



UNAM CAMPUS IZTACALA
U. D. C. PROCESOS TECNICOS
PAPELETA DE DEVOLUCION

EL LECTOR SE OBLIGA A DEVOLVER ESTE LIBRO
COMO LIMITE EN LA FECHA INDICADA EN
EL ULTIMO SELLO.

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

ESTUDIO CITOGENETICO Y CITOQUIMICO EN MEDULA OSEA Y SANGRE PERIFERICA DE NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA LLA (FAB)

TESIS

Que como Requisito
para obtener el Título de
BIOLOGO

PRESENTAN:

Reyna Rodríguez Emma
Silva Escobedo Jesús Gabriel

Los Reyes Iztacala Tlalnepantla, Estado de México 1991



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.

**ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO
"LA RAZA". EN EL LABORATORIO DE GENETICA CON LA COLABORACION
DEL SERVICIO DE HEMATOLOGIA PEDIATRICA Y EL LABORATORIO DE
HEMATOLOGIA ESPECIAL.**

A MIS PADRES:

A quienes les debo tanto en mi formación profesional como en mi integración personal.

Además de que siempre me han impulsado y apoyado para salir adelante en todo y no dejarme vencer por nada.

A ellos con todo mi amor y respeto muchas gracias.

A MIS HERMANOS:

José Luis y Lolita, que me han dado apoyo y palabras de aliento en los momentos más precisos y que con su ejemplo me infunden a ser mejor cada día.

A GABRIEL:

Por ser una persona muy capaz brindandome su amistad, apoyo, comprensión y responsabilidad para poder llevar a cabo éste trabajo.

Donde hasta el final juntos compartimos muchas satisfacciones que dejaron una huella inborrable en cada uno de nosotros.

A LUPITA CARDENAS:

A quien le debo tanto apoyo por su gran profesionalismo e integridad personal para la realización de éste trabajo.

Por brindarme su gran amistad y confianza depositada en mi finalizandose en un gran compañerismo y como un ejemplo a seguir.

A LA DRA. MARIN:

Quien nos ayudó enormemente y participó de manera importante aportando sus conocimientos en el área clínica y además por darnos palabras de aliento y confianza.

A MEDICOS HEMATOLOGOS:

Antonio Ortiz, Carmen Rodríguez, Teresa Dueñas, por su colaboración y gran entusiasmo para llevar a cabo éste estudio.

ESTUDIO CITOGENETICO Y CITOQUIMICO EN MEDULA OSEA Y SANGRE
PERIFERICA DE NIÑOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA
LLA (FAB).

CONTENIDO

	PAG.
I.-INTRODUCCION.....	2-10
-Hematopoyésis	
-Carcinogénesis	
II.-CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS (FAB) Y (MIC).....	11-13
-Aspectos citomorfológicos, citoquímicos, inmunológicos y citogenéticos para la caracterización de la LLA.	
III.-ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA DE LA LEUCEMIA.....	13-18
El papel de los factores físicos, químicos y biológicos en el desarrollo de la leucemia y su incidencia en la - población infantil.	
-ANTECEDENTES.....	19-28
-PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.....	29
-OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	30
-MATERIAL Y METODOS.....	31-35
-RESULTADOS.....	36-39
-DISCUSION	40-64
-CONCLUSIONES.....	65-70
-APENDICE I.....	71-77
-APENDICE II.....	78-83
-GLOSARIO.....	84-86
-REFERENCIAS.....	87-95

I.- INTRODUCCION.

Desde el inicio de la historia el hombre supo que la sangre es esencial para la vida tal como lo apreció Empedocles en el siglo V A.C. con su frase la sangre es vida. Por su parte Polibus primo hermano de Hipócrates estableció la teoría de que la vasculatura humana contenía sangre, bilis blanca y amarilla.

Con el perfeccionamiento del microscopio, las células rojas de la sangre fueron descritas por primera vez por Jan Swammerdam en 1650 y los eritrocitos humanos fueron descritos por Leeuwenhoek en 1673.

Muchos de los conocimientos de la sangre surgieron de observaciones y aspectos teóricos, pero no fue hasta el siglo XIX que la fuente de producción de células sanguíneas fue intensamente explorada.

Houston sugirió que las células rojas se derivaban de leucocitos en el sistema linfoide, Zimmerman creyó que los eritrocitos eran derivados de las plaquetas, una opinión compartida por Hayen. Por último en 1868 Neumann demostró que las células rojas tenían sus precursores en la médula ósea, así se iniciaba el entendimiento de la fisiología de la hematopoyesis.

HEMATOPOYESIS

En cuanto a la fisiología de la hematopoyesis en el hombre se sabe que en el curso del desarrollo embrionario, las células corporales se diferencian en tres tipos: el ectodermo que finalmente cubre al embrión formando la piel, el pelo, el esmalte de los dientes, etc; el endodermo que tapiza el intestino primitivo y el mesodermo que se encuentra entre el ectodermo y el endodermo el cual da origen al aparato circulatorio, células de la sangre, músculos, huesos, ligamentos y otros tejidos conectivos.

En algunas regiones del cuerpo del embrión, el mesodermo está representado al principio por el mesenquima del cual se forma el sistema circulatorio y las células de la sangre.

En el tercer mes de vida embrionaria, el hígado se convierte en el principal formador de células de la sangre con

contribuciones adicionales del bazo, ganglios linfáticos y del timo.

* La médula ósea llega a ser un sitio hematopoyético activo en la mitad de la vida embrionaria y hasta el final de la gestación su función es la hematopoyesis. Este tejido mielóide se considera especializado en la producción de eritrocitos, leucocitos y plaquetas, pero se sabe más aún que el tejido mielóide produce otra clase de células hemáticas como son los linfocitos, los cuales intervienen de manera importante en las reacciones de defensa.

El espacio relativo de la médula ósea (activa) de un niño es mucho más grande que la de un adulto esto debido presumiblemente por los elevados requerimientos de producción de células por la demanda de vida neonatal. Durante la vida posnatal la demanda de células rojas se abate y mucho del espacio medular disminuye y progresivamente se mezcla con grasa (Figura 1). En ciertos estados patológicos que están usualmente asociados con anemia tales como la metaplasia mielóide, la hematopoyesis puede retornar y formar nuevos sitios activos en el hígado, bazo, nódulos linfáticos, tejido adiposo y en los riñones.

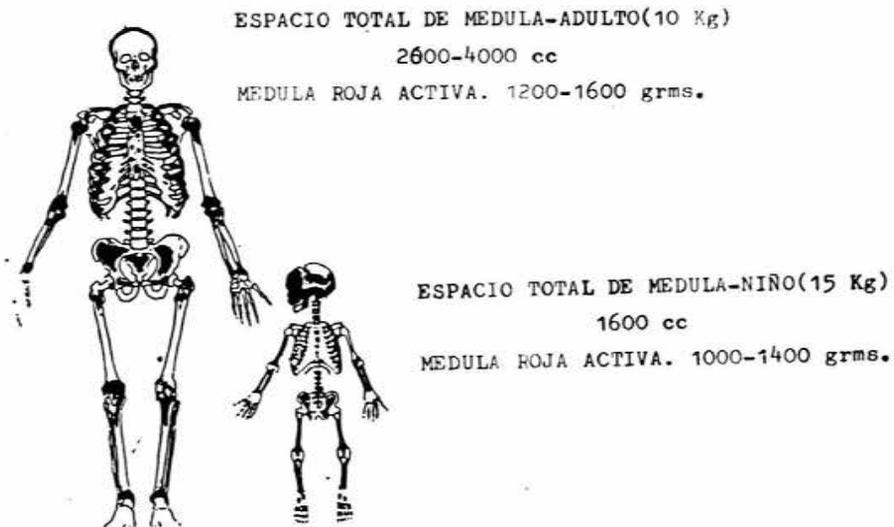
El tejido mielóide después del nacimiento, queda limitado en las cavidades de los huesos de ahí su nombre, mielos-médula. En estado normal se usan a menudo los términos mielóide y médula ósea. En el adulto hay dos tipos de médula, la médula ósea roja la cual debe su color al gran número de glóbulos rojos que contienen en diversas etapas de su desarrollo y es la que produce activamente células sanguíneas. La médula amarilla esta caracterizada por la gran cantidad de grasa que contiene.

En el feto, la médula de la mayor parte de los huesos es roja, pero durante el período de crecimiento en la vida extrauterina gran cantidad de médula se torna amarilla de manera que en el adulto solo se halla médula roja en el diploe de los huesos de la bóveda craneal, en las costillas, en el esternón, en los cuerpos de las vertebrae, en el tejido esponjoso de algunos huesos cortos y en los extremos de los huesos largos. En todos los demás lugares es amarilla, pero si se presenta la necesidad urgente de aumentar la producción de células hemáticas parte de la médula amarilla se convierte en roja.

FIG.1.- COMPARACION DE LAS AREAS DE MEDULA OSEA ACTIVA (ROJA) EN NIÑOS Y ADULTOS.

NOTESE LAS VARIACIONES EN PESO Y LA FORMA DE DISTRIBUCION.

(DE: MacFarlane,R and Robb-Smith,A.(Eds).Functions of the Blood.Oxford,
Blackwell Scientific Publications, 1961,p.357.)



Los elementos celulares sanguíneos están reemplazándose para mantener un número constante de células rojas, blancas y plaquetas mediante el mecanismo de hematopoyesis.

Existen evidencias que apoyan los principios básicos de este mecanismo los cuales son:

- Una célula madre pluripotencial es capaz de dar lugar a diferentes células progenitoras, éstas están destinadas a formar precursores diferenciados de tipos específicos de células sanguíneas.

- La célula madre pluripotencial es capaz de renovarse ella misma, las células progenitoras (célula madre linfóide y célula madre mielóide) están limitadas en su potencial proliferativo y no son capaces de renovarse indefinidamente, además de que su potencial proliferativo puede ser influenciado por timocitos o protimocitos.

- Los progenitores celulares son capaces de responder a los reguladores humorales producidos en reacción debido a los niveles circulantes de un tipo particular de célula.

- La diferenciación hematopoyética requiere un apropiado microambiente, en humanos sanos este ambiente es confinado a la médula ósea.

Dentro de la médula ósea las células madres pluripotenciales son morfológicamente células indiferenciadas capaces de replicarse ellas mismas haciendo posible el mantenimiento de las células ancestrales que están siempre listas para reemplazar células que en cierta forma se pierden o destruyen en el organismo y que además tienen la capacidad de llevar a cabo los procesos de eritropoyesis, trombopoyesis y leucopoyesis (Diagrama 1).

Aproximadamente un cuarto a un tercio de la población celular de la médula ósea, está dedicada a la eritropoyesis mientras que el resto está relacionado con la formación de leucocitos. El componente eritroide de la médula consiste en células en varias etapas de maduración.

Diagrama No. 1 Diagrama de la hematopoyesis: Lineas Mieloide, Linfoide, Megacariocítica y eritrocítica.

TEJIDO HEMATOPOYETICO

SANGRE CIRCULANTE.

		M.eosinofilo-----	Eosinofilo.
MIELOBLASTO -----	Promielocito ----	M.neutrofilo----Metamielocito--	Neutrofilo----Neutrofilo.
		M.basófilo -----	en banda.-----Basofilo.
MONOBLASTO -----	Promonocito -----		Monocito.
MEGACARIOBLASTO ----	Promegacariocito--	Megacariocito---Metamegacariocito-----	Trombocito.
ERITROBLASTO -----	Pronormoblasto----	Normoblasto-----	Reticulocito -----Eritrocito.
LINFOBLASTO -----	Prolinfocito -----		Linfocito.
PLASMOBLASTO -----	Proplasmocito -----		Plasmocito.

El proceso de maduración tiene varias características notables. El precursor más primitivo del eritrocito, el eritroblasto es una célula que se divide activamente y da origen a la serie completa de maduración, sin embargo, cuando se dividen dos nuevos eritroblastos, ambos no pueden madurar pues si lo hicieran, la médula quedaría desprovista de eritroblastos. Esto debe significar que uno de los dos eritroblastos permanece como célula primitiva, capaz de una división ulterior mientras que la otra experimenta maduración. Solamente de éste modo podría ser una producción continua con eritrocitos sin agotamiento de células precursoras.

La serie de maduración es como sigue:

Eritroblasto---Pronormoblasto---Normoblasto--Reticulocito--Eritrocito.

El eritroblasto deriva de una célula primitiva indiferenciada, tanto el primer eritroblasto como el pronormoblasto son células grandes nucleadas con citoplasma basófilo. El normoblasto es la primer célula con hemoglobina reconocible, tiene tres etapas de desarrollo con disminución progresiva y basofilia citoplasmática y un aumento de hemoglobina.

La maduración del eritrocito se puede considerar como una pérdida progresiva y sistemática de potencialidades biológicas. A diferencia de sus precursores, el eritrocito maduro no puede sintetizar proteína y no puede dividirse.

Las plaquetas proceden de unas células poliploides llamadas megacariocitos las cuales a su vez derivan de los megacarioblastos. Se encuentran principalmente en la médula ósea. Las características del megacarioblasto son su enorme tamaño (21 micras de diámetro) y gran núcleo irregular que casi llena la célula. El número de cromosomas es de 8 a 32 veces el número haploide (poliploidia). Un examen más detallado revela un borde celular irregular y un citoplasma granuloso y las plaquetas son fragmentos de éste citoplasma las cuales se producen por gemación.

Menos del 0.1% de las células de la médula ósea son megacariocitos. Un megacariocito produce 400 a 800 plaquetas por día, y cada día 35,000 plaquetas por milímetro cúbico de sangre.

El promedio de vida de una plaqueta es de 10 días. Como las otras células de la sangre, las plaquetas tienen un activo metabolismo glucolítico.

• Los leucocitos se distinguen de los eritrocitos porque tienen núcleos con forma ameboidea.

Existen varios métodos para clasificar los leucocitos, basados en las reacciones de tinción, formas nucleares y sitios de origen. Una clasificación común los divide en dos grupos: los no granulocitos que se subdividen en linfocitos y monocitos y los granulocitos que se subdividen en neutrófilos, eosinófilos y basófilos según las propiedades de tinción de sus gránulos citoplasmáticos.

Las células cuyos gránulos toman el colorante ácido rojo (eosina) son los eosinófilos ó acidófilos, aquellos cuyos gránulos toman el colorante básico azul son los basófilos y aquellos cuyos gránulos toman una mezcla de ambos son neutrófilos y todos ellos se derivan de mieloblastos.

La clasificación más simple es la que divide a los leucocitos en los grupos mononucleares y polimorfonucleares.

Los linfocitos y monocitos son producidos en los tejidos reticulares de los ganglios linfáticos y del bazo (debido a esto se les nombra células linforeticulares) y los granulocitos se producen en la médula (por ello se les denominan células mieloides).

Sin embargo, existe la teoría de que los linfocitos son producidos en realidad en el tejido mieloides, podría concluirse entonces que todos los tipos de células hemáticas se derivan de un ancestro común que sería una célula libre y ésta es la Unidad formadora de colonias (UFC).

Los neutrófilos normalmente leucocitos circulantes más numerosos, muestran las siguientes características cuando se tratan con el colorante de Wright: diámetro de 10 a 12 micras, citoplasma rosado, gránulos azulados y núcleo segmentado.

La maduración de un neutrófilo implica las siguientes etapas características:

Mieloblasto--Promielocito--Mielocito--Metamielocito--Banda--Neutrófilo.

Los linfocitos son células que se encuentran en los interespacios de los órganos linfoides. Su citoplasma no contiene gránulos y su maduración es más sencilla que la de los granulocitos.

Linfoblasto-----Prolinfocito-----Linfocito

El linfoblasto es muy semejante al mieloblasto, su cromatina madura progresivamente y aumenta paralelamente su capacidad para teñirse, su estructura se vuelve más compleja y tanto la célula como su núcleo reducen su tamaño. El prolinfocito es la forma intermedia entre el linfoblasto y el linfocito.

La maduración del linfocito es función de los ganglios linfáticos y tejidos linfoides diseminados en el cuerpo. Algunos hacen camino hacia el interior de la médula y la función de los linfocitos es la síntesis de anticuerpos.

Por otra parte los monocitos que son quizá la contraparte circulante de los macrófagos fijos de los tejidos, son mayores que un neutrófilo y típicamente tiene un núcleo en forma de riñón. Su citoplasma no contiene gránulos y la secuencia de maduración del monocito es la siguiente:

Monoblasto-----Promonocito-----Monocito

Los monocitos maduros son fagocíticos maduros y actúan defendiendo al organismo contra una infección. (1, 2, 3)

Por otra parte algunas células madres e inmaduras en los tejidos hematopoyéticos permanecen indiferenciadas y bajo divisiones mitóticas producen células progenitoras de linaje linfoide y mieloides.

Otras células después de la primer mitosis se diferencian antes de que vuelvan a dividirse otra vez. Estas células en crecimiento, desarrollo y diferenciación pasan por un ciclo celular. Este ciclo

celular se define como el intervalo de tiempo que transcurre de una mitosis a la siguiente. El tiempo del ciclo de la mayoría de las líneas celulares en cultivo se encuentra entre 10 y 30 horas.

Los eventos ó fases que se producen en el ciclo celular son la fase G₀, G₁, S, G₂ y el término de ésta última es señalado por el inicio de la mitosis (Figura 2) (4, 5, 6, 7).

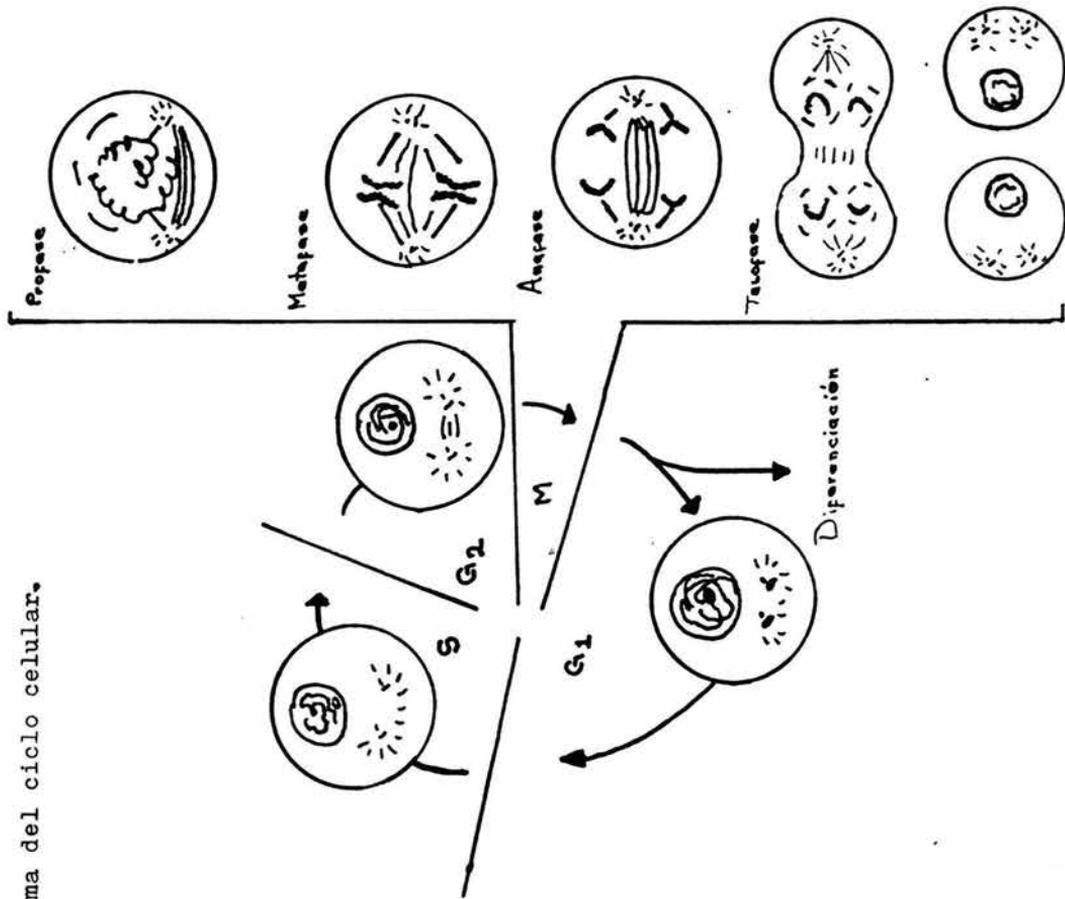
CARCINOGENESIS.

La notable regularidad del proceso de división celular garantiza que cada célula hija reciba exactamente el mismo número y tipo de cromosomas que la célula progenitora, pero cuando el mecanismo de regulación que controla el metabolismo y la reproducción celular es alterado esto puede provocar alteraciones permanentes ó mutaciones en los genes, ésto provocará que la célula presente notables anomalías que cuando éstas son muy graves pueden adquirir un carácter letal sucumbiendo la célula y si la alteración implica un incremento permanente de la actividad mitótica el resultado será un cáncer.

El cáncer es un trastorno en el crecimiento y proliferación celular. Los factores de crecimiento de origen autócrino y parácrino se fijan en la superficie de una célula blanco estimulando su proliferación. La fijación de éstos factores puede ser mediada por receptores de factor de crecimiento, una vez fijo, la interacción del factor-receptor debe transducirse de la superficie celular a través del citoplasma de la célula al núcleo, donde los genes reguladores del crecimiento se activan ó se inactivan para realizar los procesos de replicación y de división de la célula en el cáncer y uno ó más de éstos pasos estimuladores del crecimiento se desarrollan de manera errática (8).

Los genes están implicados en la carcinogénesis al menos de dos formas; varios genes adquiridos durante la concepción pueden afectar la probabilidad de desarrollar cáncer en la vida del individuo. Si estos genes de susceptibilidad para el cáncer están presentes en la línea

Figura No. 2.- Esquema del ciclo celular.



germinal, pueden actuar a diversos niveles, como afectar el metabolismo de compuestos potencialmente carcinogénicos, la capacidad para reparar el daño genético, la regulación del crecimiento de tipos celulares específicos ó la capacidad del sistema inmune en la identificación y erradicación de tumores incipientes.

La segunda clase de genes que pueden involucrarse en el desarrollo del cáncer actúan por medio de mecanismos mutacionales somáticos que dañan los genes portados en las células del órgano diana. Estos genes alterados desde el punto de vista somático pueden conferir propiedades ventajosas de crecimiento a las células portadoras al permitirles una capacidad de proliferación más rápida que sus contrapartidas genéticamente normales.

En conjunto con los alelos de las líneas germinales, éstos genes de mutación somática actúan como los determinantes centrales que desencadenan el cáncer.

Sabemos que los oncogenes que son los genes causales del cáncer se encuentran presentes en el genoma de ciertos virus tumorales, pero se ha descubierto que existen genes homólogos dentro del DNA humano normal éstos son los protooncogenes los cuales afectan el crecimiento y funcionan en diversos puntos a lo largo de ésta vía.

Por ejemplo el protooncogen *c-sis* fué identificado inicialmente en su forma viral como un gen de transformación aguda del virus de sarcoma de simio, se ha encontrado éste mismo oncogen como parte del sistema genético que produce el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (FCDP).

De modo similar el gen *c-fms* el cual codifica una proteína en el DNA normal la cual es receptor del factor estimulante de colonias (FEC). Por su parte los protooncogenes de la familia *myc* actúan estimulando ó inhibiendo el proceso de regulación, replicación y síntesis de DNA.

En el genoma de las células malignas se producen los diferentes cambios genéticos que activan a los oncogenes, ya sea mutaciones puntuales ó rearrreglos cromosómicos en gran escala; no así en el genoma de células de tejido normal adyacente.

Es evidente que estas lesiones convierten a una célula normal como precursora de toda la población celular del tumor.

Estas mutaciones somáticas no tienen ningún efecto sobre las células germinales y no se transmiten genéticamente a la progenie de un organismo afectado.

Los oncogenes no son transmitidos en la línea de células germinales por lo que no contribuyen en los factores hereditarios conocidos que influyen en la susceptibilidad al cáncer ó tumor (9, 10).

En cuanto a la clasificación de los tumores, los que se caracterizan por una proliferación excesiva de sus células con el consiguiente crecimiento expansivo, sin presentar malignidad son llamados tumores benignos, y los que se caracterizan por una proliferación invasiva, con formación de metástasis local y a distancia destruyendo al huésped son llamados tumores malignos.

Existe otra clasificación que toma en cuenta el tejido originario y el caracter benigno ó maligno del tumor, así tenemos los tumores malignos de origen epitelial que se denominan carcinomas y los del tejido conectivo denominados sarcomas (Tabla 1).

Los carcinomas y sarcomas pueden aparecer en cualquier región del organismo donde existe epitelio ó tejido conjuntivo. Otros tumores se hayan confinados a un órgano ó aparato, dentro de éste tipo de tumor tenemos a los del tejido hematopoyético, éste grupo incluye los tumores del tejido linfoide y de la médula ósea. Los miembros principales de éste grupo son el linfosarcoma, el sarcoma de células reticulares, la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple y de gran importancia la leucemia.

TABLA NO.1.- CLASIFICACION HISTOLOGICA DE LOS TUMORES. (BOYD.W,1965).

TEJIDO ORDINARIO	TUMOR BENIGNO	TUMOR MALIGNO
TEJIDOS EPITELIALES		
<i>Epitelio de revestimiento</i>	<i>Papiloma</i>	<i>Carcinoma pavimentoso</i>
<i>Epitelio glandular</i>	<i>Adenoma</i>	<i>Adenocarcinoma</i>
TEJIDOS CONJUNTIVOS		
<i>Fibroso</i>	<i>Fibroma</i>	<i>Fibrosarcoma</i>
<i>Cartilaginoso</i>	<i>Condroma</i>	<i>Condrosarcoma</i>
<i>Oseo</i>	<i>Osteoma</i>	<i>Sarcoma Osteogénico</i>
<i>Adiposo</i>	<i>Lipoma</i>	<i>Liposarcoma</i>
TEJIDO MUSCULAR		
<i>Músculo liso</i>	<i>Leiomioma</i>	<i>Leiomiomasarcoma</i>
<i>Músculo estriado</i>	<i>Rabdomioma</i>	<i>Rabdomiosarcoma</i>
TEJIDO VASCULAR		
<i>Vasos sanguíneos</i>	<i>Hemangioma</i>	<i>Hemangiosarcoma</i>
<i>Vasos linfáticos</i>	<i>Linfangioma</i>	<i>Linfangiosarcoma</i>
TEJIDO LINFOIDE Y HEMATOPOYETICO		
<i>Linfocitos</i>		<i>Linfosarcoma</i>
<i>Células mieloides</i>		<i>Leucemia linfoide</i>
		<i>Mieloma múltiple</i>
		<i>Leucemia mieloide</i>
TEJIDO NERVIOSO		
<i>Neuroglia</i>	<i>Astrocitoma</i>	<i>Glioblastoma</i>
<i>Meduloepitelio</i>		<i>Meduloblastoma</i>
TEJIDO PIGMENTARIO		
<i>Melanoblasto</i>	<i>Melanoma benigno</i>	<i>Melanoma maligno</i>
EPITELIO CORIAL		
<i>Trofoblasto</i>	<i>Mola hidatiforme</i>	<i>Coriocarcinoma</i>
TEJIDOS EMBRIONARIOS		
		<i>Teratoma</i>

II.- CLASIFICACION DE LAS LEUCEMIAS (FAB) Y (MIC).

El rasgo primordial de la leucemia es la proliferación neoplásica de los tejidos leucoblásticos, a consecuencia de lo cual suele haber un gran aumento de glóbulos blancos en la sangre. La leucemia es una de las neoplasias más conocidas y comunes que tiene una alta incidencia en la población infantil y se presenta como una alteración del tejido hematopoyético en el cual se reemplazan los elementos normales por células blásticas que invaden y se acumulan en sangre periférica, nódulos linfáticos, hígado, testículos, ovarios, pulmón y tejido subcutáneo (8, 11, 12)

Es importante tener en cuenta que a pesar de su nombre, la leucemia es una enfermedad de la médula ósea y no de la sangre. El padecimiento puede afectar a tres tipos de células: mielocitos, linfocitos y monocitos.

A partir de esto se estableció una clasificación morfológica que divide a las leucemias en: Leucemia linfoblástica aguda (LLA) que es la forma más común y constituye el 80% de las leucemias, las leucemias no linfoblásticas agudas (LNLA) son las siguientes más comunes y representan cerca del 17% y el resto lo constituye la leucemia mielógena crónica tipo adulto (LMC) y la leucemia mielógena crónica juvenil (13).

Desde 1971 Mathé sugirió en su estudio que la morfología de los linfoblastos estaba relacionada con la respuesta al tratamiento. Su clasificación morfológica en LLA comprendía 4 grupos, los cuales fueron asignados en base al tamaño celular y a ciertos criterios subjetivos de diferenciación celular. Esta clasificación no fue muy práctica de ahí que otros investigadores propusieran nuevos esquemas.

Pentazopoulos y Sinks (1975) propusieron un sistema simplificado basado solamente en el tamaño celular. Lee y Glidewentl establecieron una clasificación basada en la presencia y número de nucleolos, cantidad de citoplasma y presencia de gránulos azurófilos (14).

En 1976 Bennett y cols. (15) establecieron una clasificación integral de la LLA basada en la citología de los blastos vista en la tinción de Romanowsky en frotis de médula ósea donde tomaron en cuenta el tamaño de la célula, relación citoplasma-núcleo, contorno nuclear, presencia de nucleolos y vacuolas y la presencia de basofilia citoplasmática. La clasificación de Bennett dió un criterio más uniforme y relacionado con las características clínicas de cada subtipo de leucemia.

El grupo Franco-Americano-Británico (FAB) en 1985 (16) propone un nuevo criterio para modificar la clasificación establecida en 1976; indicando que las leucemias se dividen en dos grupos: Leucemias linfoblásticas agudas que presenta tres subtipos; L1 que es la forma más común y tiene el pronóstico más favorable, el subtipo L2 es menos común y presenta un pobre pronóstico y la L3 es muy rara y se considera como una fase hematogena del linfoma de Burkitt (Tabla 2). Las leucemias no linfoblásticas agudas (LNLA) que presenta siete variantes: leucemia mieloblástica sin maduración (M1), mieloblástica con maduración (M2), promielocítica (M3), monocítica (M4), monoblástica (M5) y eritroleucemia (M6), que al igual que las LLA se diferencian entre sí debido a las características citomorfológicas de los blastos de médula ósea anteriormente mencionadas.

La presencia del 30% ó más blastos en frotis de médula ósea es por definición una leucemia aguda. La mayoría de los niños que presentan LLA pueden tener más del 80% de sus células de médula ósea con características de linfoblastos. Por su parte en la LNLA es común observar la presencia del 50% de blastos en médula ósea.

La mayoría de las leucemias agudas infantiles (85%-90%) pueden ser fácilmente separadas en los subtipos mielóide y linfóide en base a la simple morfología.

Los pequeños mieloblastos algunas veces llamados microblastos pueden ser confundidos por linfoblastos. Contrariamente los grandes linfoblastos con una baja relación citoplasma-núcleo, prominente nucleolo y la presencia de gránulos citoplasmáticos pueden ser erradamente clasificados como células mieloides pero en muchos casos el diagnóstico se basa en la morfología. El diagnóstico final de la LLA puede ser confirmada con los patrones de las tinciones citoquímicas

TABLA 2. CLASIFICACION MORFOLOGICA DE LA LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA LLA.

CARACTERISTICAS

CITOLOGICAS	L1	L2	L3
TAMANO DE LA CELULA	<i>Predominan células pequeñas.</i>	<i>Grande, tamaño homogéneo.</i>	<i>Grande y homogéneo.</i>
CROMATINA NUCLEAR	<i>Homogénea en cualquier de los casos</i>	<i>Variable-heterogénea en -- cualquiera de los casos.</i>	<i>Punteado fino.</i>
FORMA NUCLEAR	<i>Regular, a veces dentado ó con hendiduras.</i>	<i>Irregular, hendidura y dentado frecuente.</i>	<i>--</i>
NUCLEOLO(S)	<i>Invisibles ó pequeños.</i>	<i>uno ó varios a menudo grandes.</i>	<i>Prominente; uno ó varios vesiculares.</i>
CANTIDAD DE CITOPLASMA	<i>Escasa</i>	<i>Variable a menudo moderadamente abundante.</i>	<i>Moderadamente abundante.</i>
BASOFILIA DEL CITOPLASMA	<i>Leve a moderada (raramente intensa).</i>	<i>Variable; profunda en algunas.</i>	<i>Muy profunda.</i>
VACUOLACION CITOPLASMICA	<i>Variable</i>	<i>Variable</i>	<i>A menudo importante.</i>

(técnica de Peroxidasa, Acido Periódico Shiff (PAS) y Fosfatasa ácida) las cuales diferencian con mayor precisión las dos variedades (Ver apéndice I). En algunas situaciones se utilizan estudios inmunológicos y citogenéticos (17).

Otra clasificación para las LLA fué establecida por el grupo cooperativo MIC (Morfológico-Immunológico-Citogenético) en 1986 donde el criterio de clasificación está basado principalmente en las características morfológicas de los blastos de médula ósea y en la tipificación de los subtipos de leucemia con la ayuda de marcadores inmunológicos (Anticuerpos monoclonales) los cuales son específicos para cada tipo celular, así tenemos que existen anticuerpos monoclonales (CALLA, CD4, CD6, CD8, etc) que van a reaccionar con antígenos de superficie (Ig-s), de membrana (Ig-m) y citoplasmáticos (Ig-c). Esta clasificación sirve para establecer un criterio de clasificación más preciso, en adición con el estudio citogenético, completa, apoya y reafirma el diagnóstico clínico. Por ejemplo en una LLA donde inmunológicamente se detectan células del tipo pre B típicas en L1, citogenéticamente se espera encontrar alteraciones cromosómicas tales como t(9;22); t(1;19), etc. Otro ejemplo lo tenemos con la leucemia aguda de células tipo B donde existe una reacción inmunológica positiva con la Ig-s donde es común encontrar la t(8;14) perteneciente al subtipo L3 (18).

III.- ETIOLOGIA Y EPIDEMIOLOGIA DE LA LEUCEMIA.

Por otra parte la leucemia se diferencia del resto de las neoplasias porque ésta se presenta con mayor frecuencia durante las dos primeras décadas de vida, menos del 1% de los cánceres se presenta en éste período. De todos los tipos de leucemia la LLA es la que tiene la mayor incidencia en la población infantil ya que representa de un 78 a 89% de cáncer en niños (19) (tabla 3).

La LLA es una enfermedad tanto de niños como de adultos, teniendo su punto máximo inicial de incidencia entre los 3 y 5 años de edad, después de éste intervalo la incidencia declina y vuelve a elevarse durante el tercer decenio de vida.

TABLA NO.3.- INCIDENCIA DE CANCER EN NIÑOS MENORES DE 15 AÑOS DE EDAD.

ORDEN	SITIO	NUMERO DE CASOS	% DEL TOTAL	FRECUENCIA (POR 1,000,000)
1	Leucemia	1724	30.1	37.8
2	S.N.C	1095	19.1	24.1
3	Linfoma	706	12.3	15.5
4	S.N.S	467	8.1	10.4
5	Riñón	372	6.5	8.2
6	Tejidos B.	360	6.3	7.9
7	Hueso	276	4.8	6.1
8	Retinoblastoma	154	2.7	3.4
9	Hígado	64	1.1	1.4

De Siverberg E, Lubera J: *Cáncer Statistics 1986* *Cáncer* 36:9-25,1986.

La importancia etiológica del nivel máximo inicial de incidencia de la LLA de la infancia no es clara, aunque se ha especulado que está relacionada con eventos gestacionales ó en el desarrollo inicial del sistema inmune. Es importante señalar que éste punto máximo no se produce uniformemente en todo el mundo, pues en definitiva no existe en Africa.

La LLA es más frecuente en varones que en mujeres, patrón que persiste a través de fronteras raciales y geográficas. La incidencia anual en varones menores de 15 años es de 22.3/millón y en mujeres de 15.7/millón. En la LLA de células T éste predominio es mucho más evidente y los varones superan a las mujeres en casi 4:1 y teniendo las mujeres mayor sobrevida libre de enfermedad.

El nivel socioeconómico puede reflejar muchas influencias de exposición genética donde se ha sugerido que la LLA es una enfermedad predominante de niños de clase media y media alta.

Otro factor etiológico se ha considerado a la raza, observandose que la aparición de LLA en blancos es del 20-30% mayor que en personas de color con una frecuencia menor en Africa y en el Medio Oriente e índices más elevados en China, Japón, E.U, Inglaterra y Europa.

Existen estudios que han apoyado a la posible influencia de factores ambientales en la determinación de la expresión de la malignidad. Esto se inicia con el período de exposición potencial el cual es un período de riesgo precedente al momento del nacimiento y potencialmente el de la concepción.

El período prenatal puede ser de interés particular debido a la diferenciación natural de las células primitivas y a la sensibilidad potencial del feto a influencias exteriores durante ésta fase crítica del desarrollo.

Muchos autores han encontrado que los antecedentes reproductores maternos están asociados con el riesgo de la LLA. En un estudio con control de casos Van Steensel-Moll (1988) encontró que las madres de

pacientes con LLA tenían un aumento estadísticamente significativo en la manifestación de dos ó más abortos anteriores al nacimiento del niño índice.

El riesgo de LLA pareció estar más asociado con el resultado del embarazo inmediatamente anterior al del niño leucémico, se especula que éstos eventos en términos generales son marcadores ya sea de una exposición ambiental común, un ambiente intrauterino anormal ó una predisposición genética que pone a éstos niños en un mayor riesgo de padecer LLA. Se han comunicado resultados similares que demuestran un riesgo hasta de 2.2 veces mayor entre niños de madres con una historia de pérdida fetal previa.

Se ha observado que otro factor asociado a la LLA es el peso del producto al nacimiento, en varios estudios se ha mostrado un riesgo doble en los niños con peso al nacer superior a 4,000 gramos. Aunque no siempre se ha reproducido éste hallazgo parece ser uniforme a través del tiempo y la geografía y en algunos casos se ha asociado con algunos cánceres infantiles (Tumores encefálicos y neuroblastoma).

Otros estudios han evaluado los riesgos de los anticonceptivos orales, drogas y medicamentos usados para mantener el embarazo, donde se sabe de un caso de leucemia que se originó en el producto de una madre que estuvo expuesta al dietiestilbestrol mientras el niño estaba in utero.

Se ha observado un riesgo mayor del 50% de niños expuestos a tabaquismo in utero, así como una elevada asociación entre el uso alterno de alcohol y la LLA, no obstante éstos hallazgos deberdn ser confirmados en investigaciones futuras.

Uno de los temas más estudiados es la exposición a la radiación ionizante y a la aparición subsecuentes de la LLA en la infancia. Stewart en 1958 encontró por primera vez que la exposición prenatal a la radiación ionizante era un factor etiológico de la LLA. A partir de entonces muchos otros investigadores han encontrado un efecto similar con un riesgo de 1.5 a 2 veces mayor que el de una población no expuesta.

La radiación postnatal ya sea con fines diagnósticos ó terapéuticos, por ejemplo para el tratamiento de padecimientos benignos ó malignos, se ha asociado con un mayor riesgo de LLA en niños que han sido tratados con rayos x por espondilitis anquilosante teniendo un riesgo de casi 10 veces mayor de LLA. También se han reportado casos en niños que han sido tratados con radiaciones por enfermedades benignas, por ejemplo crecimiento de timo así como los que han recibido radiaciones terapéuticas para el tratamiento de malignidades hematológicas como en el caso de la enfermedad de Hodgkin.

La exposición a catástrofes nucleares (Hiroshima y Nagasaki y recientemente Chernobyl), la precipitación radiactiva por pruebas nucleares, exposición ocupacional en las plantas nucleares ó la residencia en áreas con un fondo natural elevado de radiación han sido objeto de muchas investigaciones. En los niños expuestos a las explosiones atómicas se observó un mayor riesgo de presentar tanto LLA como LMA.

Las características de la leucemia también parecen depender de la edad ya que los niños y los adolescentes presentan mayor probabilidad de desarrollar LLA y LMC, mientras que en adultos la tendencia es a desarrollar LNLA.

También ha sido estudiada la posible asociación entre la exposición a campos electromagnéticos (ECE) y la LLA infantil debido en parte a la exposición de los individuos a éstos campos y por datos in vitro que describen anomalías cromosómicas y transformación linfoblastoide de líneas celulares expuestas a éstos campos.

Datos iniciales de un estudio con control de casos realizado en Denver sugieren un aumento de 2 ó 3 veces en el riesgo de desarrollar leucemia y otros cánceres en los niños que viven cerca de circuitos de alta conducción.

Un estudio en Texas demostró que los padres de niños con neuroblastoma se empleaban más en ocupaciones con grados elevados de exposición a campos electromagnéticos, y un estudio escandinavo encontró que padres de niños con cáncer estaban empleados en diversas ocupaciones relacionadas con hidrocarburos.

Esto conyeva a que los hijos estén expuestos a materiales carcinogénicos, sustancias químicas y solventes como resultado del material acarreado en la ropa y objetos utilizados por los padres en el trabajo.

Por otra parte se ha observado una elevada mortalidad infantil por leucemia en los estados agrícolas de Estados Unidos donde se ha evaluado metodológicamente las prácticas de las granjas y la aparición de leucemia y linfomas considerando la exposición potencial de los granjeros a herbicidas, pesticidas y virus zoonóticos, como el virus de la leucemia bovina (VLB), que ha sido considerado como un leucemógeno potencial debido a sus hallazgos en el ganado y en la leche cruda (Tabla 4).

Los virus pueden contribuir a la transformación maligna y a la etiología retroviral del cáncer. En los últimos años se ha visto que el virus de la leucemia felina puede infectar una célula y como parte de su ciclo vital integrarse en el DNA del huésped. Cuando ésta integración se produce en proximidad a un protooncogen, su presencia puede desregular la expresión de éste protooncogen. La demostración clásica de éste fenómeno es la desregulación de c-myc por la integración del virus de leucosis aviaria.

La infección retroviral puede iniciar una enfermedad aguda y a menudo polifocal, se piensa que esto sucede cuando el retrovirus se separa del DNA del huésped ó es transcrito de manera que una parte del genoma del huésped se incorpora dentro del material genético (en replicación autónoma) del virus. En la actualidad hay múltiples ejemplos de éste fenómeno causal del cáncer y de hecho fué el estudio de los genes de virus lo que definió el término de oncogen (20).

TABLA NO.4.- FACTORES DE RIESGO PARA LA LLA INFANTIL.

DEMOGRAFICOS:

Sexo: Varón.

Edad materna avanzada.

Historia reproductiva materna: Pérdida fetal previa.

Aumento del peso corporal.

(Orden de nacimiento: Primogénito).

(Edad paterna avanzada).

(Clase social).

EXPOSICIONES PRENATALES:

Exposición a radiación diagnóstica.

Uso materno de anticonceptivos orales.

Infecciones virales in utero.

EXPOSICIONES AMBIENTALES:

Radiación terapéutica.

(Precipitación radiactiva de pruebas nucleares).

(Exposición a campos electromagnéticos).

(Infección posnatal ó falta de).

(Hidrocarburos y productos de petróleo).

(Zoonosis).

(Exposición a pesticidas y herbicidas).

GENETICOS/FAMILIARES:

Gemelo de paciente leucémico.

Hermano de paciente leucémico.

Síndrome de Down.

Anemia de Fanconi.

Ataxia Telangiectasia.

Neurofibromatosis.

Síndrome de Klinefelter.

Síndrome de Bloom.

Los factores de riesgo mostrados entre paréntesis han sido comunicados por uno ó más investigadores.

La incidencia familiar de la leucemia a sido otro aspecto comunicado con frecuencia y resumida recientemente por Lynet que ha observado que las leucemias son parte del grupo de cánceres que caracterizan al "síndrome de cáncer familiar". en términos generales el riesgo de leucemia en hermanos de niños con LLA es 4 veces mayor que el de la población general.

Entre otros grupos de individuos identificados con un elevado riesgo de presentar LLA están los casos de síndrome de Down que constituyen el 2% de los casos diagnosticados con LLA. Se estima que los niños con éste síndrome tienen un riesgo de 10 a 15 veces mayor de desarrollar leucemia. (Op. cit.)

ANTECEDENTES.

Durante los últimos 30 años los citogenetistas han descrito un número siempre creciente de anomalías cromosómicas asociadas específicamente con las células tumorales de pacientes con diferentes cánceres entre ellos la LLA. (21).

Los primeros estudios citogenéticos en individuos con LLA, cuya finalidad fue la detección y análisis de los defectos cromosómicos fueron limitados en número, debido en gran parte a la pobre calidad de las metafases de células neoplásicas en contraste con la buena calidad de las células normales de médula ósea y sangre periférica, sin embargo, los avances en los estudios citogenéticos y citoquímicos permiten el conocimiento y clasificación de la LLA y establecer su comportamiento biológico (22).

Los iniciadores de éstos estudios fueron Nowell y Hungerford (1960) quienes identificaron el cromosoma Filadelfia (Ph1+) en LMC y posteriormente identificada también en LLA, la aberración fue definida por bandeo como 22q- y posteriormente fue demostrado que era una translocación entre los cromosomas 9 y 22, t(9;22) (q34;q11). (23).

El cromosoma Filadelfia inicialmente fue reportado como una alteración exclusiva de la LMC pero las altas incidencias reportadas por Paterson, Bloomfield, Brunning (1976), indican que el 33% de los pacientes con LLA pueden presentar ésta alteración (24).

Knudsen y Huang Pen (1980) reportan los siguientes trabajos : Con respecto a otro tipo de alteración cromosómica, en 1972 Manolov y Manolova, describieron una anomalía cromosómica específica, 14q+ en el Linfoma de Burkitt. Posteriormente fue demostrado que la anomalía involucraba la t(8;14) (q24;q32).

En 1974, Huang et. al. reportaron el primer estudio de bandeo cromosómico en LLA. Encontraron una línea celular pseudodiploide en cultivos de sangre periférica. Las tinciones de Wright revelaron dos marcadores: un cromosoma submetacéntrico grande y uno pequeño en el 90% de las células analizadas. Los estudios de bandeo revelaron 4 marcadores con un cariotipo 46,XX,t(4p+;4p-) y 46,XX,t(11p+;14p-).

Alimena et.al (1977) reportaron tres casos de LLA de un total de 51 casos de leucemia estudiados antes de suministrar cualquier tipo de terapia. Estos individuos mostraron hipodiploidias e hiperdiploidias pero también mostraron cariotipos normales en la mayoría de sus células. Los casos con un alto porcentaje de aneuploidias (25%) fueron los únicos que no respondieron a la terapia.

El grupo de Oshimura (1977) reportó el caso de una niña de 13 años con diagnóstico de LLA. El estudio citogenético realizado antes de la terapia reveló una línea hipodiploide con 27 cromosomas en el 70% de las células de médula. Los únicos pares de cromosomas normales fueron los Nos. 10, 14, 18 y 21, además se encontró una alteración estructural, la 7p+, la cual se presentó antes de la terapia y esta alteración fue reemplazada por un cromosoma normal en la remisión y en la recaída subsecuente. Este caso mostró una línea celular con 54 cromosomas la cual se considera como resultado de la duplicación de la línea con 24 cromosomas. Esta línea estuvo presente en la mayoría de las células de médula durante el diagnóstico, desapareció en la remisión y fue vista en menor porcentaje en médula ósea 9 meses después.

Secker-Walker y cols.(1978) fueron los primeros en presentar la evidencia de que el número cromosómico (ploidia) de las células leucémicas tienen un gran valor diagnóstico y pronóstico en LLA. En su estudio realizado en 39 niños demostraron que los hallazgos citogenéticos tienen implicaciones diagnósticas y biológicas. El punto importante de este trabajo fue que los hallazgos citogenéticos fueron clasificados de acuerdo a las características cromosómicas de las células leucémicas de médula ósea. Las características incluyeron: Hiperdiploidias, Hipodiploidias y Pseudodiploidias. Usando la prueba estadística de Log Rank la proporción de pacientes en primera remisión en cada categoría no fue igual, la proporción de pacientes con hiperdiploidias fue elevada mientras que aquellos con Pseudo e hipodiploidias fue consistentemente menor.

En otro estudio, Humbert y cols.(1978) compararon el porcentaje de metafases anormales en cultivos de médula ósea y sangre periférica con y sin estimulación con Fitohemaglutinina (PHA). De 69 pacientes con

leucemia aguda (de los cuales 55 tuvieron LLA) a solo 3 se les realizó el estudio de bandedo detallado. Los tres presentaron un elevado número de células anormales en sangre con estimulación y en médula ósea, mientras que en sangre sin estimulación el porcentaje de células alteradas fué mucho menor.

Morse et.al.(1978) reportaron los hallazgos de dos casos de LLA. En el primer paciente de 8 años se observaron dos líneas celulares anormales: una con 57 cromosomas en células de sangre periférica sin estimulación y otra con 47 cromosomas en sangre con estimulación. Después de la remisión la línea con 57 cromosomas virtualmente desapareció, pero la línea con 47 apareció tanto en sangre sin estimulación como en médula. En el segundo paciente femenino de 5 años se encontraron marcadores: una clona 47,XX,M1 en células de médula y sangre sin estimulación. En la remisión apareció una clona relacionada, 50,-X,-11,+M1,+M2,+M3,+M4,+M5,+M6 la cual se observó en cultivos de sangre con y sin PHA.

Lazarus en el mismo año, reportó un caso donde los cultivos de blastos mostraron una línea celular con un cariotipo 45,XX+Mar, con los estudios de bandedo se observó que la línea establecida mostraba un cariotipo 46,XX,t(9;12).

Un caso con hipodiploidias fue presentado por Prieto et.al(1978). Un niño de 14 años de edad presentó una línea celular de 26 cromosomas en médula ósea durante toda la evolución del padecimiento, lo cual influyó notablemente en la respuesta a la terapia. No fué posible realizar el estudio de bandedo cromosómico pero de acuerdo a la tinción Giemsa solo los cromosomas de los grupos D y G parecieron tener sus pares completos.

Observando estos casos es difícil determinar si existe relación entre la ploidia y la sobrevivencia, pero resulta de interés que estos casos recayeron a un año del diagnóstico, además de la semejanza de los cariotipos de los casos de Cimino y Prieto et al. (1978) donde tres de los pares de cromosomas eran comunes, lo que sugiere que los cromosomas 10,18 y 21 pueden ser necesarios para la sobrevivencia y proliferación de las células malignas.

En los estudios de bandeo realizados por Cimino et.al(1979) en 16 pacientes con LLA estudiados durante 4 años, se observó que 8 pacientes tuvieron un cariotipo normal en el estudio basal, sin embargo, 3 de ellos desarrollaron alguna alteración cromosómica durante la recaída. Los 8 pacientes restantes presentaron alteraciones numéricas y/o estructurales en la muestra inicial de médula.

En las aneuploidias de estos pacientes se involucraban a todos los cromosomas excepto los Nos.3,5,15,16 y Y produciéndose pseudodiploidias ó hipodiploidias.

Aún cuando se realizaban investigaciones citogenéticas en cáncer, la información era limitada debido a las deficiencias técnicas de los cultivos y del bandeo cromosómico en LLA. Por ésta razón el Grupo Internacional de Trabajo sobre Cromosomas en Leucemia examinó estos problemas técnicos y propuso nuevas ideas para resolverlos, proveyendo datos importantes en el área y los cuales eran útiles para LNLA (25,26).

Por su parte Yunis (1981) establece cambios en las técnicas de cultivo de células de médula ósea y sangre periférica con la finalidad de obtener metafases con mayor calidad para poder realizar un análisis cromosómico más detallado utilizando técnicas de alargamiento de cromosomas y de alta resolución las cuales sirven para obtener cromosomas de mayor tamaño y así poder detectar con mayor precisión las alteraciones estructurales (27).

A partir de este trabajo, Yunis realizó otro donde indica que existen más de 20 tumores, donde se han encontrado alteraciones cromosómicas indicando que un caso particular son las LLA las cuales son un subgrupo de leucemias que están bien caracterizadas en cuanto a los defectos cromosómicos los cuales en ocasiones son específicos para cierto tipo de LLA y esto tendrá efecto en el pronóstico del padecimiento (28).

Otro de los estudios importantes fue el realizado por Berger et. al (1981) quien hace una revisión y un registro general de las alteraciones citogenéticas en LLA y otras enfermedades hematológicas. Berger remarca la importancia de la aplicación práctica de la

citogenética en hematología, indicando que las alteraciones citogenéticas sirven para el diagnóstico clínico, para la aplicación adecuada de la terapia además del monitoreo citogenético que en ciertos casos puede indicar la evolución del padecimiento (29).

En relación a la importancia pronóstica de las alteraciones cromosómicas en LLA, Brodeur et.al(1981) indican que los niños con LLA que presentan translocaciones, otras Pseudodiploidias e hipodiploidias tienen una sobrevida libre de enfermedad significativamente corta en comparación a los niños con hiperdiploidias ó aquellos que tienen un cariotipo normal y cuya sobrevida es mucho mayor.

Williams et.al(1982) en su trabajo sobre la importancia biológica y pronóstica del estudio citogenético realizó un estudio citogenético en 136 niños con LLA los cuales eran vírgenes al tratamiento, encontró que los casos con un número cromosómico hiperdiploide tienen excelente pronóstico y los casos con hipo y pseudodiploidia que ocurren en solo el 1% de los individuos, frecuentemente presentan monosomias de algunos cromosomas excepto los No.10,14,18,21 y X, muchos de estos pacientes nunca entraron en remisión y su sobrevida fué muy corta (Op.cit).

Por otra parte, Andrew et.al(1984) realizaron un análisis cromosómico en 60 pacientes pediátricos con LLA los cuales presentaban células de tipo pre B, B, T y células nulas, ésta clasificación se realizó mediante las técnicas inmunológicas de anticuerpos monoclonales. En 4 de 17 pacientes con células pre B se encontró la $t(9;22)(q23;q13)$ la cual no fué observada en otro tipo de células. Cada paciente que presentó dicha alteración experimentó un fracaso temprano al tratamiento por lo que ésta alteración marcó un subgrupo de pacientes con LLA de células pre-B quienes tienen un pronóstico especialmente pobre (30).

Dos años más tarde, Stass(1986) menciona que los estudios citogenéticos, inmunológicos y de cinética del ciclo celular son necesarios para establecer el significado biológico de las diferentes variantes morfológicas de la leucemia aguda, además indicando que los

pacientes con linfoblastos tipo L2 pueden tener una no diferenciación, mezcla ó hibridación de diferentes tipos celulares(31).

Williams en el mismo año, indica la relación del papel que juegan las translocaciones en el pronóstico en niños con LLA. Reporta que aproximadamente el 40% de los individuos con leucemia presentan una clona leucémica aneuploide, esto es, una clona conteniendo un número mayor ó menor del número cromosómico diploide.

En su estudio, aproximadamente el 35% de los niños tuvieron células leucémicas con un complemento diploide normal y del 10 al 20% de los casos las metafases no fueron distinguibles para un análisis detallado del cariotipo. En el grupo aneuploide, más del 90% fueron hiperdiploidias y menos del 10% hipodiploidias (demostrando que la ploidia cromosómica es el signo más importante en el factor pronóstico como determinación por medio de análisis multivariado) (Op.Cit).

Por su parte Leiper y Chessells (1986) realizaron un trabajo donde uno de los puntos más importantes es el determinar la incidencia de la LLA en individuos menores de 2 años de edad, observando que en éste período, la frecuencia de la leucemia es más alta y se mantiene aproximadamente hasta los 6 años y posteriormente desciende. Además realizaron el estudio citogenético e hicieron la relación con los factores diagnósticos y pronósticos (32).

Bloomfield.et.al.(1987), en un reporte del comité sobre cambios cromosómicos estructurales en neoplasias, indica que las anomalías cromosómicas específicas más comunes identificadas en LLA han sido la $t(9;22)(q34;q11)$, $t(11;14)(p13;q13)$, deleciones involucrando al $12p12$ y translocaciones ó inversiones involucrando al $14q11$, por ejemplo, $t(8;14)(q24;q11)$ y la $t(10;14)(q24;q11)$.

Estas alteraciones son específicas tanto para LMA como para LLA y han sido asociadas con características distintivas, clínicas ó hematológicas incluyendo edad, relación con sistema nervioso central, conteo de leucocitos, porcentaje de blastos circulantes y tipo morfológico (FAB) (33).

Estudios más recientes como el de Miller (1988), mencionan las características biológicas de la leucemia y el uso de dichos conocimientos en la aplicación adecuada del tratamiento. Su estudio contempla una revisión de los recientes avances en la biología, etiología y terapia de la LLA infantil, también muestra la relación que existe entre las características clínicas y biológicas, una discusión entre los aspectos controversiales del tratamiento y del manejo así como el establecimiento de futuras perspectivas (34).

Otros investigadores que analizaron los aspectos biológicos de la LLA infantil además del citogenético fueron Batia y cols. (1988). Analizaron 30 casos de leucemia aguda de los cuales 24 presentaron LLA. Tomaron en cuenta características clínicas, pruebas citoquímicas, inmunológicas y citogenéticas. La evaluación citogenética efectuada en 10 pacientes con LNLA y en 5 con LLA no fué adecuada debido a la mala calidad de las metafases, pero se pudieron detectar una serie de translocaciones: $t(11;17)$, $t(4;11)$, $t(4;7)$, $t(4;19)$ en 4 recién nacidos y la $t(1;13)$ y $t(11;14)$ en niños de mayor edad. Estas alteraciones estuvieron asociadas a tipos específicos de LLA, con ciertas características morfológicas y con ciertos grupos de edad, además con el curso clínico y el pronóstico del padecimiento (35).

Por su parte Berrospe, Sole, Mirro et. al. (1988) hacen una importante observación diciendo que existen 2 tipos de alteraciones cromosómicas relacionadas con la neoplasia: las primarias que son anomalías relacionadas con la etiología y con la localización y activación de oncogenes y las alteraciones secundarias las cuales son las responsables del comportamiento biológico del tumor, capacidad invasiva, metastásica, y resistencia a la terapia y probablemente responsables de las características genotípicas y de heterogeneidad de las células tumorales. Indican que el objetivo principal de la citogenética en cáncer consiste en establecer tanto las alteraciones cromosómicas primarias y secundarias y relacionadas con los parámetros biológicos, etiológicos, de pronóstico, clínicos, patológicos y terapéuticos. Por último realiza un registro de las alteraciones cariotípicas más comunes en los subtipos de LLA y su relación con las características biológicas y de pronóstico. (Tabla 5) (36).

Tabla 5.- CAMBIOS CROMOSOMICOS EN LLA.

L1	t(9;22)(q34;q11) (Ph-1) Proximo a haploide t(1;19)(q21-q23;p13.3) t(14;-)(q32;-)
L2	t(4;11)(q21;q23) Ph-1 6q- +21 +8 i(17q) 7p- 11q- t(14;-)(q32;-) t(11;-)(q;-)
L3	t(8;14)(q24;q32) t(8;22)(q24;q11 o 12) t(2;8)(p12;q24) t(1;8;14)(q23;q24;q32) o t(3;8;14)(q14;q24;q32)6p-, 1q+, o +8/+8, 14q+.

(Berrospe y cols.1988).

En nuestros días con el establecimiento e innovación de las técnicas citogenéticas (y con la ayuda de la biología molecular), los investigadores han podido identificar anomalías clonales que van desde alteraciones estructurales muy grandes, mutaciones que involucran cientos de genes y en ocasiones mutaciones puntuales, en el caso de la LLA se han detectado cromosopatías en el 80% de los casos diagnosticados tal como lo reportan Williams et. el. (1990) quienes han identificado anomalías cromosómicas específicas en más del 90% de los casos de LLA infantil.

Nyala et. al. (1990) en su trabajo sobre anomalías citogenéticas y marcadores moleculares de la LLA explican que las anomalías que ocurren en la LLA son contempladas como causas biológicas (leucemogénesis) de ésta enfermedad. La LLA es extremadamente heterogénea e indica que diferentes tipos celulares a diferentes estados de diferenciación pueden llegar a ser células neoplásicas además de que las anomalías cromosómicas son altamente específicas para ciertos tipos celulares (38).

Crist, Carroll et.al.(1990), realizaron un estudio sobre el cromosoma Filadelfia en LLA y analizaron las características clínicas y citogenéticas y la respuesta al tratamiento en un grupo de estudio pediátrico con 3638 niños (en un protocolo establecido de junio de 1981 a abril de 1989). Los estudios citogenéticos fueron viables en 4 pacientes (2.37%). Las características asociadas con el Ph positivo fueron el conteo de leucocitos que en la mayoría tuvo una media de 33,000/mm³, edad de 9 años y con una elevada proporción de células con morfología L2.

La LLA con cromosoma Ph⁺ es una forma agresiva de la leucemia aguda que frecuentemente se presenta en niños mayores de 5 años, con un elevado conteo de leucocitos, morfología L2 y con una resistencia temprana a las drogas (39).

Ching Hon, Carroll y cols. en 1990, presentaron un estudio citogenético en 1971 niños con LLA del Hospital St. Jude for Childrens de Memphis Tennessee. A éstos pacientes se les realizaron estudios detallados de morfología de blastos e inmunotipificación, determinación

del contenido de DNA mediante la técnica de flujo citométrico y el análisis cariotípico. De los 1971 pacientes, 26 (1.3%) presentaron una línea celular leucémica con un cariotipo con más de 65 cromosomas, también se encontraron 2 grupos con alteraciones cromosómicas:

El grupo cercano a la triploidia presentó 6 casos los cuales tenían un intervalo de 66 a 73 cromosomas por célula de médula ósea, de éstos 4 presentaron alteraciones estructurales adicionales. En 2 casos se encontraron 5 copias del cromosoma 21 y las tetrasomías más comunes fueron de los cromosomas 8, 10, 11, 14, 18 y 21.

El otro grupo fue el cercano a la tetraploidia el cual tuvo 20 casos donde el número modal fue de 82 a 94 cromosomas por célula. Las tetrasomías presentes fueron las de los cromosomas 5, 8, 10, 11, 12, 18, 19, 20, 21 y los cromosomas sexuales. De los 10 casos bandeados fue posible identificar anomalías estructurales en 9 pacientes: del(6q) en 3 casos, del(9p) En dos y la t(4;11) en un caso (40).

Nuevamente Rowley (1990) realiza una minuciosa revisión y enumera los diferentes cambios cromosómicos en leucemia, linfomas y otros síndromes mieloproliferativos. Realizó la correlación entre los grupos específicos con la alteración citogenética y con esto se ha podido establecer una mejor clasificación de la LLA. Mencionando también que la mayoría de las metafases de individuos con LLA tienen una muy pobre morfología lo cual hace que el análisis cromosómico sea muy difícil y en ocasiones imposible (41).

Un trabajo más, realizado por Carroll, Crist; et. al (1990) reporta los resultados citogenéticos de un grupo de niños con LLA de células pre-B que presentaron la alteración cromosómica t(1;19)(q23;p13) en células de médula ósea, tomando en cuenta las características clínicas de los individuos, las características morfológicas (FAB) y la clasificación inmunológica, observando que un elevado número de pacientes tuvieron recaídas tempranas y su pronóstico fue pobre. (42).

Suhster, Falleta y Cols. en el mismo año mencionan que la leucemia aguda de células T es un tipo leucémico en el cual dependiendo de la alteración cromosómica que se presente manifestará ciertas características que darán un valor pronóstico específico tomando

en cuenta que los individuos que presentan alteraciones estructurales tendrán un pobre pronóstico en comparación con aquellos, con alteraciones numéricas u otro tipo de *aploidias* (43).

Un trabajo similar fue realizado por Pui, Behm, et. al (1990) donde se estudiaron 128 niños con LLA de células T y se observó una gran heterogeneidad en las características citomorfológicas y citogenéticas lo cual tuvo una marcada relación con los estudios diagnósticos y de respuesta al tratamiento. También realizó un análisis en individuos con LLA infantil donde se encontró con un grupo de pacientes con una clona celular de médula ósea con un complemento cromosómico Hipodiploide y/o Haploide (23-35 cromosomas), manejó la correlación clínico-citogenética de cada caso y analizó los resultados del tratamiento aplicado al grupo de pacientes (44).

Por último, el trabajo presentado por Berger et. al (1990) con un grupo de pacientes con leucemia y con el cromosoma Filadelfia determinado por medio del análisis citogenético en células de médula ósea y sangre periférica. En éste estudio se realizó la identificación de los genes involucrados en dicha alteración con la ayuda de las técnicas de biología molecular, localizando a los genes *bcr* y *abl* de los de cromosomas 9 y 22, los cuales al unirse producen una proteína híbrida con un funcionamiento anormal (45).

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACION DEL PROBLEMA.

En México, los laboratorios que realizan los estudios citogenéticos en leucemia linfoblástica aguda son muy escasos debido a la poca importancia que se da a esta información aún cuando la incidencia de éste padecimiento es muy alta en la población infantil, particularmente en el Hospital General Centro Médico La Raza del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) donde se reciben más de 200 casos de leucemia aguda al año. Para su estudio y clasificación de los subtipos de leucemia se cuenta con recursos elementales que incluyen diagnóstico clínico, análisis citomorfológico con microscopía de luz y pruebas citoquímicas, sin embargo, no se cuenta con el establecimiento ni la realización de estudios citogenéticos cuyas técnicas ofrecen información importante para apoyar el diagnóstico clínico además de que el estudio citogenético es útil en el conocimiento biológico de los cambios genéticos en las células leucémicas y así establecer los grupos de anomalías cromosómicas (numéricas y estructurales) las cuales sirven de marcadores genéticos e indicadores pronósticos útiles para determinar la evolución del padecimiento y en la selección e innovación de los regímenes de tratamiento (46, 47).

OBJETIVO GENERAL.

- Realizar el estudio citogenético y registrar las alteraciones cromosómicas presentes en la población pediátrica con LLA sin tratamiento previo.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Determinar mediante el estudio citoquímico la estirpe celular alterada y así establecer el tipo morfológico de leucemia en cada individuo.
- Realizar el estudio citogenético y mediante las técnicas de bandeo GTG y CBG identificar las alteraciones numéricas y estructurales de los cromosomas de células de médula ósea y sangre periférica (con y sin estimulación con fitohemaglutinina) de individuos con LLA sin tratamiento previo.
- Correlacionar los estudios citoquímicos, citogenéticos y datos clínicos para tratar de establecer una clasificación más precisa del tipo de LLA y con ésto apoyar el diagnóstico clínico para que la terapéutica sea la más adecuada en intensidad y calidad en relación al tipo de leucemia diagnosticada.

HIPOTESIS ALTERNATIVA.

- Las alteraciones citogenéticas detectadas al diagnóstico, son específicas para cada subtipo de LLA y presentan relación con los aspectos clínicos y evolutivos del padecimiento en el individuo.

HIPOTESIS NULA.

- Las alteraciones citogenéticas detectadas al diagnóstico, no son específicas para cada subtipo de LLA y no presentan relación con los aspectos clínicos y evolutivos del padecimiento en el individuo.

MATERIAL Y METODOS.

PACIENTES Y CARACTERISITCAS CLINICAS.

Este estudio se realizó con 38 pacientes pedidtricos menores de 16 años de edad de ambos sexos y que no recibieron ningún tipo de tratamiento y con un diagnóstico inicial de LLA según la clasificación morfológica del grupo Franco-Americano-Británico (FAB) (48), que ingresaron al Servicio de Hematología Pedidtrica del Hospital General Centro Médico La Raza en el periodo comprendido de Junio 15 de 1989 a Junio 15 de 1990.

En ésta investigación se incluyeron datos clínicos de cada uno de los individuos como fueron presencia de síndrome anémico, fiebres, esplenomegalia, hepatomegalia, adenomegalia, además del número inicial de leucocitos, hemoglobina y porcentaje de blastos circulantes.

Las células de médula ósea normales se caracterizan por ser semifluidas durante la vida del individuo y subsecuentemente pueden ser removidas para su exámen por medio de la técnica de aspiración y/o por la técnica de biopsia.

Existen varias zonas corporales en las cuales se puede realizar la punción y aspiración de la médula por ejemplo en el esternón, en el segundo espacio intercostal, en la epífisis del femur, costillas, tibia, etc.

El sitio donde se extrajo la muestra fué de la cresta iliaca donde la espina anterosuperior de ésta puede ser identificada por palpación y el sitio para aspiración se encuentra de 1 a 2 pulgadas justamente debajo del borde palpable de la cresta, donde la aguja puede penetrar dentro del centro de la protuberancia oval (12).

ESTUDIO MORFOLOGICO Y CITOQUIMICO.

La morfología de los blastos fué examinada con el uso de la tinción de Wright en el aspirado de médula ósea en los 38 individuos aplicandose el criterio morfológico del FAB.

Las pruebas citoquímicas realizadas en células de médula ósea fueron la técnica de Peroxidasa, Acido Periódico Shiff (PAS) y Fosfatasa ácida las cuales sirven para establecer el subtipo de leucemia presente en los individuos a través de tinciones específicas así como el porcentaje de blastos que reaccionan a dichas pruebas.

Con el estudio morfológico y las pruebas citoquímicas se obtiene un diagnóstico definido sobre el subtipo de leucemia y con ésto la aplicación de un tratamiento adecuado (35)

1.-Técnica de Peroxidasa. Esta técnica es muy usada en la detección de una enzima presente en promielocitos y células maduras de algunas series. Además de que es utilizada en la clasificación de leucemias agudas revelando la presencia de promielocitos con pocos gránulos siendo visible mediante la utilización del reactivo de Wright.

La reacción positiva indica la presencia de gránulos azules ó cristales en el citoplasma principalmente de mieloblastos ó promielocitos, mientras que la reacción negativa se presenta en linfocitos y linfoblastos en algunas ocasiones en mieloblastos.

2.-Técnica de Acido Periódico Shiff. Esta técnica detecta principalmente glucógeno intracelular. Las células que reaccionan positivamente son los megacariocitos, plaquetas y neutrófilos segmentados mientras que en mieloblastos y granulocitos la capacidad de reacción es negativa. Los eritroblastos normales y eritrocitos maduros son completamente negativos, excepto en pacientes con Talasemia ó con mielosis eritrémica.

3.-Técnica de Fosfatasa Ácida. La fosfatasa ácida está presente en linfocitos, células plasmáticas, monocitos y plaquetas. En éstas tinciones el citoplasma de las células se tñen de color rojo cuando hay presencia de fosfatasa ácida.

El ácido tartárico se inhibe por la actividad de la fosfatasa ácida cuando se ponen en la mezcla de incubación. Sin embargo, la fosfatasa ácida está presente en las células peludas de las leucemias

REACCIONES CITQUIMICAS
(Dszucker, F. 1988)



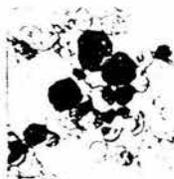
TINCIÓN DE WRIGHT ANORMAL

POSITIVA
SUGIERE LEUCEMIAS
MIELOCITICAS Y
MONOCITICAS

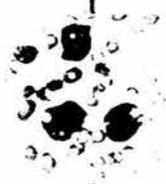


PEROXIDASA Y
SUDAN NEGRO

NEGATIVA
SUGIERE LEU-
CEMIAS LINFO-
CITICAS.



PAS. REACCION POSITIVA
EN LEUCEMIAS MEGACARIO-
CITICAS Y ERITROCITICAS
(Y ALGUNOS CASOS LINFO-
CITICAS).



←-NAFTIL ACETATO
ESTERASA



NAFTOL AS-D CLORO
ACETATO ESTERASA.



FOSFATASA ACIDA. SUGIE-
RE PRESENCIA DE LEUCE-
MIAS LINFOCITICAS.



←-NAFTIL BUTIRATO
ESTERASA. INDICA
LA PRESENCIA DE
CELULAS MONOCITI-
CAS.

FOSFATASA ALCALINA
UN SAJO NIVEL DE
LA REACCION INDICA
LEUCEMIA MIELOCITI-
CA CRONICA.



reticuloendoteliales que son resistentes al ácido tartárico y las tinciones químicas son fuertemente positivas aún cuando han sido adicionadas a la mezcla de incubación. Los linfocitos atípicos de la mononucleosis infecciosa y raramente la Leucemia linfoblástica crónica y linfosarcoma pueden presentar menos resistencia al ácido tartárico dando tinciones falsas positivas (49, 50, 51.). (Apéndice 1) (Diag. 2).

ESTUDIO CITOGENETICO.

Las muestras de médula ósea y sangre periférica de los 38 pacientes se obtuvieron en jeringas estériles de 5 ml. (heparinizadas). Para su estudio es necesario un volumen adecuado del paquete celular, utilizandose aproximadamente 3 cc. de médula ósea y 2 cc de sangre periférica. En estas muestras se realizaron los estudios citogenéticos para determinar los tipos de alteraciones numéricas y estructurales presentes en cada individuo, ambas muestras se enviaron del Servicio de Hematología Pediátrica para su análisis.

La muestra de médula ósea fue tratada mediante el método directo modificado (52) y en cultivo de 24 hrs (53).

La muestra de sangre periférica fue obtenida por medio de la vía intravenosa y se cultivó por 48 hrs. tratandose de la misma manera que el método de cultivo de 24 hrs. para médula ósea, solo que las células sanguíneas fueron tratadas con y sin estimulación con Fitohemaglutinina (PHA) (54).

Para el método de cultivo ambas muestras fueron sembradas en una campana de flujo laminar y en frascos estériles de 25 ml. conteniendo 4.5 ml de medio de cultivo Mc Coy, 0.5 ml. de la muestra con 4 repeticiones para médula y para sangre periférica dos frascos con PHA y 2 sin la adición de PHA. El proceso de cosecha tanto para el método directo de médula ósea y de cultivo de ambos tejidos consistió en los procesos de colchinización, hipotonización y fijación tal como se indica en el diagrama 3. (Apéndice 2).

Para la identificación de las alteraciones cromosómicas se emplearon las siguientes técnicas de bandeo.

1.-GTG.(Bandeo G con tripsina y tinción Giemsa). En esta técnica se produce una digestión de la envoltura que cubre a los cromosomas, de las proteínas histónicas y no histónicas tiñendo la heterocromatina y teniendo la característica estas bandas por ser ricas en Adenina y Timina. El tratamiento incluye enzimas proteolíticas, álcali, alcalino salina, calor y agentes oxidantes.

Este tipo de técnica de bandeo se considera de rutina, sin embargo, requiere experiencia para obtener un buen bandeo de los cromosomas de células leucémicas. Una de las ventajas de la técnica es que se obtienen preparaciones permanentes y la utilización de microscopia no es muy complicada.(Figura 3).(55).

2.-CBG (Bandeo C por Hidóxido de Bario y tinción Giemsa). Esta técnica de bandeo es utilizada para teñir heterocromatina constitutiva. Esta heterocromatina está localizada en el centrómero de todos los cromosomas, los satélites de los cromosomas acrocéntricos y constricciones secundarias de las regiones de los cromosomas 1, 9, 16 y cromosoma Y. Las regiones heterocromáticas difieren del resto de la cromatina (Eucromatina) en que ésta puede condensarse en interfase además de que son utilizadas para la conformación de la identidad de cromosomas adicionales. Normalmente las bandas C son localizadas en el brazo largo, pero ocasionalmente esto puede cambiar al brazo corto estando relacionado con una inversión pericéntrica parcial ó completa dependiendo de la cantidad de material invertido.

Las bandas C están predominantemente localizadas en los cromosomas 1, 9, 16 y existiendo una alta frecuencia de heteromorfismo en los cromosomas 6, 12 y 19. (Figura 4)(25,56).

De acuerdo a lo anterior se analizaron en promedio 25 metafases de cada caso (tanto de médula ósea como de sangre periférica) tomándose fotografías de los casos más representativos y realizando el idiograma correspondiente. La clasificación de los cromosomas se hizo de acuerdo a la nomenclatura de Paris (1981), donde cada cromosoma es dividido por la constricción principal ó centrómero en un brazo largo y un brazo corto, designados como p y q respectivamente.

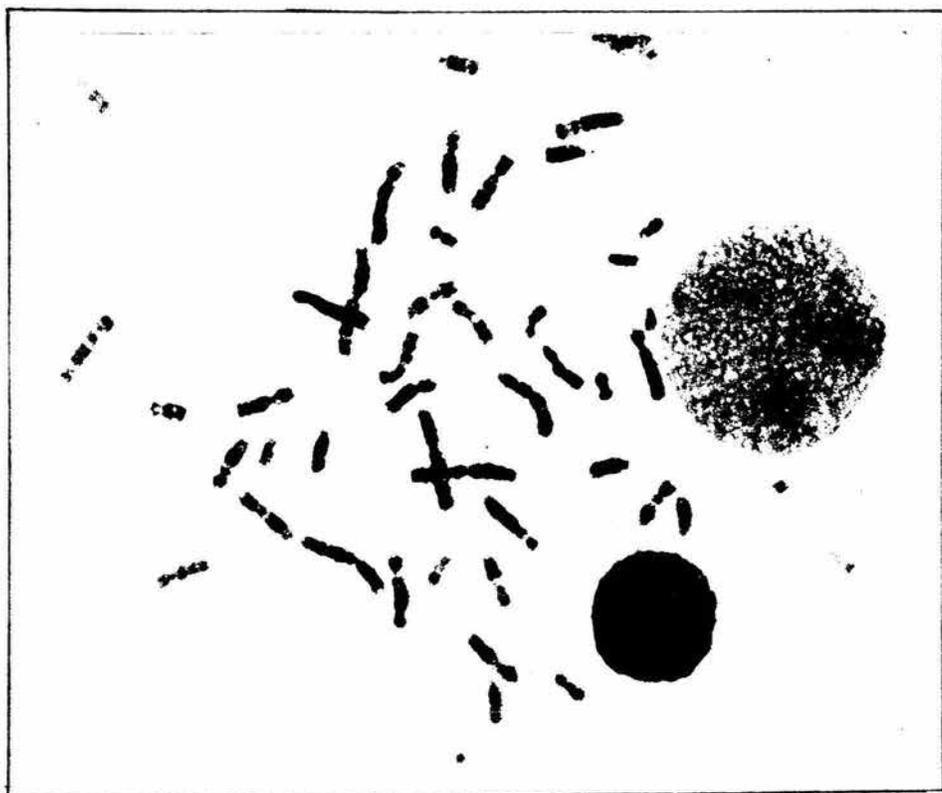


Fig.3.- Metafase de linfocito. Tratado con la técnica de bandeado GTG. (Bandas G con tinción Giemsa).

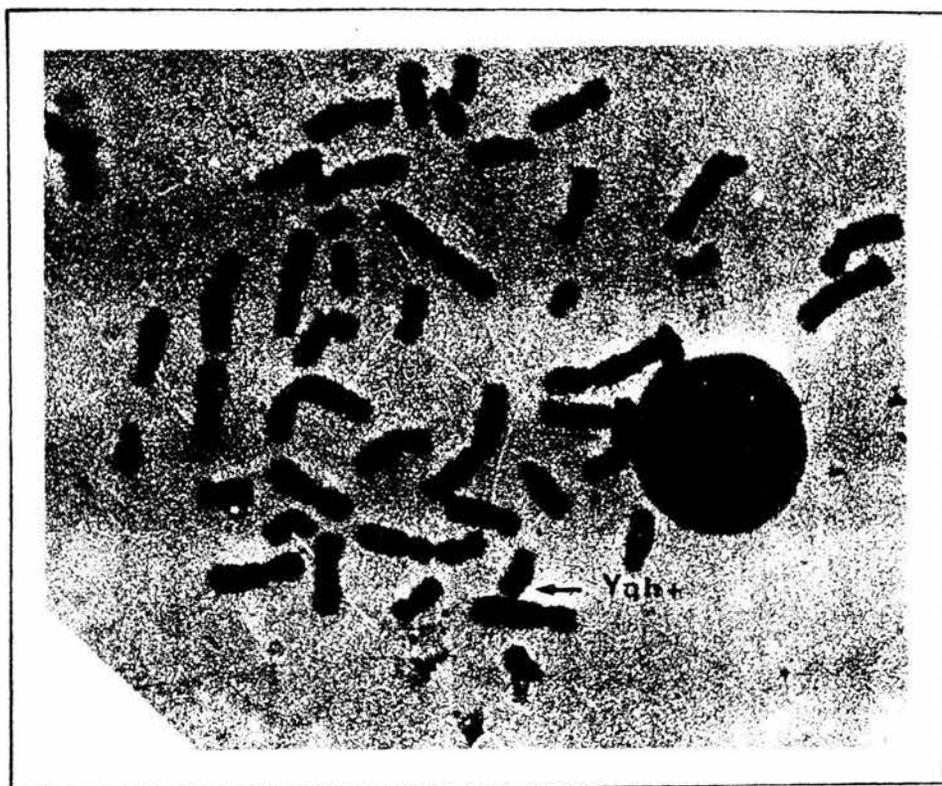


Fig. 4.- Metáfase de linfocito. Teñida con la técnica de
banco G20. (Banda 2 por hidróxido de Bario y
tinción Giemsa).

Los brazos de los cromosomas son divididos en regiones definidas por bandas específicas. En cada cromosoma las regiones y las bandas son numeradas secuencialmente del centrómero hacia los extremos y a lo largo de cada brazo.

Una banda en particular se designa con el número del cromosoma, símbolo del brazo, número de la región y número de banda, por ejemplo, 14q32, lo cual indica que se trata del cromosoma 14, brazo largo, región 3 banda 2. Para designar una sub-banda, un punto decimal es puesto después de la designación de la banda principal.

Para la composición cromosómica ó cariotipo de una célula ó un individuo, primero se indica el número total de cromosomas, después se señala con un signo + ó - para denotar si hay ganancia ó pérdida de algún cromosoma. Un signo + ó - puesto después del número de cromosoma indica un incremento ó decremento de un segmento de algún cromosoma. (Figura 5) (57)

Otras abreviaturas que se emplean para describir defectos de los cromosomas en neoplasias son: del (delección), inv (inversión), t (translocación), ins (inserción), i (isocromosoma ó duplicación de un brazo y r (cromosoma en anillo fusionado en ambos extremos) (58).

En cuanto a las alteraciones numéricas, los cariotipos se clasificaron en diploides (46 cromosomas), Hiperdiploides (cuando el complemento cromosómico sea mayor de 46), Hipodiploides (cuando el cariotipo presente menos del número diploide) y Pseudodiploidia (con 46 cromosomas pero con rearrreglos estructurales) (59).

Las clonas que se encontraron fueron consideradas de acuerdo al criterio del cuarto trabajo sobre cromosomas en leucemia donde los estudios citogenéticos son clasificados en tres grupos:

-N/N.- Cuando todas las metafases analizadas son completamente normales.

-N/A.- Cuando se presenten metafases normales y anormales.

-A/A.- Cuando todas las metafases son anormales tanto en muestras de médula ósea como en sangre periférica (60).

Con lo referente a la prueba estadística utilizada para el análisis de los datos se empleo la prueba de distribución de χ^2 cuadrada de independencia en la cual se utilizaron los valores de frecuencia de los datos obtenidos y con un nivel de confianza de 0.05 y 0.01. (61).

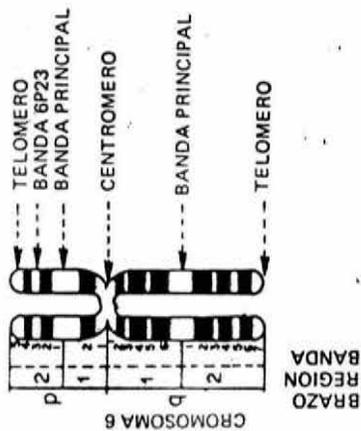
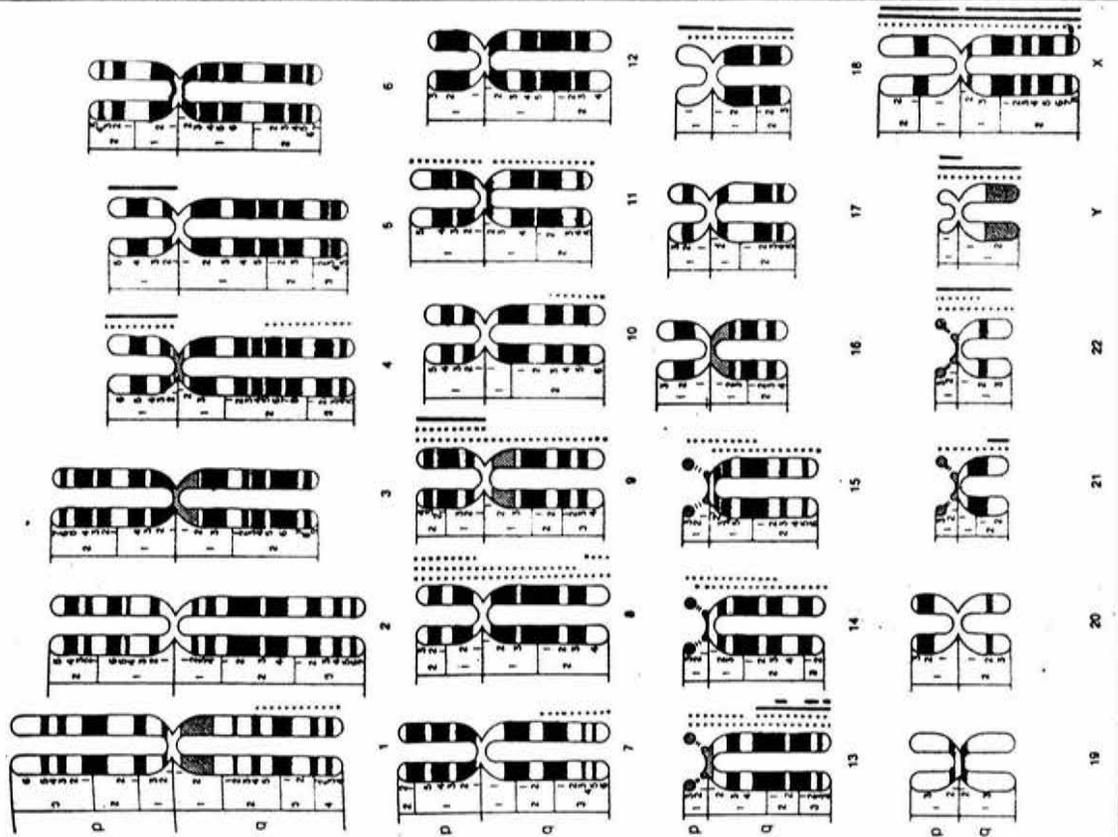


FIG.5 . NOMENCLATURA ESTABLECIDA EN LA CONFERENCIA DE PARIS(1971) PARA IDENTIFICAR REGIONES Y BANDAS- EN UN CROMOSOMA. p, BRAZO CORTO; q, BRAZO LARGO. LAS BANDAS PRINCIPALES DIVIDEN A CADA BRAZO EN REGIONES (SANCHEZ.O Y YUNIS.J, 1977).

RESULTADOS

CARACTERISTICAS CLINICAS.

En este estudio se incluyeron 38 pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de LLA de acuerdo a los criterios de la clasificación FAB. De los cuales 20 fueron del sexo masculino y 18 del sexo femenino, las edades variaron de 12 días a 15 años de edad, con una media de 6 años (Gráficas 1 y 2).

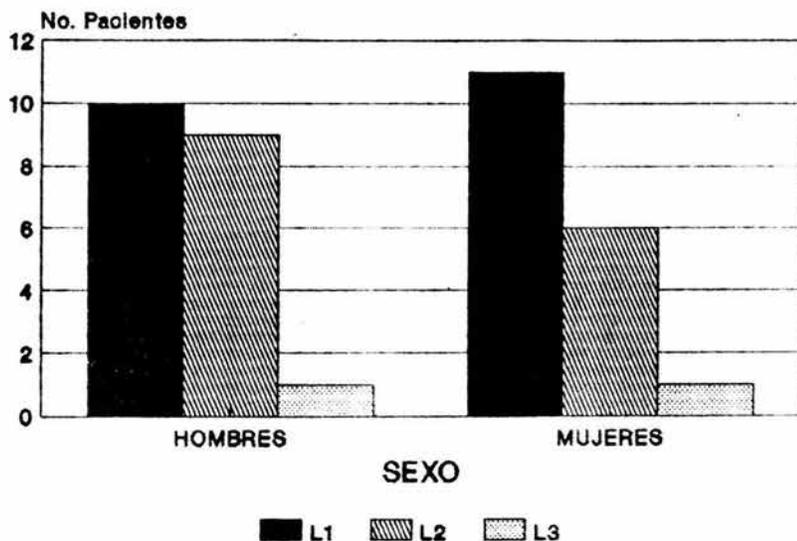
En cuanto al número de los leucocitos en sangre periférica se encontraron valores que fluctuaron entre 1,900/mm³ y de 340,000 leucocitos/mm³ con una media de 53,000 leucos/mm³ que al compararse con los valores normales de acuerdo con los 3 grupos de edad establecidos en el H.G.C.M.L.R. se observó que el 45% de dichos pacientes presentaron leucocitosis, el 34% tuvo valores normales y solo el 21% fueron leucopénicos (Tabla 6).

En relación a los blastos en el 97% (37 pacientes) se encontraron en sangre periférica con un intervalo de 2 a 98% y solo en un paciente no se observaron blastos circulantes.

29 pacientes presentaron anemia al momento del diagnóstico con valores de Hemoglobina entre 2 y 7 gr/dl y la mayoría de ellos mostró hepato, adeno y/o esplenomegalia con presencia de cuadro febril e infecciones continuas.

Cuatro pacientes presentaron otras características clínicas adicionales como fueron: Crecimiento ganglionar en zona de cuello, axila e ingle (paciente No.20), tumoración retroauricular (paciente No.37), tumoración en ojo izquierdo (paciente No.6) y un paciente (no. 26) con labio y paladar hendido y Síndrome de Down. (Tabla 7).

Grafica I. Histograma de la distribución por sexos en los subtipos de LLA (FAB)



Grafica 2. Histograma de la distribución por edades de LLA con morfología L1, L2 y L3 (FAB y pruebas citoquímicas)

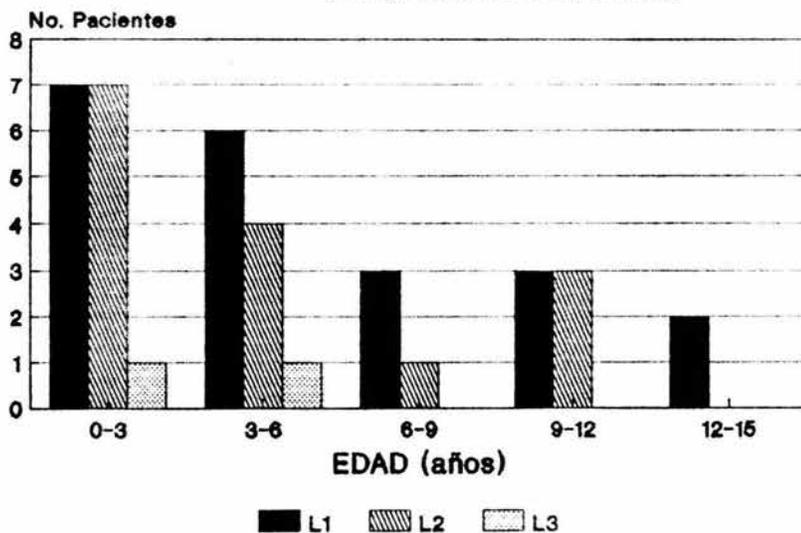


TABLA No.6.-VALORES DEL NUMERO INICIAL DE LEUCOCITOS POR INTERVALO DE EDAD EN NIÑOS CON LLA (FAB).
(Valores del IMSS).

VALORES NORMALES DE LEUCOCITOS-mm ³ . (Sangre Periférica)	E D A D (A Ñ O S) .			TOTAL
	0 - 1 (6,000- 30,000)	1 - 10 (4,500-18,000)	> 10 (5,000-13,500)	
NUMERO DE PACIENTES NORMALES	-	11	3	14
LEUCOPENIA (Intervalo)	-	6 (2,100-13,400 mm ³)	2 (2100-3,800 mm ³)	8
LEUCOCITOSIS (intervalo)	3 (78,000-118,000)	10 (18,500-340,000 mm ³)	3 (69,500-128,000 mm ³)	16
TOTAL DE PACIENTES	3	27	8	38

TABLA No. 7.- REGISTRO DE DATOS CLINICOS DE NIÑOS CON LLA (FAB).

PACIENTE NO.	SEXO/EDAD	DX.(FAB)	No. LEUCOCITOS (miles/mm ³)	% BLASTOS (S.P)	Hb. (G/dl)	CARACTERISTICAS CLINICAS Y - ANTECEDENTES.
1	M/6	L1	8,500	91	7.5	Sx.Anémico/Fiebre.
2	F/10	L1	76,800	15	6	Sx.Anémico/Contacto con Mielotoxicos
3	M/1 9/12	L1	8,600	10	6.4	Sx.Anémico/Infecciones.
4	M/2 10/12	L1	1,900	4	7.4	Hiporexia/Hepatoadenomegalia.
5	F/5	L1	2,100	17	6.3	Sx.Anémico/Adenomegalia.
6	F/12	L1	128,000	90	3.0	Tumoración en ojo izquierdo.
7	M/9	L1	13,400	22	2.5	Sx. Anémico.
8	F/8	L1	92,500	96	5.0	Sx. Anémico.
9	F/3 3/12	L1	9,000	95	6.0	Sx.Anémico/Hemorragias.
10	F/5	L1	4,800	3	5.8	Sx.Anémico/Hemorragias.
11	M/4	L1	340,000	95	16.7	Fiebre/ Infecciones/Hepatomegalia.
12	F/9/12	L1	83,500	90	5.2	Sx.Anémico Febril.
13	M/2 3/12	L1	8,000	94	3.5	Sx.Anémico.
14	F/3	L1	25,000	82	5.0	Sx.Anémico/Dolor óseo/Fiebre.
15	F/3	L1	164,000	94	6.0	Fiebre!Hepatoadenomegalia.
16	F/15	L1	69,500	98	4.3	Sx.Anémico/Fiebre/Adenomegalia.
17	F/15	L1	9,000	23	3.6	Sx.Anémico/Fatiga/Fiebre/Hepatoadeno megalia.
18	M/2	L1	2,700	2	7.0	Fiebre/Esplenoadenomegalia.

TABLA No. 7. (Continuación).

PACIENTE No.	SEXO/EDAD	DX. (FAB)	No. LEUCOCITOS (miles/mm ³)	% BLASTOS (S.P.)	Hb. (G/dl)	CARACTERISTICAS CLINICAS Y ANTECEDENTES.
19	M/12	L1	99,900	98	15.4	Fiebre/Dolor óseo.
20	M/4	L1	282,500	92	5.8	Crecimiento ganglionar en cuello, axila e ingle/Sx. Anémico.
21	M/9	L1	2,000	62	5.8	Sx. Anémico/Pérdida de peso/Astenia.
22	F/3	L2	8,700	92	6.7	Sx. Anémico/Hepatoadenomegalia.
23	F/1 5/12	L2	45,500	90	11.9	Neoplasia no especificada en Bisabuelos.
24	F/5	L2	4,600	27	5.8	Sx. Anémico/Ulceración mucónasal.
25	F/2 3/12	L2	3,600	32	7.3	Sx. Anémico/Fiebre/Organomegalia.
26	M/12/30	L2	118,500	90	18.5	Fiebre/Hepatoesplenomegalia.
27	M/3	L2	200,000	80	4.7	Sx. Anémico/Cuadro infeccioso/Hepatoadenomegalia.
28	M/5	L2	6,200	78	6.2	Sx. Anémico/Fiebre/Hepatoadenomegalia.
29	F/7	L2	51,500	93	5.0	Sx. Anémico/Pérdida de peso/Adeno-esplenomegalia.
30	M/4	L2	11,800	87	6.3	Sx. Anémico/Fiebre/Pérdida de peso.
31	F/11	L2	2,100	0	4.0	Sx. Anémico/Pancitopenia/Hemorrágias.
32	M/11	L2	11,700	84	5.9	Sx. Anémico/Infecciones.
33	M/12	L2	8,800	88	12.3	Sx. Anémico/Fiebre/Pérdida de peso.
34	M/6	L2	18,500	55	3.0	Astenia/Sx. Anémico/Infecciones.
35	M/3	L2	3,800	89	5.1	Sx. Anémico/Anorexia.

TABLA No.7. (Continuación).

PACIENTE no.	SEXO/EDAD	DX.(FAB)	No.LEUCOCITOS (miles/mm ³)	% BLASTOS (S.P.)	Hb.(G/dl)	CARACTERISTICAS CLINICAS
36	M/12/30	L2	78,000	90	18	Perdida de peso/Fiebre/infecciones.
37	M/6	L3	5,500	83	6.2	Tumoración retroauricular/Sx.Anémico - y esplenomegalia.
38	F/13	L3	3,800	90	5.8	Sx.Anémico/Fiebre/Infiltración de - - blastos.

RESULTADOS MORFOLOGICOS Y CITOQUIMICOS.

De acuerdo al criterio de la clasificación FAB se encontró que de los 38 pacientes, 17 se clasificaron en el subtipo L1, 15 por su morfología se incluyeron en el subtipo L2 y dos en el subtipo L3. (Figura 6).

Cuatro pacientes presentaron una morfología L1/L2, con mayor tendencia al subtipo L1 lo cual se corroboró posteriormente mediante las reacciones de PAS y Fosfatasa ácida. En total se registraron en el subtipo L1 21 niños.

El criterio que se utilizó para dividir a la LLA en sus 3 diferentes subtipos fue en base a los porcentajes de reacción de los blastos de médula ósea en las técnicas citoquímicas de Peroxidasa, la cual fue negativa en el 100% de los casos, Acido perhídrico Shiff (PAS) que se realizó en 32 pacientes observándose que en L1 de los 18 casos analizados el 50% tuvieron una reacción positiva, en L2 de 13 pacientes a quienes se les realizó la prueba 10 presentaron una reacción negativa lo cual representa el 77% y solo 3 pacientes presentaron una reacción positiva. Los resultados de Fosfatasa ácida (realizada en 33 pacientes) indicaron que en 16 pacientes del subtipo L1 tuvieron una reacción negativa (63%), y 6 una reacción positiva (30%). La LLA L2 10 pacientes (66%) tuvieron una reacción positiva mientras que en 5 (34%) fue negativa, y en L3 los 2 individuos tuvieron una reacción positiva. (Tabla 8 y 9).

RESULTADOS CITOGENETICOS.

En cuanto a los cultivos de médula ósea, el 63% (24 niños) mostraron metafases analizables, mientras que en el resto no se observaron metafases. En los cultivos de 48 horas de sangre periférica sin estimulación solo un individuo presentó metafases (caso 3).

En los cultivos de sangre periférica con estimulación se obtuvieron metafases en 21 individuos, 9 no desarrollaron y en 7 no se envió la muestra. En resumen 17 pacientes presentaron metafases en ambas muestras lo que representa el 45% del total, y el resto presentó metafases ya sea solo en médula ósea ó en sangre periférica tal como se observa en la tabla 10.

Figura 6.- Incidencia de la LLA (FAB) en la población de estudio.

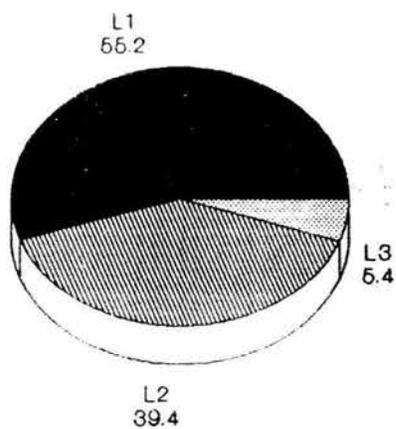


Tabla 8.-Intervalos de las reacciones citoquimicas para los subtipos de LLA (FAB).

SUBTIPO	PEROXIDASA	PAS	FOSFATASA ACIDA
L1	(-)	(+) 15-100%	(+) 10-20%
L2	(-)	(+) 15- 30%	(+) 20-100%
L3	(-)	0	0

TABLA 9.- REGISTRO DE LOS DATOS DE LAS PRUEBAS CITOQUIMICAS DE NIÑOS
CON LLA.

NO. DE PACIENTE.	PRUEBAS CITOQUIMICAS.		
	PEROXIDASA	FOSFATASA ACIDA	F.A.S.
1.-	Negativa	Negativa	Negativa
2.-	Negativa	Positiva	Negativa
3.-	Negativa	Negativa	Negativa
4.-	Negativa	Negativa	Negativa
5.-	Negativa	Negativa	Positiva
6.-	Negativa	Negativa	Negativa
7.-	Negativa	Negativa	Positiva
8.-	Negativa	Negativa	Negativa
9.-	Negativa	--	Positiva
10.-	Negativa	--	--
11.-	Negativa	Positiva	Positiva
12.-	Negativa	Positiva	--
13.-	Negativa	Negativa	--
14.-	Negativa	Positiva	Positiva
15.-	Negativa	--	--
16.-	Negativa	Negativa	Positiva
17.-	Negativa	Negativa	Negativa
18.-	Negativa	Positiva	Positiva
19.-	Negativa	--	--
20.-	Negativa	Positiva	Negativa

TABLA 9.-REGISTRO DE LOS DATOS DE LAS PRUEBAS CITOQUIMICAS DE NIÑOS CON
LLA (Continuación).

NO.DE PACIENTE.	PRUEBAS CITOQUIMICAS.		
	PEROXIDASA	FOSFATASA ACIDA	F.A.S.
21.-	Negativa	Negativa	Negativa
22.-	Negativa	Positiva	Negativa
23.-	Negativa	Positiva	Negativa
24.-	Negativa	Positiva	Negativa
25.-	Negativa	Positiva	Negativa
26.-	Negativa	--	--
27.-	Negativa	Positiva	Negativa
28.-	Negativa	Negativa	Positiva
29.-	Negativa	--	Negativa
30.-	Negativa	Positiva	Negativa
31.-	Negativa	Positiva	Positiva
32.-	Negativa	Positiva	Negativa
33.-	Negativa	Negativa	Negativa
34.-	Negativa	Positiva	Negativa
35.-	Negativa	Negativa	Negativa
36.-	Negativa	--	--
37.-	Negativa	Positiva	Negativa
38.-	Negativa	Positiva	Positiva

Tabla 10.- Resultados del desarrollo de metafases en cultivos de médula ósea y sangre periférica.

TEJIDO	C/METAFASES		S/METAFASES	S/MUESTRA
Médula ósea	24		14	-
	C/PHA	S/PHA		
Sangre periférica	21	1	9	7
Total	46		23	7

Los estudios citogenéticos se clasificaron dependiendo del tipo de clonas celulares presentes en médula ósea y sangre periférica tal como se indica en las gráficas 3 y 4, donde se observa que la mayoría de los pacientes presentaron clonas N/A tanto en médula ósea como en sangre periférica seguidas por las clonas A/A y N/N.

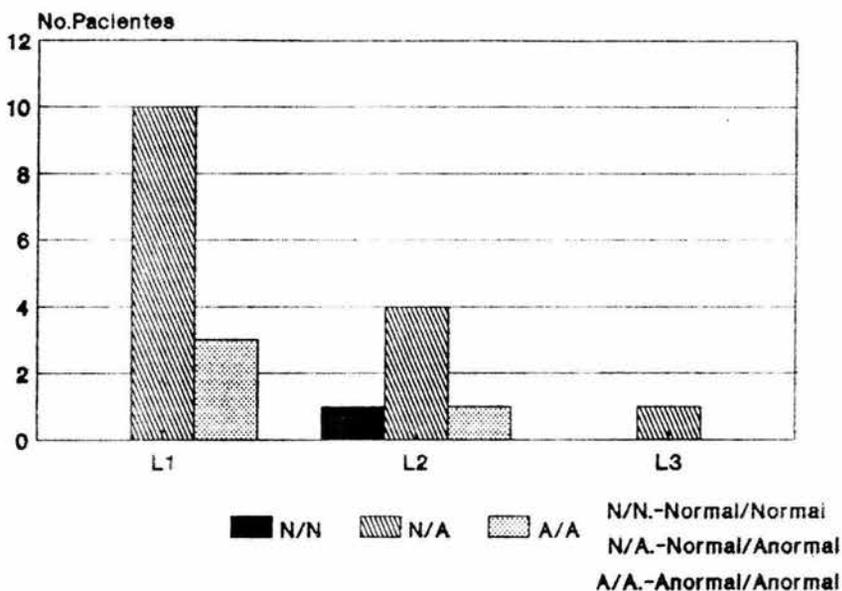
Los hallazgos citogenéticos se muestran en la tabla 11, donde se tuvo que 22 niños presentaron alteraciones numéricas, 7 con alteraciones estructurales y 4 presentaron ambas alteraciones. Solo 6 niños presentaron metafases normales en sangre periférica.

En las gráficas 5 y 6 se muestran los resultados de las frecuencias de las anomalías cromosómicas tanto en células de médula ósea como en sangre periférica, observándose que en médula la LLA L1 fue la que presentó la mayor frecuencia de alteraciones numéricas y estructurales siendo la hipodiploidia la que tuvo el mayor porcentaje de incidencia (61%), seguida de la hiperdiploidia (27%) y la pseudodiploidia con un 11%. En la L2 la frecuencia fue del 40% para la hipodiploidia, de 33% para la hiperdiploidia, 20% para la pseudodiploidia y el resto (7%) lo constituyó la diploidia. Por último solo se presentó un caso en L3 con hipodiploidia.

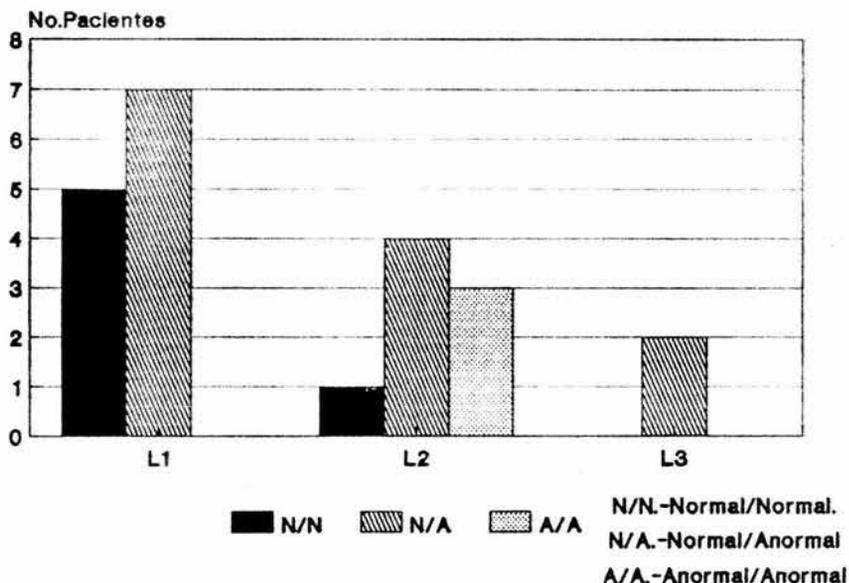
Por su parte en sangre periférica se observó que la L1 tuvo como alteración más común a la hipodiploidia con una frecuencia del 50% y en menor proporción la hiperdiploidia con un 6%, la pseudodiploidia mostró un 18% y el 25% fueron diploidias. En L2 la hipodiploidia tuvo una frecuencia de 45% seguida por la hiper, pseudo y diploidia con una frecuencia del 18% cada una.

En la tabla 12 se muestran los resultados de la correlación clínico-citogenética de los 3 subtipos de LLA y los datos de sexo, edad con los intervalos de riesgo los cuales son menores de 2 años, de 2 a 10 y mayores de 10 años, conteo inicial de leucocitos con los intervalos de conteo de leucocitos empleados por otros investigadores los cuales fueron utilizados para la discusión de los resultados y por último la correlación con los porcentajes de ploidias en cada subtipo de LLA.

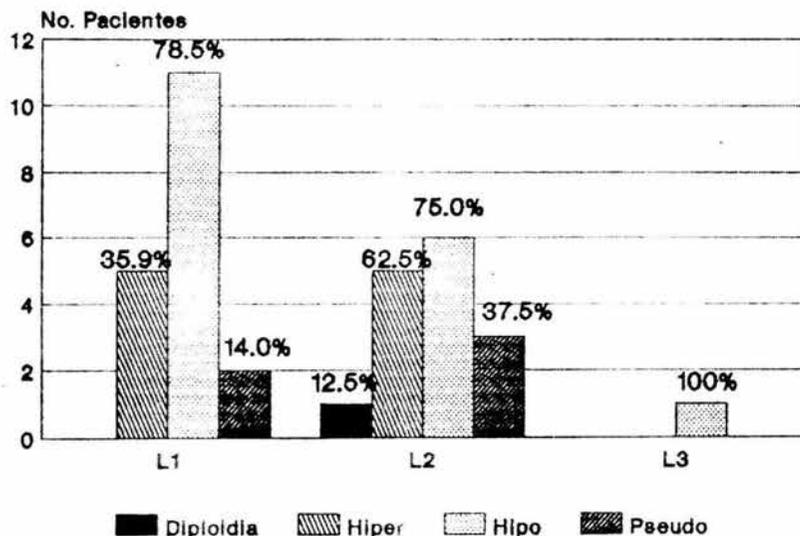
Gráfica 3. Gráfica de los estudios citogenéticos en relación a las clonas presentes en médula ósea.



Gráfica 4. Clasificación de los estudios citogenéticos en relación a las clonas celulares presentes en sangre periférica.



Gráfica 5. Frecuencia de las anomalías cromosómicas en médula ósea de individuos con LLA (FAB).



Gráfica 6. Frecuencia de las anomalías cromosómicas en sangre periférica de individuos con LLA (FAB).

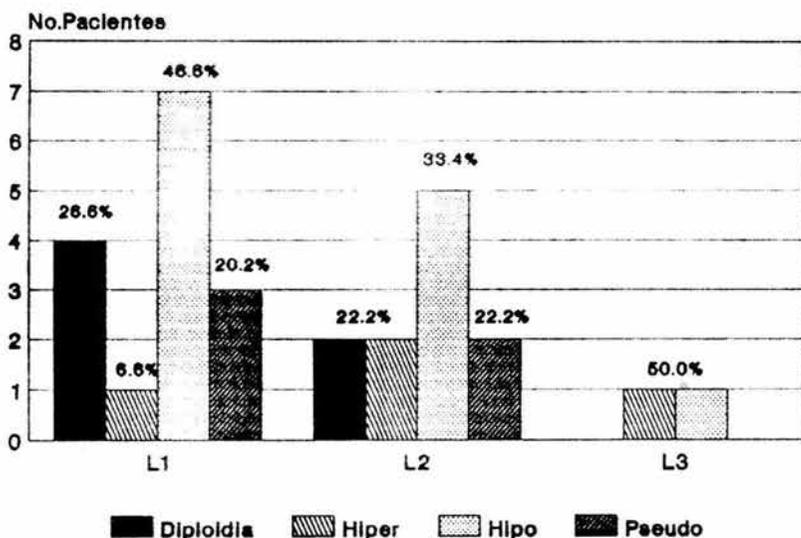


TABLA No 11 - REGISTRO DE LAS ALTERACIONES CROMOSOMICAS EN INDIVIDUOS CON LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA) (FAB).

PACIENTE No.	TIPO DE LLA	CELULAS ANALIZADAS		CELULAS ANORMALES		C A R I O T I P O	
		M.O.	S.P.	M.O.	S.P.	MEDULA OSEA	SANGRE PERIFERICA
1	L1	25	-	17	-	45,XY-8(18%)/80 crom. [*] /35-40 crom.	-
2	L1	25	20	25	0	46,XX t(1,19) (100%)	46,XX. (100%)
3	L1	7	16	2	6	35 crom.(100%)	39 crom. (100%)
4	L1	6	6	6	5	22-40 crom.(50%)-45,XY-D (50%)	33-40 crom.(100%)
5	L1	8	23	8	15	32 crom.(13%)/52-60 crom.(87%)	30-38 crom.(47%) 49-57 crom.(20%) 45,XX-8,16qh+ (20%) 45,XX-20,16qh+(13%)
6	L1	-	-	-	-	S-DESARROLLO	S/MUESTRA.
7	L1	25	25	25	25	29-44 crom.(28%)/46,XY rhh+(60%) 43,XY,Ph+(4%)/49 crom.(4%)	27-45 crom.(14%) 45,XY,-c,Ph+(30%) 46,XY Ph+ (56%)
8	L1	17	25	7	10	43-44 crom.(29%)/48,XX+F+E(71%)	20-44 crom.(80%) 48-54 crom.(20%)
9	L1	25	25	20	9	36-44 crom.(20%)/47-59 crom.(80%)	41 crom.(11%) 47-50 crom.(89%)
10	L1	25	-	2	-	38-45 crom.(100%)	S/MUESTRA.
11	L1	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO
12	L1	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO
13	L1	-	23	-	-	S/DESARROLLO	S/F 8** 37-45 crom.(75%) 51 crom.(12%) 46,XY;-B+C (13%)
						S/DESARROLLO	C/F 7*** 47-90 crom.(38%) 43-45 crom.(57%) 46,XY,-D,+C(15%)
14	L1	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/MUESTRA
15	L1	25	25	8	0	25-30 crom.(63%)/50 crom.(37%)	46,XX. (100%)
16	L1	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/MUESTRA

TABLA No.11 (Continuación).

PACIENTE No.	TIPO DE LLA	CELULAS ANALIZADAS		CELULAS ANORMALES		C A R I O T I P O	
		M.O.	S.P.	M.O.	S.P.	MEDULA OSEA	SANGRE PERIFERICA
17	L1	15	-	3	-	45,XX-16 (100%)	S/DESARROLLO
18	L1	21	25	8	0	42-45 crom. (37.5%)/45,XY-17(37.5%) 80-90 crom. (25%)	(46XY (100%))
19	L1	25	25	21	20	22-41 crom. (57%)/46,XY,Gq- (43%)	25-38 crom. (70%) 46,XY,Gq- (30%)
20	L1	25	25	9	0	30-41 crom. (55.5%)/43,XY-G,-G,-D(44.5%)	46,XY.
21	L1	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO
22	L2	16	25	10	21	32-45 crom. (80%)/43,XX,-c,-c,-c(20%)	32-45 crom. (71%) 45,xx,-2,-B,-D-- +C,+C,+C (5%)
23	L2	25	-	20	-	30-45 crom. (37%)/47-70 (58%) 46,XX,-C+Frag;46,XX,-3,-G,-C,-E -E,+2,+2Frag acrom,Dq+; 46,XX,-G,+D,-C,+D (5%)	S/MUESTRA.
24	L2	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO.
25	L2	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO.
26	L2	25	20	25	20	47,XY,+21(92%)/100 crom. (8%)	47,XY,+21. (100%)
27	L2	25	25	25	25	47,XY,-17 (8%)/46,XY,16qh+(91%)	46,XY,16qh+ (100%)
28	L2	-	20	-	-	S/DESARROLLO	46,XY. (100%)
29	L2	24	25	24	24	34-44 crom. (100%)	30-45 crom. (88%) 47-48 crom. (8%) 46,XX,18q- (4%)
30	L2	25	25	-	-	46,XY. (100%)	46,XY. (100%)
31	L2	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO

TABLA No. 11 (Continuación).

PACIENTE No.	TIPO DE LLA	CELULAS ANALIZADAS		CELULAS ANORMALES		C A R I O T I P O	
		M.O.	S.P.	M.O.	S.P.	MEDULA OSEA	SANGRE PERIFERICA
32	L2	11	25	11	12	50-60 crom. (82%) / >90 crom. (18%)	40-45 crom. (50%) 45,XY,-C. (42%) 44,XY,-E,-C (8%)
33	L2	25	20	18	5	36-38 crom. (72%) / 47,XY,+16. (28%)	36-38 crom. (100%)
34	L2	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO
35	L2	-	-	-	-	S/DESARROLLO	S/DESARROLLO
36	L2	20	-	11	-	47,XY,+21,Bq- (100%)	S/MUESTRA
37	L3	25	25	6	9	31-45 crom. (24%)	30-40 crom. (36%)
38	L3	-	20	-	15	S/DESARROLLO	50 CROM. (50%)

* CROM= CROMOSOMAS

** S/F= SIN FITOHEMAGLUTININA

*** C/F= CON FITOHEMAGLUTININA

M.O.=MEDULA OSEA.

S.P.=SANGRE PERIFERICA.

En la tabla 13 se muestra la comparación en la frecuencia de alteraciones cromosómicas tanto numéricas como estructurales que se presentaron en los tejidos de médula ósea y sangre periférica de los niños con LLA.

Por último se muestran los hallazgos citogenéticos más sobresalientes en niños con LLA (Tabla 14). En la LLA L1 se encontraron 2 pacientes con translocaciones cromosómicas, uno con la $t(1;19)(q23;p13)$ y otro con la $t(9;22)(q34;q11)(Ph+)$, uno más presentó la delección del brazo largo del cromosoma 21, $del(21)$, una mujer con monosomía del cromosoma 16 en células de médula ósea, otro con un cariotipo $45,XY-8$ y una niña con monosomía del cromosoma 8 y polimorfismo del cromosoma 16 cuyo cariotipo fue $45,XX,-8,16qh+$.

En L2 se presentaron 3 hombres con alteración, uno con trisomía del cromosoma 16 presente solo en médula ósea, otro con polimorfismo del cromosoma 16 ($16qh+$) y el último presentó un cariotipo $47,XY+21,Bq-$ éste solo en médula ósea. Por último en el subtipo L3 ambos individuos presentaron alteraciones numéricas. (Idiogramas I al XI).

En cuanto al análisis estadístico que se realizó para determinar la posible relación entre las características clínicas, citogenéticas y citoquímicas se obtuvo que en general no existieron diferencias significativas entre las características que se confrontaron, lo cual es debido básicamente al tamaño de la muestra y a los valores de las frecuencias obtenidas.

Tabla 13. Comparación en la frecuencia de las alteraciones cromosómicas así como diploidias en médula ósea y sangre periférica de individuos con LLA (FAB).

TIPO DE LLA	PLOIDIA	No. de individuos.	
		Médula ósea	Sangre periférica
L1	Diploidia	0	4
	Hiper	5	1
	Hipo	11	8
	Pseudo	4	3
L2	Diploidia	1	2
	Hiper	5	2
	Hipo	6	5
	Pseudo	3	3
L3	Diploidia	-	-
	Hiper	-	1
	Hipo	1	1
	Pseudo	-	-

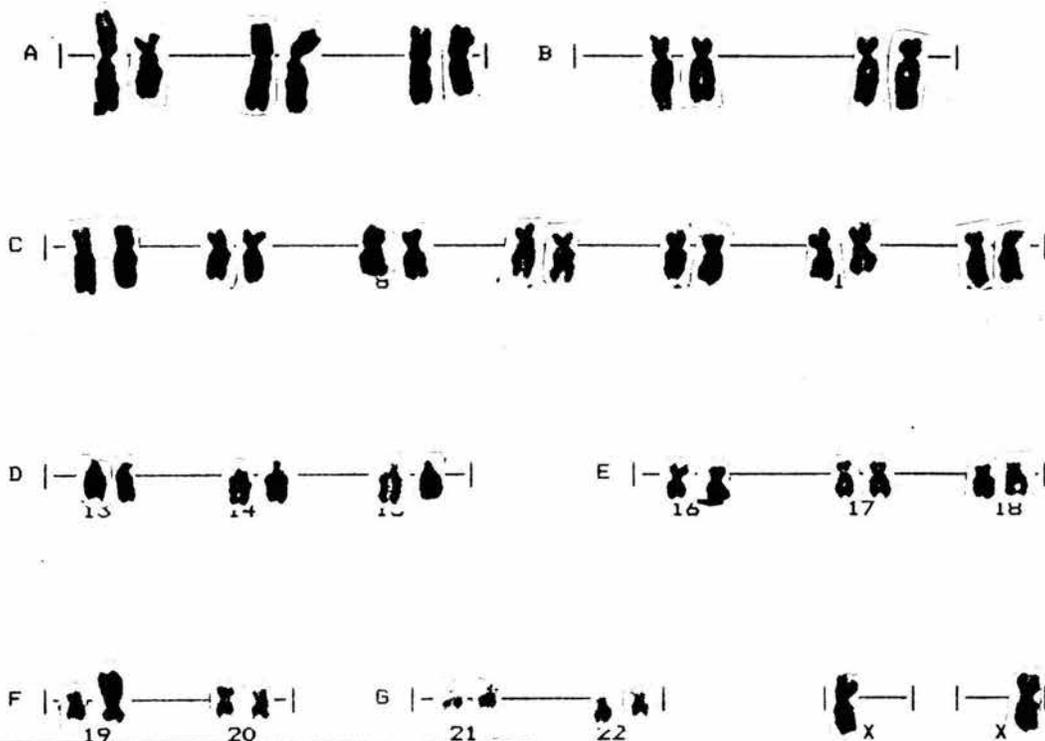
TABLA 14.-HALLAZGOS CITOGENETICOS MAS RELEVANTES EN NIÑOS CON LLA.

TIPO DE LLA	MEDULA OSEA	SANGRE PERIFERICA + PHA.
L1	- 46,XX,t(1,19) (100%)	- N (100%)
	- 46,XY,t(9;22) (60%) HIPER (4%) HIPO (32%)	- 46,XY,t(9;22) (56%) HIPO (44%).
	- 46,XY,21q- (43%) HIPO (57%)	- 46,XY,21q- (30%) HIPO (70%)
	- 45,XX-16 (100%)	- SIN DESARROLLO.
	- HIPER (87%) HIPO (13%)	- 45,XX-8,16qh+ (20%) 45,XX-20,16qh+ (13%) HIPO (47%) HIPER (20%)
	- 45,XY-8 (18%) HIPER (6%) HIPO (76%)	- SIN MUESTRA
	L2	- 47,XY+16 (28%) HIPO (72%)
- 46,XY,16qh+ (91%) 47,XY-17 (8%)		- 46,XY,16qh+ (100%)
- 47,XY+21 Bq- (100%)		- SIN MUESTRA
- HIPO (100%)		- 46,XX,18q- (4%) HIPO (88%) HIPER (8%)
L3	-HIPO (24%) N (76%)	- HIPO (36%) N (64%)
	- S/M	- HIPER (50%) N (50%)
HIPER:HIPERDIPLOIDIA		N:NORMAL
HIPO:HIPODIPLOIDIA		S/M:SIN METAFASES PHA:FITHEMAGLUTININA.

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea

NOMBRE: Berrocal L.S.



Dx. DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L1.

Dx. CITOGENETICO: 46,XX,t(1;19)

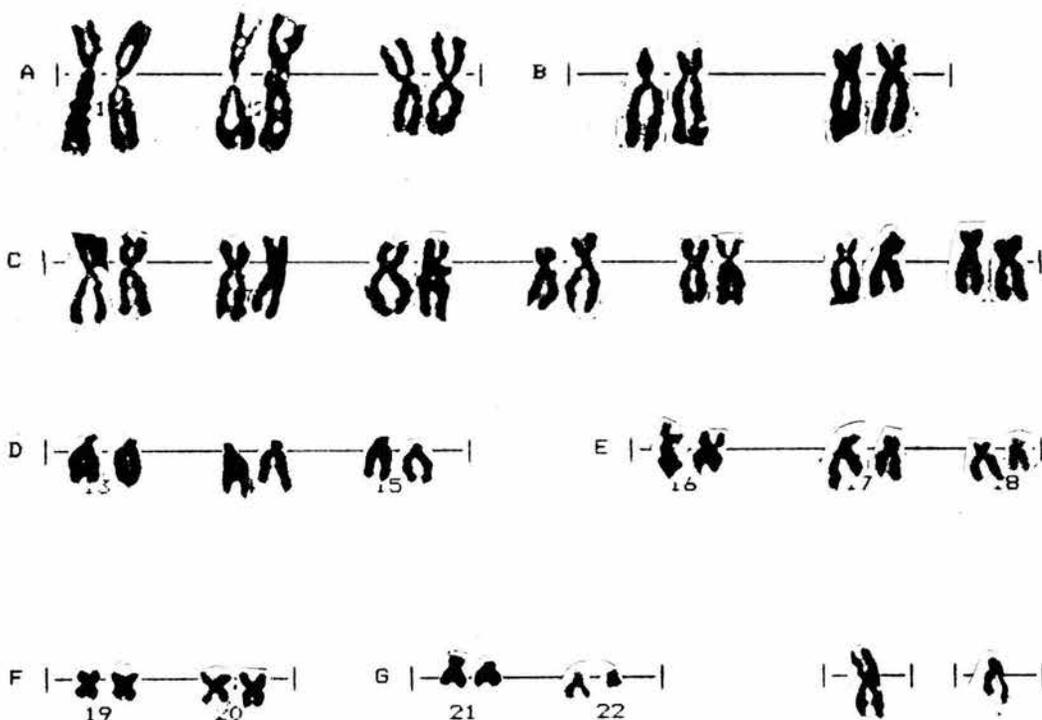


Idiograma I

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea.

NOMBRE: Sanches O.M.



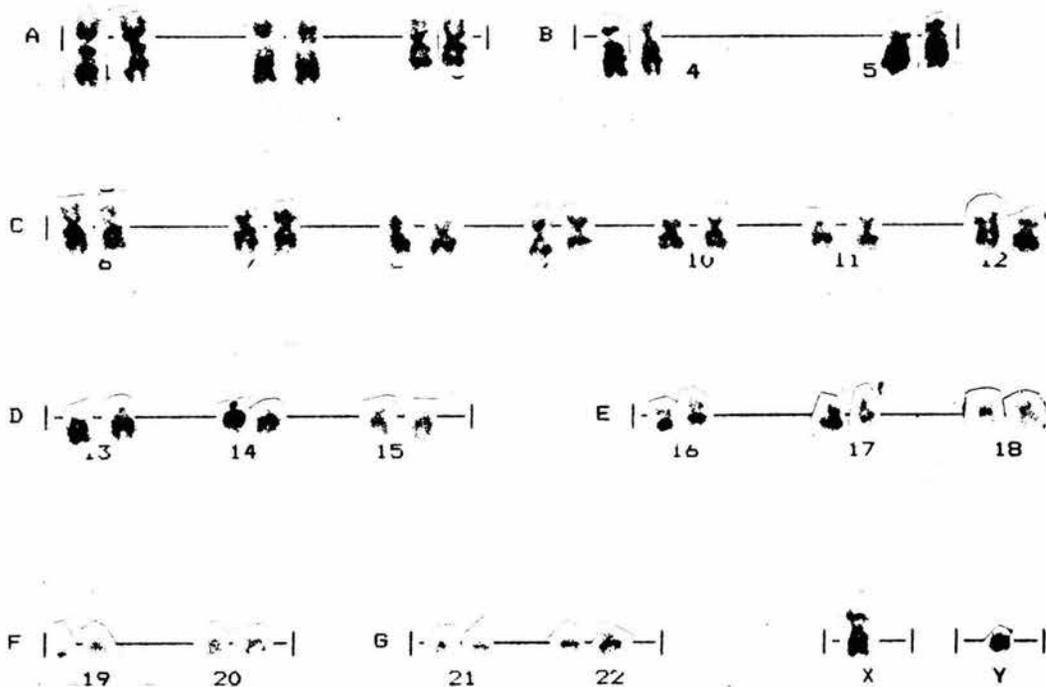
Dx.DE ENVIO:Leucemia linfoblástica
aguda L1.

Dx.CITOGENETICO: 46,XY,t(9;22)

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea.

NOMBRE: Leyva B.R.



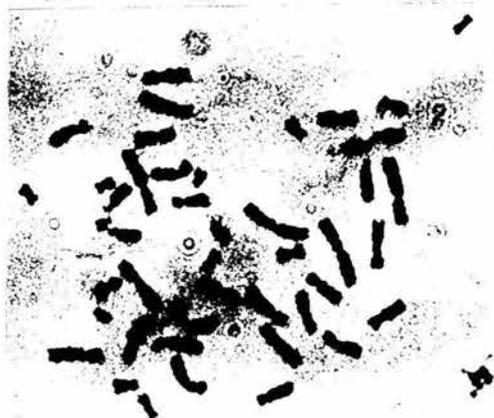
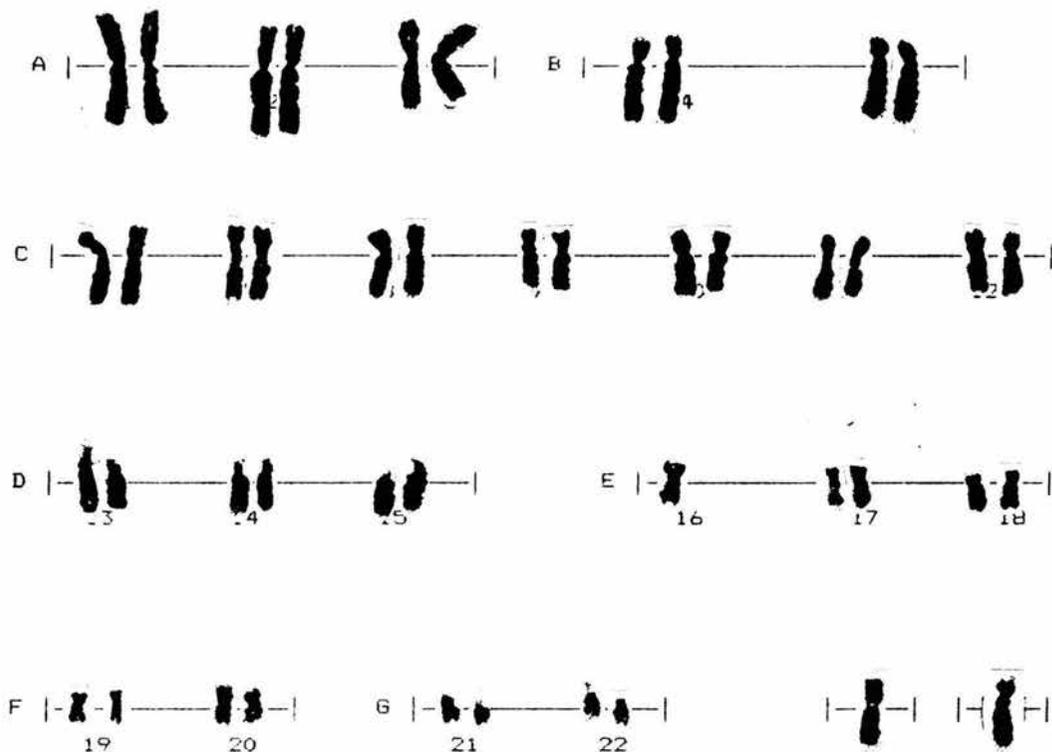
Dx.DE ENVIO:Leucemia linfoblástica
aguda L1.

Dx.CITOGENETICO: 46,XY,21q-

Idiograma III

CARIOTIPO EN: Medula Osea

NOMBRE: Hernandez A.F.



Dx. DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L1.

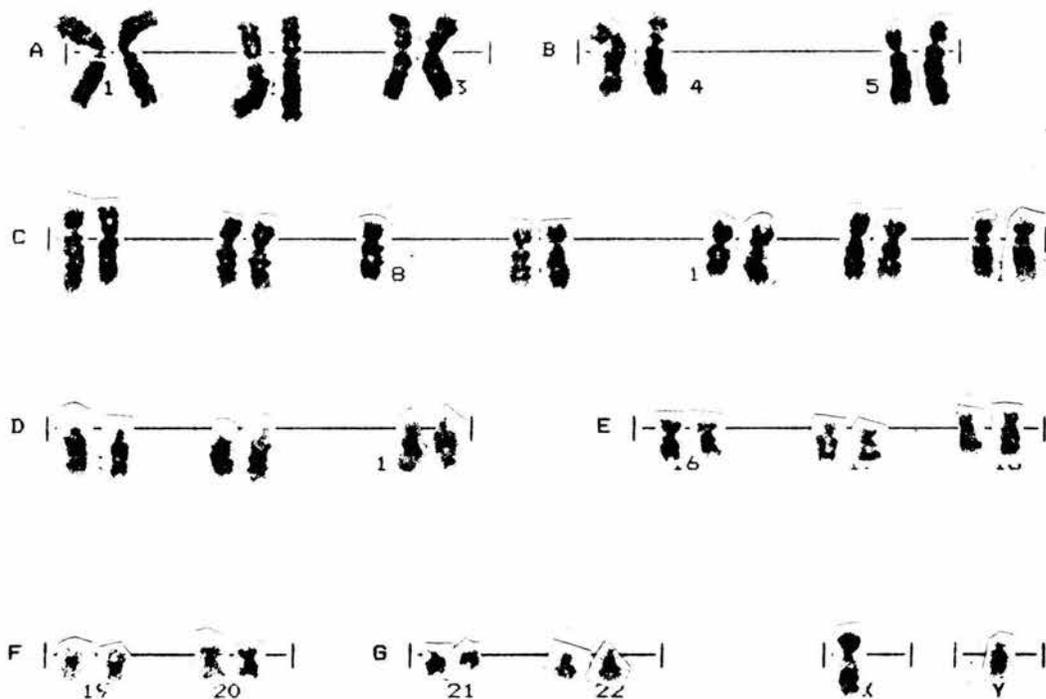
Dx. CITOGENETICO: 45,XX,-16

Idiograma IV

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea.

NOMBRE: Caballero J.J.



Dx. DE ENVIÓ: Leucemia linfoblástica
aguda L1.

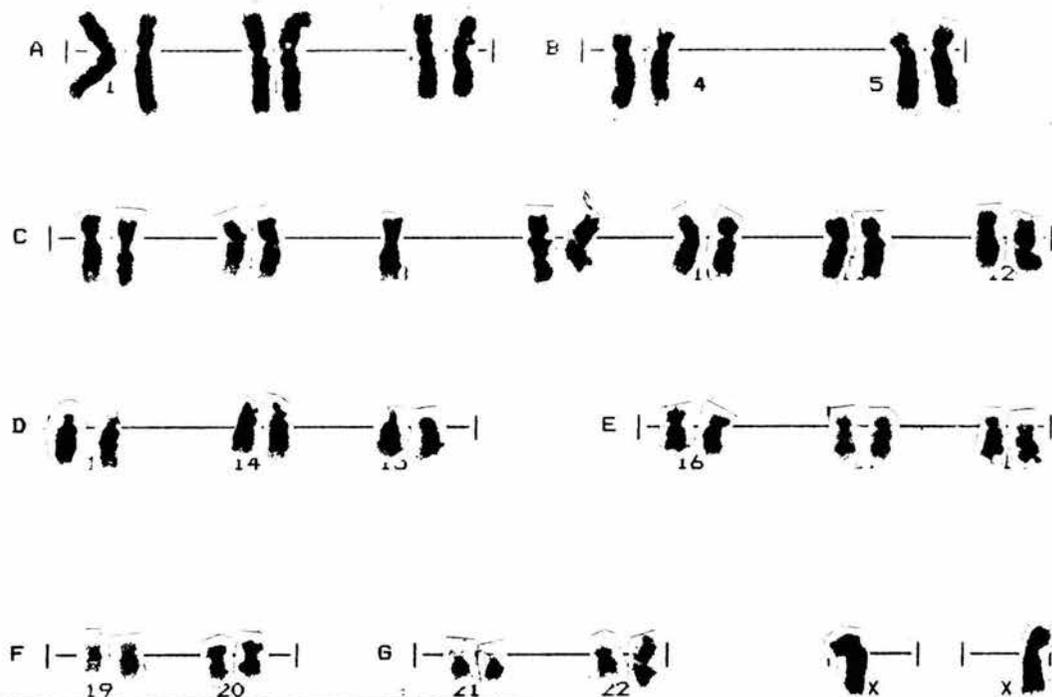
Dx. CITOGENETICO: 45,XY-8

Idiograma V

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Sangre Periferica

NOMBRE: Maya M.C.



Dx. DE ENVIO: Leucemia linfoblástica
aguda L1.

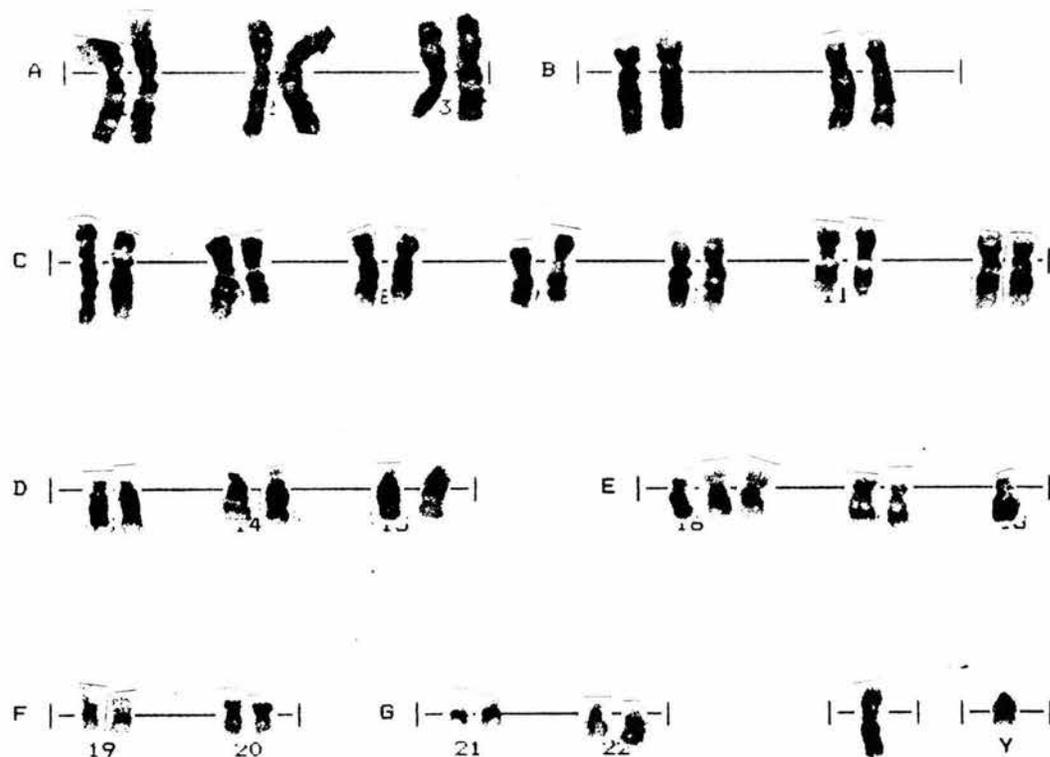
Dx. CITOGENETICO: 45, XX, -8, 16qh+

Idiograma VI

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea

NOMBRE: Juarez L.A.



Dx.DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L2.

Dx.CITOGENETICO: 47,XY,+16

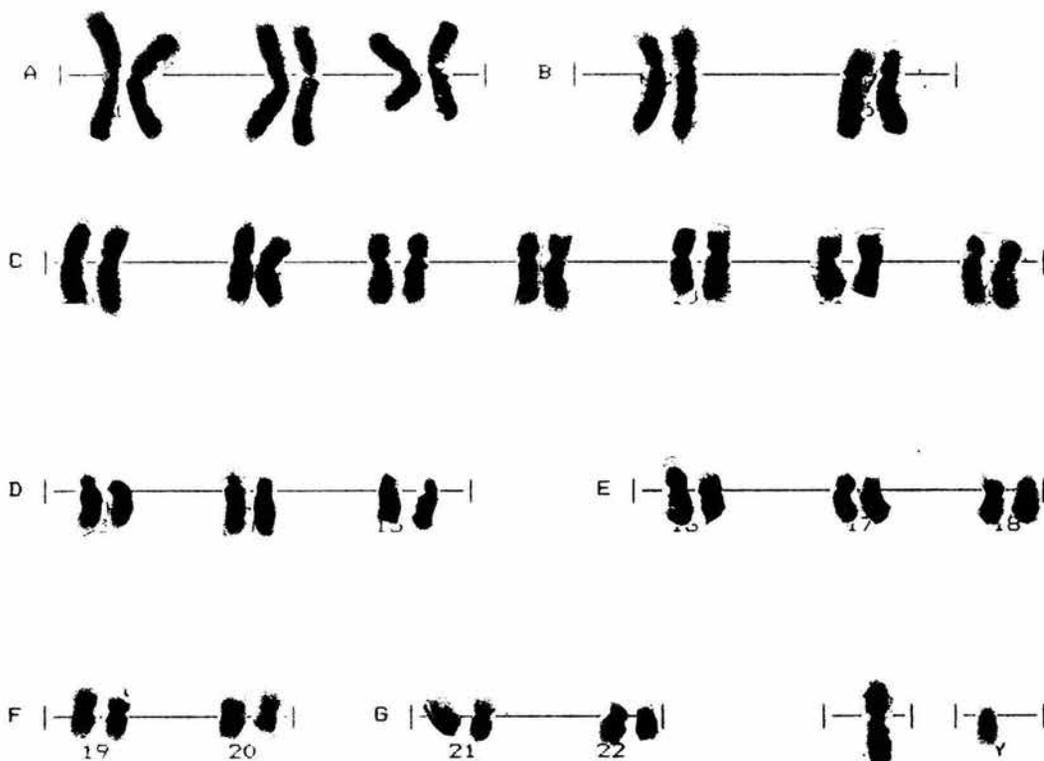


Idiograma VII

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Ósea

NOMBRE: Hernandez M.F.J.



Dx.DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L2.

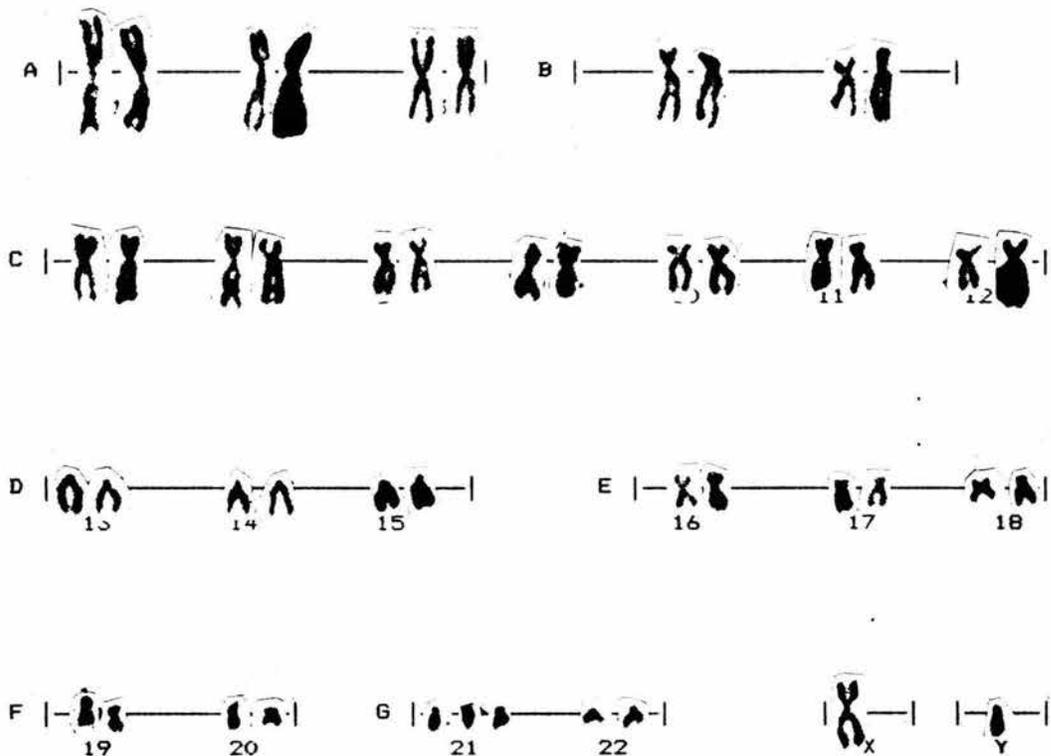
Dx.CITOGENETICO: 46,XY,16qh+

Idiograma VIII

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea.

NOMBRE: Zambrano. R/N.



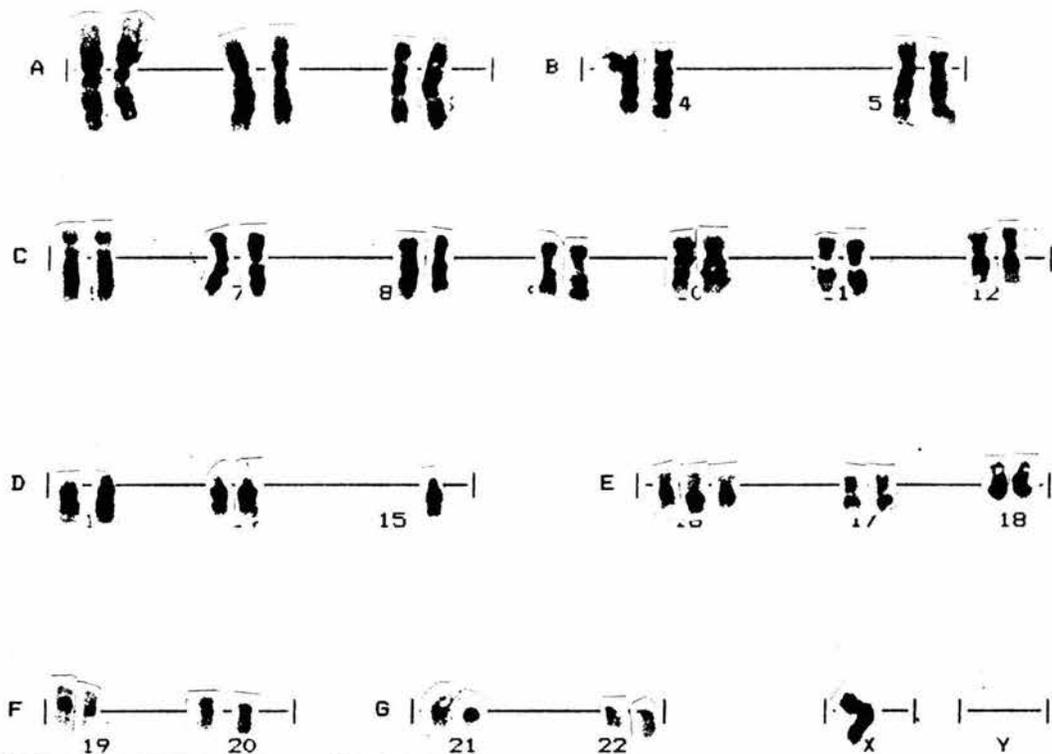
Dx. DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L2.

Dx. CITOGENETICO: 47,XY+21,Bq-

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea

NOMBRE: Juarez L.A.



Dx.DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L2.

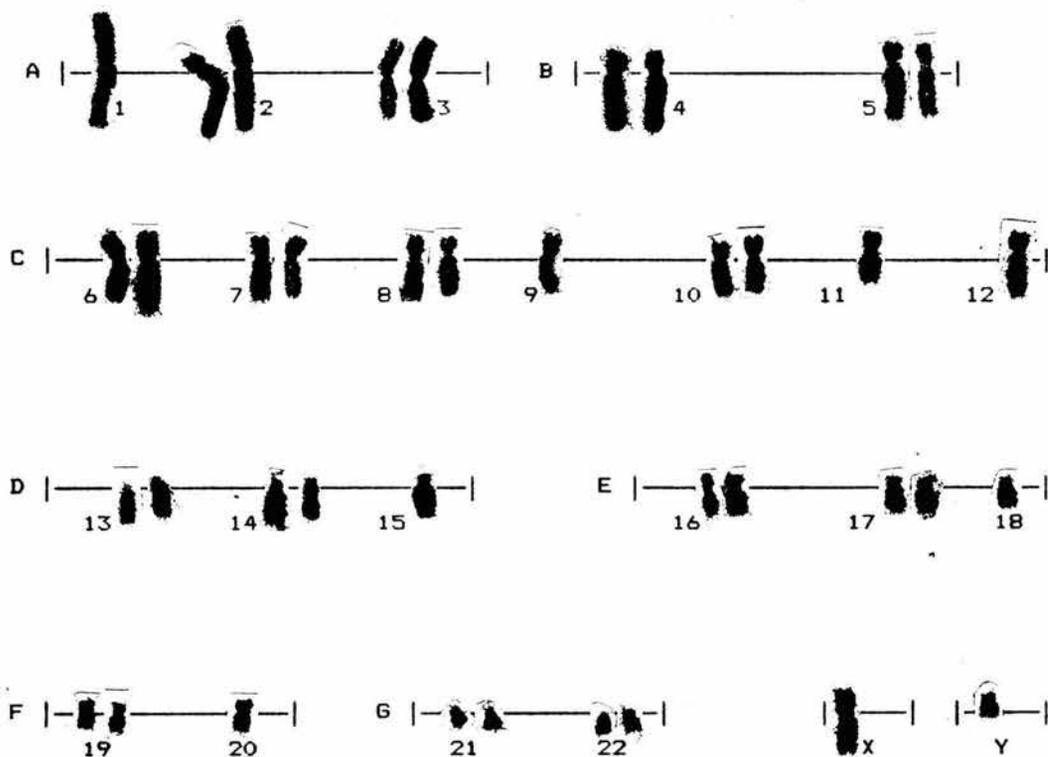
Dx.CITOGENETICO: 45,X,-Y-15+16

Idiograma X

HOSPITAL GENERAL CENTRO MEDICO LA RAZA
LABORATORIO DE CITOGENETICA

CARIOTIPO EN: Medula Osea.

NOMBRE: Limon N.F.J.



Dx. DE ENVIO: Leucemia Linfoblástica
aguda L3.

Dx. CITOGENETICO: Hipodiploidia.

Idiograma XI

DISCUSION.

CARACTERISTICAS CLINICAS.

En la leucemia linfoblástica aguda se ha observado que numerosos factores pueden tener un significado pronóstico importante, entre estos tenemos a el sexo, la edad,, el número inicial de leucocitos, valores de hemoglobina y porcentaje de blastos en sangre periférica los cuales sirven para dividir a los pacientes en grupo de riesgo y con esto realizar una adecuada selección del tratamiento para cada uno de ellos.

SEXO.

En cuanto a la incidencia en relación al sexo en LLA que se presentó en este estudio, se encontró una distribución de 20 varones y 18 mujeres. Observamos que en el subtipo L1 se presentaron 10 varones y 11 mujeres, en el subtipo L2 la diferencia de 10 hombres contra 6 mujeres y en L3 la relación fue 1:1 (Gráfica 1).

En algunos estudios como el de Miller(1981) (62) se indica que la LLA es más frecuente en hombres. Leverger, et. al. 1988 (60) menciona que la incidencia anual en Estados Unidos de varones con LLA menores de 15 años de edad es de 22.3 por millón mientras que en mujeres la incidencia es de 15.7 por millón. En la LLA de células T éste predominio masculino es mucho más evidente y estos superan a las mujeres en casi 4:1 teniendo éstas una mayor sobrevida libre de enfermedad.

Por otro lado Neglia y Robinson, 1988 (63) reportan que este patrón de incidencia de la LLA persiste a través de fronteras raciales y geográficas, y señalan como un punto importante que las cifras exactas varían dependiendo del subtipo específico de LLA.

Respecto a la población estudiada se encontró que en general la proporción de sexos no mostró diferencias y además no puede ser comparada con lo reportado en literatura, debido al pequeño tamaño de la población de estudio ya que los reportes encontrados manejan poblaciones grandes (60,62,63).

EDAD.

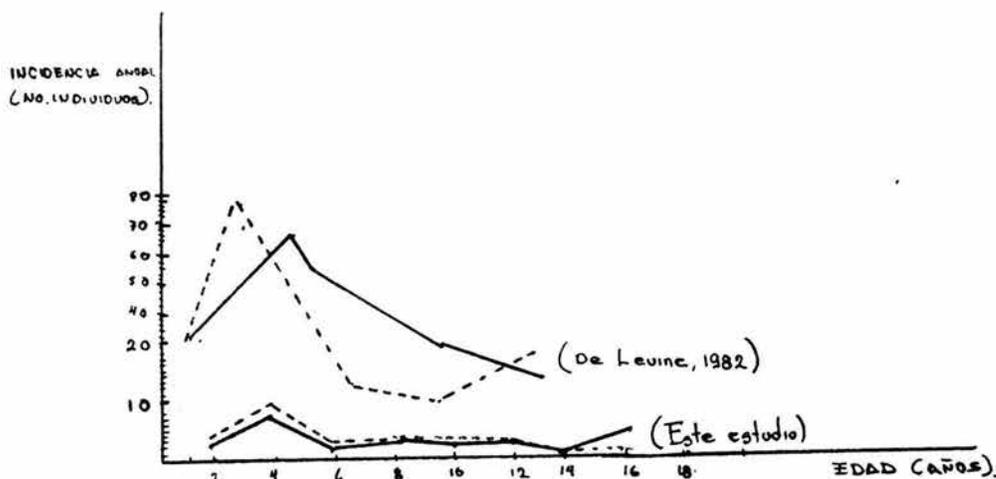
La edad es otro factor importante en la LLA en relación al pronóstico del padecimiento. Aunque su importancia etiológica no es clara se ha especulado que está relacionada con eventos gestacionales ó en el desarrollo del sistema inmune.

En éste estudio, se observó que el punto máximo de incidencia de la LLA se presentó en los intervalos de recién nacidos a 3 años de edad y en el intervalo de 3 a 6 años (26 individuos), que representa al 68% de la población y solo 13 (50%) se encontraron en el intervalo específico de 3 a 5 años.

La distribución en los diferentes subtipos fue de la siguiente manera: En L1 la mayoría de los individuos (61%) se encontraron en el intervalo de 0 a 3 y de 3 a 6 años, una distribución del 73% en los mismos intervalos para L2, en L3 que fue un grupo muy pequeño con dos casos, uno de 3 años y otro de 6 años de edad.

La distribución por edades encontrada en este trabajo es similar a lo reportado por De Levine, 1982 (64) quien establece que ésta enfermedad es tanto de niños como de adultos donde su punto máximo inicial de incidencia se encuentra entre los 3 y 5 años de edad, después de éste punto la incidencia declina y vuelve a elevarse durante el tercer decenio de vida (Gráfica 7).

Gráfica 7.- Comparación de la distribución por edades en LLA reportada por De Levine (1982) y la distribución encontrada en éste trabajo. (Línea continua: Hombres. Línea punteada: Mujeres).



Se encontró que en el estudio realizado por Bennett y Cols, 1981 (65) quienes analizaron la distribución por edades de 2 grupos morfológicos de LLA existe un claro predominio del subtipo L1 en el grupo de pacientes con edades tempranas y que la frecuencia de los casos en el subtipo L2 se incrementa gradualmente con la edad. En su estudio 45 individuos con edades de 0 a 10 años tuvieron una morfología L1, lo cual representó el 74% de la población de estudio y solo 6 casos con morfología L2.

Lo anterior concuerda con nuestros datos, ya que en nuestro estudio el subtipo más común fue L1 con 21 casos y además la mayoría (26 casos) estuvieron en los intervalos de edades tempranas (Gráfica 2)

LEUCOCITOS.

En cuanto a los valores de leucocitos en pacientes normales, en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se manejan diferentes intervalos dependiendo del grupo de edad pediátrica:

1) Recien nacidos a un año de edad. Con un conteo inicial de leucocitos que va de 6,000 a 30,000 /mm³.

2) 1 a 10 años con un intervalo de 4,500 a 18,000 leucocitos/mm³.

3) En el grupo de edad de 10 a 15 años tienen un intervalo de leucos de 4.500 a 13,800/mm³.

Comparando estos valores normales con los obtenidos en los pacientes encontramos que en el primer grupo hubo tres niños quienes presentaron leucocitosis con una media de 93,300 leucocitos/mm³. En el grupo 2 se presentaron 27 casos de los cuales, 10 presentaron leucocitosis con una media de 129,630 leucocitos/mm³, 6 con leucopenia (media de 2,683 leucocitos/mm³) y 11 tuvieron conteos dentro de los intervalos normales.

En el tercer grupo, cuatro niños tuvieron conteos mayores a 13,800 leucocitos/mm³, con una media de 77,275/mm³, por su parte dos niños con leucopenia tuvieron conteos de 2,100 y 3,800 leucocitos/mm³ respectivamente.

Con los resultados anteriores podemos decir que en general, el 45% de los niños mostraron leucocitosis, el 21% fueron pacientes leucopénicos y el 34% presentó valores normales (Tabla 6).

Algunos estudios (39,64) reportan que el conteo inicial de leucocitos es elevado en más de la mitad de los casos con LLA, lo cual difiere a lo encontrado en nuestro estudio, ya que solo el 45% presentó leucocitosis.

Además se menciona que aproximadamente el 20% de los casos con LLA tienen más de 100,000 leucocitos/mm³. En el grupo de pacientes de éste estudio se encontró algo similar ya que el 15% de los casos presentaron ésta característica con una media de 205,000 leucocitos/mm³. En cuanto a la diferencia en el porcentaje de pacientes con leucocitosis creemos que sea debido muy probablemente a las características clínicas de los pacientes ya que son distintas a las de otros estudios.

Por otra parte, podemos decir que una de las causas de que el 45% de los niños presentaran leucocitosis, fué que la mayoría de ellos cursaron con cuadros infecciosos y febriles continuos, lo cual debe haber originado un aumento en la cantidad de células blancas, que como sabemos son las responsables de proteger al organismo contra el ataque de virus y bacterias mediante la producción de anticuerpos.

Otra de las posibles causas se puede atribuir al proceso de crecimiento incontrolado de las células neoplásicas, producido por la alteración de los genes reguladores de crecimiento y proliferación celular, y en éste caso las células afectadas fueron los linfoblastos.

En el caso de los niños con leucopenia, se considera que la causa probable de esto fue que, dependiendo del grado de desarrollo de la leucemia, ciertos tipos celulares se encuentran en estados inmaduros de manera permanente, y muchas de éstas células no llegan a madurar completamente, lo cual provoca una disminución de células maduras normales en sangre periférica, adicionado a esto, los individuos presentaron hemorragias lo cual provocó una pérdida considerable de elementos celulares (1,2,21,64,66).

NO. DE LEUCOCITOS-EDAD Y PRONOSTICO DE LA LLA.

Por otra parte, para los pacientes con LLA infantil, se han establecido diferentes intervalos de número de leucocitos relacionandolos con el riesgo y pronóstico del padecimiento los intervalos son los siguientes:

1) Menor de 10,000 leucocitos/mm³. Para individuos con bajo riesgo y buen pronóstico. (Representan el 21.6% aproximadamente)

2) De 10,000 a 50,000 leucocitos/mm³. Individuos con riesgo intermedio y buen pronóstico que representan el 60% de los casos de LLA.

3) Mayor a 50,000 leucocitos/mm³. Para individuos con alto riesgo y un pronóstico muy pobre. (65, 44, 67, 68, 69).

En la tabla 15 se muestra la distribución que presentaron los 38 pacientes en los diferentes intervalos y relacionados con los grupos de edad según el pronóstico de la LLA.

Tabla 15.-Distribución de niños con LLA, en relación al grupo de edad y al conteo de leucocitos dependiendo del pronóstico de la LLA. o e

Grupo de edad (años)	Conteo inicial de leucocitos (miles/mm ³) en relación al grupo de riesgo.		
	Riesgo bajo (< 10,000)	Riesgo intermedio (10,000-50,000)	Riesgo alto (> 50,000)
0-2	-	-	3
2-10	15	5	7
10-15	4	1	3
total (%)	19 (50%)	6 (16%)	13 (34%)

Con lo anterior observamos que en el grupo de riesgo bajo se encuentra el 50% de los individuos, seguido de el grupo de alto riesgo (34%) y por último el grupo de riesgo intermedio con 16%.

Se encontró que existe una relación entre los grupos 1 y 3 en relación a la edad, ya que la mayoría de los niños tuvieron una edad entre 2 y 3 años que clínicamente corresponden al grupo de buen pronóstico.

En la revisión de la literatura se encontró que Steinhertz (1987) indica que la leucemia implica un número elevado de leucocitos, sin embargo, es común que el 53% de los casos con LLA tengan menos de 10,000 leucocitos/mm³ y solo el 17% con conteos mayores a 50,000 leucocitos/mm³. Estos mismos valores son reportados por Miller (1988), y Andreff, et.al.(1985).

En un grupo de más de 700 niños con LLA se encontraron 3 grupos de pronóstico. Uno con pacientes de pronóstico favorable que abarcó el 72% del total con un conteo de leucocitos de 10,000/mm³ y con una edad entre los 3 y 7 años, un grupo de riesgo intermedio con un 55% y un conteo de 10,000 a 50,000/mm³ presentándose en todos los grupos de edad predominando en los de menor a los 3 y mayor a los 7 años de edad. El último grupo con pobre pronóstico tuvo conteos mayores a 50,000 leucocitos/mm³ y no hubo edad específica (44,67,68,69).

Comparando los resultados obtenidos en éste estudio, observamos que en cuanto al grupo de buen pronóstico nuestro porcentaje (50%) es similar a lo reportado por Miller,1980, Andreff,1985 y Steinhertz,1987, que indican un porcentaje del 53% para este grupo pronóstico.

En cuanto al segundo y tercer grupo, los porcentajes difieren en casi la mitad para cada grupo en relación a lo reportado (Tabla 16).

Consideramos que estas diferencias probablemente son debidas a que las características de la población estudiada son distintas a las de otros países, y tales características son las raciales, nutricionales, socioeconómicas y etiológicas.

Tabla 16.-Incidencia de niños con LLA en los 3 grupos pronósticos.
(En relación al conteo de leucocitos).

Autor(año)	Grupos pronósticos e intervalo de leucocitos (miles/mm ³).		
	buen pronóstico (<10,000)	pronóstico intermedio (10,000-50,000)	mal pronóstico (>50,000)
Andreff (1985)			
Steinhertz (1987)	53%	30%	17%
Miller (1988)			
Este Estudio (1990)	50%	16%	34%

HEMOGLOBINA.

Otra de las características clínicas que se tomaron en cuenta fue el nivel de hemoglobina. En los 38 niños con LLA se encontró que el 50% presentó síndrome anémico, el 34% mostró una anemia severa con niveles de hemoglobina menores de 7 gr/dl. Por otro lado solo el 16% de los casos tuvieron niveles normales (Tabla 7).

Varios autores utilizan los valores de hemoglobina como indicadores clínicos en casos con LLA. Steinhertz, 1987 (68), Mauer, 1989 (70) y Miller, 1990 (34) reportan que la anemia está presente en casi todos los niños con LLA y en el 23% de éstos la anemia es severa con menos de 5 gr/dl de hemoglobina, además el 45% de los niños muestran valores entre 7 y 10 gr/dl y solo el 12% con niveles arriba de los 11 gr/dl. Estos porcentajes son distintos a los encontrados en este

estudio (Tabla 17) y creemos que una de las posibles causas fue que en muchos casos los pacientes acuden muy tardíamente al servicio médico y la leucemia es diagnosticada en etapas muy avanzadas, ésto se presentó en casi todos los niños incluidos en este estudio, lo cual trajo como consecuencia que además de la neoplasia se presentaran síntomas y/o signos tales como la propia anemia, dolor óseo, fiebre, pérdida de peso y hemorragias.

Tabla 17.- Incidencia de niños con LLA en los diferentes intervalos de nivel de Hemoglobina. (Comparación de Frecuencias reportadas por otros investigadores).

Autor (Año)	Niveles de Hemoglobina (Hb gr/dl)		
	<5 gr/dl.	7-11 gr/dl	>11 gr/dl
Steihertz (1987)			
Mauer (1987)	25%	45%	12%
Miller (1990)			
Este estudio (1990)	34%	50%	16%

BLASTOS EN SANGRE PERIFERICA.

Por último se encontró que el porcentaje de blastos en sangre periférica fué muy variable ya que se tuvieron valores de 2 a 99%. (Tabla 7). De los 38 pacientes con LLA, solo uno no presentó blastos en sangre periférica.

La presencia de blastos en sangre periférica nos da una información básicamente diagnóstica y pronóstica de la leucemia, ya que nos indica que tan evolucionado está el padecimiento y nos refleja el grado de invasión y metástasis de las células blásticas.

También se observó que no existe relación entre el porcentaje de blastos, con el subtipo de LLA ni con el tipo de alteración cromosómica ya que los porcentajes fueron muy heterogéneos. Tal como se observó en

el caso de la paciente con la t(1;19) (caso no.2). Dicha alteración cromosómica se considera de mal pronóstico, sin embargo, presentó un porcentaje bajo de blastos (15%), en comparación con otro caso (caso 30) que no presentó alteración cromosómica y tuvo 87% de blastos.

La causa de que existan blastos en sangre periférica es debido a que las células blásticas (linfoblastos) han proliferado en gran cantidad dentro del tejido hematopoyético, debido a la alteración en los genes reguladores de crecimiento y proliferación celular por lo que no pueden ser retenidas más en la médula ósea por lo que salen, se inicia la invasión y la formación de metástasis en sangre periférica y posteriormente a otros tejidos como hígado, riñón, testículos, pulmón, ovarios y tejido subcutáneo (22).

PRUEBAS CITOQUIMICAS.

Reacción de Peroxidasa.

Con lo referente a los resultados de las pruebas citoquímicas, observamos que el 100% de los niños con LLA tuvieron una reacción negativa para la prueba de Peroxidasa, debido a que en estos linfoblastos se encuentra ausente la enzima mieloperoxidasa, la cual es específica para blastos de LNLA.

Reacción de Acido Perhiodico Shiff (PAS).

En cuanto a la técnica de PAS, el 50% (9 niños) de los casos con L1 mostraron positividad para esta técnica. Para la variedad L2, la prueba de PAS se realizó en 13 casos donde el 77% presentó reacción negativa lo cual significa que la mayoría de las células se encuentran en una fase temprana de maduración por lo que la cantidad de glucógeno es escasa ó en algunos casos nula.

Reacción de Fosfatasa Acida.

En relación a la técnica de Fosfatasa Acida, se logró realizar en 16 casos de L1 (71%), presentando una reacción positiva únicamente en 6 casos (37%) y negativa en el resto (63%).

Tomando en consideración que la reacción positiva de la Fosfatasa Ácida pertenece a células de estirpe T, podemos inferir, que el 37% de los casos del subtipo L1 corresponden a dicho tipo celular, lo cual indica un pobre pronóstico, en cambio para el subtipo L2 resultaron 10 casos (67%) con una reacción positiva. Con lo anterior se puede decir que mediante ésta técnica es posible determinar que probablemente las células de estirpe T son más frecuentes en el subtipo L2. En la literatura se reporta que aproximadamente del 15 al 20% de los casos de LLA son del tipo de células T, lo cual difiere con el porcentaje encontrado en éste estudio (43,67).

Bhem,1990, reporta que la prueba de PAS puede ser positiva en más del 70% de los casos con LLA, pero en ocasiones los agregados granulares son vistos en leucemias monocíticas. En cuanto a la Fosfatasa ácida indica que ésta técnica comunmente tiene una reacción positiva en linfoblastos de linaje T, aunque también existen excepciones como es el caso de células leucémicas con linaje inmunológico de células B (17).

Como se observa el porcentaje de reacción positiva de PAS obtenida en el estudio que fue del 32%, no fue similar al 70% reportado por Bhem,1990, confirmando también con la técnica de Fosfatsa ácida que presentó positividad para el 54%, lo cual indica que la mayoría de los niños presentaron una línea celular de estirpe T, que se reflejó en el pobre pronóstico del padecimiento y esto está dado por las células T, ya que estas presentan poca respuesta a la terapia debido a sus características inmunológicas (17).

DISCUSION DE RESULTADOS CITOGENETICOS.

De la serie de 38 casos de niños con LLA, solo en 24 (63%) fue posible obtener metafases en los cultivos de médula ósea, de los cuales el 95% (23 casos) presentaron alteraciones cromosómicas.

En cuanto a los cultivos de sangre periférica con PHA, únicamente 22 pacientes desarrollaron metafases y de éstos el 72% (16 casos) mostraron alteraciones numéricas y/o estructurales. Solo un caso (2.6%) presentó metafases en cultivo de sangre periférica sin PHA.

Con respecto, en la literatura se sabe que en la LLA los blastos que están circulando en sangre periférica se encuentran en distintas fases de maduración ya sea temprana, intermedia ó tardía, además de que estos presentan un bloqueo en alguna etapa del ciclo celular y por esto al momento de realizar el frenamiento con colchicina de las células en la etapa de metafase es muy poco probable ó en ocasiones nulo el encontrar las células en ésta etapa. Por lo que creemos que en el caso que presentó metafases en sangre sin estimulación fué que las células no presentaban algún bloqueo en su ciclo celular (26).

En relación a los 11 pacientes que no presentaron desarrollo de metafases en ambos tejidos, se considera que fue debido al bajo número de leucocitos y escasa muestra de médula ósea y/o sangre periférica, tal como se presentó en 5 casos que presentaron leucopenia (con una media de 3,000 leucocitos/mm³). Debido a esto, la cantidad de células que se tienen en el cultivo no son las suficientes para obtener resultados óptimos, considerando que muchas células llegan a morir y en las que logran continuar no siempre se obtienen metafases (44,53).

Por otro lado, otro niño (caso 11) que no desarrolló metafases en los cultivos tuvo la característica de presentar leucocitos con un conteo de 340,000/mm³ y consideramos que las células de éste niño y también el de los anteriores, probablemente el ciclo celular presentó un cambio, debido a las características de los genes relacionados con los procesos de proliferación celular, por lo que no fué posible obtener formas metafásicas para el análisis. Los 5 individuos restantes (caso 6,12,14,16,34) no tuvieron metafases debido básicamente

a la escasa muestra de ambos tejidos. Las condiciones de esterilidad de las muestras no fueron las adecuadas ya que hubo contaminación en los cultivos de 3 pacientes.

Hubo 2 niños con leucopenia (caso 4 y 5) que presentaron metafases, pero éstas fueron muy escasas y con una calidad muy deficiente producto del mismo proceso neoplásico (74,76).

Con lo referente a la frecuencia de anomalías cromosómicas encontradas en médula ósea en la población de estudio, se encontró que las alteraciones más frecuentes fueron las numéricas (más o menos de 46 cromosomas) y en menor frecuencia las alteraciones estructurales (Tabla 11. Gráfica 5 y 6). El porcentaje de alteración cromosómica encontrado en nuestro trabajo (95%), es similar a lo reportado por Michael, et. al, 1988 (71), Pui y Williams, 1990 (72), Williams, 1990 (73) y Heerema, 1990 (59) quienes sugieren que es posible detectar en la actualidad alguna alteración genética en un 55 a 94% de los niños diagnosticados con LLA aún con la presencia de metafases poco analizables.

Sin embargo, existió una diferencia en cuanto a la frecuencia de las anomalías numéricas y estructurales reportadas por Miller, 1990 (34) quien indica que aproximadamente el 40% de los niños con LLA tienen una clona aneuploide, esto es, una clona conteniendo más o menos de 46 cromosomas y cerca del 35% de los casos tienen células leucémicas con un complemento diploide normal, mientras que del 10 al 20% son pseudodiploides (Tabla 18). En nuestro estudio se encontró una frecuencia de 75% de aneuploidia y un 25% de pseudodiploidia, la diferencia de frecuencias consideramos que sea debido a las características etiológicas y genéticas propias de la población infantil del Hospital, así como las características sociales y ocupacionales de los individuos.

Tabla 18.- Comparación del porcentaje de alteración cromosómica reportada por otros autores en muestra de médula ósea.

Autor	Año	% de alteración cromosómica.
Michael	1988	60-94%
Pui y Williams	1990	55-80%
Williams	1990	90%
Heerema	1990	90%
Miller	1988	aneuploide 40% pseudodiploide 20%
Este estudio	1990	95%

*Aneuploide 75% y Pseudodiploidia 25%.

Por otro lado, las técnicas de bandeo GTG y CBG se realizaron en ambas muestras de los casos que presentaron metafases, pero debido al bajo número y mala calidad de las metafases no se pudo obtener mayor información sobre la posible presencia de otras alteraciones estructurales y en el caso de las alteraciones numéricas no fue posible detectar con precisión cuales fueron los cromosomas que se encontraban adicionados ó ausentes.

En cuanto a la calidad de las metafases se ha establecido (Yunis,1981, Lawler,1982, Lebau y Rowley,1989 y Berger,1981) (25,27,29,37,) que en la gran mayoría de los pacientes con LLA (más del 50%) presentan metafases con apariencia de "pelusa" (Fuzzy) lo cual impide obtener en primer instancia, metafases de buena calidad y en segundo al momento de realizar el bandeo, la resolución de las bandas de cada cromosoma es muy deficiente, haciendo difícil y en muchas ocasiones imposible el análisis cariotípico.

En el cariotipo de los pacientes (90%) nos encontramos con el mismo problema de la calidad deficiente de las metafases, tanto en médula ósea como en sangre periférica, las cuales tuvieron cromosomas con apariencia de "pelusa" ó deshilachadas, sin embargo se tomó el criterio de analizar tanto metafases de mala calidad y aquellas con buena calidad con la finalidad de no excluir si es que existiese, alguna clona anormal y así obtener resultados más reales de cada paciente.

Otro de los eventos que observamos fue la baja actividad mitótica en los cultivos de médula ósea y debido a las características morfofuncionales de los linfoblastos.

En el caso de la sangre periférica se considera que fue debido a la pobre estimulación mitógena, lo cual sucede con frecuencia en células de individuos con LLA, sin embargo, se ha reportado que en LLA la división celular es elevada, pero las metafases obtenidas de éstas células presentan una calidad cromosómica deficiente en contraste con la buena calidad de las metafases de células normales de la misma preparación, desconociéndose hasta ahora cual es la verdadera razón (27,37,59).

En las anomalías cromosómicas de médula ósea y sangre periférica que se muestran en las gráficas 5 y 6, observamos que el subtipo L1 fue el que presentó el 100% de alteración cromosómica en médula ósea mientras que en el subtipo L2 con 15 casos el 93.4% presentó anomalías. Por su parte en L3 con 2 pacientes solo 1 caso (caso 37) desarrollo metafases en médula ósea presentando el 100% de alteración cromosómica. (Tabla 11).

GRUPO HIPODIPLOIDE.

La ploidia más frecuente en médula ósea en los 3 diferentes subtipos fue la hipodiploidia la cual se presentó con más frecuencia en L1 con 11 casos representando el 58% de alteración y en el subtipo L2 la frecuencia de hipodiploidia fué de 40% (6 pacientes).

Los intervalos en el número de cromosomas de la hipodiploidia fue variable. En 5 casos la pérdida de uno ó más cromosomas fue constante predominando los cromosomas del grupo C seguido del grupo G y por último el grupo D.

Los 8 pacientes restantes presentaron pérdida de cromosomas inespecíficos. La causa principal de no poder determinar el número de cromosoma específico fue la pobre calidad de las metafases haciendo difícil el análisis cromosómico (56,72,76) (Tabla 11).

Consideramos que la causa de las hipodiploidias encontradas en el estudio fue la mitosis multipolar (40) ya que parece ser el mecanismo más factible para producir la línea cercana a la haploidia y la línea hipodiploide, aunque el apareo parcial de cromosomas homólogos puede ser posible. Se ha determinado una retención constante y no al azar de ciertos cromosomas como son el 10,14,18,21 y X, éste patrón de retención cromosómico es muy similar al de la hiperdiploidia donde los cromosomas 4,6,10,14,17,18,20,21 y X están adicionados y esto puede ser debido a que éstos cromosomas participan en la proliferación y/o sobrevivencia de las células leucémicas.

También se ha observado que los cariotipos de las células leucémicas son clasificados de acuerdo a la línea celular más frecuente. En muchos casos se ha observado la coexistencia de una línea hiperdiploide y una hipodiploide (biclonal), aunque la población celular predominante fuese la hipodiploide, ambas proceden de una evolución clonal siendo la primera el doble de la línea hipodiploide teniendo ésto importancia tanto biológica como pronóstica.(75).

El tipo de leucemia biclonal se observó en 4 pacientes con L1 (casos 8,9,15 y 18) y en dos casos con L2 (caso 23,32) que presentaron tanto metafases hiperdiploides como hipodiploides por lo que se incluyeron en ambos grupos de ploidias (Gráficas 5 y 6).

Correlacionando los hallazgos citogenéticos con las características clínicas de los pacientes observamos que en el subtipo L1 la mayoría de ellos (8 casos) se encontraron en el intervalo de edad de 2 a 10 años.

Como ya se mencionó anteriormente la distribución de los individuos en relación al número de leucocitos fue homogénea en los 3 intervalos establecidos 7 de ellos se consideraron como pacientes de riesgo habitual y solo 4 en el grupo de alto riesgo. Esto coincide con lo reportado para L1 ya que clínicamente éste subtipo de leucemia es considerado de buen pronóstico y no es tan agresiva como los otros subtipos (74).

Cabe mencionar que en este punto existe una discrepancia ya que el subtipo L1 clínicamente es considerado de buen pronóstico y bajo riesgo, pero como la mayoría de los casos presentó hipodiploidias, citogenéticamente está establecido que los individuos con éste tipo de alteración tienen mal pronóstico y un alto riesgo, independientemente de sus características clínicas, es decir, aunque el paciente presente un conteo de leucocitos dentro del intervalo de buen pronóstico y esté dentro del grupo de riesgo habitual no responderá adecuadamente al tratamiento debido a la pérdida del material genético (Heerema,1990) (59).

En el subtipo L2 se encontró a 1 paciente menor de 2 años, 3 entre 2 y 10 años y 2 mayores de 10 años de edad. Cuatro de ellos presentaron conteos mayores de 50,000 leucos/mm³ y 2 pacientes con conteos entre 10 y 50,000 leucos/mm³, observando también que solo 1 paciente perteneció al grupo de alto riesgo.

Con lo referente a la hipodiploidia en la literatura está reportado que ésta alteración numérica es relativamente poco común en la LLA afectando solo del 3 al 9% de los individuos y la mayoría de los investigadores señalan que está asociada con pobre respuesta al tratamiento. Pui y cols (1987) encontraron que el 7.6% de 409 pacientes tuvieron células leucémicas hipodiploides y que los

niños tenían una edad media de 5 años con un intervalo de 9 meses a 17 años. La morfología de las células blásticas fué L1 en 26 casos y L2 en 5. En su estudio el conteo inicial de leucocitos tuvo un intervalo de 100,000 a 132.000 leucos/mm³ con una media de 12,700/mm³ también indican que algunos pacientes con hipodiploidia comunmente tienen conteos bajos de leucocitos, pobre respuesta al tratamiento y metafases con números cercanos a la haploidia.(75).

Se conoce muy poco de los casos con hipodiploidia. De 2084 casos estudiados por Pui y Carroll en 1990, 1384 tuvieron un cariotipo anormal incluyendo 27 (1.2%) con un número cromosómico modal de menos de 45 cromosomas.

Los niños con hipodiploidia son asociados con un alto conteo de leucos, edad mayor de 2 años y sexo femenino. Se ha observado que pacientes con un número hipodiploide cercano a la haploidia tienden a ser de sexo femenino, pero la edad, el conteo de leucos y el fenotipo leucémico es similar a los pacientes con LLA en general (44).

El número de casos detectados y estudiados con hipodiploidia en su estudio tuvieron un análisis cariotípico muy pobre. La poca cantidad de casos con hipodiploidia y haploidia reportados parece ser el reflejo de la dificultad de obtener cariotipos de buena calidad de dichos pacientes.

Heerema en 1990 establece que el patrón cariotípico de niños con LLA es un factor pronóstico independiente de las características clínicas y que la hipodiploidia es de muy mal pronóstico, además de que en ésta alteración se ha observado que los cromosomas que tienden a ser disómicos son los cromosomas sexuales y cromosomas 10,14 y 18 (59).

En cuanto al conteo inicial de leucocitos en la literatura se menciona que los pacientes con hipodiploidias tienen valores heterogéneos y ésto último fue lo que se encontró en nuestros pacientes, ya que se obtuvieron valores desde 1900 hasta 282,500 leucocitos/mm³.

Con lo anterior observamos que no existe un patrón constante en cuanto a la incidencia de la LLA en niños con hipodiploidia en ciertos grupos de edad, de sexo y ni con un conteo de leucocitos específico, por lo que consideramos que éste grupo de ploidia es un factor independiente de las características clínicas.

GRUPO HIPERDIPLOIDE.

Otra de las alteraciones encontradas en médula ósea fue la hiperdiploidia con un intervalo de 47 a 50 cromosomas (6 casos), hiperdiploidia de más de 50 cromosomas (4 casos), un paciente con un cariotipo cercano a la triploidia (Aproximadamente 69 cromosomas) y 3 con un número cromosómico cercano a la tetraploidia (cerca de 92 cromosomas).

Su incidencia en el subtipo L1 fue de la siguiente manera: 3 niños con hiperdiploidia (47-50 cromosomas) con edades entre los 3 y 9 años de edad y un intervalo de 13,400 a 164,000 leucocitos/mm³.

Tres individuos con hiperdiploidia (mas de 50 cromosomas) con edades de 3 meses a 6 años y un conteo de leucocitos de 2,100 a 45,000/mm³.

En L2 hubo dos casos con hiperdiploidia de 47 a 50 cromosomas y uno con más de 50 cromosomas. Las edades fluctuaron de 12 días de nacidos hasta los 12 años y el conteo inicial de leucocitos fue muy variable con un intervalo de 11,700 a 118,500 leucocitos/mm³.

Por su parte en L3 solo un paciente presentó hiperdiploidia de 47 a 50 cromosomas y otro paciente presentó más de 50 cromosomas. las edades fueron muy distintas (6 y 13 años), y los conteos de leucocitos fueron muy elevados (tabla 7).

Dentro del grupo de las hiperdiploidias (47-50 cromosomas) sobresalen los casos que tuvieron trisomias específicas tales como: 47,XY+16 (caso 33), 47,XX+21,Bq- (caso 36) y 47,XX+21 (caso 26), estos dos últimos corresponden al síndrome de Down.

La trisomía del cromosoma 16 no está reportada por ningún autor y por lo tanto se determinó como una alteración nueva en ésta población pediátrica con LLA subtipo L1.

En cuanto a la trisomía 21, está documentado que los individuos con síndrome de Down tienen un alto riesgo de desarrollar leucemia además de otros padecimientos.

Se ha determinado que los individuos con este síndrome constituyen cerca del 2% de todos los casos diagnosticados de LLA infantil, estimándose que estos niños tienen un riesgo de 10 a 15 veces mayor de desarrollar leucemia aguda (Neglia y Robinson, 1988) (63).

En cuanto a la determinación de cuáles fueron los cromosomas que estuvieron adicionados en los cariotipos de los casos con hiperdiploidia esto no se pudo realizar detalladamente debido a que los cromosomas tuvieron mala calidad por lo que el bandedo G y C no pudo realizarse de manera óptima y solo se pudo saber a que grupo pertenecían los cromosomas, pero no se descarta la posibilidad de que éstos cromosomas adicionales sean iguales a los reportados en otros estudios. (op cit).

Las hiperdiploidias son atribuidas a una no disyunción mitótica, pero otros mecanismos como la segregación somática son posibles. Esta última propone una fase tetraploide seguida por una segregación independiente y posiblemente irregular de los cromosomas. Este mecanismo puede colaborar para la producción de homocigosidad de genes recesivos los cuales pueden ser expresados (Berger, 1981) (29).

Otros autores como Berger, 1981 y Heerema, 1990, mencionan que niños con hiperdiploidia con más de 50 cromosomas tienen un mejor pronóstico que aquellos con 47 a 49 cromosomas, mientras que en niños con pseudo y/o hipodiploidia tienen un pobre pronóstico (30,59).

Michael, 1988, reporta que el 30% de los niños con LLA presentan hiperdiploidias, además menciona que las trisomías más comunes son las de los cromosomas 4, 6, 10, 14, 17, 20, 21 y X y con una frecuencia relativamente baja de translocaciones. Realizó también la correlación clínico-citogenética mencionando que los niños con mejor pronóstico tienen conteos de leucocitos menores a 10,000/mm³, edad entre 2 y 10 años, morfología L1 y un cariotipo hiperdiploide (71,46).

En otro trabajo, Pui Williams, Crist y Look, 1990, reportaron que los pacientes con células leucémicas con hiperdiploidia ocupan el 25% de los casos con LLA y son los que tienen la respuesta más favorable al tratamiento (76).

En un estudio con 22 niños con hiperdiploidia, la edad media fue de 3 años, el conteo de células blancas tuvo una media de 6,000 leucocitos/mm³, además estos pacientes tuvieron otros factores pronósticos reconocidos incluyendo edad entre 3 y 7 años bajo conteo de células blancas y marcadores no-T y no-B (77).

La frecuencia de hiperdiploidias encontradas en este estudio fue del 54.6% la cual fue diferente a lo reportado por Pui y Williams quienes mencionan que la hiperdiploidia tiene una frecuencia del 42% en los casos con LLA. Otros autores que reportan porcentajes similares son Williams, et.al, 1990, Pui, et.al, 1990, Pui, Williams, et.al, 1990 y Raimondi, Bhem, et.al, 1990. (73, 75, 76, 78).

En cuanto a la correlación clínica, nuestros datos difieren con lo reportado, ya que la edad y el número de leucocitos fueron muy heterogéneos por lo que no se pudo realizar una correlación clínica citogenética más precisa tal como se menciona en la literatura donde los pacientes con hiperdiploidias están en el intervalo de 2 a 10 años, con una media de 3 años y un conteo de leucocitos menor de 10,000/mm³.

La frecuencia de pacientes con tri y tetraploidia fue muy baja ya que solo se encontró un paciente (4%) con un cariotipo cercano a la triploidia con una edad de un año 5 meses, morfología L2, 90% de blastos y un número de leucos de 45,500/mm³ y en tres niños (9%) se encontró un número cromosómico cercano a la tetraploidia (casos, 18, 26, 32) con edad de 2 años, morfología L1, leucos de 2,700/mm³, otro paciente de 12 días morfología L2, y 118,500 leucos/mm³, paciente de 11 años, morfología L2 y leucos de 11,700/mm³.

La endorreducción de una célula en el intervalo diploide, con o sin la subsecuente pérdida de cromosomas parece ser el mecanismo más común para producir la tetraploidia, la evidencia más notable para esta explicación es la presencia de pares de cromosomas conteniendo el mismo arreglo. En el caso de la triploidia, la no disyunción, duplicación de células hipodiploides, pérdida de cromosomas de células hiperdiploides y la mitosis multipolar de células tetraploides son las causas de esta anomalía, la ausencia de una línea hipodiploide con marcadores cromosómicos apareados sugieren que la no disyunción es la causa más común de la triploidia (40).

En relación a la tri y tetraploidia en la literatura se menciona que la tetraploidia se presenta en solo el 1% indicando la baja incidencia de ésta anomalía en la LLA infantil. El tercer trabajo internacional sobre cromosomas en leucemia reportó solo un caso cercano a la tetraploidia en 330 casos bandeados de LLA.(29). Al igual que Herema, 1990 quién encontró un caso de LLA cercano a la tetraploidia en un estudio de 70 niños con diagnóstico de LLA.(59).

Pui y Williams(1990)(40) en un estudio de 500 casos con LLA, encontró 4 casos (0.8%) con cariotipo cercano a la tetraploidia y 6 (0.3%) tuvieron triploidia.

Los porcentajes encontrados en nuestro trabajo de tri y tetraploidia difirieron de lo reportado y esto es debido al tamaño de muestra. El punto que coincidió fue que nuestros pacientes tuvieron en su mayoría una morfología L2 tal como esta indicado por los autores mencionados anteriormente.

GRUPO PSEUDODIPLOIDE.

En lo referente a las pseudodiploidias que se encontraron en muestras de médula ósea y sangre periférica fueron t(9;22) (caso no.7), 46,XY,Gq- (caso no.19), 46,XY,16qh+ (caso no. 27).

La t(1;19), en el caso no.2 y el caso 36 con el cariotipo 47,XY+21,Bq- estuvieron presentes solo en médula ósea. Y exclusivamente en sangre periférica fueron encontradas la alteración 45,XX-8,16qh+ y 45,XX-20,16qh+ (caso no.5). Las características clínicas de cada uno de ellos se muestran en la tabla no.2.

El caso de la t(1;19) que se presentó en éste estudio, corresponde al 4% de los pacientes con LLA, el caso fue una niña con 10 años de edad con un conteo elevado de leucocitos (76,800/mm³), 93% de blastos y morfología L1. Los datos anteriores son apoyados con lo reportado en bibliografía donde se menciona que la LLA con inmunofenotipo de células pre-B, el 24% de éstos pacientes presentan la t(1;19) (q23;p13) los cuales tienen comunmente un pronóstico muy pobre además que la edad promedio de incidencia es de 11 años y con un conteo inicial de 10,000 leucos/mm³ (Andrew y Carroll,1984) (30). Por su parte Trent, Shikano, Yasuhiko Kaneko et.al.(1989) indican que las características

clínicas y hematológicas que se presentan en pacientes con la t(1;19) son: edad entre 9 meses y 16 años, morfología FAB L1 y un conteo inicial de leucocitos con un intervalo de 18,000 a 164,000/mm³, además de tener elevados porcentajes de blastos en sangre periférica. Resultados similares han sido reportados por Trent; .et.al(1989), Michael,et.al(1990) y Crist and y Carroll,(1990), Pui et al (1990). (42,72,76,79).

Cabe mencionar que la t(1;19) (q23;p13) se presentó en el 100% de las metafases de médula ósea, sin embargo, no se encontró en células de sangre periférica lo cual nos indica que la clona anormal no invade sangre periférica debido a que la cantidad de blastos circulantes fue del 15 % y posiblemente el cariotipo de la mayoría de estos blastos fue normal.

En cuanto al paciente que presentó la translocación t(9;22) ó cromosoma filadelfia (Ph+) mostró las siguientes características clínicas: sexo masculino, edad de 9 años, conteo inicial de 13,400 leucos/mm³ y 93% de blastos. Este paciente presentó la t(9;22) en el 60% de las metafases de médula ósea, mientras que en el 32% presentó células blásticas con un cariotipo hipodiploide.

En sangre periférica se tuvieron 56% de las metafases con la pseudodiploidia y el 44% con hipodiploidia (20-44 cromosomas).

Este paciente corresponde al 4% del total de los casos con LLA (éste porcentaje está en función de los pacientes que solo desarrollaron metafases), Coincidiendo en edad y conteo de leucos a lo reportado en la literatura.

Comparando con lo reportado por otros autores tenemos que Lawler en 1982 estableció que los pacientes con Ph+ se dividen en 4 clases:

- 1.-Cuando la translocación es la única anomalía.
- 2.-Cuando la translocación está asociada a otra anomalía.
- 3.-Está representada con el Ph- en Leucemias mieloides crónicas y se considera como un cariotipo normal.(59,71,42).
- 4.-Se considera en aquellos pacientes con un cariotipo completamente anormal.

Con base en lo anterior consideramos que el caso de Ph+ en este estudio corresponde a la segunda clase debido a que además de la translocación también se presentaron hipodiploidias.

Además se indica que los pacientes con pseudodiploidias comúnmente tienen elevados conteos de leucocitos y muestran un pronóstico pobre, aunque en muchos casos los hallazgos cromosómicos al diagnóstico son usados como factores pronósticos independientes del sexo, edad y conteo inicial de leucocitos (25).

Reportes de frecuencia del cromosoma Ph+ muy similares han sido reportados por Michael (1988), Herema (1990), Crist y Carroll (1990) quienes indican que esta pseudodiploidia se presenta del 3 al 5.7% de los casos con LLA infantil. Estos estudios han documentado la influencia pronóstica de las anomalías cromosómicas (pseudodiploidias) como indicadores de un pronóstico adverso en la LLA infantil. Algo importante del estudio de Crist y Carroll fue que 9 de los pacientes con cromosoma Ph+ además tuvieron hipodiploidias lo cual es muy común en los casos que presentan alteraciones estructurales, esto mismo se presentó en el caso registrado en este trabajo (59, 71, 42).

Con lo referente a las alteraciones estructurales restantes tenemos 2 pacientes que mostraron polimorfismo del cromosoma 16, detectado por bandeado C. donde uno de ellos, (caso no.5) presentó monosomía del cromosoma 8, hiper e hipodiploidias en sangre periférica.

En médula ósea no pudo ser detectado el polimorfismo debido a que las metafases no tuvieron la calidad necesaria para realizar el estudio detallado, pero si se pudieron detectar alteraciones de número (hiper e hipodiploidias).

El otro paciente (no.27) presentó un cariotipo 46,XX,16qh+ en ambos tejidos. Las características de éstos pacientes no tuvieron nada en común, el primero tuvo una edad de 5 años, sexo femenino, un conteo de leucos de 2,100/mm³, 17% de blastos y morfología L1, mientras que el segundo paciente mostró una edad de 3 años, sexo masculino, 200,000 leucos/mm³, 80% de blastos y morfología L2, en conclusión no existió correlación entre el tipo de LLA y el polimorfismo observado en los individuos.

Algunos reportes han sugerido una relación entre el polimorfismo y la hiperdiploidia de las células blásticas, en otros casos se ha observado la inversión de la región heterocromática del cromosoma 9

(inv 9qh) asociada en casos con trisomía 21. (American Journal of Genetic) (80).

Se especula que la presencia del polimorfismo en leucemia puede ser debido a varias circunstancias, una de ellas puede estar relacionada con el evento neoplásico ya que se ha observado que pacientes con LLA tienen un incremento en la heterocromatina de los cromosomas 1, 9, 16 entre otros, posiblemente por causas mutacionales, ó bien puede ser un hecho casual, ya que en condiciones normales puede existir el polimorfismo y esto se considera como un marcador familiar ya que cada individuo puede presentar variaciones notables en la cantidad de heterocromatina de los cromosomas (comunicación personal).

La causa que provocó el aumento de la heterocromatina en los cromosomas de las metafases de los 2 pacientes creemos que fue la siguiente: el DNA que constituye la heterocromatina (tanto constitutiva como facultativa) y que se denomina DNA satélite en ocasiones tienen un papel estructural además de que este DNA repetitivo sirve de "amortiguador" para que en él se produzcan las mutaciones que llegaran a presentarse y así no afectar a los genes funcionales (De Robertis, 1987) (5)

Por último las alteraciones estructurales que se encontraron en 2 pacientes las cuales fueron 46,XY,21q- (presentes en médula ósea y sangre periférica) y 47,XY+21,Bq- (sólo en médula ósea), no han sido reportadas en la literatura, por lo que se les considera probablemente como alteraciones citogenéticas nuevas para el registro de la población pediátrica con leucemia del Hospital.

Consideramos que estas alteraciones fueron producidas por el proceso biológico de la neoplasia, es decir, que la pérdida del material genético fue provocada por alguna causa mutacional producida durante la evolución del padecimiento. (Berrospe, 1988). (36).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Con la utilización de la prueba de χ^2 de independencia ($p > 0.01$) se realizó el análisis estadístico confrontando los datos obtenidos de las características clínicas, citogenéticas y cit químicas de los niños con LLA.

Se observó que al realizar la correlación entre el tipo de LLA contra el sexo, la edad, alteración cromosómica y tipo de clonas, no se rechazó la hipótesis nula, concluyendo que no existe relación entre estas características.

Por otro lado al tratar de correlacionar los datos de clonas celulares y alteración cromosómica con el tipo de tejido estudiado no se obtuvieron diferencias significativas.

Otra correlación que se realizó fue la de los datos del número de leucocitos contra el subtipo de LLA y por otra parte con la alteración cromosómica concluyéndose al final que no existen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula, por lo que no hubo correlación entre dichas características.

Por último al realizar la relación entre las pruebas citoquímicas y el subtipo de LLA, la prueba estadística demostró que no hubo diferencias significativas excepto con la prueba de Fosfatasa ácida donde se obtuvo que los subtipos L2 y L3 son los que presentan relación con una frecuencia mayor de reacción positiva para esta técnica.

Aunque estadísticamente no se encontró relación clínica-citogenética, se observó tanto en las tablas como en las gráficas que existieron diferencias cuantitativas notables entre algunas características discutidas con anterioridad.

Consideramos que el hecho de que no haya existido diferencia entre los resultados analizados sea debido básicamente al tamaño pequeño de la muestra de estudio ya que en algunos casos se tuvieron frecuencias de cero por lo que la cantidad de datos no fue la adecuada para obtener un resultado estadístico más preciso.

CONCLUSIONES.

En relación al análisis y discusión de los resultados en éste estudio se concluye lo siguiente:

En cuanto a la distribución por sexos de la LLA no existieron diferencias significativas ya que la proporción fue de 1:1 aproximadamente. Solo existió una pequeña diferencia en el subtipo L2 donde la proporción fué de 9 hombres y 6 mujeres.

En relación a la edad la mayor incidencia se encontró en los subtipos L1 y L2 en los intervalos de recién nacidos a 3 años (39%) y de 3 a 6 años (29%) teniendo su punto máximo de incidencia en éste último lo cual coincide con lo reportado en la literatura. (64).

Con lo referente al conteo inicial de leucocitos concluimos que el 45% de los pacientes presentaron leucocitosis, el 21% fueron pacientes leucopénicos mientras que el 34% tuvieron conteos normales éstos resultados no coincidieron con los datos reportados para individuos con LLA infantil. (36,64).

Con los intervalos utilizados en los estudios citogenéticos tuvimos que el 50% de los niños perteneció al grupo de bajo riesgo y buen pronóstico y esta frecuencia fue similar a la reportada por otros autores mientras que para el segundo y tercer grupo de riesgo existieron diferencias notables las cuales atribuimos a las características particulares de nuestra población. (44,65,69,70,71).

En general, el 76% de los niños presentaron niveles menores de 7 gr/dl de hemoglobina presentando una anemia severa y solo el 16% tuvieron valores normales.

En los cultivos de médula ósea solo fué posible obtener metafases en el 63% y de este el 95% presentó alguna alteración cromosómica y en los cultivos de sangre periférica con PHA 22 pacientes (57%) desarrollaron metafases y de estos el 72% mostró alteraciones citogenéticas y solo uno desarrolló metafases en sangre periférica sin PHA. y consideramos que la causa de que algunos individuos que no presentaron metafases fue debido a que las células neoplásicas responden pobremente en los cultivos in vitro, en otros casos la muestra que se envió para realizar el estudio fue muy escasa, algunas de las muestras de médula y sangre estuvieron contaminadas y en otros

casos la celularidad fue ya sea muy baja ó extremadamente elevada. (26,44,53).

En el análisis cariotípico de médula ósea encontramos en general que el subtipo L1 fue el que presentó la mayor frecuencia de alteraciones cromosómicas con un 100% donde la hipodiploidia abarcó el 57% casos seguida de la hiperdiploidia con un 26.3% y por último la pseudodiploidia con 10.5% .

En el subtipo L2 el porcentaje de alteración cromosómica fue del 93.4% .La hipodiploidia tuvo una frecuencia de 40%, 33% de hiperdiploidia , 20% de pseudodiploidia y 6.6% de diploidia.

En L3 solo hubo un paciente con el 100% de alteración cromosómica (hipodiploidia).

En sangre periférica el porcentaje de alteración fue del 78% para L1 donde la hipodiploida fue la de mayor frecuencia (50%) y la diploidia ocupó el 25% del total. En el subtipo L2 la frecuencia de la hipodiploidia se presentó en el 45.4% de los casos y la pseudo, hiper y diploidia tuvieron una incidencia del 18% cada una. .

Por último el la L3 se presentaron dos pacientes, uno con hiperdiploidia y otro con hipodiploidias ambos en el 100% de las metafases.

La frecuencia de las alteraciones numéricas, especialmente de la hipodiploidia, difirió notablemente a lo reportado por muchos investigadores quienes indican que la hipo solo afecta del 3 al 9% de los niños con LLA mientras que la hiperdiploidia afecta a más del 30% de los casos diagnosticados de LLA infantil. en éste estudio se encontró que el 75% de los niños tuvieron hipodiploidia y el 45% con hiperdiploidia. Consideramos que éstas diferencias son debidas principalmente a las características geográficas e inherentes a la carga genética, socioeconómicas y ocupacionales de la población derecho habiente del Hospital General Centro Médico La Raza del IMSS. (44,59,77).

En el grupo de las ploidias sobresalieron los casos con tri y tetraploidia que tuvieron una frecuencia del 5% y de 16% respectivamente las cuales son muy raras de encontrar el la LLA tal como lo indican algunos reportes (40,59).

La trisomía del cromosoma 16 se presentó en un niño y la trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down) en dos niños.

Las otras alteraciones importantes fueron las pseudodiploidias t(9;22), t(1;19), 16qh+ (dos individuos), y el caso con un cariotipo 47,XX+21,21Bq- las cuales como es sabido son de alto riesgo y de pobre pronóstico clínico.

En la correlación clínico citogenética realizada en los diferentes subtipos de LLA, encontramos que en el subtipo L1 la hipodiploidia con mayor incidencia no mostró diferencias en relación al sexo, la mayoría de los niños se encontraron dentro del intervalo de 2 a 10 años que corresponde según la clasificación al grupo de buen pronóstico, la mayoría presentó un conteo menor a los 25,000 leucocitos/mm³ perteneciendo así al grupo de riesgo habitual y clínicamente está reportado que el subtipo L1 es el grupo de mejor pronóstico lo cual coincide con los datos de conteo de leucos y del intervalo de edad de los casos de este estudio, sin embargo, citogenéticamente los pacientes pertenecieron al de pobre pronóstico debido a la presencia de hipodiploidias y pseudodiploidias.

En el subtipo L2 tampoco hubo diferencias en cuanto a la incidencia de sexos de los niños con hipodiploidia, la distribución por edades de riesgo fue muy heterogénea, pero la mayoría de los niños entraron en el grupo de riesgo habitual en relación al conteo de leucocitos.

En el conteo inicial de leucocitos no hubo diferencias notables. Lo importante en este subtipo fue que los pacientes con Pseudodiploidia uno tuvo correlación con las características de alto riesgo tanto de edad como de número de leucocitos es decir, tanto los datos clínicos como citogenéticos corresponden al grupo de riesgo alto y pobre pronóstico. Por último es necesario mencionar que el subtipo L2 es un tipo de leucemia de mal pronóstico clínico lo cual coincide con la presencia de la hipodiploidia en este grupo.

Con todo lo anterior concluimos que no existe una correlación específica entre las características clínicas y las anomalías cromosómicas (numéricas) presentes en cada subtipo de LLA debido a que se presentaron de manera heterogénea en la población estudiada.

En cuanto a las alteraciones estructurales si existió relación del tipo morfológico de LLA y la pseudodiploidia presente como fueron los casos de la t(1;19) la cual es exclusiva de la LLA L1 y la t(9;22) que puede estar presente en L1 ó L2 y nosotros la encontramos en una leucemia LLA L1.

Estadísticamente no existieron diferencias significativas entre las características clínicas, citogenéticas y citoquímicas en los tres diferentes subtipos de LLA, sin embargo, observando las tablas y gráficas tenemos que el sexo es independiente tanto del subtipo de LLA como de el tipo de alteración cromosómica. La edad donde se presenta la mayor incidencia de LLA es en los intervalos de 0 a 2 años y de 2 a 10 teniendo el punto máximo de 0 a 6 años. En cuanto al tipo de clonas se encontró que la más común fue la N/A (Normal/Anormal) presente con mayor frecuencia en los subtipos L1 y L2 tanto en médula ósea como en sangre periférica. La alteración citogenética con mayor frecuencia fue la hipodiploidia en L1 y L2 presente en ambos tejidos.

Con lo referente a la importancia biológica del estudio citogenético diremos que han revelado un amplio espectro de anomalías en la estructura y número de cromosomas de células leucémicas. Estas anomalías son adquiridas durante el proceso de transformación maligna dentro de la clona neoplásica y refleja las lesiones genéticas que ocurren en estas células.

Estas alteraciones genéticas están fuertemente ligadas a procesos moleculares que conducen a la leucemogénesis y estos eventos influyen en las características clínicas, en la evolución y en la respuesta a la terapia del padecimiento.

El cariotipo, que es determinado por las técnicas de bandedo, ha aportado una nueva dimensión a la clasificación de la leucemia, que son muy útiles en la identificación de grupos con importancia biológica y pronóstica.

El entendimiento biológico de los cambios cromosómicos en las células leucémicas pueden guiar al médico hematólogo a mejorar el tratamiento como en el caso de la LLA con células hiperdiploides que tienen la capacidad de diferenciarse a células no proliferantes que son

tratamiento como en el caso de la LLA con células hiperdiploides que tienen la capacidad de diferenciarse a células no proliferantes que son menos agresivas y responden más al tratamiento químico.

Por otro lado, la presencia de anomalías cromosómicas reflejan un incremento en las tasas de mutación de células somáticas y esto correlaciona con un incremento en el desarrollo a la resistencia a drogas.

Así también, el cariotipo de las células cancerosas es clasificado de acuerdo a la clona celular anormal presente y se puede así conocer que en ocasiones existe una coexistencia de poblaciones celulares leucémicas, como es el caso de la hiperdiploidia e hipodiploidia lo cual nos indica desde el punto de vista biológico, una evolución clonal de la línea hiperdiploide a partir de una línea hipodiploide.

Es importante remarcar que la importancia biológica de la citogenética en LLA es conocer que la célula leucémica (linfoblasto) no es una célula aberrante, desdiferenciada, oncofetal, u ectópica sino que es una célula inmadura que refleja una expansión clonal de cierto tipo celular que retiene patrones normales de expresión genética y la alteración del control normal de proliferación es el resultado de cambios en la expresión de genes reguladores.

Así que el incremento en éstos estudios sobre las alteraciones cromosómicas en LLA infantil pueden ayudar al entendimiento de la importancia biológica y su aplicación a modernizar los requerimientos terapéuticos y así predecir los resultados de los mismos, tal como lo hicieron Secker y Walker en 1978 quienes como ya se mencionó, fueron los primeros en presentar evidencia de que las alteraciones cromosómicas de las células leucémicas al momento del diagnóstico tienen una importancia biológica y pronóstica en la LLA infantil.

En el servicio de Hematología Pediátrica del Hospital General Centro Médico La Raza, para el médico hematólogo estos estudios han sido una herramienta muy útil e importante, inicialmente para conocer las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales presentes en la población infantil con LLA. Además de apoyar el diagnóstico

clínico haciéndolo más preciso. También es útil para modificar los esquemas terapéuticos y en el monitoreo de la evolución y comportamiento biológico de las leucemias tanto in vivo como in vitro.

Por último se propone realizar estudios citogenéticos con una población de individuos mas grande y en intervalos de tiempo más prolongados para poder realizar un análisis mas detallado y registrar la presencia de otras alteraciones cromosómicas presentes en la población pediátrica con LLA y con esto tener una información estadística más precisa en cuanto a la incidencia de un subtipo específico de LLA y su posible correlación con las características clínicas y citogenéticas presentes en este cáncer.

También se propone la realización de estudios de monitoreo citogenético en individuos con LLA infantil para conocer el estado de evolución tanto cromosómica, biológica y clínica del padecimiento y de ser posible también establecer metodologías a nivel molecular para así identificar las alteraciones que no pueden ser observadas en el análisis citogenético.

Plantear nuevas metodologías en cuanto a las condiciones de cultivo tanto de médula ósea como de sangre periférica para poder obtener metafases de buena calidad y con esto un buen análisis cariotípico.

APENDICE I.

PRUEBAS CITOQUIMICAS PARA LLA (FAB) TECNICA DE PEROXIDASA.

MATERIAL Y EQUIPO.

Probetas de 100 ml.
Pipetas de 1 y 10 ml.
Balanza analítica.
Vasos de precipitado de 100 ml.
Vasos de Koplín.
Portaobjetos.
Microscopio.

REACTIVOS.

Solución fijadora.
Reactivo de Peroxidasa.
Sulfato de Zinc ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$).
Etanol.
Cloruro de Bencidina.
Acetato de Sodio trihidratado.
Hidróxido de Sodio al 1N.

PREPARACION DE REACTIVOS.

- 1.- Solución fijadora: Mezclar 90 ml de etanol y 10 ml de formol al 37%.
- 2.- Reactivo de Peroxidasa:
 - a) Etanol al 30% (30 ml de OH y 70 ml de H_2O) (100 ml).
 - b) $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.132 M (3.8 gr para 100 ml de agua) (1 ml).
 - c) Dicloruro de Bencidina (3 gr).
se debe disolver (ste reactivo en el etanol caliente antes de agregar el reactivo b.
 - d) Acetato de Sodio trihidratado (1 gr).
 - e) H_2O_2 (9.7 ml de H_2O más 0.3 ml de H_2O_2) (0.9 ml).
 - f) NaOH al 1N (1.5 ml).
 - g) Safranina (2 gr).
- 3.- reactivo de Safranina 0.5% (0.5 gr en 100 ml de agua).

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Fijar el frotis inmediatamente después de tomada la médula ósea, ya que la peroxidasa es inestable a la luz. Los frotis conservados así en la oscuridad son útiles por 3 semanas.
- 2.- El frotis se fija sumergiendolo 60 seg. en la sol. fijadora a temperatura ambiente.
- 3.- se lavan de 15 a 30 seg. con agua corriente, se secan totalmente. Se sumergen en el reactivo de Peroxidasa durante 30 seg. a temperatura ambiente.

- 4.- Se lavan con agua destilada durante 5 seg. secar totalmente.
- 5.- Se tiñe durante 30 seg. con Safranina al 0.5%. Se lava por 5 seg. con agua corriente. Secar y observar al microscopio (Brown, 1972).

TINCION DE PAS

MATERIAL Y EQUIPO.

Probetas de 100 ml.
Vasos de pp. de 200 ml.
Matraces volumétricos de 200 ml.
Pipetas graduadas de 10 ml.
Termómetro.
Balanza analítica.
Parrilla.
Portaobjetos.
Cajas petri.
Algodón.
Palillos de madera.
Microscopio.

REACTIVOS.

Formaldehído al 37%.
Acido Periódico al 0.5%.
Metabisulfito de Sodio.
Carbón activado.
Acido clorhídrico al 1 N (HCl).

PREPARACION DE REACTIVOS.

- 1.- Acido Periódico al 0.5% . Agregar 0.5 ml en 100 ml de H₂O destilada.
- 2.- Reactivo de Shiff: Disolver un gramo de Fucsina básica en 200 ml. de H₂O destilada hirviendo.
- 3.- Enfriar a 50°C con hielo. Agregar 20 ml. de HCl al 1 N y enfriar. Añadir 2.5 grs. de Metabisulfito de Sodio anhidro.
Almacenar en la obscuridad de 24 a 48 hrs. Agregar aproximadamente 2.5 grs. de carbón activado, agitar por un minuto y filtrar (desechar las primeras gotas). El reactivo debe ser incoloro.
- 4.- Metabisulfito de Sodio al 0.5% (1 gr en 200 ml. de H₂O destilada).

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Fijar la laminilla con vapores de formol durante 5 min.
- 2.- Lavar con agua corriente por 15 min. Enjuagar con agua destilada y dejar secar.
- 3.- Tratar con ácido periódico durante 10 min.

- 4.- Lavar con agua corriente varias veces y con agua destilada 2 veces, dejar secar.
- 5.- Incubar el reactivo de Shiff de 30 a 45 min. en la oscuridad (hasta que aparezca el color rosado en las laminillas). Se debe tener cuidado de que el reactivo siempre se encuentre incoloro, si aparece un tono rosado desechar.
- 6.- Lavar con Metabisulfito de Sodio al 0.5% tres veces, 3 min. c/u. Secar.
- 7.- Lavar con agua destilada 3 veces, 3 min. c/u. Dejar secar.
- 8.- Contrateñir con hematoxilina por 3 min. Lavar rapidamente con agua corriente. Secar y observar al microscopio (Sanchez, 1972).

TECNICA DE FOSFATASA ACIDA.

MATERIAL Y EQUIPO.

Matraces volumétricos de 100 y 1000 ml.
 Probetas de 250 ml.
 Pipetas de 5 y 10 ml.
 Vasos de Koplín.
 Balanza analítica.
 Portaobjetos.
 Potenciómetro.
 Microscópio.

REACTIVOS.

Buffer formalina-acetona de fijación (pH 6.6 a 6.8).
 Nitrito de Sodio al 4%.
 Solución de Pararosaanilina.
 Acido acético al 1N.
 Buffer de acetatos 0.1N. (pH 5.0).
 Solución A.
 Solución B.
 Mezcla de Incubación I.
 Mezcla de Incubación II.
 Verde de metilo al 1%.

PREPARACION DE REACTIVOS.

- I.- Buffer de formalina-acetona de fijación pH de 6.6 a 6.8:
- | | | |
|------------------------------------------------------------------|-------|---------|
| Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄) | ----- | 0.2 gr. |
| Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄) | ----- | 1.0 gr. |
| Agua destilada | ----- | 300 ml. |
| Acetona | ----- | 450 ml. |
| Formalina | ----- | 250 ml. |
- Guardar en refrigeración.
- II.- Nitrito de Sodio al 4%:
- | | | |
|------------------------|-------|---------|
| Nitrito de Sodio (Q.P) | ----- | 4.0 gr. |
| Agua destilada | ----- | 100 ml. |
- III.- Solución de Pararosaanilina:
- | | | |
|------------------------------|-------|---------|
| Pararosaanilina hidrociorada | ----- | 1.0 gr. |
| Agua destilada | ----- | 100 ml. |
| HCL (Q.P) | ----- | 5.0 ml. |
- Mezcla de 10 a 15 min. Hsta que la Pararosaanilina se disuelva. Almacenar en cuarto obscuro (filtrar).
- IV.- Acido acético 1 N:
- | | | |
|----------------------------|-------|----------|
| Acido acético glacial | ----- | 6.0 ml. |
| Agua destilada (aforar a) | ----- | 1000 ml. |

V.-Buffer de acetatos 0.1 N pH 5.0:

Acetato de Sodio	-----	4.7 gr.
Acido acético 1 N	-----	14.75 ml.

Aforar a 1 lt y guardar en refrigeración.

VI.-Solución A:

Nitrito de Sodio 4%	-----	2.4 ml.
Solución de Pararosaanilina	-----	2.4 ml.

VII.-Solución B:

Naftol AS-BI	-----	40 mg.
N,N-Dimetil formamida	-----	4.0 ml.
Buffer de Acetatos 0.1 N. pH 5.0	-----	71.2 ml.

En este orden mezclar y usar.

VIII.-Mezcla de Incubación I:

Mezclar solución B y solución A. De ésta separar 40 ml en un vaso. Ajustar el pH a 5.1 con NaOH saturado al sobrante de ésta mezcla (22 gotas aprox. de NaOH al 50%). Filtrar en vaso de Koplín y usar.

IX.-Mezcla de incubación II:

Acido tartárico	-----	300 mg.
Mezcla de Incubación I	-----	40 ml.

Mezclar y ajustar a pH de 5.1. Filtrar en vaso de Koplín y usar.

X.-Verde de Metilo al 1%:

Verde de Metilo	-----	1.0 gr.
Buffer de Acetatos 0.1 N.	-----	100 ml.

Ajustar a pH de 4.2 a 4.5 con NaOH + HCL al 1 N.

XI.-PVP. Medio de montaje (resina sintética).

XII.-Incubar a 37°C (baño maria).

XIII.-7 vasos de Koplín.

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Preparar frotis sanguíneo ó de médula ósea. Por lo menos dos frotis por cada paciente y dos para control normal, rotular correctamente, el frotis para control normal con I (Mezcla de incubación I) y los frotis problema con II (mezcla de incubación II).
- 2.- Colocar los frotis en un vaso de Koplín con buffer acetona-formalina de 4 a 10°C durante 30 seg.
- 3.- Lavar los frotis con 3 cambios de agua destilada.
- 4.- Pasar los frotis a la mezcla de incubación respectiva. Frotis problema en la mezcla de incubación II. Incubar a 37°C durante 60 min.

- 5.- Lavar los frotis con dos cambios de agua destilada.
- 6.- Pasar los frotis al vaso de Koplín con verde de Metilo al 1% durante 2 min.
- 7.- Lavar rápidamente al chorro de agua y secar totalmente al aire.
- 8.- Fijar y leer al microscopio de inmersión.

Nota: Los frotis de control normal (Mezcla de incubación I) presentan actividad de la fosfatasa ácida en el citoplasma de los glóbulos blancos y plaquetas (variando el grado de tinción rojiza). Los frotis problema (Mezcla de incubación II) no presentan actividad de fosfatasa ácida o solamente una mínima cantidad de coloración rojiza.

Las células peludas de las leucemias reticuloendoteliales presentan al rojo positivo tiñiéndose con ambas mezclas de incubación I y II (Sanchez, 1972).

APENDICE 11

TECNICAS DE CULTIVO Y DE ESTUDIO CITOGENETICO PARA SANGRE PERIFERICA Y MEDULA OSEA.

TECNICA PARA CULTIVO DE LINFOCITOS.

MATERIAL Y EQUIPO.

Campana de flujo laminar.
Mechero Bunsen.
Jeringa desechable estéril (5 ml.).
Pipetas pasteur.
Torundas y ligadura.
Frascos de vidrio de 25 cc. (esteriles).
Tubos para centrifuga de 15 ml.
Estufa.
Centrifuga.
Vortex.
Portaobjetos.
Microscopio óptico.

REACTIVOS.

medio de cultivo McCoy.
Fitohemaglutinina (PHA).
Colchicina o colcemid. (0.125 μ /ml.).
Antibiótico. Penicilina y estreptomycin.
Solución hipotónica de KCl 0.075 M.
Solución fijadora de Carnoy.
Heparina (1000 U.I.).
Alcohol al 70%.
Colorante Giemsa.
Buffer de Fosfatos 0.6 M pH 6.8.
Aceite de inmersión.

PREPARACION DE REACTIVOS.

- 1.- Solución hipotónica de KCl 0.075 M : Pesar 5.44 gr y disolver en 1000 ml. de agua destilada.
- 2.- Solución fijadora de Carnoy: Mezclar Metanol y ácido acético 3:1.
- 3.- Alcohol al 70%: Mezclar 70 ml. de Metanol con 30 ml. de agua destilada.
- 4.- Colorante Giemsa al 5%: Mezclar 2.5 ml. de colorante con 47.5 ml. de buffer de fosfatos.
- 5.- Buffer de fosfatos: Fosfato ácido de Sodio dibásico: Pesar 3.549 gr. y disolver en 1000 ml de agua desionizada.

Fosfato monobásico de Potásio: Pesar 3.402 gr. y disolver en 1000 ml de agua desionizada.

PROCEDIMIENTO.

SIEMBRA:(en condiciones de esterilidad).

Extraer del paciente 2 o 3 ml. de sangre periférica con una jeringa heparinizada (0.1 ml.). Colocar en un frasco estéril lo siguiente:

- 1.- 4.5 ml. de medio de cultivo McCoy.
 - 2.- 0.5 ml. de suero fetal bovino.
 - 3.- 0.3 ml. de PHA.
 - 4.- 0.5 ml. de sangre periférica.
 - 5.- 0.01 ml. de antibiótico.
- Agitar vigorosamente e incubar durante 48 hrs. a 37°C.

COSECHA:

- 1.- Agregar al frasco 0.1 ml. de Colcemid (0.125 µg/ml.)
- 2.- Incubar durante 30 min. a 37°C.
- 3.- Agitar y pasar a tubos de centrifuga.
- 4.- Centrifugar 10 min. a 1500 rpm.
- 5.- Eliminar el sobrenadante.
- 6.- Agregar 5 ml. de sol. Hipotónica e incubar durante 30 min. a 37°C.
- 7.- Centrifugar a 1500 rpm durante 10 min.
- 8.- Eliminar el sobrenadante.
- 9.- Agregar 5 ml. de solución fijadora (fria), poco a poco y agitar en el vortex.
- 10.- Centrifugar a 1500 rpm. durante 10 min.
- 11.- Desechar el sobrenadante. Repetir del paso 10 al 11 5 veces.
- 12.- Diluir el botón celular con solución fijadora hasta obtener una solución turbia.
- 13.- Elaborar las laminillas utilizando portaobjetos limpios con alcohol.(frios y secos). Se deja caer la muestra (tomada con pipeta Pasteur) de una altura aprox. de 30 cm. Secar al aire.
- 14.- Teñir la laminilla durante 7 min en colorantes Giemsa al 5%. Lavar con agua corriente y secar al aire.
- 15.- Observar al microscopio.

TECNICA PARA CARIOTIPO EN MEDULA OSEA.

MATERIAL Y EQUIPO.

Campana de flujo laminar.
Mechero Bunsen.
Jeringa de vidrio estéril.
Pipetas Pasteur y Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.
Frascos de vidrio de 25 cc. estériles.
Tubos para cantrífuga de 15 ml.
Estufa.
Vortex.
Portaobjetos.
Cubreobjetos.
Microscopio.

REACTIVOS.

Medio de cultivo RPMI 1640 ó medio McCoy.
Antibiótico.
Colchicina ó Colcemid (0.125 $\mu\text{g/ml}$).
Solución hipotónica de KCL 0.075 M.
Solución Fijadora de Carnoy.
Buffer de Fosfatos.
Colorante Giemsa.
Alcohol al 70%.
Aceite de inmersión.

PREPARACION DE REACTIVOS.

Los reactivos utilizados se preparan de la misma manera que en la técnica de sangre periférica.

PROCEDIMIENTO.

METODO DIRECTO: (trabajar en condiciones de esterilidad).

En un frasco se colocan:

- 1.- 4.5 ml. de Medio RPMI 1640 ó Medio McCoy.
- 2.- 0.5 ml. de médula ósea (heparinizada).
- 3.- 0.25 ml. de Colchicina = Colcemid.
- 4.- Agitar e inncubar a 37°C durante 30 min.
- 5.- Cosechar con el mismo procedimiento para cariotipo en sangre periférica (Srivastava, 1979).

CULTIVO DE 24 HORAS.

En un frasco colocar:

- 1.- 4.5 ml. de Medio de cultivo.
- 2.- 0.5 ml. de médula ósea.
- 3.- 0.01 ml. de Antibiótico.
- 4.- Agitar e incubar durante 24 hrs. a 37°C.
- 5.- Cosechar igual que el método directo (desde el paso 3). (Yunis, 1974).

TECNICA DE BANDAS G.

MATERIAL Y EQUIPO.

Vasos de koplín.
Matraces volumétricos de 100 y 1000 ml.
Pipetas de 5 y 10 ml.
Fotomicroscopio.
Portaobjetos.
Balanza analítica.
Potenciómetro.

REACTIVOS.

Tripsina 1:250 Difco (250 mg/100 ml.) (Solución de trabajo).
Colorante Giemsa.
Buffer de fosfatos 0.6 M pH 6.8.
EDTA

PREPARACION DE REACTIVOS.

- 1.- Giemsa al 5% con buffer de fosfatos.
- 2.- Tripsina: Pesar 250 mg y disolver en 100 ml de buffer de fosfatos. Tomar una alícuota de 0.2 ml. y aforar a 50 ml. con buffer de fosfatos, distribuir en alícuotas de 0.2 ml. y guardar en congelación.
- 3.- Buffer de fosfatos: Buffer A. KH_2PO_4 (Fosfato monobásico de potasio). Pesar 113.4 gr. y disolver en 2.5 lt. de agua destilada.
Buffer B. Na_2HPO_4 (fosfato dibásico de Sodio). Pesar 148.3 grs. y disolver en 2.5 lts. de agua destilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl o NaOH.

PROCEDIMIENTO.

- 1.- Colocar en un vaso de Koplín 50 ml. de buffer de fosfatos y adionar una alícuota de tripsina (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). En esta solución, dejar de 10 a 20 seg. la laminilla de 2 días de haberse preparado.
- 2.- En un segundo vaso de Koplín, colocar 40 ml. de agua destilada más un gramo de EDTA y enjuagar la laminilla por 10 seg.
- 3.- Pasar la laminilla por dos vasos de Koplín con buffer de fosfatos (40 ml. c/u) por 10 seg.
- 4.- Teñir en Giemsa al 5% en buffer de fosfatos de 5 a 7 min.
- 5.- Secar al aire.
- 6.- Observar al microscopio para realizar el análisis. (Seabright, 1971).

TECNICA DE BANDAS C.

MATERIAL Y EQUIPO.

Matraces volumétricos de 100 y 100 ml.
Pipetas graduadas de 5 y 10 ml.
Vasos de precipitado de 100 y 500 ml.
Baño maria.
Termómetro
Balanza analítica.
Potenciómetro.
Papel filtro.
Fotomicroscopio.
Portaobjetos.
Vasos Kiplin.

REACTIVOS.

$Ba(OH)_2$ 0.1 N.
Buffer de Fosfatos 0.6 M pH de 6.8.
HCL 0.2 N.

PREPARACION DE REACTIVOS.

- 1.- $Ba(OH)_2$ 0.1 N. Pesar 13.82 grs. y aforar a 1000 ml. con agua desionizada.
- 2.- Buffer de Fosfatos: Buffer A. Fosfato de Sodio. Pesar 3.549 grs. y disolver en 1000 ml. de agua desionizada.
Buffer B. Fosfato de Potasio. Pesar 3.402 grs. y disolver en 1000 ml. de agua desionizada.
- 3.- HCL 0.2 N.: Tomar 1.62 ml. y aforar a 1000 ml. con agua destilada.

PROCEDIMIENTO.

- 1.-Se preparan las laminillas de forma usual sin flamear.
- 2.-Las laminillas tendrán 2 días de preparadas.
- 3.-Colocar las laminillas en HCL 0.2 N. durante 20 min.
- 4.-Lavarlas en agua destilada.
- 5.-Pasarlas a un baño maria de hidróxido de bario 0.1 N. (filtrado previamente) a una temperatura de 60°C. Procurar que las laminillas queden cubiertas por la solución durante 3 min. cuidando de retirar la nata que se forma con un papel filtro antes y después de colocar las laminillas.
- 6.-Lavarlas con agua desionizada a temperatura de 60°C por 10 seg.
- 7.-Lavar durante 20 seg. con agua desionizada a temperatura

ambiente.

8.-Teñirlas con Giemsa al 5% durante 15 min.

9.-Secar al aire.

10.-Observar al microscopio. (Gómez,G.M y Cárdenas,G.G,1982)

GLOSARIO

ANEUPLOIDIA. Condición que indica anomalía de número y/o estructural de los cromosomas de una célula en relación a las células somáticas de la especie correspondiente.

BANDAS CBG. Bandas C con tratamiento de Hidróxido de Bario y tinción Giemsa.

BANDAS GTG. Bandas G con tratamiento de tripsina y tinción Giemsa.

CARIOTIPO. Ordenamiento de los cromosomas somáticos de un individuo en relación al número, tamaño y forma de los cromosomas.

CENTROMERO. Región de un cromosoma donde se unen dos cromátidas.

CITOCINESIS. División del citoplasma en la mitosis.

CLONA. Línea o familia derivada de una célula.

COLCHICINA. Alcaloide C₂₂ H₂₅ N O₆, derivado del *Colchicum autumnale*, usada como agente para interrumpir la mitosis durante la metafase.

CROMATINA. Material celular que se tiñe intensamente, por colorantes básicos, constituido por ADN principalmente.

CROMOSOMAS. Estructuras filamentosas compuestas de material cromático (ADN y proteína) que se observan durante la división celular. Existe una amplia variación en número, forma y tamaño de acuerdo con la especie biológica.

CROMOSOMA FILADELFIA (Ph+). cromosoma del grupo G que pierde una parte de sus brazos largos debido a una translocación entre el cromosoma 9 y 22 t(9;22).

DELECIÓN. Pérdida de un fragmento ya sea del brazo largo o del brazo corto de un cromosoma.

DIPLOIDE. Cantidad de material cromosómico (ADN) de una célula somática. Equivalente al doble del de un gameto (célula germinal).

ENDORREDUPLICACION. Doble duplicación de los cromosomas con una sola división del citoplasma. En el hombre se producen células con 92 cromosomas tetraploides. Para algunos autores es sinónimo de endomitosis.

GENOMA. Conjunto de genes transmitidos en forma hereditaria a un individuo y que pueden ser expresados o quedan latentes.

HAPLOIDE. Cantidad de material cromosómico en un gameto.

HETEROCROMATINA. Cromatina que se tiñe con mayor intensidad, constituida principalmente por ADN repetitivo.

HIPERDIPLOIDE. Número cromosómico mayor al diploide.

HIPODIPLOIDE. Número menor al complemento diploide.

IDIOGRAMA. Estudio gráfico cuantitativo y comparativo de los cromosomas de un individuo.

INVERSION PARACENTRICA. Inversión de un segmento cromosómico en la misma porción de la cromátide.

INVERSION PERICENTRICA. Separación e inversión de un segmento cromosómico que incluye el centrómero.

ISOCROMOSOMA. duplicación del número de genes en un cromosoma por escisión transversal del mismo en vez de longitudinal.

LEUCEMIA LINFOBLASTICA AGUDA (LLA). Neoplasia producida por una proliferación de una clona de células hematopoyéticas (linfoblastos) anormales.

METAFASE. Fase de la mitosis en la que los cromosomas se disponen en la placa ecuatorial.

MITOSIS. División ecuacional de una célula con la formación de dos células hijas con el mismo número cromosómico que la célula madre.

MONOSOMIA. Existencia de un solo cromosoma homólogo ó perdida de un fragmento de un cromosoma homólogo (monosomia parcial).

MUTACION. Variación espontánea ó inducida del genoma.

MUTAGENO. *Cualquier agente capaz de producir la mutación de un gen.*

POLIMORFISMO. *Genes diferentes con la misma función en una especie, sin que la forma más rara explique su presencia por mutaciones.*

POLIPLOIDE. *Célula con un múltiplo mayor de 2 veces el número haploide.*

TETRAPLOIDE. *Cuatro veces el número cromosómico haploide.*

TRANSLOCACION. *Ligamiento de una parte ó de todo un cromosoma a otro cromosoma (ej. t(1;19) y t(9;22)).*

TRIPLOIDE. *Célula que presenta tres veces más el número cromosómico haploide (3 n).*

TRISOMIA. *Aumento de un cromosoma homólogo (ej. trisomia 21 ó síndrome de Down).*

REFERENCIAS

- 1.- Nathan,G.D y Hosman,E.D.1979. Bone Marrow Failure.in: Fisiology of the Bone Marrow.
- 2.- Beck,S.W. 1983. Fisiología Molecular, Celular y Sistemática. Publicaciones Interamericana. México D.F. 800 pp.
- 3.- Ham,W.A. 1976. Tratado de Hematología. 7a.Edición. Interamericana. México D.F. 935 pp.
- 4.- Bell;S.D. 1985. The Morfology of Human Blood Cell. 5Th. Edition. Abbott laboratories. Abbott Park.II. 90 pp.
- 5.- Robertis,P.D.E y Robertis,F.M.E.1987. Biología Molecular y Celular. Undécima edición. Ed. España. pg. 340-354.
- 6.- Sanchez, J. F. Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) en leucocitos. Tesis de postgrado. Facultad de Medicina, México D.F. 1989.
- 7.- Solomon, E. P.et.al. 1987. Biología. 7a.Edición. Interamericana. México D.F. pg.96-101.
- 8.- Boyd.W. 1965. Tratado de patología. 3a.Edicion. El Ateneo. México D.F. 1414 pp.
- 9.- Kirch,R.I. 1988. Biología Molecular de Las Leucemias. en: Clínicas Pediátricas de Norteamérica. Vol.4. pg.747.778.
- 10.- Yunis,J.J.1976. The chromosomal basis of human neoplasia. Science. 221:227.
- 11.- Wintrobe,M.M; Lee,R.G.1974. Clinical Haematology. Philadelphia and Febiger Eds. 1986 pp.
- 12.- Willams,W.J; Beutler.E; Allan,J.E. 1972. Hematology. McGraw. 1480 pp.

- 13.- Mathé G; Pouillart. P; Sterescu. M; et. al. (1971). Subdivision of Classical varieties of Acute Leukemia: Correlation with Prognosis and Cure Expectancy. *Eur.J.Clin.Biol.Res.* 16: 554.
- 14.- Miller, R.D. et.al. 1980. Prognostic Importance of Morphology (FAB Classification) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukaemia (ALL). *British Journal of Haematol.* 48. 199-200.
- 15.- Bennett, M.J; Catovsky.D.et.al. 1976. Proposals for the Clasification of Acute Leukemias (French-American-British Group). *British Journal of Haematol.* 33. 451-458.
- 16.- Bennett, M.J; Catovsky D.M.D. 1985. Proposed Revised Criteria for the Clasification of Acute Leukemia. *Annals of Internal Medicine.* 103. 626-629.
- 17.- Bhem, G.F. (1990). Morphologic and Cytochemical Characteristics of Childhood Lymphoblastic Leukemia. In: Pochedly, C; Curt, I.C. Childhood acute Lymphoblastic Leukemia. Part I. *Hematology/Oncology Clinics of North America.* (Ags). pp. 715-741.
- 18.- First MIC Cooperative Study Group: Morphologic, Immunologic, and Cytogenetics (MIC) Working Classification of Acute Lymphoblastic Leukemias. Report of the Workshop Held in: Leuven Belgium. April 22-23. 1988. *Cancer Genet Cytogenet.* 23: 189.
- 19.- Pierce, M.L; Borges, W.H, et.al. 1969. Epidemiological Factors and Survival Experience in 1770 Children with Acute Leukemia Treated by Members of Children Study Group a Between 1946 and 1964. *Cancer.* 23: 1296.
- 20.- Bishop, J.M. 1985. Viral Oncogenes. *Cell.* 42:23.
- 21.- Rich, I.Md. 1988. Biología de las Leucemias. en: *Clínicas Pediátricas de Norteamérica.* Vol.4. Leucemias.

- 22.- Nowell and Hungerford. 1960. A Minute Chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. Science. 7.132-149.
- 23.- Rowley, J.D. 1973. A New Consistent Chromosome Abnormalities in Chronic Myelogenous Leukemia. Identified by Quinacrine Fluorescence and Staining. Nature. (London). 243-290.
- 24.- Bloomfield, C.D; Paterson y Yunis, J.J. 1977. The Philadelphia chromosome Ph in adult with LLA. A comparison of Ph+ and Ph- patient. British Journal of Haematology.
- 25.- Lawler, D.S. 1982. Significance of chromosome abnormalities in leukemia. Seminars in Hematology. Vol.19. No.4 (October). pg 257-271.
- 26.- Wang Peng, J; Knütsen, T. 1980. Lymphocytic Leukaemias, Acute and Chronic, in: Clinics in Haematology. Vol.8. No.1 (February). pg 87-127.
- 27.- Yunis, J.J. 1981. New Chromosome Techniques in the Study of Human Neoplasia. Human Patology. Vol.12. no.6 (June). pg.540-548.
- 28.- Yunis, J.J. 1981. Specific Fine Chromosomal Defect in Cancer: An overview. Human Patology. Vol.12. No.6. (June) pg.549-554.
- 29.- Berger. R. 1981. The Chromosome in Hematology. Cancer Genet Cytogenet. 4.69.88. pg.69-85.
- 30.- Andrew, J; Carroll, M; Williams, M. 1984. Pre-B Cell Leukemia Associated with Chromosome Translocation 1;19. Blood. Vol.63. No.3 (March) pg.721-724.
- 31.- Stass, S.A; Mirro, J.Jr. 1986. Lineage Heterogeneity in Acute Leukemia, Acute Mixed Lineage leukemia and Lineage Switch. Clin.Haematol 15: 811-27.

- 32.- Leiper,A.D; Chessells,J.M. 1986.Acute Lymphoblastic Leukemia under 2 years. Arch.Dis.Child. 61:1007-1012.
- 33.- Bloomfield,C.D; Trent,J.M. Van den Berghe,H. 1987. Report of the Committee on Structural Chromosome Changes in Neoplasias. Cytogenet Cell Genet. 46:344-366.
- 34.- Miller,R.D.1988. Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Biological Features and their use in Predicting Outcome on Treatment. The American Journal of Pediatric Haematology/Oncology. 10(2):163-177.
- 35.- Batia-Voger, et .al. 1989. Biologic and Cytogenetic Characteristics of Leukemia in Infants. Cancer. Vol.63. (January). pg.117-125.
- 36.- Berrospé,G; Solé,F; Mirro,R. et.al. 1988. Anomalías Cromosómicas en Neoplasias Humanas. En: Tratado de Medicina Práctica. 2 ed. Medicina. No.48. Diciembre. Pg 3075-3079.
- 37.- Lebau,M.M and Rowley,J.D. 1989. Cytogenetics. in: Williams,W.J; Beutler,E. et.al.(Eds). Haematology. Ed.4. Mc Graw Hill. New York. N.Y. pg 78-79.
- 38.- Nysa,H.A. 1990. Cytogenetic Abnormalities and Molecular Markers of Acute Lymphoblastic Leukemia. In: Hematology/Oncology. Clinics of North America. Vol.4. No.4. (August).
- 39.- Crist,W; Carroll,J.et.al. 1990. Philadelphia Chromosome Positive Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical and Cytogenetics Characteristic and Treatment Outcome. A Pediatric Oncology Group Study. Blood. Vol.76. No.3 (August). pg 489-494.
- 40.- Pui,C.H; Andrew,J.C.1990. Near Triploid and Near Tetraploid Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood. Blood. Vol.76.No.3. (August). Pg 590-596.

- 41.- Rowley, J.D. 1990. Recurring Chromosome Abnormalities in Leukemia and Lymphoma. Seminars in Hematology. Vol.27. No.2 (April).pg 122-136.
- 42.- Crist, W.M; Carroll, A.J. et.al. 1990. The Poor Prognosis of Children with Pre B Acute Lymphoblastic Leukemia is associated with the t(1;19)(q23;p13). A Pediatric Oncology Group. (POG) Study. Blood. 76.pg 117.
- 43.- Shuster, J.J; Falletta, J.M; Pullen, J. 1990. Prognostic Factors in Childhood T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. A Pediatric Oncology Group Study. Blood. 75. pg 166.
- 44.- Pui, C.H; Carroll, A.J; Raimondi, S.C; Land, V.J. et.al. 1990. Clinical Presentation, Kariotypic Characterization, and treatment outcome of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia with Near Haploid or Hipodiploid <45 Chromosome Line. Blood. 75. pg 1170.
- 45.- Berger, D; Chen, S.J; Chen, Z. 1990. Philadelphia Positive Acute Leukemia Cytogenetic Molecular Aspect. Cancer Genet Cytogenet. 44:143.
- 46.- Look, T.A. 1988. The Cytogenetics of Childhood Leukemia. Clinical and Biologic Implication. Pediatric Clinics of North America. Vol No.4. (August).
- 47.- Keating, M.J; Cork, A; Broach, J. et.al. 1988. Toward a Clinically relevant Cytogenetic Classification of Acute Myelogenous Leukemia. Leuk. Research. 11:119-133.
- 48.- Bennett, M.J; Catovsky, D. et.al. 1981. The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia Concordance Among Observers and Clinical Correlations. Br. J. Haematology. 47: 553-61.
- 49.- Gallego, N.Q. 1977. Clasificación Inmunológica de LLA por medio de anticuerpos monoclonales. Tesis. Facultad de Química. UNAM. 1987.

- 50.- Brown,B.A.1985. Hematology: Principles and Procedures. 3rd. Ed. Lea and Febiger. Philadelphia.
- 51.- Sanchez.1972. Planchas d'Hematologie. Deuxieme edition.Refoude et complete. Par Sanchez.
- 52 Srisvastava, K.P. 1979. Basic Genetics for Health Professionals. PSG.Publishing Company Inc. Littleton Massachusetts.U.S.A. 199 pp.
- 53.- Yunis.J.J.1974. Human Chromosome Methodology. 2nd.Edition. New York and Academic Press.
- 54.- Finan,J.B. et.al. 1978. Chronic t-Cell Leukemia: Cytogenetics and Response to mitogens. Proceeding of Am. Asc. of Cancer Res. p 48.
- 55.- Seabright; Marina.1971. A Rapid Banding Technique for Human Chromosome. The Lancet. October. pg. 971-972.
- 56.- Gomez.G; Cárdenas,G.G. 1983. Bandas C Por Hidróxido de Bario. Trabajo Inédito. Agosto. Comunicación Personal.
- 57.- Yunis,J.J. 1981. Chromosomes and Cancer: New Nomenclature and Future Directions. Human Pathology. Vol.12. No.6. (June).
- 58.- Fourth International Workshop on Chromosome in Leukemia. 1982. Organization. Cancer Genet Cytogenet. 11:259-264. 1984.
- 59.- Heerema,N.A. PhD.1990. Cytogenetic Abnormalities and Molecular Markers of acute Lymphoblastic Leukemia. Hematology/Oncology Clinics of North America.Vol.4 No.4 August. pg.796-819.
- 60- Leverger.G;Berheim.A.et.al.1988. Cytogenetic Study on 130 Childhood Acute Non-Lymphocitic Leukemia. Medical and Pediatric Oncology. 16: 227-232.
- 61.- Daniels,W.W.1983.Bioestadística. Limusa.4a.Ed. México,D.F. 495 pp.

- 62.- Miller.P.D;Leikin.S;;Albo.V;Shater.H;Coccia.P.(1981). Prognostic Importance of Morphology (FAB Classification) in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL).Br.J.Haematol. 48:199-206.
- 63.- Neglia,P.J y Robinson, L.L.(1988).Epidemiología de las Leucemias Agudas de la Infancia.En: Clínicas Pediátricas de Norte América. Vol.4. Leucemias. pg. 727-746.
- 64.- De Levine.A.S. (1982). Cancer in the Young. Chicago Year Book Medical. En: Clínicas Pediátricas de Norte America. Vol.4. Leucemias. 1988.
- 65.- Bennett,J.M; Catovsky,J.H; Daniel,M.T;et.al.(1981). The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukemia. Concordance Among Observers and Clinical Correlations. Br.J.Haematol; 47:553-61.
- 66.- Poplack,G.D;Reaman.G.(1988).Leucemia Linfoblástica Aguda en la Infancia.En: Clínicas Pediátricas de Norte América. Vol.4. Leucemias. pg. 977-1027.
- 67.- Miller,R.D.(1980).Leucemia Linfoblástica Aguda. En: Clínicas Pediátricas de Norte América.Hem.Fed.Ed. Interamericana. Vol.2. 946 pp.
- 68.- Steinhertz,G.P.M.D.(1987).Acute Lymphoblastic Leukemia of Childhood. Hematology/Oncology clinics of North America. Vol.1.No.4.(Dec).pg.549-565.
- 69.- Andreff,M;Redner.A;Thongprarset;et.al.(1985). Multiparameter Flow Cytometry for Determination of Ploidy, Proliferation and Diferentiation in Acute Leukemia.
- 70.- Mauer.M.A.(1989). Acute Lymphocytic Leukemia. In: Williams,W.J; Beutler,E;et.al.(Eds). Haematology.Ed.4.New York.N.Y. Mc Graw Hill.pp. 78-89.

- 71- Michael, F.M; Garson, M.O; Ekert, H; Tauro, G; et.al. (1988). Prospective Study of Childhood Acute Lymphoblastic. Medical and Pediatric Oncology. 16: 153-161.
- 72.- Pui, C.H; Williams and Look. (1990). Hypodiploidy is Associated with a Poor Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood. Vol.70. No.1.
- 73.- Williams, D.I; Raimondi, S.S; Pui, C.H; et.al. (1990). Evolving Chromosome Patterns and New Cytogenetics Concepts in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Gale R.F.Moelzer, D (eds). Acute Lymphoblastic Leukemia. U.C.L.A. Symposia on Molecular And Cellular Biology, New Series. Vol.108. New York, N.Y. Wiley Liss. pg 91.
- 74.- Crist, W; Pullen, J; Boyett, J; Fallete, J; et.al. (1986). Clinical and Biologic Features Predict a Poor Prognosis in Acute Lymphoid Leukemias in Infants: A Pediatric Oncology Group Study. Blood. 67:135.
- 75.- Pui, C. H; Williams, D.L; Raimondi, S.C; et.al. (1987). Hypodiploidy Associated with a Poor Prognosis in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood. 70:274.
- 76.- Pui, C.H; Williams, M; Crist; Look, T.A. (1990). Biology and Clinical Significance of Cytogenetics Abnormalities in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. Blood. Vol. 76. No.8. (Oct).pp. 1449-1463.
- 77.- The Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. (1980). Cancer Genet Cytogenet. 4: 95-142. 1981.
- 78.- Raimondi, S.C; Bhem, F.G; et.al. (1990). Cytogenetics of Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia With Emphasis on Prognostic implications of the t(1;19). J.Clin.Oncol.8: 1380.

79.- Trent, J.M; Kaneko, Y; Mitelman, F. (1989). Report of the Committee on Structural Chromosome Changes in Neoplasia. Cytogenet Cell Genet. 51: 533.

80.- Turk, S.S (1982). Polimorfismo de los cromosomas 1, 9, 16 y Y. Human Genetics. pp.217-220.