banda p13, codifica para una proteína de regulación transcripcional de la familia ETS (factor de transcripción) (Cayado *et al.*, 2000; Frost *et al.*, 2004; Sawinska y Ladon, 2004). La proteína Tel es caracterizada por dos distintas regiones, un dominio ETS que consta de 70 aminoácidos el cual es localizado en la región C-terminal de la proteína y un dominio HLH (helix-loop-helix) localizado en el extremo N-terminal de la proteína (Figura 1), el cual puede mediar las interacciones con otras proteínas (Faderl *et al.*, 1998).

AML1

El gen *AML1* (también llamado CBFA2 ó RUNX1) localizado en el cromosoma 21 en la banda q22, codifica para una de las dos subunidades (una subunidad α y una β) que constituyen el CBF en el humano (core binding factor) (Miyoshi *et al.*, 1991; Speck *et al.*, 1999; Roumier *et al.*, 2003).

La proteína Aml1 es un heterodímero que contiene un dominio altamente conservado de 128 aminoácidos denominado "runt" (en homología al gen runt de *Drosophila*), responsable de la heterodimerización tanto de la subunidad β de CBF como del dominio de ADN (DB) (Wang *et al.*, 1996).

Figura 1. Estructura de los genes *TEL* y *AML1* y el producto de fusión que forma la t(12;21)



El gen *AML1* es normalmente expresado en todas las líneas celulares hematopoyéticas, actúa regulando la expresión de varios genes específicos para la hematopoyesis, incluyendo al factor del receptor para la estimulación de colonias de macrófagos (M-CSFR), interleucina 3

(IL3), mieloperoxidasa (MPO) y los genes TCR β (Lutterbach y Hiebert, 2000; Roumier *et al.*, 2003).

TEL/AML1

En la t(12;21) el dominio HLH del gen *TEL* se fusiona al intrón 2 del gen *AML1* (Faderl *et al.*, 1998), como resultado de la translocación se origina un gen híbrido que da lugar a la síntesis de una proteína también híbrida, cuyo extremo N-terminal es un segmento del gen *TEL* y el C-terminal es un segmento del gen *AML1* (Figura 1), ésta proteína híbrida Tel/Aml1 tiene propiedades anormales y por lo tanto afecta la función normal del complejo transcripcional aml1/cbf β y por lo tanto la síntesis de las proteínas que este complejo controla (Liang *et al.*, 1996; Cayado *et al.*, 2000).

Translocación t(9;22)(q34;q11.2)

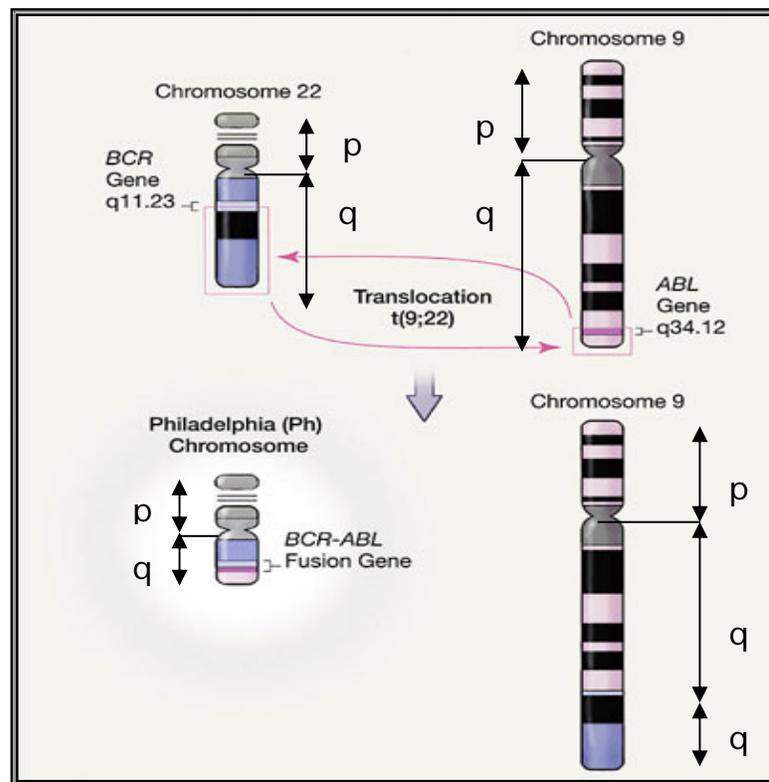
La translocación t(9;22) o cromosoma Filadelfia (Ph⁺) fue identificada por primera vez por Nowel y Hungerford en 1960 pero hasta 1973 Rowley la describe, como una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 que transponen el segmento 3' del gen *ABL* en la banda 9q34 al segmento 5' del gen *BCR* en la banda 22q11 (Kolomietz *et al.*, 2001) (Figura 2), ésta alteración fue asociada primero con la leucemia granulocítica crónica (LGC) ya que se presentaba hasta en el 90% de los casos con ésta enfermedad, pero también se observó en los casos con leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA) aunque con una frecuencia menor (Secker-Walker, 1997).

En la LLA la t(9;22) o cromosoma Ph⁺ se presenta en el 2-6% en los niños (Ribeiro *et al.*, 1987; Fletcher *et al.*, 1989), en los pacientes adultos se ha identificado hasta en el 29% (Prete *et al.*, 1994; Towatari *et al.*, 2004), la frecuencia de ser portador de cromosoma Ph⁺ aumenta conforme avanza la edad. Esta alteración es asociada a cuentas altas de

leucocitos y a un subtipo morfológico L₂, sobretodo en adultos se asocia con una frecuencia alta de expresión de antígenos CD₁₀ y CD₃₄ (Cortes y Kantarjian, 1995).

El pronóstico para los portadores de la t(9;22) en la LLA es desfavorable a cualquier edad (Slavutsky, 1999; Secker-Walker, 1997).

Figura 2. Translocación t(9;22) ó Cromosoma Filadelfia



Aspectos moleculares de la t(9;22)

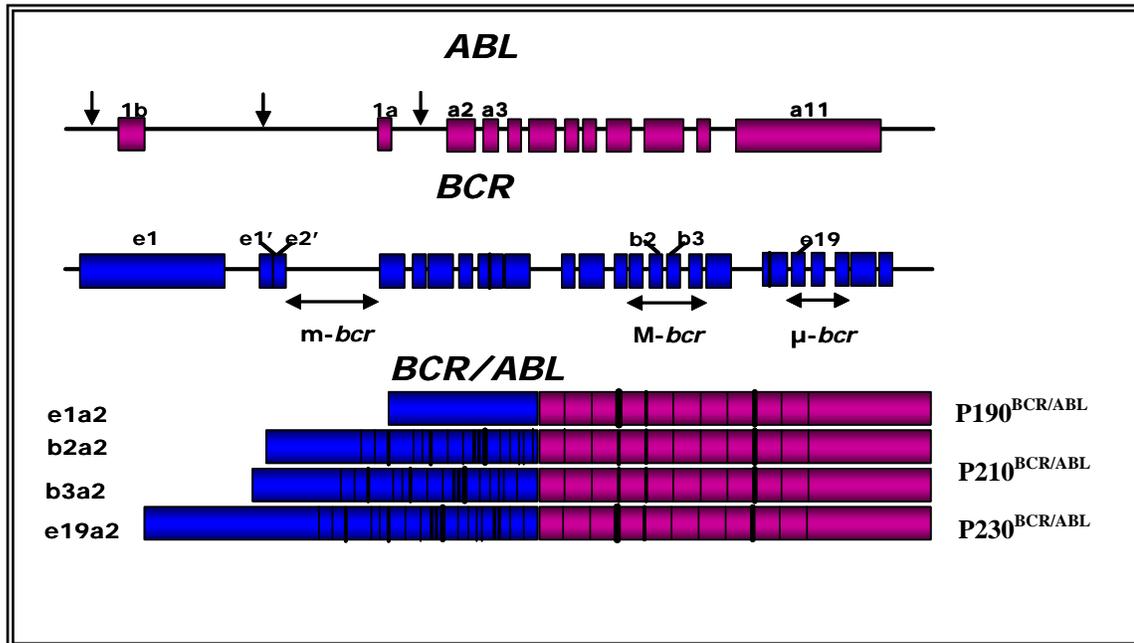
Desde el punto de vista molecular el cromosoma Ph⁺ involucra al proto-oncogen c-ABL que se encuentra en la banda 9q34 y al gen BCR en la banda 22q11 (Heisterkamp *et al.*, 1983; Kurzrock *et al.*, 1988), los cuales dan origen al producto de fusión BCR/ABL que posteriormente se describirá con mayor detalle.

c-ABL

Estructuralmente el c-ABL humano es un gen que presenta secuencias homólogas al oncogen v-*abl* viral (conocido como virus de la leucemia en murinos Abelson) distribuidas de manera discontinua sobre una región de aproximadamente 300 Kb (kilobases) y está constituido por 12 exones y varios intrones (Figura 3) (Abelson y Rabstein, 1970; Heisterkamp *et al.*, 1985; Kurzrock *et al.*, 1988; Pasternak *et al.*, 1998; Deininger *et al.*, 2000).

c-ABL codifica para una proteína con actividad de tirosina-cinasa de 145 KDa (p145^{c-ABL}), con dos isoformas (Ia y Ib) producidas por splicing alternativo (corte de intrones y empalme de exones) del primer exón, es en este sitio donde se lleva a cabo la ruptura y la fusión con BCR (Deininger *et al.*, 2000) (Figura 3).

Figura 3. Estructura de los genes ABL y BCR, sus puntos de ruptura y productos de fusión



Se han atribuido diversas funciones a la proteína Abl normal, entre las que destacan la regulación del ciclo celular (Kipreos y Wang, 1990; Sawyers *et al.*, 1994; Deininger *et al.*, 2000), la respuesta a estrés genotóxico y la transmisión de información a través de la cascada de señalización por integrinas (Yuan *et al.*, 1999). Se ha sugerido que ésta proteína sirve como complejo de modulación de señales intra y extracelulares que inducen a la célula a tomar la decisión de seguir el ciclo celular o sufrir apoptosis (Lewis y Schwartz, 1998).

BCR

El gen *BCR* es relativamente grande ya que consta de alrededor de 130 Kb, está constituido por 25 exones y codifica para una proteína de 160 KDa (p160^{c-BCR}) semejante a la proteína Abl. Este gen presenta tres sitios de ruptura que dan origen a tres proteínas quiméricas de diferente peso molecular (Figura 3). La función de *BCR* en la hematopoyesis aún no está bien establecida (Diekmann *et al.*, 1991; Pasternak *et al.*, 1998; Deininger *et al.*, 2000).

BCR/ABL

Como resultado de ésta translocación el gen *BCR/ABL* es transcrito en proteínas quiméricas de diferente peso molecular (p190^{BCR/ABL}, p210^{BCR/ABL} y p230^{BCR/ABL}) (Figura 3) dependiendo del punto de ruptura involucrado en este proceso (Deininger *et al.*, 2000; Kolomietz *et al.*, 2001; Towatari *et al.*, 2004).

En cuanto a los puntos de ruptura se ha observado que del 50% al 70% de los pacientes con LLA involucran el punto de ruptura menor (m-*bcr*), donde el gen *BCR* se rompe entre el exón 1 y 2 (e1-e2) y el gen *ABL* en el exón 1 y 2 (1a y a2) y se translocan, produciendo un transcrito e1a2, que genera una proteína de 190 KDa llamada p190^{BCR-ABL} (Figura 3) (Secker-Walker y Craig, 1993; Inokuchi *et al.*, 1997; Bose *et al.*, 1998;

Goldman, 1998). En el 99% de los pacientes con LMC se presentan el punto de ruptura mayor (M-*bcr*), el cual se produce por la translocación del exón a2 del gen *ABL* y los exones 13 ó 14 (b2 ó b3) del gen *BCR*, generando un RNAm con unión b2a2 o b3a2 que producirá una proteína de 210 KDa llamada p210^{*BCR-ABL*} (Secker-Walker y Craig, 1993; Faderl *et al.*, 1998) (Figura 3). Finalmente el punto de ruptura μ -*bcr* es raro en la LMC y la LLA, pero se ha asociado a algunos transtornos como la leucemia neutrofílica crónica o la trombocitosis (Pane *et al.*, 1996; Pasternak *et al.*, 1998).

La fusión de los genes *BCR/ABL* ocurre en las células precursoras del sistema hematopoyético pluripotencial. Los factores relacionados con el origen de ésta fusión son desconocidos, se ha propuesto que debe existir inestabilidad cromosómica que condiciona a que ocurra este evento, aunque no existen factores hereditarios conocidos (Pasternak *et al.*, 1998). La proteína quimérica Bcr/Abl confiere a las células portadoras ventajas sobre las células normales hematopoyéticas (Melo, 1996), ya que presenta incremento en la actividad de tirosina-cinasa, comparada con p145^{*c-ABL*} normal, lo que lleva a la célula al descontrol en el ciclo celular (Sawyers *et al.*, 1991; Guo *et al.*, 1994; Pasternak *et al.*, 1998).

METODOS ALTERNATIVOS PARA LA DETECCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

El estudio citogenético en LLA a pesar de ser fundamental en la detección de alteraciones cromosómicas con valor pronóstico, también enfrenta una serie de complicaciones debido a que frecuentemente resulta ser incompleto. Esto se atribuye a que en la mayoría de los casos las muestras de médula ósea tienen un índice mitótico bajo o no

se obtiene el material adecuado para llevar a cabo el análisis (Bloomfield *et al.*, 1989; Secker-Walker, 1990).

Cabe mencionar que los resultados obtenidos por la técnica de bandas G también se ven limitados por el bajo número de células que pueden ser analizadas, debido a la mala calidad de la estructura de los cromosomas, porque en algunos casos solamente se dividen células normales y finalmente por que se trate de alguna translocación críptica que no pueda ser detectada por citogenética convencional como en el caso de la t(12;21); por todo esto en el 15 al 30% de los casos analizados por citogenética convencional no se observan alteraciones cromosómicas (Moorman *et al.*, 1996). El análisis de 20 metafases solamente incluye el 11% de las poblaciones que se encuentran proliferando, lo que hace que el estudio citogenético no siempre sea representativo de las características de las poblaciones celulares leucémicas ya que se excluyen células que se encuentran en interfase que pueden ser portadoras alteraciones cromosómicas (Döhner *et al.*, 1995).

Estas limitaciones han llevado a plantear métodos alternativos para la identificación de estas alteraciones, por ello se han desarrollado técnicas que detectan alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales, como la hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR), la cuantificación del índice de ADN por citometría de flujo y recientemente la aplicación de la hibridación genómica comparativa (CGH). En el presente estudio sólo nos enfocaremos a la FISH como una alternativa para llevar a cabo el estudio de una manera más completa.

HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA

La hibridación *in situ* con sondas (secuencias de ADN complementario) marcadas radioactivamente fue descrita por primera vez por Pardue y Gall en 1969, usando como blanco de hibridación cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila*, posteriormente se utilizaron sondas con marca fluorescente que son de fácil manejo, gran estabilidad, sensibilidad y permiten analizar varias sondas a la vez utilizando fluorocromos con diferente espectro de emisión (Döhner *et al.*, 1995).

La FISH es un método en el cual una sonda no radiactiva marcada con biotina, digoxigenina o directamente con un fluorocromo, se hibrida con un cromosoma completo, o con una región cromosómica como los centrómeros, telómeros o secuencias de genes específicos (Le Beau, 1993; Pinkel, 1993).

Sondas de ADN

Existen sondas de diferentes tipos para llevar a cabo la citogenética molecular:

- Sondas que detectan los centrómeros específicos de cada cromosoma. Gran parte de estas secuencias son ADN satélite III compuestas de monómeros de 5pb.
- Sondas que reconocen un cromosoma completo, las cuales se componen de una mezcla de sondas que reconocen muchos elementos a lo largo de un cromosoma determinado, generalmente se obtienen de bibliotecas genómicas a partir de cromosomas aislados, esto permite la hibridación del cromosoma completo.

- Las sondas de secuencia única o locus específicas, identifican locus determinados que reconocen secuencias entre 15 y 500 Kb por lo que son útiles en la detección de regiones que por citogenética no pueden ser reconocidas (Le Beau, 1993; Pinkel, 1993; Romana *et al.*, 1993; Swiger y Tucker, 1996).

La longitud de la sonda varía entre 250 pb y 1Kb dependiendo de la aplicación, para las sondas de cromosomas completos o "painting", la longitud óptima es de 200 a 800 pb (Brenemam *et al.*, 1994). Cuando una sonda excede de 1Kb resulta en un incremento en la hibridación inespecífica. En contraste, las sondas con menos de 200 pb pueden tener insuficientes enlaces para hibridar con el blanco (Brenemam *et al.*, 1994).

Actualmente las sondas de ADN están marcadas directamente con fluorocromos covalentemente unidos al ADN como la FITC, rodamina y tintes de ciano. La ventaja de estas sondas es que no requieren de avidina o anticuerpos para su detección. Este tipo de marcaje proporciona una alta resolución y aumento de la intensidad de la señal (Döhner *et al.*, 1995; Lempert *et al.*, 1998).

Contratinción y colorantes

En la FISH la identificación de los cromosomas o de la cromatina en general es muy importante, ya que se debe reconocer la metafase o el núcleo sobre el cual hibrida la sonda, esto se consigue usando una contratinción, entre las más usadas se encuentran el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y el yoduro de propidio.

El DAPI se une con gran afinidad al surco menor del ADN, de 3 a 4 pb en secuencias A-T, permitiendo la identificación de cromosomas por bandeo (Pinkel, 1993; Schad y Dewald, 1995; Swiger y Tucker, 1996).

Aplicaciones y ventajas de la FISH

En cuanto a las aplicaciones de FISH en el diagnóstico y seguimiento de pacientes con cáncer, la metodología permite: Identificar marcadores cromosómicos, monitorear el efecto terapéutico (enfermedad mínima residual), detectar recaídas tempranas, identificar el origen de las células de médula ósea después de un trasplante, identificar la estirpe de células neoplásicas por monitoreo de los marcadores identificados inicialmente, detectar genes específicos o ubicarlos en el mapa genético humano, caracterizar células somáticas híbridas y detectar secuencias virales (Poddighe *et al.*, 1991; Heerema *et al.*, 1992; Döhner *et al.*, 1995; Moorman *et al.*, 1996; Lempert *et al.*, 1998; Chinnppan *et al.*, 1998).

Dentro de las ventajas que presenta el método de FISH podemos encontrar las siguientes:

- Identifica alteraciones numéricas y estructurales en muestras con escaso material o de mala calidad, permite analizar células que se encuentran en cualquier fase del ciclo celular.
- Las sondas son específicas y pueden ser identificadas como señales fluorescentes en el núcleo o en la longitud del cromosoma.
- Es un método con alta especificidad y sensibilidad.
- Permite analizar desde cientos a miles de células en muestras que tienen material escaso (Poddighe *et al.*, 1991; Heerema *et al.*, 1992; Döhner *et al.*, 1995; Moorman *et al.*, 1996; Lempert *et al.*, 1998; Chinnppan *et al.*, 1998).

JUSTIFICACIÓN

El análisis de las células leucémicas por medio de citogenética convencional en los pacientes con LLA es muy importante, ya que revelan la presencia de alteraciones cromosómicas que aportan información de gran valor para establecer el diagnóstico preciso y el tratamiento adecuado en éstos pacientes. El estudio citogenético convencional se ha enfrentado a algunas limitaciones para obtener el resultado del cariotipo en las muestras de médula ósea de éstos pacientes, es por ello que se ha empleado como un método alternativo el análisis por medio de citogenética molecular FISH. Este método ha ayudado en gran medida a detectar alteraciones crípticas que no son visualizadas por medio de bandas G, como en el caso de la t(12;21). Por otra parte la FISH también ha permitido realizar el análisis en aquellas muestras que no cuentan con metafases, ya que este método se puede aplicar en células en interfase, haciendo el análisis más fácil, en un menor tiempo y en un mayor número de células.

Para este estudio se han utilizado ambas técnicas; ya que de ésta manera tenemos información más precisa y confiable.

HIPÓTESIS

Debido a que las alteraciones cromosómicas se presentan en más del 70% en células leucémicas de pacientes con LLA, entonces se esperaría observar alteraciones de tipo numérico y/o estructural, en los distintos subtipos de LLA, que son marcadores que se evalúan durante la enfermedad y que confieren valor pronóstico.

Algunas alteraciones no son detectadas por citogenética convencional, por ello aplicando la técnica de FISH se esperaría encontrar la translocación t(9;22) y t(12;21) en pacientes con LLA, ya que estas son las más frecuentes en adultos y niños respectivamente.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar en muestras de médula ósea por medio de citogenética convencional (con bandas G) y FISH las alteraciones cromosómicas con valor pronóstico en pacientes con LLA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reportar las alteraciones cromosómicas de pacientes con LLA identificadas por citogenética convencional, así como su frecuencia.
- Identificar la presencia de la t(9;22) en pacientes adultos (>17 años) por FISH, en donde el cariotipo sea incompleto o normal y en aquellos que presenten ésta alteración por citogenética convencional, para conocer el punto de ruptura.
- Identificar la presencia de la t(12,21) por medio de FISH en pacientes pediátricos (<17 años) con cariotipo incompleto o normal.
- Correlacionar los hallazgos citogenéticos y moleculares con los datos hematológicos.

POBLACIÓN DE ESTUDIO

- 50 pacientes consecutivos con diagnóstico de LLA basado en los criterios propuestos por el grupo FAB de los subtipos L₁, L₂ y L₃, que acudieron durante los años 2002 a 2004 al Servicio de Hematología del Hospital Juárez de México, SSA.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Con edad y sexo indistinto
- Captados al momento del diagnóstico
- Vírgenes de tratamiento

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Pacientes que no cuenten con una buena muestra de médula ósea que sea suficiente para llevar a cabo las metodologías propuestas.
- Pacientes a los que se diagnostique posteriormente una enfermedad distinta a la LLA subtipos L₁, L₂ y L₃.

METODOLOGÍAS

ESTUDIO CITOGENÉTICO

Siembra

En todos los casos se obtuvieron muestras de médula ósea (5ml), las cuales fueron tomadas con una jeringa heparinizada en condiciones de esterilidad.

Para la obtención de cromosomas se realizó el cultivo celular de médula ósea, para ello se agregaron en un tubo estéril 10 ml de medio McCoy (Gibco, invitro gene corporation) suplementado con el 20% de suero fetal de ternera (Sigma Chemical CO., St. Louis) y de 10 a 15 gotas de la muestra de médula ósea y se incubó a 37°C durante 24, 48 y 72 horas sin estimulación. Todas las muestras se procesaron por duplicado.

Cosecha

Pasado el tiempo de incubación a cada tubo se le adicionaron 0.1 ml de colchicina (1µg/10 ml, Sigma Chemical CO., St. Louis) y se incubaron durante 20 minutos, después de este tiempo los tubos se centrifugaron a 1500 RPM durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante, posteriormente se adicionaron 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.075 M; Merck, México) y se incubaron a 37°C durante 15 minutos, se centrifugó nuevamente y se desechó el sobrenadante, las células se fijaron con solución de Carnoy (metanol-ácido acético, 3:1 Merck, México) y se hicieron tres lavados con este fijador, el botón celular final se resuspendió en 1ml de fijador y se goteó la muestra en las laminillas, mismas que se deshidrataron a 60°C, durante 48 horas. El paquete celular restante se almacenó a 2°C para su posterior uso.

Técnica de Bandas G

Las laminillas ya deshidratadas fueron tratadas en una solución de Cloruro de sodio (NaCl) al 9% durante 1 minuto, posteriormente se pasaron a una solución de tripsina (Sigma Chemical CO., St. Louis) al 0.5%, se enjuagaron en agua para detener la actividad enzimática y posteriormente se tiñeron con colorante de Wright y Giemsa (Sigma, México).

Análisis de las laminillas

Se analizaron como mínimo de diez o hasta 30 metafases, según lo permitiera el caso y los cariotipos fueron reportados de acuerdo a los criterios del Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética (ISCN, 1995). Se tomaron microfotografías de las metafases de mejor calidad y se armaron los cariotipos.

A los pacientes con cariotipo incompleto, a los que no contaron con metafases para el análisis y a los que presentaron cariotipo normal (20 metafases analizadas), se les realizó la técnica de FISH con las sondas de secuencia única *BCR/ABL* o *TEL/AML1*, según los criterios de edad para la identificación.

ESTUDIO MOLECULAR

HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA (FISH)

Para la identificación de la t(9;22) se utilizó la sonda de secuencia única de los genes *BCR* y *ABL* con señal extra (Vysis Inc., Downers Grove IL, USA), que identifica ambos puntos de ruptura del gen *BCR* (mayor *M-bcr* y menor *m-bcr*) y se aplicó a todos aquellos pacientes que presentaron la t(9;22) por citogenética convencional con la finalidad de conocer el punto de ruptura al igual que en pacientes adultos (>17 años).

En el caso de la t(12;21)(p13;q22) se utilizó la secuencia única de los genes *TEL* y *AML1* con señal extra (Vysis Inc., Downers Grove IL, USA), en aquellos pacientes pediátricos (<17 años).

PROCEDIMIENTO

Desnaturalización

Se gotearon las preparaciones sobre laminillas y se dejaron secar al aire, se incubaron en una solución de 2XSSC (pH=7) (Merck, México) a 37°C durante 30 minutos, se deshidrataron en una serie de etanol al 70%, 80% y 100% (durante 2 minutos en cada uno) a temperatura ambiente, posteriormente se desnaturalizaron en una solución al 70% de formamida/2XSSC (pH=7) (Merck, México) a 73±1°C durante 2 minutos, se retiraron y se sumergieron inmediatamente en una serie de etanol frío al 70%, 80% y 100% (durante 1 minuto en cada uno).

Hibridación

Se mezcló 1µl de sonda (de secuencia única *BCR/ABL* o *TEL/AML1*), 7µl de buffer de hibridación (Vysis Inc., Downers Grove, IL, USA) y 2µl de agua destilada (para cada determinación); ésta mezcla (sonda ya preparada) se desnaturalizó durante 5 minutos a 73±1°C y se agregó sobre la laminilla en el área seleccionada, se colocó un cubreobjetos y los extremos se sellaron con pegamento IRIS, la laminilla se incubó a 37°C en una cámara húmeda durante toda la noche, protegida de la luz.

Lavados post hibridación

Pasado este tiempo se retiró el cubreobjetos en una solución de lavado (2XSSC/0.1% NP-40), se sacaron y las laminillas se sumergieron nuevamente en una solución de lavado (0.4XSSC/0.3% NP-40) a 73±1°C durante 2 minutos, posteriormente se pasaron a otra solución de lavado (2XSSC/0.1% NP-40) a temperatura ambiente durante 1

minuto y se agitaron por 30 segundos, las laminillas se secaron al aire en oscuridad.

Contratinción

Enseguida se aplicaron 10µl de solución de contratinción DAPI-II (4',6-diamino-2-fenil indol, Vysis Inc., Downers Grove IL, USA), se colocó un cubreobjetos y se selló con pegamento IRIS (en condiciones de oscuridad), las preparaciones ya listas se observaron en un microscopio de Epi-fluorescencia (Olympus BH2) utilizando el filtro de cuatro bandas para los fluorocromos DAPI/orange/green/aqua.

ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA *BCR/ABL*

Descripción de la sonda

La sonda de secuencia única *BCR/ABL* con señal extra a doble color es una mezcla de la sonda *ABL* marcada con espectro rojo y la sonda *BCR* marcada con espectro verde. El tamaño de la sonda *ABL* es aproximadamente de 650 Kb, extendiéndose desde el área centromérica del gen Argininosuccinato sintetasa (*ASS*) al área telomérica del último exón de *ABL*. El espectro verde de la sonda *BCR* es aproximadamente de 300 Kb iniciando entre los exones 13 y 14 (*M-bcr* exones 2 y 3) y extendiéndose más la región de *m-bcr* (Figura 4).

ANÁLISIS DE LA FUSIÓN GÉNICA *TEL/AML1*

Descripción de la sonda

La sonda de secuencia única *TEL/AML1* con señal extra a doble color es una mezcla de la sonda *TEL* marcada con espectro verde y la sonda *AML1* marcada con espectro rojo. La sonda *TEL* marca desde los exones 3 y 5 y se extiende aproximadamente 350 Kb hacia la región del telómero en el cromosoma 12. La sonda *AML1* abarca aproximadamente 500 Kb y se extiende en todo el gen (Figura 5).

Figura 4. Representación esquemática del marcaje de la sonda BCR/ABL

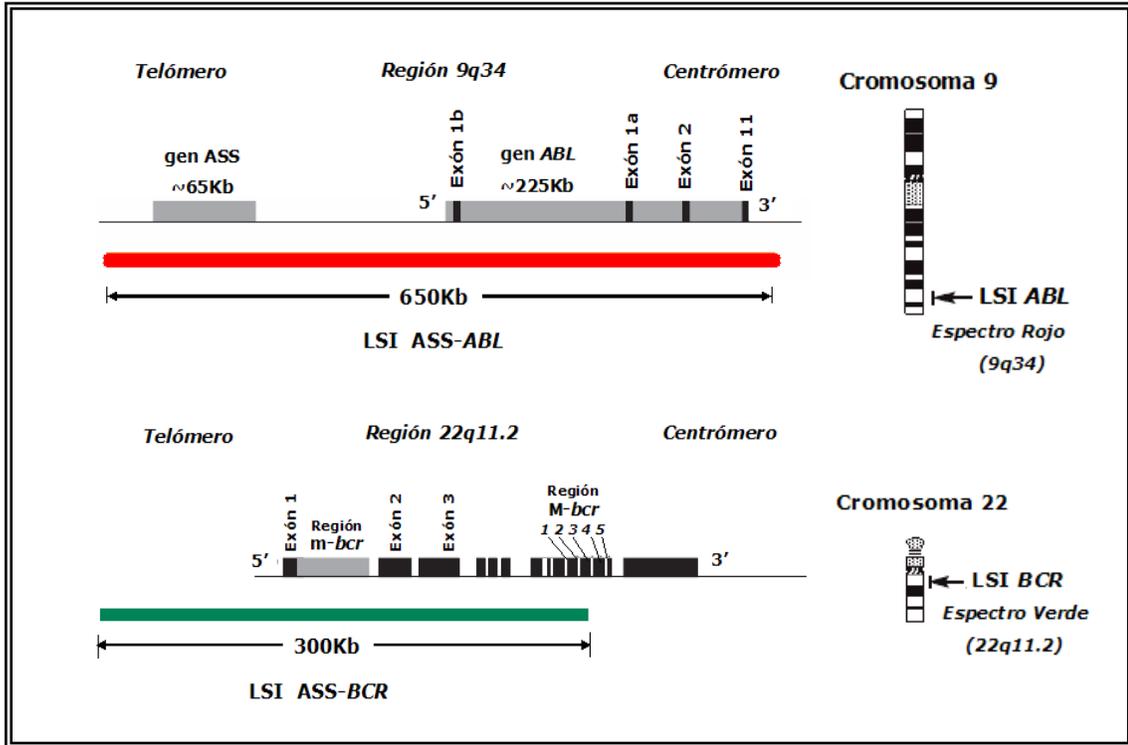
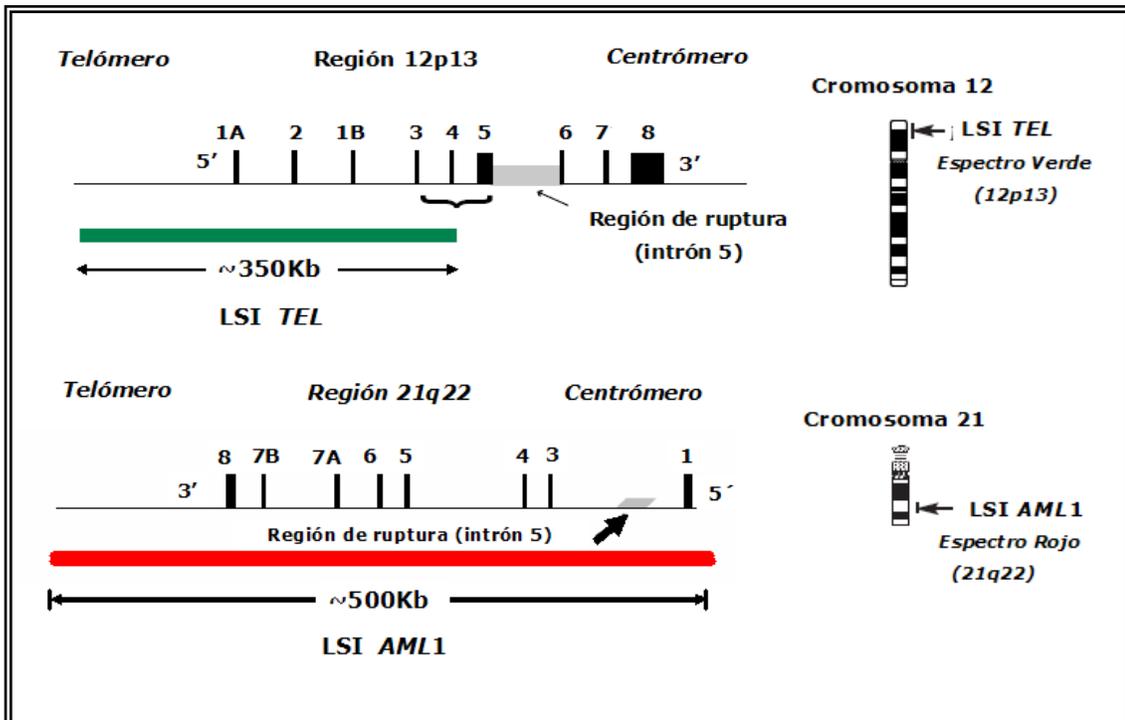


Figura 5. Representación esquemática del marcaje de la sonda TEL/AML1



Criterios de análisis

Se analizaron por lo menos 200 núcleos por paciente, para determinar si las células presentaban la fusión génica *BCR/ABL* y para conocer el punto de ruptura involucrado (*M-bcr* o *m-bcr*), de igual manera se procedió para determinar si las células presentaban la fusión génica *TEL/AML1*.

Para este análisis se aplicaron los siguientes criterios:

- Las células que se analizaron se encontraban bien definidas y con bordes nítidos.
- Las señales estaban dentro de la célula.
- Las señales se encontraron en un área, en donde el 90% de las células presentaron señales de hibridación claras.
- Las señales presentaron la misma intensidad, y se encontraban separadas por un diámetro de una señal y sin hebras.

Fusión génica *BCR/ABL*

- En un núcleo normal que carece de la fusión de los genes *BCR/ABL* se observaron dos señales verdes y dos rojas (2 *BCR* y 2 *ABL*).
- Se consideró una señal positiva con punto de ruptura en *M-bcr* cuando se observó que el núcleo presentaba una señal verde (*BCR*), una roja (*ABL*), una señal amarilla (fusión *BCR/ABL* y una pequeña señal extra (ES) de color rojo.
- En un núcleo con la fusión con punto de ruptura menor *m-bcr*, se observó una señal verde, una roja, y dos señales amarillas (fusionadas).

Fusión génica *TEL/AML1*

- En un núcleo normal que carece de la fusión de los genes *TEL/AML1* se observaron dos señales verdes y dos rojas (2 *TEL* y 2 *AML1*).
- Se consideró una señal positiva con la fusión *TEL/AML1* cuando se observó que el núcleo presentaba una señal verde (*TEL*), una roja (*AML1*), una pequeña señal roja (residual *AML1*) y la fusión de dos señales (verde / roja) en amarillo. La señal verde (*TEL*) puede estar ausente en algunos casos en donde exista delección del alelo *TEL*.

MUESTRAS CONTROL

Se analizaron 10 muestras de sangre periférica de individuos clínicamente sanos, con edades entre 20 y 30 años. Se observaron un total de 1000 núcleos para cada tipo de sonda (*BCR/ABL* y *TEL/AML1*) y se calculó el valor basal (VB= Promedio de células alteradas + 3 SD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

DATOS CLÍNICOS Y DE LABORATORIO AL MOMENTO DEL DIAGNÓSTICO.

Se captaron 50 pacientes, los datos en cuanto a sexo, edad y clasificación citomorfológica de todos los pacientes incluidos en este estudio se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Datos de los pacientes con LLA al inicio del estudio

	No. de Pacientes	(%)
Sexo		
<i>Hombres</i>	27	54
<i>Mujeres</i>	23	46
Edad (Años)		
<i>Niños ≤ 17</i>	21	44
0-2	1/21	4.7
3-10	13/21	62
11-17	7/21	33.3
<i>Adultos > 17</i>	29	56
18-25	10/29	34.5
26-33	5/29	17.2
34-41	6/29	20.7
42-49	4/29	13.8
>50	4/29	13.8
Citomorfolología		
L ₁	4	8
L ₂	46	92
L ₃	0	0

La proporción de sexos mostró que el 54% de éstos pacientes correspondieron al sexo masculino y el 46% al sexo femenino, para este estudio los pacientes fueron divididos en dos grupos de edad: niños o pacientes pediátricos (≤ 17 años) y adultos (> 17 años).

Se captaron 21 pacientes pediátricos, el rango de edad fue de 2-17 años con una media de 9.23 años, la edad más frecuente osciló en el rango de 3-10 años observándose en 13/21 (62%) de los casos. Con respecto al grupo de los adultos se captaron 29 pacientes, el rango de edad fue de 18-66 años, con una media de 33.72 años, la edad más frecuente fue entre 18-25 años presentándose en 10/29 (34.5%) de los casos.

La edad es un factor muy importante que confiere valor pronóstico en los pacientes con LLA, ya que según Cortes y Kantarjian (1995) los niños menores de 1 año de edad y mayores de 10 años se asocian a un pronóstico adverso, mientras que los de 1 a 9 años se asocian con un pronóstico favorable. En otros estudios se ha reportado que los adultos con LLA, sobre todo en los pacientes de más de 60 años tienen un pronóstico desfavorable (Ruiz-Argüelles, 1994).

El subtipo citomorfológico en las LLA también es un factor pronóstico, se observó que en ambos grupos de edad el subtipo L₂ fue el más predominante (92%); el subtipo L₂ se asocia con un pronóstico desfavorable y es más frecuente en adultos; el subtipo L₁ es más común en la población pediátrica y confiere un buen pronóstico, buena respuesta al tratamiento y la tasa de curación más alta (Heim y Mitelman, 1995).

Al momento del diagnóstico los datos hematológicos de éstos pacientes mostraron que el intervalo en la cuenta de leucocitos (CL) fue de 0.7 a 259.93 X10⁹/L con una media de 39.37, misma que indica que la mayoría de éstos pacientes tienen una CL por arriba de los valores normales (Cuadro 4). Morrison (1998), establece que en adultos los valores normales de leucocitos van de 4 a 10 X10⁹/L, mientras que en niños de 2 a 5 años la cuenta normal de leucocitos es de 5 a 10 X10⁹/L.

Al aumento en la CL por arriba de los valores normales (de 4 a 10 $\times 10^9/L$) se le denomina leucocitosis, en tanto que a la disminución en el número total de leucocitos por debajo de los valores normales ($< 4 \times 10^9/L$) se le denomina leucopenia (Morrison, 1998).

Por tanto se observó que el 24% de los pacientes presentaron leucopenia ($<4 \times 10^9/L$), mientras que un porcentaje similar (24%) de los pacientes presentó leucocitosis ($>51 \times 10^9/L$), sólo el 14% de los casos presentó una CL normal (Cuadro 4), tanto la leucocitosis como la leucopenia confieren a los pacientes con LLA un curso desfavorable (Chessells, 1982).

En cuanto a la hemoglobina, el intervalo al momento del diagnóstico fue de 2.2 a 13.3 g/dL con una media de 7.50 g/dL, lo cual indica que la mayoría de los pacientes (96%) presentaron datos que se encuentran por debajo de los valores normales, siendo ésta una de las características clínicas de la LLA, según Morrison (1998) los valores normales de hemoglobina van de 12-16 g/dL, por tanto es importante mencionar que sólo el 4% de los pacientes se encuentran dentro de los valores de hemoglobina normales.

En las plaquetas el intervalo fue de 1.7 a 279 $\times 10^9/L$ con una media de 54.20 $\times 10^9/L$, se ha reportado que el valor normal de plaquetas en adultos va de 250 a 500 $\times 10^9/L$ mientras que el valor normal para los niños es de 150 a 450 $\times 10^9/L$ (Morrison, 1998), éstos datos indican que la cuenta plaquetaria en éstos pacientes se encuentra por debajo de los valores normales, por lo que tienen predisposición a sangrados, siendo ésta una característica clínica de los pacientes con LLA.

Cuadro 4. Datos de laboratorio de los pacientes con LLA al momento del diagnóstico

Cuenta de leucocitos (X10⁹/L)		
Intervalo		0.7-259.93 X10 ⁹ /L
Media		39.37 X10 ⁹ /L
Valores Normales		5-10 X10 ⁹ /L (Niños) ^Δ 4-10 X10 ⁹ /L (Adultos) ^Δ
Rango		No. de pacientes (%)
	<4	12(24%)
	4-10	7(14%)
	11-25	7(14%)
	26-50	12(24%)
	>51	12(24%)
Hemoglobina (g/dL)		
Intervalo		2.2-13.3 g/dL
Media		7.50 g/dL
Valores Normales		12-16g/dL (Niños y Adultos) ^Δ
Plaquetas (X10⁹/L)		
Intervalo		1.7-279 X10 ⁹ /L
Media		54.20 X10 ⁹ /L
Valores Normales		150-450 X10 ⁹ /L (Niños) ^Δ 250-500 X10 ⁹ /L (Adultos) ^Δ
% de Blastos en Sangre Periférica		
Intervalo		0-99 % *
Media		56.2 %
Valores Normales		0% (Niños y Adultos) ^Δ
% de Blastos en Médula Ósea		
Intervalo		30-100 % **
Media		89.04 %
Valores Normales		0% (Niños y Adultos) ^Δ

* Sólo se obtuvo el dato de 40 pacientes. ** Sólo se obtuvo el dato de 42 pacientes.

^ΔValores Normales de referencia, tomados de Morrison, 1998.

Otro dato importante al momento del diagnóstico es el porcentaje de blastos en médula ósea (MO) y en sangre periférica (SP), ya que un porcentaje de blastos en MO mayor del 30% confirma un diagnóstico de leucemia aguda (McKenzie, 2000).

En éstos pacientes el rango de blastos en MO fue del 30 al 100% con una media del 84.8% y en SP el intervalo fue de 0 al 99% con una media del 56.2%. Un porcentaje de blastos en MO elevado, se asocia a infiltración de estas células en torrente sanguíneo afectando órganos como son hígado, bazo y ganglios linfáticos (Bleyer, 1988; Cortes y Kantarjian, 1995).

ANÁLISIS CITOGENÉTICO

Se realizó el estudio citogenético (EC) en muestras de médula ósea analizadas por la técnica de bandas G en todos los pacientes, obteniéndose resultados en el 74% de los casos (37/50 pacientes), el 26% restante (13/50 pacientes) presentaron hipocelularidad o bajo índice mitótico.

Los resultados del análisis citogenético revelaron que 54% (20/37) de los pacientes presentaron cariotipo normal y 46% (17/37) cariotipo alterado.

De los cariotipos alterados 7 casos presentaron alteraciones cromosómicas de tipo numérico y 10 casos presentaron alteraciones de tipo estructural.

Alteraciones numéricas

En el cuadro 5, se muestran los resultados de los cariotipos que presentaron alteraciones de tipo numérico, donde se observó que un paciente (caso 14) presentó un cariotipo con una clona hipodiploide

(~38 cromosomas) (Figura 4b), asociado a una subclona triploide (~69 cromosomas) (Figura 4c).

Cuadro 5. Alteraciones cromosómicas de tipo numérico

No. de caso	Edad/ Sexo	Cariotipo	No. de metafases analizadas
5	25/M	92,XY[8]/46,XY[13]	21
7	15/M	52-53,XY,inc [5]/46,XY[5]	10
12	7/M	~86,XY[7]/46,XY [10]	17
13	16/F	92,XX [5]/46,XX[7]	12
14	20/F	~38,XX[11]/~69,XX [4]/ 46,XX[5]	20
24	46/F	47,XX+18/[6] 46,XX[15]	21
44	3/F	~66,XX,-2,-10,-20[3]/46,XX,3dmin[3]/46,XX[23]	29

Se ha reportado que la hipodiploidía de 30-39 cromosomas se presenta con mayor frecuencia en adultos, sobre todo en edades superiores a los 40 años (su frecuencia en niños es menor al 6%) y puede estar asociada a la presencia de una segunda clona de línea celular hiperdiploide producto de una endoduplicación de la línea hipodiploide (Callen *et al.*, 1989 y Charrin *et al.*, 1996). En todos los pacientes la hipodiploidía (30-39 cromosomas) se ha asociado fuertemente con una baja cuenta de leucocitos (8×10^9 /L), a una morfología L₂ y a un inmunofenotipo de línea B (Secker-Walker, 1997; Charrin *et al.*, 2004).

Otro de los pacientes (caso 24), presentó una hiperdiploidía baja (47 cromosomas) con la ganancia del cromosoma 18, está reportado que las

clonas hiperdiploides con 47 cromosomas son las más frecuentes, ya que Raimondi *et al.* (1992), en un estudio realizado a 86 pacientes encontraron que muchos de los casos tenían clonas con 47 cromosomas (72%) seguidas por clonas con 48 cromosomas (28%), 49 cromosomas (5%) y 50 cromosomas (3%) donde observaron que los cromosomas que se ganaban con mayor frecuencia eran; el 21, X, 8 y 10. Moorman *et al.* (1996), reportaron además de los cromosomas ya mencionados la ganancia de los cromosoma 6 y 16.

No obstante cabe mencionar que en los cariotipos con 47 cromosomas la ganancia del cromosoma 18 no está reportada y por tanto no se sabe si confiere valor pronóstico en quienes la presentan, quizás por que se trata de una alteración secundaria que ocurre de manera poco frecuente.

Por otra parte en el cuadro 5 también se pudo observar un paciente (caso 7) que cursó con un cariotipo con hiperdiploidía alta (52-53 cromosomas), en este tipo de hiperdiploidías la ganancia cromosómica parece estar restringida a ciertos cromosomas, los que se han reportado con mayor frecuencia son; el X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 y 21 (Onodera *et al.*, 1992; Moorman *et al.*, 1996 y Paulsson *et al.*, 2003). Desafortunadamente en este caso no se pudo determinar que cromosomas se ganaron, ya que las metafases analizadas fueron de mala calidad.

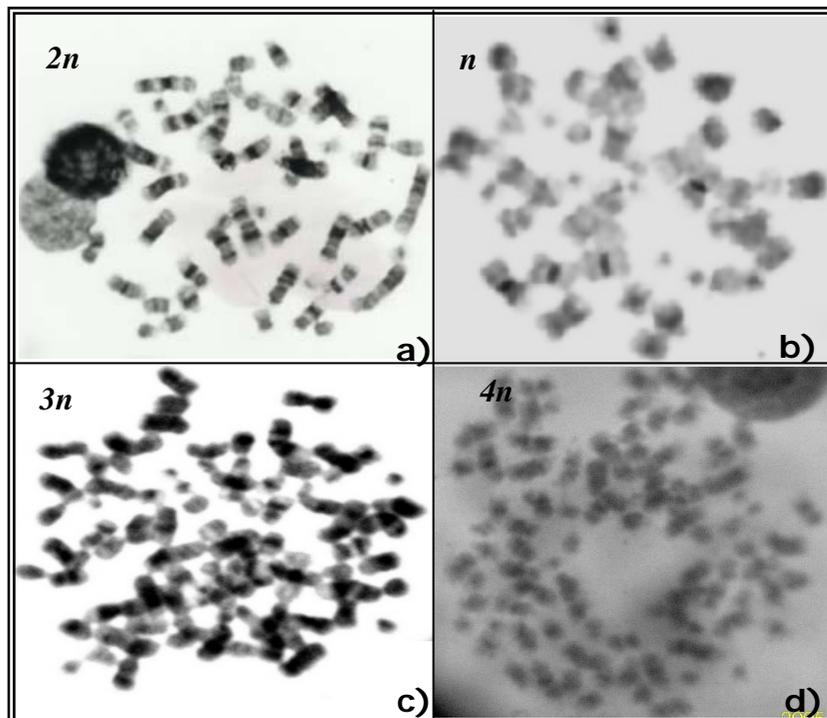
La presencia de hiperdiploidía >50 cromosomas se relaciona fuertemente con un pronóstico favorable, incluyendo la edad entre 3 y 7 años (Williams *et al.*, 1986), cuenta de leucocitos menores a $10 \times 10^9/L$, subtipo L₁ y línea celular pre-B temprana; éstos pacientes tienen un periodo de supervivencia mayor que cualquier otro grupo de ploidía (Onodera *et al.*, 1992).

En cuanto a otros grupos de ploidía, se pudo observar un paciente (caso 44) que mostró un cariotipo con una clona cercana a la triploidía (~66 cromosomas) (Figura 4c), en este caso los cromosomas que están ausentes son el 2, 10 y 20.

Secker-Walker (1997), ha reportado que los cariotipos cercanos a la triploidía (66-73 cromosomas) son raros en niños, pero no así en adultos ya que se ha encontrado hasta en el 2%.

Finalmente se observaron tres pacientes con cariotipo tetraploide (casos 5, 12 y 13) (Figura 4d), ésta alteración es poco frecuente ya que en la población adulta puede verse hasta en el 2% y en niños alrededor del 1% y se encuentra asociada con inmunofenotipo de células de línea T (Pui *et al.*, 1990).

Figura 4. Grupos de ploidía con diferente número modal cromosómico en pacientes con LLA



Células en metafase con número modal cromosómico: a) diploide, b) haploide, c) triploide y d) tetraploide

En el caso de triploidía y tetraploidía anteriormente se había establecido que estaban asociadas a un pronóstico adverso, pero recientemente se reportó que la tetraploidía específicamente en pacientes adultos se asocia con un pronóstico excelente (Mrózek *et al.*, 2004).

Alteraciones estructurales

La fórmula cromosómica de los pacientes que presentaron cariotipo con alteraciones de tipo estructural se muestra en el cuadro 6, en donde la t(9;22) (Figura 5) fue la alteración más frecuente, observándose ésta en 4/10 pacientes (casos 18, 22, 36 y 49); la frecuencia de observar la t(9;22) en los pacientes con LLA, aumenta conforme avanza la edad, asociándose a cuentas elevadas de leucocitos y al subtipo citomorfológico L₂ (Crist *et al.*, 1990a; Preti *et al.*, 1994; Cortes y Kantarjian, 1995). Se ha reportado que el cromosoma Ph⁺ confiere un muy mal pronóstico en los pacientes con LLA, ya que se ha asociado a tasas bajas de remisión con corta duración y supervivencia menor a 15 meses (Cortes y Kantarjian, 1995; Guizar, 2001).

Dentro de este tipo de alteraciones, también se observaron translocaciones que involucran al cromosoma 1, como la t(1,19) y la t(1;12) (caso 1 y 48 respectivamente) así como translocaciones que involucran al cromosoma 11, tal es el caso de la t(4;11) y la t(9;11) (caso 9 y 50 respectivamente) (Figura 5).

Se ha reportado que la t(1,19) se presenta con una frecuencia muy baja tanto en niños como en adultos (cerca del 5%) y se ha asociado a inmunofenotipo pre-B (Crist *et al.*, 1990b) con cuentas elevadas de leucocitos, lo que confiere un pronóstico adverso a los pacientes que la presentan (Raimondi *et al.*, 1990; Slavutsky, 1999; Van der Burg *et al.*, 2004). En el caso de la t(1;12) se tienen pocos datos, ya que ésta alteración está reportada en la leucemia mieloide aguda de tipo M₄ (Van

der Burg *et al.*, 2004). Los rearrreglos de 12p ocurren del 4 al 6% en adultos con LLA, frecuentemente como parte de un cariotipo complejo (Mrózek *et al.*, 2004).

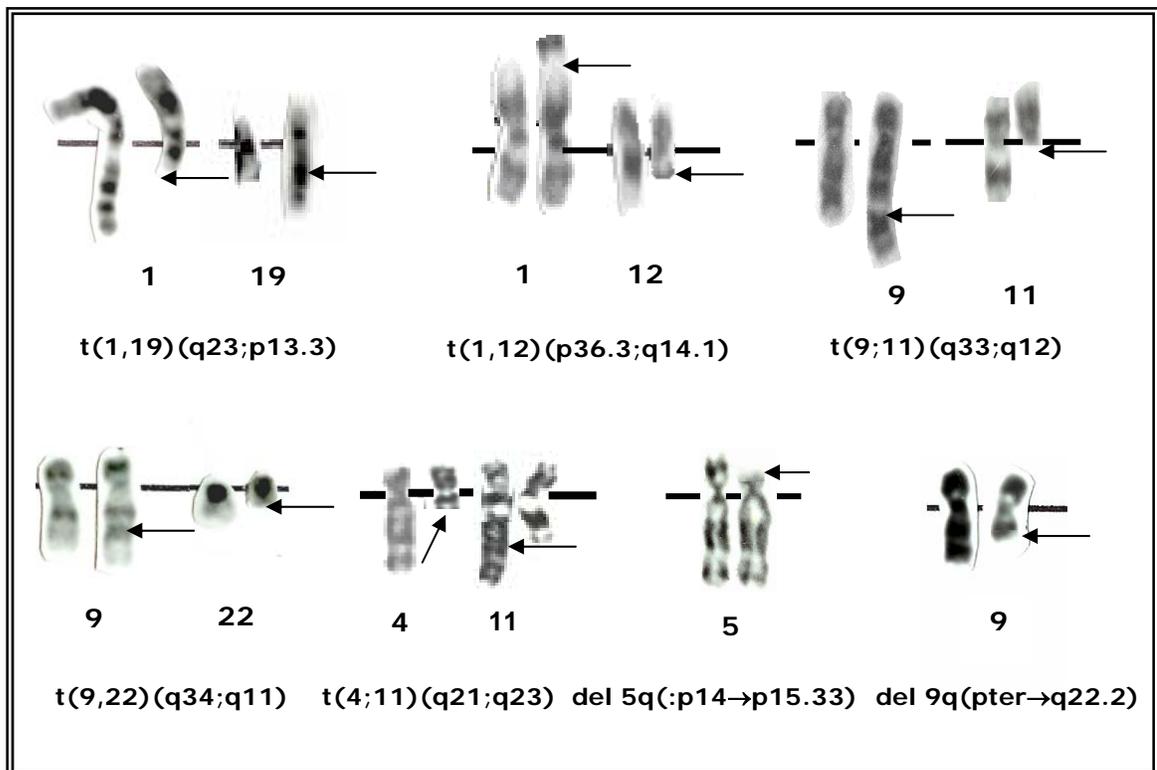
Cuadro 6. Alteraciones cromosómicas de tipo estructural

No. de caso	Edad/ sexo	Cariotipo	No. de metafases analizadas
1	5/M	46,XY, t(1;19)(q23;p13.3)[3]/46,XY [3]	6
4	21/M	46,XY, del 9q22.2[3]/60,XY[3]/46,XY[4]	10
9	66/F	46,XY, t(9;11)(q33;q12)[11]	11
18	45/M	46,XY, t(9;22)(q34;q11)[13]/46,XY[3]	16
22	7/F	46,XX, t(9;22)(q34;q11)[20]	20
34	34/F	46,XX, del 5(:p14q35.2)[3]/46,XX[13]	16
36	4/M	46,XY, t(9;22)(q34;q11)[9]	9
48	34/F	47,XX, t(1;12)(p36.3;q14.1), +3[8]/46,XX[12]	20
49	41/M	46,XY, t(9;22)(q34;q11)[2]/69,XY[3]/46,XY[19]	24
50	41/F	46,XX,t(4;11)(q21;q23)[5]/ 46,XX[14]	19

En cuanto a las alteraciones que involucran al cromosoma 11, Mrózek *et al.*, (2004) han reportado que la t(4;11) es una alteración recurrente en la LLA y se observa en el 2% de los pacientes pediátricos y del 3 al 7% en los adultos, está asociada a un inmunofenotipo de línea T y a una cuenta de leucocitos elevada (Wetzler *et al.*, 1999). En el caso de la t(9;11) se ha reportado que se encuentra hasta en el 5% de los pacientes pediátricos con LLA menores de 6 meses de edad (Secker-Walker, 1993). Las translocaciones en el cromosoma 11 que involucran el gen *MLL* (11q23) en la LLA, son asociadas con un mal pronóstico particularmente en niños (Pui *et al.*, 2003).

Finalmente se observaron deleciones de los cromosomas 9 y 5 (No. de caso 4 y 34 respectivamente) (Figura 5). En la LLA no se tienen reportes de deleciones en el cromosoma 9q (brazo largo), sólo están reportadas alteraciones del cromosoma 9p (brazo corto), dentro de las que se incluyen deleciones, translocaciones no balanceadas y pérdidas cromosómicas (Mrózek *et al.*, 2004), por tanto la del 9q no es una alteración que confiera pronóstico. Las deleciones del cromosoma 5q están reportadas con una frecuencia del 6 al 11% en adultos con LLA y no se tiene un valor pronóstico establecido para este caso (Dabaja *et al.*, 1999), en cambio en niños la frecuencia de ésta alteración es del 4% y confiere a éstos pacientes un pronóstico adverso (Rao *et al.*, 2000).

Figura 5. Alteraciones estructurales que se observaron en los pacientes con LLA



ANÁLISIS DE LA FISH

Fusión génica *BCR/ABL*

Se realizó la técnica de FISH utilizando la sonda de secuencia única de los genes *BCR/ABL* en pacientes que por citogenética convencional presentaron la t(9;22) para conocer el punto de ruptura implicado y corroborar el diagnóstico; de igual manera se procedió en aquellos casos en donde el cariotipo fue incompleto o normal en pacientes con edad > 17 años.

Se estudiaron 23 pacientes, de los cuales 7/23 se incluyeron por no contar con el resultado del estudio citogenético (sin cariotipo), 12/23 por presentar cariotipo normal y 4/23 por ser portadores de la t(9;22) por citogenética convencional (Cuadro 7).

Cuadro 7. Pacientes estudiados por FISH con sonda *BCR/ABL*

	No. de pacientes estudiados	No. de pacientes con fusión <i>BCR/ABL</i>	No. de pacientes con ganancia de los loci <i>BCR/ABL</i>
Sin Cariotipo	7	2	1
Cariotipo Normal	12	1	-
t(9;22)	4*	4*	-
Total	23	7/23	1/23

*Número de pacientes con t(9;22) detectada por citogenética convencional

El valor basal (VB) calculado para la fusión génica *BCR/ABL* en las muestras control fue del 0% y para ganancias o pérdidas de los loci tanto de *ABL* como de *BCR* también fue del 0%. Por lo tanto los porcentajes superiores al VB calculado son significativos.

En el análisis de éstos pacientes se observó que 8/23 (34.7%) resultaron portadores de alteraciones en los genes *BCR/ABL*, de los

cuales 7/23 (30.4%) presentaron la fusión *BCR/ABL* o cromosoma Ph⁺ y sólo un paciente presentó la ganancia de ambos loci *BCR* y *ABL*, pero sin la fusión, el resto de los pacientes (15/23) resultaron negativos a la translocación, presentando solamente núcleos con señales normales.

En el cuadro 8 se presentan los resultados del análisis de la sonda de secuencia única *BCR/ABL* en los pacientes con LLA que presentaron alteraciones en éstos genes donde se observa; el número de caso, el modelo de señales, su localización, la interpretación para cada modelo, el punto de ruptura involucrado y el porcentaje de fusión.

Cabe mencionar que ésta sonda exhibe un patrón de señales típico ya que en un núcleo que no presenta la fusión se observan 2 señales rojas y dos señales verdes (Figura 6a), para un núcleo que presenta la fusión en el punto de ruptura menor (*m-bcr*) se observan 2 señales amarillas (fusionadas), una señal roja y una verde (Figura 6b) y para un núcleo que presenta la fusión en punto de ruptura mayor (*M-bcr*) se observa una señal amarilla (fusionada), una señal roja, una pequeña roja (residual) y una verde (Figura 6c).

Al análisis de la FISH en éstos pacientes se observó que el caso 22 fue el único que mostró solamente el punto de ruptura *m-bcr* (Figura 6b), siendo el porcentaje de fusión para este caso del 52.5%, mientras que el porcentaje restante correspondió a núcleos interfásicos normales (Cuadro 8). Para Reid *et al.*, (2002) el punto de ruptura *m-bcr* se observa con mayor frecuencia en los pacientes con LLA positivos a la fusión génica *BCR/ABL*, sobre todo en niños en donde llega a estar presente hasta en el 72% de los casos, este punto de ruptura también puede encontrarse en los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en una proporción baja (Berger *et al.*, 1990; Secker-Walker *et al.*, 1993).

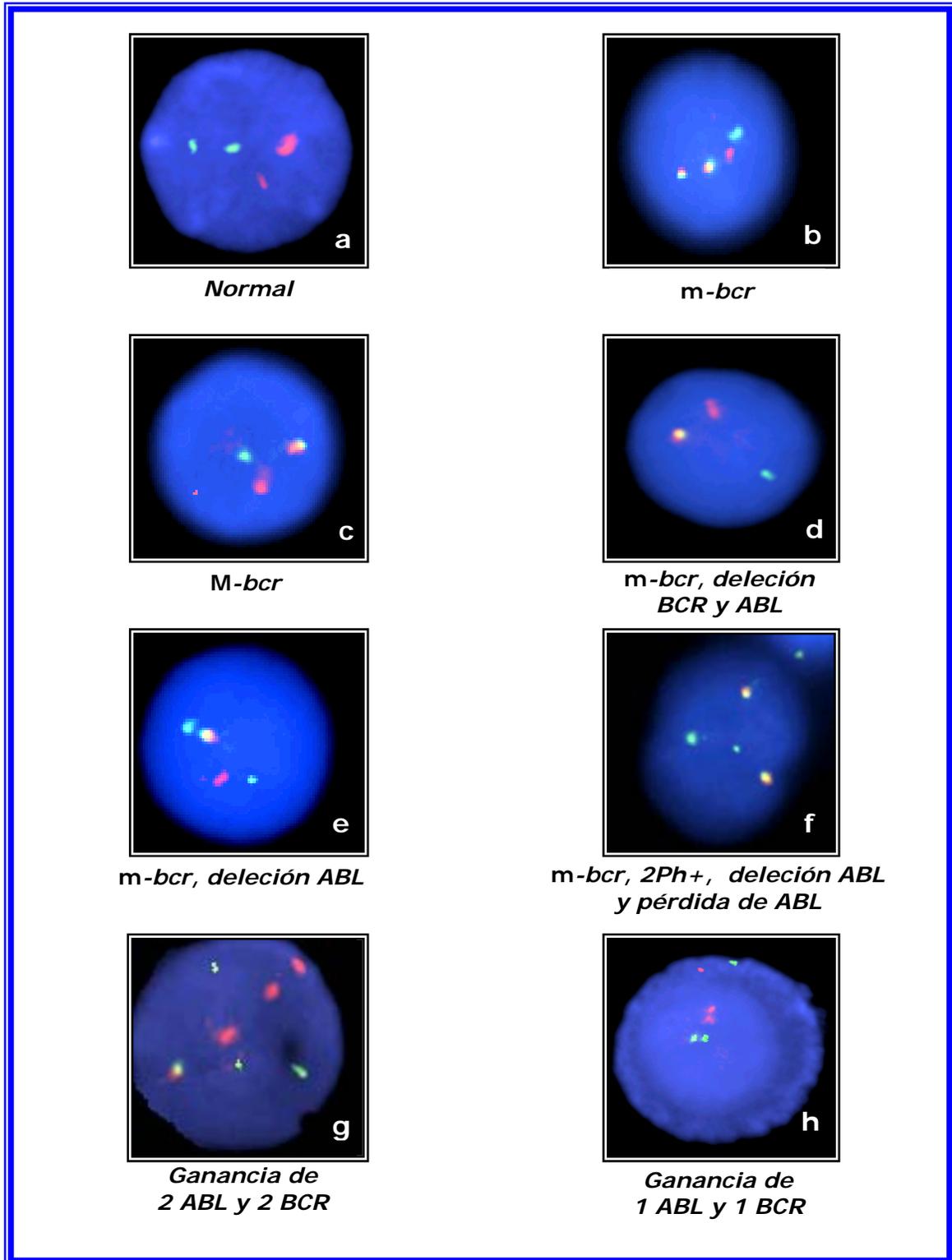
Cuadro 8. Análisis e interpretación de la secuencia única BCR/ABL en pacientes con LLA

No. de caso	Modelo de señales FISH	Localización de señales cromosómicas			Interpretación	Punto de Ruptura	% de fusión
		F	R	V			
3	1F 1R 1r 1V	1F (Ph)	1R(9) 1r(9q+)	1V(22)	t(9;22)	M-bcr	15.2
	2F 1R 1V	1F (Ph):1F(der9q+)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr	3.2
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	81.6
18	2F 1R 1V	1F (Ph):1F(der9q+)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr	56.3
	1F 1R 1V	1F (Ph)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr, del BCR y ABL	13.6
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	30.1
19	4R 4V	-	4R(9)	4V(22)	FISH(-)	-	6
	3R 3V	-	3R(9)	3V(22)	FISH(-)	-	3
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	91
22	2F 1R 1V	1F (Ph):1F(der9q+)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr	52.5
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	47.5
36	2F 1R 1V	1F (Ph):1F(der9q+)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr	53.6
	1F 1R 1V	1F (Ph)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr, del BCR y ABL	3.8
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	42.6
37	1F 1R 1r 1V	1F (Ph)	1R(9) 1r(9q+)	1V(22)	t(9;22)	M-bcr	23.6
	1F 1R 1V 1v	1F (Ph)	1R(9)	1V(22) 1v(22q+)	t(9;22)	m-bcr, del ABL	48.3
	1F 1R 1V	1F (Ph)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr, del BCR y ABL	11.8
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	16.3
46	1F 1R 1V 1v	1F (Ph)	1R(9)	1V(22)1v(22q+)	t(9;22)	m-bcr, del ABL	77.3
	2F 1R 1V	1F (Ph):1F(der9q+)	1R(9)	1V(22)		m-bcr	5.5
	1F 1R 1V	1F (Ph)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr, del BCR y ABL	2.7
	2F 1V 1v	1F (Ph),+ 1(Ph)	-	1V(22)v(22q+)	t(9;22)	m-bcr, 2Ph+, del ABL, pérdida de ABL	4.6
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	9.9
49	1F 1R 1r 1V	1F (Ph)	1R(9) 1r(9q+)	1V(22)	t(9;22)	M-bcr	12
	2F 1R 1V	1F (Ph):1F(der9q+)	1R(9)	1V(22)	t(9;22)	m-bcr	49.5
	2R 2V	-	2R(9)	2V(22)	FISH(-)	-	38.5

F= fusionada (amarilla), R= roja normal, r= roja residual, V= verde normal, v= verde residual, del= deleción, der= derivativo, M-bcr= punto de ruptura mayor, m-bcr= punto de ruptura menor, Ph= Cromosoma Filadelfia.

*** Al análisis de la sonda VB=O para la fusión génica BCR/ABL y VB=O para ganancias de los loci BCR y ABL***

Figura 6. Modelo de señales de la fusión *BCR/ABL*



m-bcr = punto de ruptura menor, *M-bcr* = punto de ruptura mayor

Los casos 3 y 49 presentaron ambos puntos de ruptura (*m-bcr* y *M-bcr*) (Figura 6b y 6c), en el caso 3 el punto de ruptura *M-bcr* se observó en el 15.2%, mientras que el punto de ruptura *m-bcr* sólo en el 3.2%. El 81.6% correspondió a núcleos normales.

Para el caso 49 el punto de ruptura *m-bcr* se observó en el 49.5% de los núcleos analizados, en tanto que el *M-bcr* se detectó en el 12%. El 38.5% restante no presentó ninguna alteración (Cuadro 8).

Está reportado que la frecuencia de encontrar ambos puntos de ruptura en un mismo paciente es baja; Secker-Walker (1997) al realizar un estudio en 93 pacientes con cromosoma Ph^+ , encontró que el 55% de los casos presentaron punto de ruptura *m-bcr*, el 45% presentaron el punto de ruptura *M-bcr* y sólo el 4% de los casos presentaron ambos puntos de ruptura, lo que confirma la presencia de ambos puntos de ruptura como ocurre en nuestros pacientes analizados.

Por otra parte, Rieder *et al.*, (1998) corroboran la baja frecuencia de encontrar ambos puntos de ruptura ya que el 65% de los casos que ellos analizaron presentaron el punto de ruptura *m-bcr*, el 30% el punto de ruptura *M-bcr* y el 5% ambos puntos.

En el presente estudio esto no se cumple, ya que para nosotros la frecuencia de encontrar ambos puntos de ruptura en los pacientes con Ph^+ fue del 28%, siendo superior a lo reportado por estos autores.

Los casos 18 y 36 presentaron entre ellos un comportamiento muy similar ya que ambos revelaron dos clonas alteradas, ambas con punto de ruptura *m-bcr*, donde una de éstas presentó la delección de ambos loci *BCR* y *ABL* (*m-bcr*, del *BCR/ABL*); el porcentaje de fusión para el punto de ruptura *m-bcr* fue del 56.3% en el caso 18 y para el caso 36 del 53.6%. En aquellas clonas que presentaron el punto de ruptura *m-bcr* con delección de *BCR/ABL*, el porcentaje fue del 13.6% para el caso

18 mientras que para el caso 36 fue del 3.8%, el resto de los núcleos fueron normales (Cuadro 8).

El patrón de señales que exhibe el punto de ruptura *m-bcr*, del *BCR/ABL* es atípico para este tipo de sonda, ya que puede verse sólo una señal fusionada (amarilla), una roja y una verde (Figura 6d), la señal fusionada se origina tanto en el derivativo 22 como en el derivativo 9 (Lawce *et al.*, 2002), siendo el transcrito del derivativo 22 el que causa el fenotipo de la clona maligna en los pacientes con LLA (Melo *et al.*, 1993), por lo tanto el derivativo perdido en este caso es el 9.

Lawce *et al.* (2002) han reportado que la delección de *BCR/ABL* también puede observarse en los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) hasta en el 12.5% de los casos, mientras que en los pacientes con LLA sólo se observa en el 1.5% (Reid *et al.*, 2002).

En el presente estudio la delección de *BCR/ABL* se observó en un porcentaje superior a lo reportado, ya que nosotros la observamos en 4/7 (57%) de los pacientes con cromosoma Ph⁺.

En el caso 37 se observaron 3 clonas alteradas; en donde la clona principal correspondiente al punto de ruptura *m-bcr* con delección del loci *ABL*, se presentó en el 48.3% de los núcleos analizados; ésta clona muestra un modelo de señales atípico, con una señal amarilla (fusionada), una roja, una verde y una pequeña verde (residual) (Figura 6e), la clona subsecuente correspondió al punto de ruptura *M-bcr* observándose en el 23% de los casos, seguida por una clona correspondiente al punto de ruptura *m-bcr* con delección de los loci *BCR* y *ABL* en el 11.8%, el 16% restante fueron núcleos normales o sin la fusión (Cuadro 8).

En éste caso ocurre algo muy interesante, aparentemente se encuentran involucrados ambos puntos de ruptura, ya que se observó una clona con punto de ruptura *M-bcr* y las otras dos aun que con deleciones de diferentes loci correspondieron al punto de ruptura *m-bcr*. Sería lógico pensar que si la sonda empleada no detectara ambos puntos de ruptura simultáneamente lo que estaría sucediendo en este caso es que a partir de un punto de ruptura en *m-bcr*, se pudiera estar dando origen a una clona con deleción del loci *ABL*, seguida por una clona con deleción ahora del loci *BCR* (Patrón de señales para *M-bcr*) y una clona que finalmente tuviera deletados ambos loci (del, *BCR* y *ABL*). Esta hipótesis sólo podría confirmarse empleando otro tipo de sonda donde esté marcada la región de manera más amplia (Q-BIOgene, Cambridge, MA. USA) o con cuatro fluorocromos (Sonda F-FISH PerkinElmer Life Science, Boston, MA) para conocer que derivativo pierde.

Efectivamente la deleción del loci *BCR* se encuentra reportada en pacientes con LLA en el 2.9% de los casos y se debe a la pérdida del derivativo 22q por deleción. También la deleción del loci *ABL* se presenta con una frecuencia muy baja, puede presentarse hasta en el 2.6% de los casos (Lawce *et al.*, 2002).

Para el caso 46 se observaron 4 clonas alteradas, una en punto de ruptura *m-bcr* con la deleción del loci *ABL* en el 77.3% de los núcleos analizados, otra clona con el punto de ruptura *m-bcr* en el 5.5%, otra clona con *m-bcr* con la deleción del loci *BCR* y *ABL* en el 2.7% y una clona con punto de ruptura *m-bcr* con doble cromosoma Ph^+ en el 4.6% de los núcleos analizados, el porcentaje restante correspondió a núcleos normales (Cuadro 8). Es importante mencionar que el modelo de señales para *m-bcr* con doble cromosoma Ph^+ también es atípico para este tipo de sonda ya que se observan dos señales fusionadas (amarillas), una señal verde y una verde pequeña (residual) (Figura 6f).

En este caso se pensaría que las clonas con deleciones se originaron a partir de una clona principal en punto de ruptura *m-bcr*, y que ésta a su vez estaría originando una clona con deleción de *ABL*, posteriormente una clona con la deleción de *BCR/ABL* y finalmente la clona con doble cromosoma Ph⁺, lo que nos indica probablemente la evolución de la enfermedad.

Finalmente el caso 19 (Cuadro 8) aunque no presentó la fusión génica *BCR/ABL*, mostró dos clonas alteradas una con la ganancia de 2 loci *BCR* y 2 *ABL*, exhibiendo un modelo de señales de 4 rojas (cromosoma 9) y 4 verdes (cromosoma 22) (Figura 6g), en el 6% de los núcleos analizados y otra clona con la ganancia de un loci *BCR* y un *ABL* con un modelo de señales de 3 rojas (cromosoma 9) y 3 verdes (cromosoma 22) (Figura 6h) en el 3%, el 91% de los núcleos restantes no presentaron alteración alguna.

En éstos casos se pudiera pensar que lo que se estuviera observando correspondiera a clonas triploides y tetraploides, lamentablemente este hecho no se pudo comprobar ya que no se contaba con material que tuviera células en metafase que pudieran corroborar si efectivamente se trataba de la ganancia completa de los cromosomas 9 y 22.

Fusión génica *TEL/AML1*

Se realizó la técnica de FISH empleando la sonda de secuencia única de los genes *TEL/AML1* para identificar la t(12;21) en pacientes con edad menor o igual a 17 años en donde el cariotipo fue incompleto o normal.

Se analizaron 19 pacientes, de los cuales 6/19 se incluyeron por no contar con resultados del estudio citogenético (sin cariotipo), 8/19 por presentar cariotipo normal y 5/19 por presentar cariotipo alterado (Cuadro 9).

Cuadro 9. Pacientes estudiados por FISH con sonda *TEL/AML1*

	No. De pacientes estudiados	No. de pacientes con fusión <i>TEL/AML1</i>	No. de pacientes con ganancia de los loci <i>TEL</i> y <i>AML1</i>
Sin Cariotipo	6	1	2
Cariotipo Normal	8	-	-
Cariotipo Alterado	5	-	1
Total	19	1/19	3/19

El valor basal (VB) calculado para la fusión génica *TEL/AML1* en las muestras control fue del 0% y para ganancias o pérdidas de los loci tanto *TEL* como *AML1* también fue del 0%, por lo tanto los porcentajes superiores al VB calculado son significativos.

Al analizar éstos pacientes se observó que 4/19 (21%) fueron portadores de alteraciones en los genes *TEL/AML1*, de los cuales solamente 1/4 fue positivo a la fusión génica *TEL/AML1* o t(12;21) y el resto de los pacientes presentaron solamente ganancias en los loci *TEL* y *AML1* sin presentar la fusión, finalmente 15/19 de los pacientes resultaron negativos a la translocación presentando núcleos con señales normales.

El cuadro 10 muestra los resultados del análisis de los genes *TEL/AML1* para los casos que presentaron alguna alteración, en donde puede observarse el número de caso, el modelo de señales, su localización, la interpretación para cada modelo de señales y el porcentaje de fusión.

Es importante recordar que la sonda *TEL/AML1* exhibe un patrón de señales típico, ya que en un núcleo que no presenta la fusión se observan 2 señales rojas y dos señales verdes (Figura 7a) y para un núcleo que presenta la fusión *TEL/AML1* se observa una señal amarilla (fusionada), una señal roja, una pequeña roja (residual) y una verde (Figura 7b).

El caso 23 (1/19) fue el único que presentó la fusión génica *TEL/AML1* (Figura 7b), siendo el porcentaje de fusión del 66%, mientras que el 34% restante correspondió a núcleos normales con ausencia de la fusión (Cuadro 10). Según Van der Burg *et al.*, (2004) la fusión génica *TEL/AML1* o t(12;21), es observada en el 25% de los niños con LLA que presentan inmunofenotipo pre-B y corresponden al subtipo L₁, en adultos también puede observarse pero su frecuencia es menor del 2%; en ambos casos ésta translocación se asocia a un pronóstico favorable, sobretodo en aquellos pacientes que presentan una cuenta de leucocitos baja y una edad entre 1 y 10 años (Hübner *et al.*, 2004).

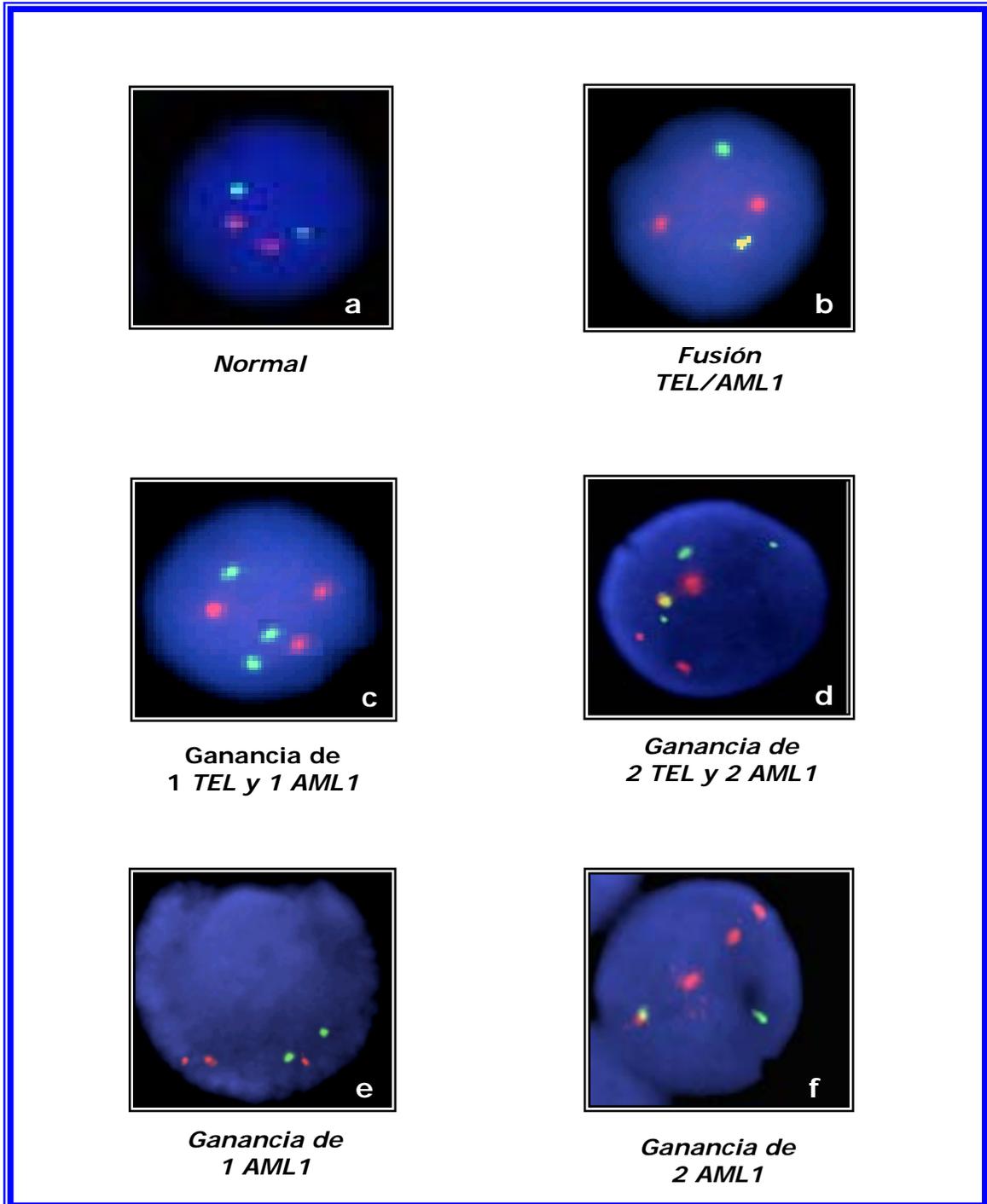
En este estudio la frecuencia con que se presentó la t(12;21) sólo fue del 5.2% en niños con LLA, este dato es inferior a lo reportado y quizás se deba a que la mayoría de los pacientes corresponden al subtipo citomorfológico L₂ y a un inmunofenotipo diferente al pre-B (Van der Burg *et al.*, 2004).

Cuadro 10. Análisis e interpretación de la secuencia única *TEL/AML1* en pacientes con LLA

No. de caso	Modelo de señales FISH	Localización de señales cromosómicas			Interpretación	% de fusión
		F	R	V		
13	3R 3V	-	3R(21)	3V(12)	FISH(-)	1
	4R 4V	-	4R(21)	4V(12)	FISH(-)	1.5
	2R 2V	-	2R(21)	2V(12)	FISH(-)	97.5
20	3R 2V	-	3R(21)	2V(12)	FISH(-)	2.5
	2R 2V	-	2R(21)	2V(12)	FISH(-)	97.5
23	1F 1R 1r 1V	1F (<i>TEL/AML1</i>)	1R(21) 1r(der12)	1V(12)	t(12;21)	66
	2R 2V	-	2R(21)	2V(12)	FISH(-)	34
35	4R 2V	-	4R(21)	2V(12)	FISH(-)	64.5
	2R 2V	-	2R(21)	2V(12)	FISH(-)	35.5

F= fusionada (amarilla), R= roja normal, r= roja residual, V= verde. *** Al análisis de la sonda **VB=0** para la fusión *TEL/AML1* y **VB=0** para ganancias de los loci *TEL* y *AML1* ***

Figura 7. Modelo de señales de la fusión *TEL/AML1*



En este paciente (caso 23) se puede corroborar que la fusión génica *TEL/AML1* predice un buen pronóstico en quienes la presentan, ya que en este caso se alcanzó la remisión completa y el paciente actualmente sigue en tratamiento (sobrevivida de aprox. 2 años).

Para el caso 13 se observaron dos clonas alteradas, en donde la primera de ellas correspondió a un modelo de señales de 3 rojas (cromosoma 21) y 3 verdes (cromosoma 12) (Figura 7c) (ganancia de un loci *TEL* y un *AML1*) en el 1% de los núcleos y otra con un modelo de señales de 4 rojas (tetrasomía del cromosoma 21 ó ganancia de 2 loci *TEL*) y 4 verdes (tetrasomía del cromosoma 12 ó ganancia de 2 loci *AML1*) (Figura 7d) en el 1.5% de los núcleos analizados. El 97.5% de los núcleos analizados no presentó ninguna alteración, el porcentaje de células con ganancias es muy bajo, pero cabe mencionar que como el VB para ganancias de los loci aplicando ésta sonda es cero, éste valor es considerable.

En el caso 20 sólo se observó una clona alterada con la ganancia del loci *AML1*, ya que el patrón de señales que se encontró para este caso fue de 3 señales rojas (trisomía del cromosoma 21 ó ganancia de un *AML1*) y 2 verdes (cromosoma 12) (Figura 7e), éste modelo de señales se observó en el 2.55% de los núcleos analizados.

Finalmente el caso 35 mostró una clona alterada, en la cual se observó un modelo de señales de 4 rojas y 2 verdes, correspondientes al cromosoma 21 y 12 respectivamente (Figura 7 f). En este caso la tetrasomía del cromosoma 21 (4 señales rojas) se presentó en 64.55% de los núcleos analizados, mientras que el 35.45% restante correspondió a núcleos normales.

Las ganancias de los loci principalmente la del *AML1*, pueden estar relacionadas con células que presentan hiperdiploidía alta, ya que dentro

de ésta alteración los cromosomas que se encuentran con mayor frecuencia son el 4, 6, 10, 14, 17, 18, 20, **21**, y X. Frecuentemente los cromosomas ganados están presentes en tres copias (trisómicos), no obstante el cromosoma 21 es tetrasómico, como se observa en el caso 35 (Onodera *et al.*, 1992).

CORRELACIÓN DE LOS DATOS HEMATOLÓGICOS CON LOS HALLAZGOS CITOGENÉTICOS Y MOLECULARES EN PACIENTES CON LLA

Los datos hematológicos iniciales en los pacientes con LLA son de valor pronóstico ya que se pueden asociar con alteraciones citogenéticas que son importantes para confirmar un diagnóstico, para dar el tratamiento adecuado y el seguimiento del curso de la enfermedad.

Dentro de los datos hematológicos; la cuenta de leucocitos (CL) es importante, ya que los valores altos de CL se encuentran fuertemente relacionados con cariotipos alterados que involucran frecuentemente alteraciones citogenéticas como la t(9;22) que es de curso desfavorable a cualquier edad (Cortes y Kantarjian, 1995).

En este estudio se comparó la CL en pacientes que presentaron cariotipo normal, cariotipo alterado (por ambas metodologías) y en aquellos pacientes en los que no se obtuvo resultado del estudio citogenético, esperando que entre ellos existieran diferencias significativas como se observa en la literatura.

En el caso de pacientes con cariotipo normal, la CL en promedio fue de $20.65 \times 10^9/L$, este valor se comparó con el promedio de CL de los pacientes que presentaron cariotipo alterado por ambas metodologías el cual fue de $39.75 \times 10^9/L$, por tanto al aplicar la prueba estadística de ANOVA (Análisis de Varianza) con $p < 0.05$ seguida por la prueba de Tukey a ambos grupos de pacientes, se observó que entre ellos no hay

diferencias estadísticamente significativas; sin embargo no ocurre así en aquellos pacientes sin cariotipo, debido a que el promedio en la cuenta de CL fue $88.86 \times 10^9/L$; es evidente que este valor comparado con el de cariotipo normal y alterado es muy elevado, siendo estadísticamente significativo por la prueba de ANOVA al compararse con ambos. El hecho de que la CL sea tan elevada en los pacientes sin cariotipo, quiere decir que éstos pacientes cursan con alteraciones citogenéticas que no pudieron ser detectadas por ambas metodologías debido a la calidad de la muestra.

Dentro de los datos hematológicos, los valores de hemoglobina (Hb) y plaquetas (Pt), también fueron comparados en pacientes con cariotipo normal, con cariotipo alterado y en aquellos casos sin cariotipo.

Para el caso de la Hb no hubo diferencias significativas al aplicar la prueba estadística de ANOVA con una $p < 0.05$, ya que el valor promedio de Hb en los pacientes con cariotipo normal, alterado y sin cariotipo fue muy homogéneo (7.4, 7.8 y 6.4 g/dL respectivamente). En los pacientes con LLA es muy frecuente encontrar valores de Hb bajos como en éstos casos, ya que es un indicador de anemia de rápida evolución (Morrison, 1998). En el caso de las plaquetas (Pt), tampoco hubo diferencias significativas al comparar el valor promedio en los pacientes con cariotipo normal, alterado y sin cariotipo ya que dicho valor fue muy homogéneo (56.2 , 55.6 y $43.5 \times 10^9/L$ respectivamente) para cada grupo.

Análisis de los pacientes que presentaron la t(9;22) y su correlación con los datos hematológicos iniciales y supervivencia

De acuerdo con Cortes y Kantarjian (1995), la t(9;22) es una alteración de mal pronóstico que se asocia fuertemente a CL altas y a una supervivencia corta. En este estudio lo anterior no se pudo corroborar

en todos los pacientes portadores de la t(9;22), pues la CL fue muy heterogénea y la supervivencia en la mayoría de los pacientes se desconoció, debido a que algunos pacientes cambiaron de institución o abandonaron el tratamiento. Aunque en la mayoría de los pacientes no se supo que ocurrió lo más probable es que hayan fallecido, sin embargo no se pudo confirmar.

Dentro de éstos pacientes cabe destacar que el caso 36 tiene reportado el periodo de supervivencia más largo (12 meses), este paciente de 4 años de edad correspondiente al sexo masculino, se encuentra dentro del pico de edad de buen pronóstico el cual es de 2 a 5 años (Smith *et al.*, 1996; Secker-Walker, 1997) y presenta una CL baja, la cual es de $13.765 \times 10^9/L$, este paciente a pesar de ser positivo a la t(9;22) en punto de ruptura menor (m-*bcr*), se encuentra asociado a la delección de los loci *BCR* y *ABL* (Cuadro 11), en éste caso es muy probable que las delecciones asociadas a la t(9;22) sean las que le confieran a éste paciente una evolución más favorable, como ocurre en los casos reportados de LGC (Lawce *et al.*, 2002).

En los casos 22 y 46 pudo observarse una asociación con lo reportado por Secker-Walker (1997), ya que en ambos casos la CL es superior a $50 \times 10^9/L$ y está fuertemente relacionada con una supervivencia muy corta, la cual fue de 3 meses para el caso 22 y de 1 mes para el caso 46 (Cuadro 11) además de que éstos casos presentaron el punto de ruptura menor (m-*bcr*) el caso 46 presentó doble cromosoma Ph⁺ el cual es de muy mal pronóstico en éstos pacientes, ya que indica que los pacientes que lo presentan se encuentra en una etapa terminal.

Cuadro 11. Análisis de la t(9;22), su correlación con los datos hematológicos iniciales y supervivencia en pacientes con LLA

No. de caso	Edad/ Sexo	Fusión BCR/ABL, alteraciones y ganancia de los loci	CL (X10 ⁹ /L)	Pt (X10 ⁹ /L)	Hb (g/dL)	Supervivencia (meses)	Estado actual
3	31/M	M- <i>bcr</i> y m- <i>bcr</i>	29.35	77	9.3	1	?
18	45/M	m- <i>bcr</i> , deleción de ABL y BCR	33.24	72	12.3	?	?
19	28/F	Gancia 1 ABL y 1BCR Ganancia de 2 ABL y 2 BCR	1.5	175	9.4	1	?
22	7/F	m- <i>bcr</i>	56	20	7	3	Falleció
36	4/M	m- <i>bcr</i> , deleción de ABL y BCR	13.7	26	7.2	12	?
37	42/M	M- <i>bcr</i> , deleción de ABL y deleción de ABL y BCR	40.59	1.7	8.1	?	?
46	55/M	m- <i>bcr</i> , deleción de ABL, deleción de ABL y BCR, 2Ph	52	15	5.9	1	Falleció
49	41/M	M- <i>bcr</i> y m- <i>bcr</i>	96.6	78	8.3	6	?

CL= cuenta de leucocitos, Pt= plaquetas, Hb= hemoglobina, ?= No se sabe que paso con esos pacientes

Análisis de los pacientes que presentaron la t(12;21) y su correlación con los datos hematológicos iniciales y supervivencia

De acuerdo con lo reportado por Cayado *et al* (2000), la t(12;21) sólo puede ser analizada por FISH y es una alteración con valor pronóstico en edad pediátrica, que confiere un buen pronóstico y que se encuentra asociada CL bajas, al subtipo L₁ y a un periodo de supervivencia amplio (Shurtleff *et al.*, 1995; Cayado *et al.*, 2000).

En este estudio se observó, que el paciente portador de la t(12;21) se asoció con un pronóstico favorable ya que en él pudo observarse que tenía todos los factores de buen pronóstico a su favor; paciente

masculino de 3 años de edad, con la fusión génica *TEL/AML1* y una CL de $23.9 \times 10^9/L$, lo que concuerda con lo reportado por Cayado *et al* (2000), ya que este paciente ha tenido una supervivencia de dos años y actualmente sigue en tratamiento (Cuadro 12).

Cuadro 12. Análisis de la t(12;21), su correlación con los datos hematológicos iniciales y supervivencia en pacientes con LLA

No. de caso	Edad y Sexo	Fusión <i>TEL/AML1</i> ó ganancia de los loci y No. modal cromosómico	CL ($\times 10^9/L$)	Pt ($\times 10^9/L$)	Hb (g/dL)	Supervivencia (meses)	Estado actual
13	16/F	+12, +21 (48) +12,+12; +21,+21(50)	2.7	279	10.3	33	Vive
20	9/F	+21 (47)	2.35	42	8.6	1	?
23	3/M	Fusión <i>TEL/AML1</i> (46)	23.9	13	4.5	23	vive
35	7/M	+21,+21 (48)	36	17	7.5	15	vive

CL= cuenta de leucocitos, Pt= plaquetas, Hb= hemoglobina

En los casos 13 y 35 se observó que las ganancias de los loci, particularmente del *AML1* son de buen pronóstico, se encuentran asociadas con una CL baja y una supervivencia superior a 15 meses; en éstos dos casos los pacientes siguen actualmente bajo tratamiento; éstas ganancias predicen un curso favorable de la enfermedad ya que pueden estar fuertemente relacionadas con un cariotipo hiperdiploide en éstos pacientes el cual es de muy buen pronóstico (Mrózek *et al.*, 2004).

Sólo en el caso 20 se desconoce el curso de la enfermedad, debido a que este paciente abandonó el tratamiento después del primer mes; es muy probable que si el paciente cambio de institución para ser atendido tenga la misma supervivencia que los pacientes anteriores, ya que de igual manera presenta factores de buen pronóstico.

RESPUESTA AL TRATAMIENTO Y SUPERVIVENCIA

Al final de este estudio observamos que de los 50 pacientes analizados, el 12% alcanzaron la remisión parcial, el 24% alcanzaron la remisión completa, el 34% abandonaron el tratamiento y el 30% fallece durante el tratamiento; lo anterior demostró que se pierde el 64% de la población estudiada (entre los que abandonan y los que fallecen al inicio del estudio) (Cuadro 13).

No obstante los pacientes fallecen durante el tratamiento porque acuden a ésta institución en un estado crítico (etapa final de la enfermedad), por lo cual es imposible poder hacer una correlación detallada de las alteraciones citogenéticas de valor pronóstico con la supervivencia en la mayoría de los pacientes.

Cuadro 13. Respuesta al tratamiento y supervivencia de los pacientes con LLA durante el estudio

Respuesta al tratamiento	No. de pacientes	Porcentaje
Remisión parcial	6/50	12%
Remisión completa	12/50	24%
Abandonan tratamiento	17/50	34%
Fallecen durante el tratamiento	15/50	30%

CONCLUSIONES

1. El estudio citogenético convencional permitió identificar alteraciones con valor pronóstico de tipo numérico y estructural en los pacientes con LLA, aunque presentó limitaciones debido a la calidad de las muestras.
2. La FISH permitió observar alteraciones como la $t(12;21)$ en éstos pacientes, la cual no se observa por citogenética convencional; también fue posible identificar los puntos de ruptura involucrados en la $t(9;22)$ en los pacientes que resultaron positivos por citogenética convencional.
3. Por medio de la FISH fue posible identificar ganancias y pérdidas de los loci *BCR* y/o *ABL*, así como *TEL* y *AML1*.
4. El empleo de la FISH no debe descartar la aplicación del estudio citogenético convencional, ya que éste último permite reconocer un mayor número de alteraciones presentes a la vez.
5. No se pudo hacer una correlación en todos los pacientes ya que abandonan el tratamiento, cambian de institución o fallecen por llegar en un estado crítico.

REFERENCIAS

- Abelson H, Rabstein L. (1970). Lymphosarcoma: virus-induced thymic-independent disease in mice. *Cancer Res.* 30: 2213-2222.
- Berger R, Chen S, Chen Z, *et al.* (1990). Philadelphia-positive acute leukemia. Cytogenetic and molecular aspects. *Cancer Genet Cytogenet.* 44:143-152.
- Bleyer A, (1988). Central nervous system leukemia. *Pediatr Clin North Am.* 35:789-814.
- Bloomfield C, Secker-Walter L, Goldamn A, *et al.* (1989). Six year follow-up of clinical significance of karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. From the Sixth International Workshop on Chromosomes in Leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 40: 171-185.
- Bose S, Deininger M, Gora-Tybor, *et al.* (1998). The presence of typical and atypical bcr-abl fusion genes in leukocytes of normal individuals: Biologic significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood.* 92: 3362-3367.
- Brenemam J, Ramsey M, Lee D, *et al.* (1994). The development of chromosome-specific composite DNA probe for the mouse and their application to chromosome painting. *Chromosoma.* 102: 591-598.
- Brüggemann M, Raff T, Flohr Thomas, *et al.* (2006). Clinical significance of minimal residual disease quantification in adult patients with standard-risk acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 107:1116-1123.
- Callen D, Raphael K, Michael P, (1989). Acute lymphoblastic leukemia with a hypodiploid karyotype with less than 40 chromosomes: the bases for division into two subgroups. *Leukemia.* 3:749-752.
- Cayado N, Muñiz A, González A, *et al.* (2000). Estudio del reordenamiento molecular de los genes *TEL/AML1* en la leucemia linfocítica aguda. Resultados preliminares. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 16(3):206-210.

- Copelan E, McGuire E. (1995). The biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*. 85: 1151-1168.
- Cortes E, Kantarjian H, (1995). Acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 76(12): 2393-2417.
- Crist W, Carroll A, Shuster J, *et al.* (1990 a). Philadelphia chromosome positive childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical and cytogenetic characteristics and treatment outcome. A Pediatric Oncology Group study. *Blood*. 76:489-494.
- Crist W, Carroll A, Shuster J, *et al.* (1990 b). Poor prognosis of children with pre-B acute lymphoblastic leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13): A pediatric oncology group study. *Blood*. 76(1):117-122.
- Charrin C, Magaud C, Sebban D, *et al.* (1996). Cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia: correlations with hematologic findings and outcome. A collaborative study of the Groupe Français de Cytogénétique Hématologique. *Blood*. 87(8):3135-3142.
- Charrin C, Thomas X, Ffrench M, *et al.* (2004). A report from the LALA-94 and LALA-SA groups on hypodiploidy with 30 to 39 chromosomes and near-triploidy: 2 possible expressions of a sole entity conferring poor prognosis in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Blood*. 104:2444-2451.
- Chessells J, Bailey C, Richards S. (1995). Gender and treatment outcome in childhood lymphoblastic leukaemia: report from the MRC UKALL trials. *Br J Haematology*. 89:364-372.
- Chessells M, (1982). Acute lymphoblastic leukemia. *Seminars in Hematology*. 19(3):155-171.
- Chinnppan D, Cowan J, Rastogi A, *et al.* (1998). Discrepante cytogenetic fluorescencia in situ results in 26-year-old male with early T-cell acute lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. 106: 116-121.
- Dabaja B, Faderl S, Thomas D, *et al.* (1999). Deletions and losses in chromosomes 5 or 7 in adult acute lymphocytic leukemia: incidence, associations and implications. *Leukemia*. 13:869-872.
- Dailing J, Stary P, Olshan A, *et al.* (1984). Birth weigth and incidence of childhood cancer. *J Natl Cancer Inst*. 72:1039-41.

- Deininger M, Goldman M, y Melo J. (2000). The molecular biology chronic myeloid leukemia. *Blood*. 96: 3343-3356.
- Diekmann D, Brill S, Garrett M, *et al.* (1991). *Bcr* encodes a GTAsa-activating protein for p21^{rac}. *Nature*. 351:400-402.
- Döhner H, Stilgenbauer S, Fischer, *et al.* (1995). Diagnosis and monitoring of chromosome aberrations in hematological malignancies by fluorescence in situ hybridization. *Stem Cell*. 13(suppl 3): 76-82.
- Evans W, Crom W, Abromowitch M, *et al.* (1986). Clinical pharmacodynamics of high-dose methotrexate in acute lymphoblastic leukemia: identification of a relation between concentration and effect. *N Engl J Med*. 314: 471-477.
- Faderl S, Kantarjian H, Talpaz M, *et al.* (1998). Clinical significance of cytogenetics abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 9:3995-4019.
- Fletcher J, Kimball V, Lynch E, *et al.* (1989). Prognostic implications of cytogenetics studies in an intensive treatment group of children with acute lymphocytic leukemia. *Blood*. 74:2130-2135.
- Frost B, Forestier E, Gustaffson G, *et al.* (2004). Translocation t(12;21) is related to invitro cellular drug sensitivity to doxorubicin and etoposide in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 104: 2452-2457.
- Goldman M. (1998). Chronic myeloid leukemia: New strategies for cure. Ham-Wasserman lecture.
- Guizar V, (2001). Genética Clínica. Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Ed. El Manual Moderno. 3^a ed. México. pp.985
- Guo J, Lian J, Xian Y, *et al.* (1994). *BCR-ABL* protein expression in peripheral blood cells of chronic myelogenous leukemia patients undergoing therapy. *Blood*. 83: 3629-3637.
- Heerema A, Argyropoulos G, Weetman M, *et al.* (1992). Interphase in situ hybridization reveals minimal residual disease in early remission and return of the diagnostic clone in karyotypically normal relapse of acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 7: 537-543.

- Heim S, Mitelman F, (1995). Acute lymphoblastic leukemia in: Cancer cytogenetic. 2^a ed. New York, NY, Wiley-Lis. pp. 141.
- Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, *et al.* (1985). Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph translocation. *Nature*. 315:758-761.
- Heisterkamp N, Sthephenson J, Groffen J, *et al.* (1983). Localization of teh c-abl oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 306:239-42.
- Henderson E. (1990). Acute leukemia: general considerations. In: Williams W, Beutler E, Erslev A, Lichtman M, editors. Hematology. 4^a ed. New York: McGraw-Hill. pp. 236-251.
- Hübner S, Cazzaniga G, Flor T, *et al.* (2004). High incidence and unique features of antigen receptor gene rearrangements in *TEL-AML1*-positive leukemias. *Leukemia*. 18:84-91.
- Inokuchi K, Futaki M, Hanawa H, *et al.* (1997). Heterogenous expression of bcr-abl fusion mRNA in a patient with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Br J Haematol*. 97: 837-840.
- ISCN (1995). Guidelines for cancer cytogenetics, supplement to an international system for human cytogenetics nomenclature. Basel: Karger. pp.114
- Ito C, Kumagai M, Manabe A, *et al.* (1999). Hyperdiploid Acute Lymphoblastic Leukemia UIT 51 to 65 Chromosomes: A Distinct Biological Entity With a Marked Propensity to Undergo Apoptosis. *Blood*. 93(1): 315-320.
- Kaye S, Robison L, Smithson W, *et al.* (1991). Maternal reproductive history and birth characteristics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 68:1351-1355.
- Kipreos E, Wang J. (1990). Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science*. 248:217-220.
- Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, *et al.* (2001). Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood*. 97(11): 3581-3588.

- Kosaka Y, Koh K, Kinukawa N, *et al.* (2004). Infant acute lymphoblastic leukemia with *MLL* gene rearrangements: outcome following intensive chemotherapy and hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*. 104: 3527-3534.
- Kurzrock R, Gutterman J, Talpaz M. (1988). The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 319(15):990-998.
- Lawce H, Durum C, Unsworth N, *et al.* (2002). *BCR/ABL* FISH: Probes, Patterns, and Prognoses. *The Journal of the Association of Genetic Technologists*. 28(2): 40-46.
- Le Beau M. (1993). Detecting genetic changes in human tumor cell: Have Scientists "Gone Fishing?". *Blood*. 81: 1979-1983.
- Lempert C, Kafko M, Scalise, *et al.* (1998). The value of interphase fluorescence in situ hybridization in the study of patients with lymphoproliferative disorders: Further evidence for a higher sensitivity of detecting chromosomes 7 y 8 aneuploidy. *Cancer genet cytogenet*. 105: 193-197.
- Lewis J, Schwartz M. (1998). Integrins regulate the association and phosphorylation of paxillin by *c-Abl*. *J Biol Chem*. 273:14225-14230.
- Liang D, Chou T, Chen J, *et al.* (1996). High incidence of *TEL/AML1* fusion resulting from cryptic t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia in Taiwan. *Leukemia*. 10:991-993.
- Look A, Melvin S, Williams D, *et al.* (1982). Aneuploidy and percentage of S-phase cell determined by flow cytometry correlate with cell phenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 60: 959-964.
- Lorna M, Secker-Walker y Craig M. (1993). Prognostic Implications of Breakpoint and Lineage Heterogeneity in Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: a Review. *Leukemia*. 7(2):147-151.
- Lutterbach B, Hiebert S. (2000). Role of the transcription factor *AML1* in acute leukemia and hematopoietic differentiation. *Gene*. 245:223-235.

- McKenzie S, (2000). Hematología Clínica. Ed. Manual Moderno. 2^a ed. México. pp. 429-545.
- Melo J, Gordon D, Tuszynski S, *et al.* (1993). Expression of the ABL/BCR fusion gene in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 81(10):2488-2491.
- Melo J. (1996). The molecular biology of chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*. 10: 751-756.
- Miyoshi H, Shimizu K, Kozu T, *et al.* (1991). Breakpoints on chromosome 21 in acute myeloid leukemia are clustered within a limited region of a single gene, *AML1*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:1031-1034.
- Moorman A, Clark R, Farrell D, M, *et al.* (1996). Probe for hidden hyperdiploidy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosom Cancer*. 16: 40-45.
- Morrison T, (1998). Laboratorio clínico y pruebas de diagnóstico. Ed. El Manual Moderno. 1^a ed. México. pp. 79-110.
- Mrózek K, Heerema A, Blomfield D, (2004). Cytogenetics in acute leukemia. *Blood reviews*. 18:115-136.
- Onodera N, McCabe N, Rubin C, (1992). Formation of a hypodiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 80:293-208.
- Pane F, Frigeri F, Sindona M, *et al.* (1996). Neutrophilic-chronic myelogenous leukemia (CML-N): a distinct disease with a specific marker (*BCR-ABL* with c3a2 junction). *Blood*. 88:2410-2414.
- Pasternak G, Hochhaus A, Schultheis B, *et al.* (1998). Chronic myelogenous leukemia: molecular and cellular aspects. *J Cancer Res Clin Oncol*. 124:643-660.
- Paulsson K, Panagopoulos L, Knuutila S, *et al.* (2003). Formation of trisomies and their parental origin in hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 102(8):3010-3015.
- Peing L, Keng T, Sinniah D. (1981). Fever in children with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 47:583-587.

- Pinkel D. (1993). Chromosomes analysis by multicolor in situ hybridization using direct-labeled fluorescent probe. *Clinical Chemistry*. 39: 709-711.
- Poddighe J, Moesker O, *et al.* (1991). Interfase cytogenetics of hematologic cancer: comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probe. *Cancer Research*. 51: 1959-1967.
- Preti H, O'Brien S, Giralt S, *et al.* (1994). Philadelphia-chromosome-positive adult acute lymphocytic leukemia: characteristics, treatment results, and prognosis in 41 patients. *Am J med*. 97:60-65.
- Pui C, Boyett J, Relling M, *et al.* (1999). Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J of Clin Oncology*. 17(3):818-824.
- Pui C, Crist W, Look A, (1990). Biology and clinical significance of cytogenetics abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 76:1149-1463.
- Pui C, Chessells J, Cammita B, *et al.* (2003). Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia*. 17:700-706.
- Pui C, Evans W. (1998). Acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 339: 605-515.
- Pui C, Williams D, Robertson P, *et al.* (1988). Correlation of karyotype and immunophenotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*. 6:56.
- Raimondi C, Roberson P, Pui C, *et al.* (1992). Hyperdiploid (47-50) acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Blood*. 79: 3245-3252.
- Raimondi C. (1993). Current status of cytogenetics research in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 81: 2237-2251.
- Raimondi S, Behm F, Roberson P, *et al.* (1990). Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on prognostic implications of the t(1;19). *J Clin Oncol*. 8:1380-1388.

- Rao K, Heerema N, Sather H, *et al.* (2000). Deletions of chromosome arm 5q in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Proc Am Soc Clin Oncol.* 19: 589a.
- Rapaport S. (1986). Introducción a la hematología. Ed. Salvat. 2ª reimpresión. Barcelona, España. pp. 164-173.
- Reaman G, Sposto R, Sensel M, *et al.* (1999). Treatment outcome and prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trials of the Children's Cancer Group. *Journal of Clinical Oncology.* 17(2):445-455.
- Reid A, Huntly J, Henning E, *et al.* (2002). Deletions of the derivative chromosome 9 do not account for the poor prognosis associated with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. To the editor: *Blood.* 99(6):2274-2275.
- Ribeiro R, Abromowich M, Raimondi C, *et al.* (1987). Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 70: 948-953.
- Rieder H, Bonwetsch C, Janssen L, *et al.* (1998). High rate of chromosome abnormalities detected by fluorescence in situ hybridization using *BCR* and *ABL* probes in adult acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 12: 1473-1481.
- Rinsky R, Smith A, Hornung R, *et al.* (1987). Benzene and leukemia: an epidemiologic risk assessment. *N Engl J Med.* 316:1044-1050.
- Robinson L, Nesbit M, Sather H, *et al.* (1984). Down Syndrome and acute leukemia in children: a 10 year retrospective survey from Childrens Cancer Study Group. *J Pediatr.* 105:235-244.
- Romana S, Cherif D, y Le Coniat (1993). In situ hibridization to interfase nuclei in acute leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 8: 98-103.
- Romana S, Poirel H, Leconiat M, *et al.* (1995). High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Bood.* 86:4263-4269.
- Roumier C, Fenaux P, Lafage M, *et al.* (2003). New mechanisms of *AML1* gene alteration in hematological malignancies. *Leukemia.* 17:9-16.

- Ruiz-Argüelles, (1994). Fundamentos de Hematología. Ed. Panamericana. México. pp. 137-162.
- Ruiz-Argüelles y San-Miguel (1996). Leucemias Agudas. Ed. Panamericana, pp. 120.
- Sawyers C, McLaughlin J, Goga A, *et al.* (1994). The nuclear tyrosine kinase *c-Abl* negatively regulates cell growth. *Cell*. 77:121-131.
- Sawinska M, Ladon D, (2004). Mechanism, detection and clinical significance of the reciprocal translocation t(12;21)(p12;q22) in the children suffering from acute lymphoblastic leukaemia. *Leuk Res*. 28:35-42.
- Sawyers C, McLaughlin C, Witte O., (1991). Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cell by the Bcr-Abl oncogene. *J Exp Med*. 181: 307-313.
- Schad R, y Dewald W. (1995). Building a new clinical test for fluorescence in situ hybridization. *Applied cytogenetics*. 21: 1-4.
- Schmitt T, Degos L. (1978). Leucemias familiares. *Bull Cancer*. 65:83-88.
- Secker-Walker L, Craig M. (1993). Prognostic implications of breakpoint and Lineage heterogeneity in Philadelphia-Positive in acute lymphoblastic leukemia: a Review. *Leukemia*. 7(2):147-151.
- Secker-Walker L. (1990). Prognostic and biology importance of chromosomes findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. 10 th anniversary article. *Cancer Genet Cytogenet*. 49: 1-13.
- Secker-Walker L. (1997). Chromosomes and genes in acute lymphoblastic leukemia. Ed. Chapman y Hall. New York, pp. 167.
- Seeger K, von Stackelberg A, Tube T, *et al.* (2001). Relapse of *TEL/AML1*-positive acute lymphoblastic leukemia in childhood: a matched-pair analysis. *J Clin Oncol*. 19:3188-3193.
- Shurtleff S, Bujis A, Behm F, *et al.* (1995). *TEL/AML1* fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common genetic lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with an excellent prognosis. *Leukemia*. 9:1985-1989

- Slavutsky I, (1999). Leucemias agudas: Impacto del estudio citogenético en el resultado. *Revista de la Sociedad Argentina de Medicina. Avances en Medicina.* 99: 213-220.
- Smith M, Arthur D, Camitta B, *et al.* (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol.* 14:18-24.
- Speck N, Stacy T, Wang Q, *et al.* (1999). Core-binding factor: a central player in hematopoiesis and leukemia. *Cancer Res.* 59:1789s-1793s.
- Stewart A, Kneale G. (1970). Radiation dose effects in relation to obstetric x-rays and childhood cancers. *Lancet.* 1:1185-1188.
- Swiger R, y Tucker D. (1996). Fluorescence in situ hybridization. A brief review. *Environm and Mol Mut.* 27:245-254.
- Towatari M, Yanada M, Usui N, *et al.* (2004). Combination of intensive chemotherapy and imatinib can rapidly induce high-quality complete remission for a majority of patients with newly diagnosed BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 104:3507-3512.
- Van der Burg M, Poulsen T, Hunger S, *et al.* (2004). Split-signal FISH for detection of chromosome aberrations in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 18:895-908.
- Wang Q, Stacy T, Miller J, *et al.* (1996). The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (*AML1*) function in vivo. *Cell.* 87:697-708.
- Westbrook A. (1997). Molecular subsets and prognostic factor in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* (supp 4) 11:s8-s10.
- Wetzler M, Dodge R, Mrózek K, *et al.* (1999). Prospective karyotype analysis in adult acute lymphoblastic leukemia: the Cancer and Leukemia Group B experience. *Blood.* 93:3983-3993.
- Whitlock J, Sather H, Gaynon P, *et al.* (2005). Clinical characteristics and outcome of children with Down syndrome and acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group study. *Blood.* 106:4043-4049.
- Yuan Z, Shioya H, Ishiko T, *et al.* (1999). p73 is regulated by tyrosine kinase *c-Abl* in the apoptotic response to DNA damage. *Nature.* 399:814-817.