



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA**

“ ESTUDIO CITOGENETICO EN
PACIENTES CON LINFOMA
NO-HODGKIN ”

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
LEONOR ENCISO MORENO



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. 1994



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIA

A mis padres:

**" Por que soy producto de su unión, de su amor y
de toda su humanidad "**

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres: Por todos sus esfuerzos, y por el respeto de mi libertad.

A mis Hermanos, Sobrinos y ¡por que no! mis cuñados y agregados: Eva, Susana, José Antonio, Rosa María, Jesus, Adrian, aunque ya no estas aquí, Daniel. Cris, Wendy, Miguel Angel, Gaby, Aisha, Edith, Atenas, Veronica, Areli, Aldara, José Carlos, Frida, Odín, Paty, Rosy, Pepé, José y César. Por la fortuna de seguir juntos, ¡ En todo, y para todo!

A mis Amigos: Gaby, Mela, Carmen, Lulú, José Rodriguito, Humberto, Cholo, Ana Luisa, Sra Carmen, Rosy C., Alma, Monse, Tere R., Gaby Q., Silvia, Jaime, Angel, Pelos, Héctor, Alejandro, Jarocho, Adrian por supuesto, Silvia de Leobardo, claro que a tí también Leo, María Eugenia Palacios, Hugordo, Martín, Miguel, Sergio "Patita", Mara, Gustavo, y a todos los cuates que se puedan olvidar. ¡No tú no te me olvidaste !, a tí también Pollito!. Por los momentos compartidos, buenos o malos,¡los compartimos!.

A mis compañeros de trabajo.

A todos los seres humanos que conocí en mi estancia en el Servicio de Genética.

Jurado asignado

Biol. Ma. Eugenia Heres Pulido.
M. en C. Martha O. Salcedo Alvarez.
Dr. Rafael Jiménez Flores.
Q.F.B. Alicia Cervantes Peredo.
M. en C. Diego J. Arenas Aranda.

ASESOR: Q.F.B. ALICIA CERVANTES PEREDO.
ASESOR TECNICO: Q.F.B. ROSA MARIA ARANA TREJO.
DRA. SUSANA KOFMAN-ALFARO.

SUSTENTANTE: LEONOR ENCISO MORENO.

Este trabajo se desarrolló en el Servicio de Genética del Hospital General de México, SSa.

INDICE

I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Objetivos	4
IV. Antecedentes.	5
4.1. Clasificación de LNH.	5
4.1.1. Clasificación de Rappaport.	5
4.1.2. Clasificación de Lukes y Collin.	6
4.1.3. Clasificación New Working Formulation.	6
4.1.3.1. Linfomas de Bajo Grado.	7
4.1.3.1.1. Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas.	7
4.1.3.1.2. Linfoma Folicular Mixto de células pequeñas hendidas y células grandes	7
4.1.3.1.3. linfoma Linfocítico Difuso de células pequeñas.	8
4.1.3.2. Linfomas de Grado Intermedio.	9
4.1.3.2.1. Linfoma Difuso de células grandes.	9
4.1.3.2.2. Linfoma Difuso Mixto de células pequeñas hendidas y de células grandes	10
4.1.3.2.3. Linfoma Folicular de células grandes.	11
4.1.3.3. Linfomas de Alto Grado.	11
4.1.3.3.1. Linfoma Linfoblástico.	12
4.1.3.3.2. Linfoma difuso de células pequeñas no hendidas.	12
4.1.3.3.3. Leucemia-Linfoma de células T del adulto.	13
4.1.4. Otras Entidades.	14
4.1.4.1. Granulomatosis Linfomatoidea.	15
4.1.4.2. Linfadenopatías Angioinmunoblásticas.	15
4.2. Características clínicas.	17
4.2.1. Etapas clínicas de LNH.	17
4.2.2. Características generales.	20
4.3. Diagnóstico	21
4.4. Tratamiento.	22
4.5. Etiología.	25
4.5.1. Factores Ambientales.	25
4.5.1.1. Factores Biológicos.	25
4.5.1.2. Factores Físicos.	26
4.5.1.3. Factores Químicos.	27
4.5.2. Factores Genéticos.	27
4.5.2.1. Factores Hereditarios.	28
4.5.2.2. Oncogenes.	29
4.5.2.3. Sitios Frágiles.	30
V. Rearreglos cromosómicos en LNH.	36
5.1. Antecedentes Históricos	36
5.2. Nomenclatura Citogenética.	37
5.2.1. Criterios para determinar los diferentes tipos de rearreglo citogenético.	38
5.3. Citogenética.	39
5.4. Hallazgos Citogenéticos.	40
5.4.1. Rearreglos cromosómicos en LNH de Bajo Grado.	41
5.4.1.1. Rearreglos estructurales	41
5.4.1.2. Rearreglos numéricos.	44
5.4.1.3. Otros rearreglos cromosómicos en Linfomas de Bajo Grado.	44
5.4.2. Linfomas de Grado Intermedio	45
5.4.2.1. Rearreglos estructurales	45
5.4.2.2. Rearreglos numéricos.	46
5.4.3. Linfomas de Alto Grado.	47
5.4.3.1. Rearreglos estructurales.	47
5.4.3.2. Rearreglos numéricos.	51

5.4.4. Rearreglos cromosómicos secundarios en LNH.	51
VI. Material y Metodología.	53
6.1. Material biológico.	53
6.2. Cariotipo Técnica Habitual de Sangre Periférica.	53
6.3. Cariotipo de Médula Ósea Técnica Directa.	55
6.4. Cariotipo de células de Ganglio Linfático.	55
6.5. Técnica de Bandas GTG.	57
6.6. Preparación de soluciones.	58
VII. Resultados.	59
VIII. Discusion y Conclusiones.	67
IX. Bibliografía.	74

I RESUMEN

Los Linfomas no Hodgkin (LNH) son causados por neoplasias proliferativas de células linfoides, se presentan en los ganglios linfáticos, pero ocasionalmente se desarrollan en otros órganos. Estas alteraciones varían desde el Linfoma de Burkitt (LB), característico en niños, hasta el Linfoma Difuso Nodular (LDN) en adultos.

En este trabajo se realizó análisis citogenético de 108 muestras de sangre periférica, médula ósea y/o ganglio linfático, provenientes de pacientes con LNH, recibidas en el laboratorio de Citogenética del Servicio de Genética del Hospital General de México, SSA para determinar el subtipo específico de cada paciente. Dicho análisis se basó en el uso de la técnica estándar (tinción con Giemsa), y también mediante la técnica de bandas GTG.

Utilizando la técnica estándar se obtuvo material analizable en 14 pacientes, tres de los cuales presentaron cariotipo normal, otros dos con alteraciones numéricas y el resto presentó rearrreglos estructurales. Por otro lado, la técnica de bandas GTG permitió analizar claramente los rearrreglos cromosómicos en nueve pacientes, dentro de los cuales uno resultó con cariotipo normal, uno más presentó alteración numérica y el resto mostraron rearrreglos tanto estructurales como numéricos, concordando esto último con los informes encontrados en la literatura. En total se analizaron citogenéticamente a 23 pacientes.

Estos resultados sugieren que es necesario establecer una correlación más amplia entre los datos obtenidos por las diferentes áreas involucradas en la clasificación de los Linfomas no-Hodgkin, lo cual puede ser determinante para establecer con mayor exactitud el subtipo de Linfoma que se presenta en cada paciente. Esto último tiene importancia clínica ya que la terapia brindada en estos casos está relacionada con el subtipo particular que presenta cada individuo. De este modo, nuestros resultados sugieren la necesidad de realizar un seguimiento citogenético en los pacientes afectados con Linfomas no-Hodgkin.

I. INTRODUCCION.

Los Linfomas son tumores causados por neoplasias proliferativas de células linfáticas. En muchos casos estos tumores pueden derivarse del nódulo linfático, pero ocasionalmente se desarrollan en otros órganos donde abundan las células linfáticas. Las células linfoides son capaces de proliferar en la médula ósea con sobreflujo en torrente sanguíneo (Leucemia), así como ocasionar tumores localizados (Linfomas). Debido a esto, muchas veces es difícil, si no imposible, diferenciar entre una Leucemia y un Linfoma con acción en médula ósea.

Por otra parte, también se encuentran dificultades cuando se trata de clasificar a los Linfomas, ya que las opiniones han diferido ampliamente, tanto para determinar cual es la célula linfática que da origen a determinados tumores, como en la causa de este proceso. Sin embargo, la introducción de nuevas técnicas de investigación, tales como Inmunofenotipos, Análisis Cromosómico y técnicas de Biología Molecular, han permitido comprender la patología de los Linfomas.

Los Linfomas son comunmente divididos en dos grupos basándose principalmente en datos histopatológicos y clínicos. De acuerdo a ello tenemos:

- 1) Enfermedad o Linfoma de Hodgkin.
- 2) Linfomas no-Hodgkin.

Este último grupo de Linfomas ha sido mejor caracterizado tanto clínica como citogenéticamente. Los Linfomas no-Hodgkin (LNH) se presentan en los ganglios linfáticos, sin embargo, entre ellos hay diferencias en lo que se refiere a: células de origen, distribución por edades, cuadro clínico, estadio de aparición, manifestaciones clínicas, complicaciones y su respuesta al tratamiento. Estas alteraciones comprenden un amplio espectro que varía, desde el Linfoma de Burkitt en los niños africanos hasta el Linfoma Difuso Nodular en adultos. La mayoría de los casos de LNH son neoplasias monoclonales de células B.

A nivel mundial la incidencia de LNH varía enormemente. En E.U.A. la incidencia aproximada es de 6.5 / 100,000 habitantes, mientras que en ciertas áreas de Polonia es tan baja como 1/100,000 habitantes. En los E.U.A. los Linfomas Foliculares se encuentran entre los tipos más comunes. El Linfoma de Burkitt es más frecuente en determinadas áreas con características climatológicas específicas, como las existentes en Africa Central, de donde es endémico, mientras que en Japón y en Jamaica predominan los Linfomas de células T, variante que también recientemente se ha reportado en el Caribe y en el Sureste Mexicano. En el Norte de nuestro país llama la atención la alta frecuencia de Linfomas en áreas donde se emplean insecticidas, por lo cual estos hechos sugieren la participación de ciertos factores endémicos, tales como agentes químicos, físicos o biológicos. Así mismo, los factores genéticos no se pueden desligar de esta observación, ya que el cáncer es una forma de crecimiento celular maligno e incontrolable, que ocurre en un organismo a través de continuas generaciones de células. El crecimiento anormal y por lo tanto su inhibición están íntimamente conectados con los mecanismos de división celular, por lo que se requiere del conocimiento de los principios citológicos que lo rigen para su manejo. En la mayoría de los tumores malignos se presentan defectos cromosómicos específicos, por lo que el análisis citogenético en pacientes con LNH, es importante para la subclasificación y entendimiento del origen de este tipo de neoplasia, lo que permitirá realizar un diagnóstico más exacto, lo que conduce a elegir un tratamiento específico y adecuado, que garantice una mayor supervivencia para el paciente.

II.- OBJETIVOS

- 1.- Realizar análisis citogenético de cultivos de sangre periférica (S.P), médula osea (M.O) y/o ganglio linfático (G.L) de pacientes con LNH.
- 2.- Estandarizar la técnica de cultivo de muestras de Ganglio Linfático en el Servicio de Genética del Hospital General de México SSa.
- 3.- Establecer la frecuencia y tipo de aberraciones citogenéticas en pacientes con LNH.
- 4.- Iniciar un proyecto de seguimiento de estudios citogenéticos a largo plazo, en pacientes con LNH.

IV. ANTECEDENTES.

4.1. CLASIFICACION DE LINFOMAS NO-HODGKIN.

Los linfomas malignos son comunmente divididos dentro de dos subgrupos principales en base a los datos histopatológicos y clínicos: Enfermedad de Hodgkin (EH) y Linfomas no-Hodgkin (LNH). Los últimos, están desde el punto de vista citogenético, mejor caracterizados. (1)

Los LNH son un grupo heterogéneo de tumores, existiendo numerosos sistemas de clasificación (1). Las tres clasificaciones más importantes son: la histológica propuesta por Rappaport (2), la anatomopatológica propuesta por Lukes y Collin (3) y la Tentativa Multinacional de LNH ("New Working Formulation")(4).

4.1.1. Clasificación histológica propuesta por Rappaport.(2)

De acuerdo a la estructura de los ganglios linfáticos, la clasificación de Rappaport divide a los Linfomas en: 1) Tipo nodular (N), en el cual las células neoplásicas se agrupan simulando folículos linfoides (centros germinales), y 2) el tipo difuso (D), en el cual no hay agregación y está borrada la conformación de los ganglios linfáticos. Además, de acuerdo con sus características citológicas, los LNH se clasifican en las variedades "histiocíticas" (H) ("hidtiocítica" se pone entre comillas para indicar que los tumores así clasificados son de origen linfoide, con excepción de algunos casos raros) y linfocíticas (L); esta última consiste en tipos linfocíticos mal diferenciados (LMD) y linfocíticos bien diferenciados (LBD). Además, existe un grupo de Linfomas Celulares Mixtos (CM) que poseen elementos de los tipos histiocítico y linfocítico. Aunque la clasificación de Rappaport se puede seguir y, en algunos casos, predice el pronóstico, científicamente no es segura debido a que los avances en el estudio de la estructura de los ganglios linfáticos y de los marcadores inmunológicos de los linfocitos han revelado que, cada uno de los diferentes tipos Rappaport consiste de diversas formas de expresión de la

morfología de diferenciación de las células B. Por ejemplo, la categoría de Linfoma "Histiocítico" incluye Linfomas que derivan en su mayoría de linfocitos B transformados, de células foliculares centrales hendidas y no hendidas, y sólo rara vez de linfocitos T y de verdaderos histiocitos.(2,5)

4.1.2 Clasificación Anatomopatológica propuesta por Lukes y Collin.(3)

Lukes y Collin (1974) han propuesto una clasificación anatomopatológica alternativa, basada en hallazgos histológicos, e inmunológicos, tales como, inmunoglobulinas de superficie y marcadores en los ganglios linfáticos. Los Linfomas Malignos se clasifican por el sistema de Lukes y Collin, de acuerdo con la designación funcional de células B, T o U (sistemas celulares indefinidos) e histiocitos, en general se encuentra que 68 a 70 por ciento de los Linfomas Malignos derivan de células B, 18 a 19 por ciento de células T, 13 por ciento de células U y una pequeña fracción de verdaderos histiocitos. La clasificación para las células U es hipotética, y ha sido propuesta para las proliferaciones celulares con características morfológicas primitivas que no son exclusivas de ellas. En estas células no son detectables los marcadores inmunológicos o citoquímicos. Sin embargo la clasificación inmunológica de Lukes y Collin para LNH carece de datos para establecer correlaciones con la terapéutica y es difícil de reproducir. Aún así están surgiendo entidades patológicas específicas con características morfológicas e inmunológicas exclusivas, signos clínicos reconocibles y respuestas predecibles al tratamiento (5,6,7).

4.1.3."New Working Formulation"(4)

Recientemente se hizo una tentativa multinacional, para vencer los problemas de incompatibilidad entre las diferentes clasificaciones incluyendo una Nueva Formulación de Trabajo para la nomenclatura de LNH. El objetivo de la formulación de trabajo, no es en sí mismo crear un nuevo sistema de clasificación, sino reconocer varios subtipos histopatológicos dentro de tres categorías principales -Linfomas Malignos de bajo grado, intermedios y de alto grado- (Tabla 1) para permitir la interpretación entre términos equivalentes ya existentes.

Además se incluyen otras formas que recientemente se han detectado (1,4).

4.1.3.1. Linfomas de Bajo Grado.

El grupo de Linfomas de Bajo Grado o indolentes incluye el Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas (LFCPH); el Linfoma Folicular Mixto de células pequeñas hendidas y células grandes (LFM); el Linfoma Linfocítico Difuso de células pequeñas (LLDCP) y el Linfoma Linfocítico Difuso de diferenciación intermedia (LLDDI).(4, 7,)

2.1.3.1.1. Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas.- El Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas (LFCPH) es el más común de los subtipos histológicos de Bajo Grado y representa alrededor de 60 a 70% de todos los Linfomas de Bajo Grado y 30% de todos los Linfomas Linfocíticos. Estos tumores se originan primariamente en los ganglios linfáticos y están compuestos por células que muestran considerables variaciones en tamaño, configuración y grado de diferenciación. El patrón histológico de crecimiento es nodular pero también en muchos casos el patrón de crecimiento folicular del ganglio linfático es incompleto. A menudo los pacientes con un patrón nodular puro (con independencia del tipo celular), presentan mejores índices de sobrevida que aquéllos con áreas difusas que abarcan más de 25% de la superficie de corte transversal del ganglio. A medida que aumenta el porcentaje de células grandes, los Linfomas Foliculares tienen un comportamiento más agresivo. Cuando se obtienen dos biopsias o más en el momento del diagnóstico, pueden observarse variaciones en los rasgos histológicos (discordancia) hasta en 25% de los pacientes con Linfoma Linfocítico.(7)

4.1.3.1.2. Linfoma Folicular Mixto de células pequeñas hendidas y de células grandes.- El Linfoma Folicular Mixto de células pequeñas hendidas y de células grandes (LFM) representa aproximadamente 20 a 30% de los casos de Linfoma de Bajo grado. Se diferencia del LFCPH por la presencia de 5 a 15 células grandes nucleadas por campo en el centro de los nódulos malignos. Las células poseen un fenotipo celular, de superficie semejante al de las células del

LFCPH, pero poseen una fracción de crecimiento algo mayor. Los pacientes con LFM presentan adenopatías difusas y una historia natural indolente, similar a la asociada con el LFCPH (de 0 a 5 células grandes por campo de gran aumento). Con menor frecuencia, el LFM afecta la médula ósea y es común su asociación con masas abdominales. Cuando está comprometida la médula ósea, es a menudo con el componente de células pequeñas hendidas, las cuales se consideran células migratorias.(6,7,8)

4.1.3.1.3. Linfoma Linfocítico Difuso de células Pequeñas.- Este Linfoma (LLDCP) está compuesto por linfocitos pequeños bien diferenciados y parece ser el equivalente sólido de la Leucemia Linfocítica Crónica. Estos tumores presentan un patrón difuso de crecimiento, usualmente en el momento del diagnóstico se encuentran diseminados y, en la mayoría de los casos, son leucémicos o se convierten en tales. Por lo general la presentación clínica incluye linfadenopatías generalizadas y asintomáticas, con compromiso local de la médula ósea y del hígado. En raras ocasiones, las células secretan Ig en forma espontánea. La secreción de Ig puede ser inducida con facilidad *in vitro* por medio de la incubación con ésteres de forbol. Las células tumorales son T101-positivas y el estadio de maduración es mayor o cercano a las células secretoras de Ig. Hasta en 10% de los casos es posible detectar una anemia hemolítica positiva a la prueba de Coombs. La progresión histológica hacia un Linfoma Difuso de células grandes (LDCG) es rara y ocurre en alrededor de 5% de los casos.(8)

4.1.3.1.4. Linfoma Linfocítico Difuso de diferenciación intermedia o de la zona del manto. El Linfoma Linfocítico Difuso de diferenciación intermedia o de la zona del manto (LLDDI) es un raro subtipo, no incluido en la Formulación Operativa. Estos tumores por lo general crecen en forma difusa con un patrón que puede ser vagamente nodular y de células un poco más grandes que los linfocitos pequeños, con irregularidades e indentaciones nucleares leves. Estas células provienen de las células B en la zona del manto que rodea a los folículos y el tumor podría correlacionarse con la Leucemia Prolinfocítica, del mismo modo que el Linfoma

Linfocítico Difuso Pequeño se correlaciona con la Leucemia Linfocítica Crónica. Las células del LLDDI son células B maduras positivas para el antígeno de la Leucemia Linfoblástica Aguda común (CALLA +) y CD 10-positivas, además de ser B1- negativas, B4-positivas e Ia-positivas. A diferencia de la mayoría de los Linfomas de células B, que por lo general expresan los genes de cadenas ligeras kappa, aproximadamente dos tercios de los LLDDI expresan los genes de cadenas ligeras lamda. Es posible observar junto con la expresión de IgM, algo de producción de IgD o IgG. La presentación clínica del LLDDI es similar a la de otros Linfomas indolentes, con adenopatías generalizadas y compromiso de la médula ósea y el hígado. Sin embargo, la progresión a un LDCG es sumamente rara. La sobrevida media es de alrededor de 3 años y parecería ser algo más breve que la asociada con los otros subtipos histológicos de bajo grado (6,7,9)

4.1.3.2. Linfomas de Grado Intermedio.

Los Linfomas de grado intermedio generalmente presentan un curso clínico agresivo. Este grupo incluye los Linfomas Difusos de células grandes (LDCG), los Linfomas Difusos Mixtos de células pequeñas hendidas y células grandes (LDM) y los Linfomas Foliculares de células grandes (LFCG). (5,7)

4.1.3.2.1. Linfoma Difuso de células grandes.- Los Linfomas agresivos constituyen aproximadamente 60% de todos los Linfomas Linfocíticos. Estos representan alrededor 85% de la totalidad de los Linfomas agresivos. El LDCG fue denominado Linfoma Histiocítico Difuso (LHD) en la clasificación de Rappaport y con anterioridad era conocido como sarcoma de células reticulares. Los LDCG son heterogéneos, tanto desde un punto de vista morfológico como inmunológico. Se han efectuado numerosos intentos de subclasificación de estos tumores, sobre la base de subgrupos morfológicos y/o inmunológicos. Invariablemente, los criterios morfológicos han demostrado ser irreproducibles; sin embargo, ha sido posible diferenciar un subgrupo de LDCG, el Linfoma Inmunoblástico (LDCG-1). Estos Linfomas se caracterizan por

la presencia de células malignas con rasgos plasmocitoides y pueden originarse en las células T o B. En apariencia no existen evidencias con respecto a las manifestaciones clínicas asociadas con los LDCG-I de células T o B o entre los rasgos clínicos de los LDCG y los LDCG-I. Si bien en un principio se pensó que había una diferencia en la historia natural de estos tumores, determinando que en la NWF el LDCG-I se agrupara con los Linfomas de Alto Grado. Después se observó que no existían tales subtipos para el LDCG (ya sea inmunoblástico de células T o B) en cuanto a la historia natural, las manifestaciones clínicas o la respuesta al tratamiento. Los LDCG muestran una alta incidencia de enfermedad extraganglionar (40%) con presentaciones en tracto gastrointestinal, piel, huesos, tiroides, testículos y otros sitios extraganglionares. La historia natural de los LDCG es considerada agresiva, puesto que la sobrevida media de los pacientes no tratados es de 8 meses. En los Linfomas agresivos se han identificado algunos factores pronósticos desfavorables, como el deterioro del estado general, la presencia de síntomas constitucionales y masas gastrointestinales voluminosas, el compromiso de la médula ósea y un nivel de LDH superior a 250 (7,9,10).

4.1.3.2.2. Linfoma Difuso Mixto de células pequeñas hendidas y de células grandes.- En el Instituto Nacional de Cáncer de los EE.UU se ha visto que aproximadamente 85% de los Linfomas de células pequeñas hendidas y células grandes (LDM) se originan en células T. A menudo los LDM, los LDCG y los LDCG-I, portadores de marcadores celulares T, son agrupados bajo la categoría de Linfomas de células T periféricas. En pequeñas series de pacientes tratados en forma heterogénea, se les ha asociado con un pronóstico más desfavorable que los LDM, LDCG y LDCG-I de origen en las células B. Sin embargo, los resultados obtenidos en numerosas series de pacientes que recibieron tratamientos homogéneos no sustentan una diferenciación de estos Linfomas sobre la base de su estirpe celular. Más aún, tanto la Leucemia-Linfoma de células T del adulto (LTA) como la Micosis Fungoide son neoplasias de las células T periféricas, pero generalmente no se les incluye en la categoría de Linfomas de células T periféricas. No existe rasgo morfológico alguno que permita al patólogo

establecer una diferenciación entre los LDCG o los LDCG- I de origen celular B o T. Debido a que la distinción de Linfomas de células B o de células T del mismo subgrupo histológico no reviste una utilidad clínica, así como tampoco se emplea correctamente en los Linfomas de Grado Intermedio y, ya que los criterios morfológicos no son confiables para identificar dicho subgrupo, se considera que tal denominación deberá ser abandonada.(4,7,9,10)

4.1.3.2.3. Linfoma Folicular de células grandes.- Dentro de los Linfomas Foliculares el de mayor agresividad es el Linfoma Folicular de células grandes (LFCG). Este es identificado por la presencia de más de 15 células grandes en el centro de los nódulos malignos. La historia natural de estos Linfomas se vuelve progresivamente más breve a medida que aumenta el componente de células grandes. Por otra parte, en el LFCG la evolución hacia un LDCG es mucho más rápida. El LFCG es el Linfoma Folicular más raro. Su historia natural y sus características clínicas no se distinguen de las del LDCG. Con respecto al fenotipo inmunológico y a las anomalías citogenéticas, la célula maligna es semejante a la del LFCPC. Al igual que todos los Linfomas Foliculares, el LFCG siempre se origina a partir de células B, pero la fracción de crecimiento de las células de este tumor es generalmente mayor que en el LFCPHC y en el LFM. (4,7)

4.1.3.3. Linfomas de Alto Grado.

Los Linfomas de Alto Grado incluyen al Linfoma Linfoblástico (LL), los Linfomas Difusos de células pequeñas no hendidas (LDI), Linfomas de Burkitt (LB) y no Burkitt (no-B) y a la Leucemia-Linfoma de células T del adulto asociada con HTLV1 (L-LCT) y los Linfomas Difusos de células pequeñas no hendidas (LDI), Linfomas de Burkitt (LB) y no Burkitt (no-B). Las características comunes de los Linfomas de Alto Grado comprenden un rápido índice de crecimiento (fracción de crecimiento elevada), residentes en el SNC y tendencia a evolucionar hacia una fase leucémica. La mayoría de los pacientes con Linfomas de Alto Grado están comprendidos en el grupo de edad pediátrica.(4,5)

4.1.3.3.1. Linfoma Linfoblástico.- El Linfoma Linfoblástico es un proceso maligno cuyo rasgo principal es un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos supradiaphragmáticos, tanto en las cadenas mediastínicas anteriores como en las cervicales. La neoplasia se disemina con rapidez a la médula ósea (en caso de que no se encontrara afectada desde un principio) así como a menudo se propaga a las meninges y a los testículos. Existe una notable similitud clínica, inmunológica y citológica entre el Linfoma Linfoblástico en estadio avanzado y la Leucemia Linfoblástica aguda (LLA). En particular cuando el Linfoma Linfoblástico afecta la médula ósea es morfológicamente indiferenciable de la LLA. La fenotipificación inmunológica de estas entidades sugiere que alrededor de 95% de los casos presentan células con distintos estadios del desarrollo de la célula T. Así la Leucemia Linfoblástica aguda de células T constituiría una neoplasia del timocito temprano y el Linfoma Linfoblástico un proceso maligno de las fases media a tardía del desarrollo del timocito, aunque los casos individuales conforman un espectro continuo. Aproximadamente 5% de los Linfomas Linfoblásticos se originan en las células B. Estas neoplasias pueden ser identificadas por su característica morfología nuclear contorneada y por la presencia casi invariable de la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT).(7,8)

Estudios recientes muestran que alrededor del 50% de los pacientes tienen una masa tumoral mediastínica aunque pueden mostrar adenopatías (en especial mediastínicas) como lesión predominante en el momento del diagnóstico. A menudo la neoplasia se disemina hacia el hueso y la médula ósea y puede conducir al desarrollo de una Leucemia franca con compromiso del SNC o sin él.(7,11)

4.1.3.3.2. Linfoma Difuso de células pequeñas no hendidas (LDI; Linfoma deBurkitt (LB) y no Burkitt (L no-B)).- Estos Linfomas son neoplasias originadas en las células B, diferenciables sobre la base de sus rasgos morfológicos. El LB se caracteriza por la presencia de células uniformes con núcleos más pequeños que los de los histiocitos normales, el LNB se distingue del anterior por la presencia de células de tamaño variable, con núcleos de diverso tamaño y nucleólos más prominentes. Estas diferencias a menudo son difíciles de establecer y,

dato que ambos tumores constituyen neoplasias de células B con IgM y que comparten anomalías citogenéticas t(8;14), t(2;8), t(8;22), es probable que sea válido considerarlas en conjunto. Si bien muchos autores dudan de la importancia de establecer una distinción entre estos tumores, algunos informes sugieren diferencias en su comportamiento (37). Los LB se presentan con más frecuencia como neoplasias extraganglionares, en especial con un compromiso intraabdominal, y muchas veces se encuentran en el estadio IV. La enfermedad diseminada también se observa en la mayoría de los pacientes con Linfomas de células pequeñas no hendidas de la variedad LNB. Se ha registrado un compromiso de la médula ósea en 37.5% de los LNB y en 4.5% de los LB. En los primeros la probabilidad de diseminación leucémica es mayor. Ambos tumores tienen una propensión bien comprobada a la invasión del SNC. Los estudios iniciales que evaluaron la supervivencia de estos pacientes revelaron supervivencias medias de menos de un año, sin diferencias significativas entre las variedades de este grupo.(5,8)

El estudio de los Linfomas de Burkitt presenta un interés particular, debido al papel etiológico desempeñado por los Virus de Epstein-Barr (VEB). Los pacientes africanos con LB muestran elevaciones significativas en los títulos de anticuerpos contra una diversidad de antígenos de VEB. Así 80 a 90% de los tumores de los pacientes africanos contienen copias del genoma del VEB. Por el contrario, en los casos raros y esporádicos de LB en zonas no endémicas sólo 15 a 20% se asocian con VEB.(7,9)

El Linfoma de Burkitt es el único trastorno linfoproliferativo en el cual la reducción quirúrgica del tamaño del tumor ha demostrado repetidamente asociarse con una mayor supervivencia cuando es seguida de quimioterapia.(7,11)

4.1.3.3.3. Leucemia-Linfoma de células T del adulto.- La Leucemia Linfoma de células T del adulto (LTA) es un trastorno proliferativo de las células T, rápidamente fatal, que afecta sobre todo a adultos nacidos en el sudeste de Japón. Los pacientes con LTA desarrollan con rapidez linfadenopatías difusas progresivas, hipercalcemia, hepatoesplenomegalia, infiltración de la piel, lesiones óseas líticas e infiltrados pulmonares intersticiales. Los infiltrados pulmonares pueden

estar causados por una infiltración leucémica o por una infección por *Pneumocystis carinii*, puesto que las infecciones oportunistas son frecuentes. En la mayoría de los pacientes, el trastorno se expresa en sangre periférica en algún momento de la evolución, observándose células linfoides muy pleomórficas y núcleos multilobulados bizarros (7,8).

En el momento del diagnóstico, 70 a 100% de los pacientes tienen un recuento leucocitario elevado y 60 a 100% de células pleomórficas en el extendido de sangre periférica. El fenotipo inmunológico en las células es T3+, T4+, Tac+ (receptor de interleucina-2) y T8-. Este fenotipo es similar al de las células del Linfoma de células T periféricas o del Síndrome de Sézary, salvo por la expresión de Tac (5). La anemia y la trombocitopenia, detectadas a menudo en otras Leucemias Agudas, no constituyen una manifestación importante de la LTA. Casi 100% de los pacientes presenta niveles elevados de fosfatasa alcalina y deshidrogenasa láctica. Con frecuencia se observa una elevación de los niveles de enzimas hepáticas, sobre todo en los estadios terminales. El hallazgo de laboratorio más notable es la hipercalcemia, que se registra en 24% de los pacientes japoneses y 90% de los casos fuera del Japón. Por lo general, los niveles séricos de fosfato se encuentran en el rango normal y los de hormona paratiroidea son elevados, normales o adecuadamente bajos. En algunos casos, se han realizado diagnósticos erróneos de hiperparatiroidismo y los pacientes han sido derivados para ser sometidos a una paratiroidectomía. Los estudios de autopsia revelaron glándulas paratiroides normales.(8,11)

4.1.4. Otras entidades.

Se han descrito diversos trastornos linforreticulares "Benignos" capaces de crear un cuadro clínico indiferenciable del Linfoma. La enfermedad de Clasteman o hiperplasia gigante de ganglios linfáticos se presenta por lo regular como masas mediastínicas o abdominales en pacientes con síntomas sistémicos como fiebre y pérdida de peso (5,7). Recientemente se ha registrado una variante de la enfermedad de Clasteman con adenopatías generalizadas y síntomas sistémicos. El examen histopatológico revela, por lo general, que las masas están compuestas por centros germinativos hiperplásicos en un ganglio linfático que conserva una arquitectura

normal. Es usual observar un infiltrado de células plasmáticas y un cierto grado de proliferación vascular. Esta enfermedad puede tener un curso benigno y responder al tratamiento local o persistir en forma fatal para el paciente. La sobrevida media es de sólo 30 meses.(8,11)

4.1.4.1. Granulomatosis Linfomatoidea.- Es una enfermedad vasculítica inusual, de etiología desconocida, que origina una infiltración angiocéntrica destructiva de la piel, los pulmones y a veces el sistema nervioso con un infiltrado celular polimorfo compuesto por linfocitos (en especial células T), células plasmáticas, histiocitos y, a menudo,, células linfoides atípicas con rasgos citológicos malignos. La enfermedad comprende un amplio espectro, desde procesos con rasgos histológicos benignos y un curso clínico crónico, hasta el desarrollo de Linfomas altamente malignos, por lo general originados en las células T.(7,8)

4.1.4.2. Linfadenopatías Angioinmunoblásticas (LDAI).- Se describió inicialmente como un trastorno hiperinmune. Estos pacientes presentan un cuadro agudo con linfadenopatías generalizadas, hepatoesplenomegalia con síntomas constitucionales en asociación con erupción cutánea, una anemia hemolítica Coombs positiva y una hipergammaglobulinemia policlonal. El examen histopatológico revela un borramiento completo de la arquitectura, una proliferación polimórfica de linfocitos, inmunoblastos y células plasmáticas y la ausencia de centros germinativos. Por lo general, están afectados los ganglios linfáticos y, a pesar de que estas células no son morfológicamente malignas, la enfermedad como tal es progresivamente fatal, desarrollando un Linfoma durante el curso clínico o detectado por autopsia. Datos recientes sugieren que esta enfermedad podría deberse a una proliferación anormal de los linfocitos T.(8)

TABLA 1

Clasificación de Linfomas no-Hodgkin (LNH) por grados de malignidad, propuesta Multinacional "New Working Formulation" (4).

LINFOMAS DE BAJO GRADO

Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas	(LFCPH)
Linfoma Folicular mixto de células pequeñas hendidas y células grandes	(LFM)
Linfoma Linfocítico Difuso de células pequeñas	(LLDCP)
Linfoma Linfocítico Difuso de diferenciación - intermedia	(LLDDI)

LINFOMAS DE GRADO INTERMEDIO

Linfoma Difuso de células grandes	(LDCG)
Linfoma Difuso Mixto de células pequeñas hendidas y células grandes	(LDM)
Linfoma Folicular de células grandes	(LFCG)

LINFOMAS DE GRADO ALTO

Linfoma Linfoblástico	(LL)
Linfoma Difuso de células pequeñas no hendidas Burkitt y noBurkitt	(LDI) (LB) (L no-B)
Leucemia-Linfoma de células T del adulto	(LTA)

4.2. CARACTERISTICAS CLINICAS.

Los Linfomas no-Hodgkin son un grupo clínica y patológicamente diverso de trastornos neoplásicos de las células linfoides. La heterogeneidad de los Linfomas refleja el potencial de malignización en cualquier etapa de la diferenciación de los linfocitos B o T. Por lo común, los Linfomas Malignos afectan primero los ganglios linfáticos u otros tejidos linfopoyéticos.

Los Linfomas malignos se caracterizan por:

- 1) Poblaciones de células neoplásicas homogéneas.
- 2) Un patrón histológico de proliferación neoplásica en nidos cohesivos, llamado patrón folicular o nodular, o como infiltración difusa.
- 3) Un pronóstico determinado, en particular, por el subtipo histopatológico.
- 4) Propagación imprevisible de la enfermedad.
- 5) Presentación frecuente como enfermedad generalizada o sistémica.
- 6) Pronunciadas diferencias clínicas y patológicas entre los Linfomas Malignos de los niños y adultos.

Además de los patrones morfológicos característicos, la demostración de rearreglos en los genes de cadenas ligeras de Ig con expresión de cadenas kappa o lambda exclusivamente, confirma la monoclonalidad y, por ende, la neoplasia de células B. El diagnóstico en células T requiere de la demostración de una población homogénea de células linfoides citológicamente malignas, que expresan marcadores para células T o reordenamiento de genes para cadenas beta o gamma del receptor de células T (6).

4.2.1. Etapas clínicas de Linfomas no-Hodgkin.

La clasificación por etapas de un cáncer intenta establecer una estimación de su agresividad o nivel de malignidad según la diferenciación citológica de las células tumorales y el número de

mitosis dentro del tumor. Es frecuente utilizar para LNH un tipo de establecimiento clínico de etapas como se muestra en la Tabla No. 2.

TABLA 2

Etapas clínicas de los LNH. (6)

Etapa*	Distribución de la enfermedad
I	Participación de una sola región ganglionar linfática (I) o de un solo órgano o zona extralinfática (IE)
II	Participación de dos o más regiones ganglionares linfáticas en el mismo lado del diafragma, sola (II) o con lesiones de órgano o tejido contiguo extralinfático (IIE)
III	Participación de regiones ganglionares linfáticas a cada lado del diafragma (III), que pueden incluir el bazo (IIIS), un órgano, o zona limitada extralinfáticas (IIIE), o ambos (IIIES)
IV	Focos múltiples o diseminados de participación de uno o más órganos o tejidos extralinfáticos con participación linfática o sin ella.

* Todas las etapas se dividen según la ausencia (A) o presencia (B) de los siguientes síntomas sistémicos: fiebre elevada, sudores nocturnos, pérdida de peso inexplicable mayor de 10% del peso corporal normal.

4.2.2. Características Generales.

En los Linfomas Malignos no-Hodgkin, los ganglios linfáticos afectados son grandes, blandos y de color gris pálido, pero pueden ser firmes si existe fibrosis concomitante. La fibrosis se observa con mayor frecuencia en los Linfomas Malignos que toman sitios retroperitoneales, mediastinales e inguinales. La presencia de fibrosis no influye sobre la evolución clínica, ni sobre el pronóstico de los Linfomas. La necrosis tumoral se observa a simple vista, como unos focos de reblandecimiento amarillo opaco. Es característico observar necrosis tumoral en Linfomas de células grandes que se dividen rápido, pero ocurre en células individuales y no en zonas amplias de tejido neoplásico. La fagocitosis de detritos nucleares y citoplasmáticos por los macrófagos es conspicua en Linfomas con división rápida que presentan necrosis celular e imparte, a los cortes histológicos, el aspecto llamado en círculo estrellado (6,12).

El examen histológico muestra una población monomorfa de células linfoides que infiltra y desdibuja la arquitectura normal de los ganglios linfáticos u otros tejidos. Las células linfáticas se caracterizan por exhibir rasgos citológicos atípicos uniformes. Puede verse un espectro de células neoplásicas. Pero el examen histológico cuidadoso por lo general, revela atipia citológica en todas las células linfoides infiltrantes. La atipia celular falta únicamente en el Linfoma Linfocítico de células pequeñas o bien diferenciado.(6,12,13)

A nivel macroscópico, en 40% de los Linfomas Malignos de los adultos, el cuadro clínico incluye aglomeraciones uniformes de células neoplásicas, que se conocen como folículos o nódulos. Todas las neoplasias malignas que exhiben una disposición folicular se originan en células B. En 85% de los Linfomas Foliculares, hay translocación cromosómica específica t(14;18). Los LF suelen ser trastornos indolentes que siguen una evolución crónica, pero son comunes las recaídas tardías o repetición y la cura resulta excepcional. Los LF infiltran en forma progresiva a los tejidos interfoliculares normales para tornarlos foliculares y difusos; son más comunes en adultos de mediana edad, observándose con poca frecuencia antes de los 30 años y son por demás raros en los niños (6,14).

Los Linfomas malignos de los adultos inicialmente se presentan en forma difusa e infiltrativa, 60% no tienden a formar folículos ni nódulos. Estos Linfomas Difusos se originan en células B o T, con excepción del Linfoma Linfocítico de células pequeñas, los Linfomas Difusos siguen un curso clínico más agresivo que los Foliculares (6,13,14).

4.3. DIAGNOSTICO.

La presentación de los síntomas del LNH depende en gran medida de la localización del tumor, por esta razón los LNH pueden presentarse en una gran variedad de formas, representando así un gran problema diagnóstico. Los sitios más comunes de invasión incluyen, linfadenopatía periférica mediastinal y abdominal. El primer dato generalmente lo constituye el crecimiento de ganglios linfáticos, que con más frecuencia aparecen en la región cervical, supraclavicular, axilar o inguinal. Los síntomas de decaimiento, pérdida de peso, fiebre y diaforesis, generalmente son datos de enfermedad avanzada (14).

Ocasionalmente el sitio primario de invasión es el intestino en cualquiera de sus segmentos, originando síntomas abdominales como: dolor abdominal, vómito, diarrea y masa palpable. En los niños puede encontrarse sangrado intestinal agudo, requiriendo, frecuentemente, laparotomía exploradora diagnóstica.(5,14)

La invasión mediastinal comunmente se manifiesta por disnea, tos y derrame pleural. Pueden existir datos de síndrome de vena cava superior, el crecimiento de nódulos linfáticos en la región presacra, puede originar síntomas de obstrucción intestinal o del tracto urinario. Otros sitios frecuentes de presentación extralinfática son: la piel, órbitas de los ojos, huesos, cerebro, glándulas salivales y gónadas (5,15).

El diagnóstico se realiza a partir de una cuidadosa historia clínica y examen físico; la historia debe incluir fecha de inicio de la lesión, tamaño, características y rapidez de crecimiento. El examen físico deberá encaminarse a poner de manifiesto la presencia de organomegalías y datos que revelen la participación de otros niveles de la economía. (5,14)

El diagnóstico histopatológico requiere de una biopsia escisional de un nódulo linfoide

representativo, con la realización de improntas, citología hemática, con cuenta de plaquetas y sedimentación globular, biopsia por aspiración de médula ósea, química sanguínea, electroforesis de proteínas séricas, punción raquídea para estudio bacteriológico y citoquímico, radiografía de tórax, tomografía computarizada abdominal y gammagrama nuclear por resonancia magnética. En la actualidad la laparatomía no constituye un procedimiento de rutina (14).

En el diagnóstico inmunológico, se suele emplear inmunofluorescencia indirecta en cortes de tejidos congelados, o bien citometría de flujo en suspensiones celulares, con anticuerpos monoclonales para células T e Histiocitos y para células B inmunoglobulinas de superficie.(6)

El diagnóstico citogenético se realiza, en muestras de sangre periférica, aspirado de médula ósea y/o biopsia de ganglio linfático, mediante un cariotipo con bandas GTG (16).

4.4. TRATAMIENTO.

Antes de comenzar el tratamiento es importante obtener un diagnóstico adecuado y determinar cuidadosamente la extensión de la enfermedad. Dada la tendencia de los LNH a la diseminación hematológica precoz, rara vez se emplean tratamientos locales como la cirugía o la radioterapia; en la mayoría de los casos se emplea la quimioterapia como tratamiento inicial. La intensidad de ésta viene dada primero por el diagnóstico histológico mientras se obtienen datos inmunológicos y citogenéticos. Por ello, hay que subrayar, que el diagnóstico debe ser lo más certero posible, efectuándolo un patólogo con considerable experiencia (6).

Los pacientes con Linfoma de Bajo Grado o subtipos histológicos favorables, muestran desde el principio diseminación sistémica (estadios III o IV) en el momento del diagnóstico. No se cree que en estos subtipos histológicos favorables se deba usar quimioterapia demasiado agresiva. Algunos pacientes con estos tipos histológicos muestran una evolución muy indolente. Los ganglios linfáticos permanecen estables, disminuyen de tamaño o incluso regresan espontáneamente. Es posible que en estos casos no se precise un tratamiento durante meses o años.(5,6)

Cuando éste ya es necesario suelen emplearse agentes únicos como el clorambucil o la

ciclofosfamida, que habitualmente tienen buena tolerancia y resultan efectivos en la mayoría de los pacientes. La quimioterapia combinada con CVP (ciclofosfamida, vincristina y prednisona) es en general, bien tolerada y probablemente consigue tasas de respuesta más altas, pero la sobrevida no es mayor que la lograda con la monoquimioterapia. Se han probado otras combinaciones, pero no se han presentado ventajas sobre el esquema CVP.(7)

Algunos autores han propuesto el empleo de una forma sistémica de radiación (irradiación corporal total ICT), pero su aplicación no es general. En algún momento de la evolución, casi siempre al cabo de unos años de seguimiento y tratamiento paliativo, la mayoría de los pacientes con subtipos histológicos favorables desarrollan un curso clínico más agresivo. Se hacen resistentes a los fármacos, áreas que hasta entonces respondían al tratamiento, comienzan a crecer con rapidez en localizaciones tumorales preexistentes o aparecen nuevas zonas de infiltración a pesar de la quimioterapia. Todos estos fenómenos obligan a realizar una nueva biopsia para comprobar si se ha producido la transformación histológica a un subtipo más agresivo de Linfoma.(5,6)

La progresión histológica lleva habitualmente a una evolución fatal, sin embargo en algunos pacientes resulta útil pasar a uno de los protocolos terapéuticos más agresivos que se emplean en subtipos histopatológicos desfavorables (5,7).

Los Linfomas de tipos histológicos favorables comienzan como formas localizadas (estadios I o II) sólo en 10% de los casos, por lo tanto el enfoque de estas formas está peor definido que el de la enfermedad generalizada. Se ha recomendado observación sin tratamiento, radioterapia de los campos afectados, radioterapia ganglionar total y quimioterapia, pero ninguno de ellos constituye de forma clara el tratamiento de elección en estos casos. Es probable que la radioterapia de los campos afectados sea el menos perjudicial de estos enfoques terapéuticos. (5,12,14)

El tratamiento de los pacientes con estadios avanzados de los Linfomas de subtipos histológicos desfavorables (estadios III o IV: algunos expertos incluyen la enfermedad en estadio II en categoría de avanzada) (6) requieren quimioterapia con capacidad curativa demostrada.

Estos regímenes terapéuticos suelen incluir desoxirribicina y ciclofosfamida, el más empleado es la combinación CHOP [ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, oncovin (vincristina), prednisona] con la que se obtiene una tasa de respuesta completa de 50%. Casi todas las recaídas se producen en el primer año, rara vez aparecen al cabo de 2 años. En los pacientes que logran una respuesta completa, habitualmente se interrumpe el tratamiento a los 6 meses. Tras el tratamiento con CHOP alrededor de 30 a 50% de los enfermos sufren una recaída y finalmente mueren (12).

En los últimos años se han realizado varios intentos de mejorar esta tasa de respuesta y la duración de las mismas. Los resultados de los estudios iniciales con protocolos tales como M-BACOD (metotrexato, bleomicina, adriamicina, ciclofosfamida, oncavín y dexametasona) y el pro-MACE-MOPP [prednisona, metotrexato, adriamicina, ciclofosfamida, hepipodofilotoxina VP-16, mostaza nitrogenada, oncovin, procarbina y prednisona en tratamientos alternos] son esperanzadores; aproximadamente 80% de los pacientes logran respuestas completas y 70 a 80% de ellas son duraderas.(12,13)

Los protocolos más agresivos se asocian a una mayor morbilidad y a una mortalidad ligada al tratamiento de hasta 10%. En alrededor de 30 a 40% de los pacientes se encuentran Linfomas de subtipos histológicos desfavorables en formas aparentemente localizadas (estadios I o II). El tratamiento tradicional de estos casos ha sido la radioterapia sola, con tasas de curación situadas en torno a 40-50%. El empleo en los últimos años de quimioterapia con capacidad curativa demostrada en la enfermedad avanzada, para tratar estas formas localizadas, como el protocolo CHOP, ha elevado la proporción de enfermos que aparentemente han curado de su enfermedad hasta 80%. Cuando la enfermedad se halla localizada (estadio I) la terapéutica puede consistir en quimioterapia inicial, o la radioterapia de los campos afectados; con ambos se obtienen resultados aproximadamente en 90 a 95% de los casos.(13)

Existen muchas excepciones a las reglas generales de tratamiento expuestas anteriormente. Por ejemplo, los pacientes con Linfomas Inmunoblásticos de células T rara vez curan con protocolos convencionales como CHOP. En ellos es muy frecuente la participación de la médula

ósea. Los protocolos convencionales fracasan a menudo por recaída del sistema nervioso central. En estos casos tienen más éxito los esquemas que incluyen tratamiento intensivo de inducción y profilaxis del sistema nervioso central, tal y como se hace en la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Con los programas de quimioterapia intensiva empleados para tratar los Linfomas de la infancia se ha obtenido una notoria mejoría en el pronóstico de estos pacientes adultos. (6)

4.5. ETIOLOGIA.

Aunque se desconoce la causa de la mayoría de los Linfomas malignos no-Hodgkin, las variaciones en los patrones epidémicos mundiales ofrecen indicios sugestivos que hacen que cada vez sea más evidente, que no sólo es un factor el responsable de la enfermedad (6). Actualmente, se les considera como un grupo heterógeno de desórdenes, producto de diferentes factores, como son: los ambientales y genéticos, dentro de los primeros, tenemos los factores químicos, físicos y biológicos, los cuales regularmente por sí solos no producen la enfermedad, sino que incrementan la susceptibilidad del individuo para desarrollarla. (18,19)

4.5.1. FACTORES AMBIENTALES.

Se ha observado que los Linfomas humanos tienen una estrecha relación entre su incidencia y factores como la situación socioeconómica, la zona geográfica y el medio de vida de los pacientes (5), lo cual nos sugiere que existen agentes biológicos, físicos y químicos que participan en la etiología de los mismos.

4.5.1.1. FACTORES BIOLÓGICOS.

Los factores biológicos entran dentro del grupo de factores ambientales responsables de algunos tipos de cáncer y comprenden los agentes infecciosos como virus, bacterias, hongos y parásitos considerados con potencial carcinogénico. De éstos los que muestran una evidencia mayor de ser factores de riesgo en neoplasias de vertebrados son los virus (20).

En el ser humano, se ha establecido una firme asociación entre el virus de Epstein-Barr (EBV) y el Linfoma de Burkitt africano. Sin embargo, dicha asociación no es válida, para el Linfoma de Burkitt diagnosticado en los Estados Unidos (21).

La etiología viral de un tipo de Linfoma humano fue demostrada por Gallo y col. en 1978 (20). Estos investigadores identificaron un retrovirus específico en ciertos pacientes con Linfoma de células T maduras (21-23).

Esta enfermedad presenta una identidad clinicopatológica distintiva y se han descrito agregaciones en el sudeste de Japón (20), en el Caribe (22) y en el sudeste de los Estados Unidos (23).

En todas estas áreas endémicas el mismo virus, denominado virus de la Leucemia Humana de Células T tipo I (HTLV-I), ha sido asociado con el síndrome clínico de Linfoma-Leucemia de células T en el adulto. Se desconoce el mecanismo exacto por medio del cual el virus induce una transformación maligna de estas células (22).

Se ha observado que otros virus son capaces de transformar células animales después de la inserción de un gen transformante (oncogén) en el genoma del huésped. Esta inserción resulta en el crecimiento desordenado de la célula y la eventual formación de un tumor. Sin embargo, el genoma de HTLV-I no parece contener un oncogén. El HTLV-I es un virus exógeno cuyo mecanismo específico de transformación celular no se conoce con exactitud (20,22,23).

Inicialmente HTLV-I fue aislado de nódulos linfáticos de un paciente con una variante de Linfoma cutáneo de células T (Síndrome de Sézary) y posteriormente fue estudiado y/o identificado en pacientes japoneses con Linfoma-Leucemia de células T de adulto (20,24).

A pesar de las evidencias de esta asociación, esto se considera como uno más de los mecanismos moleculares causantes de los Linfomas (25).

4.5.1.2. FACTORES FISICOS.

Los factores físicos como las radiaciones ionizantes, son otro factor de riesgo para el desarrollo de Linfomas (5). La radiación, cualquiera que sea su fuente (luz solar, rayos X, etc.)

es un carcinógeno establecido. Se ha comprobado que aún la radiación terapéutica es carcinógena. (26)

También se observó que la radiación por la bomba atómica produjo aberraciones cromosómicas en una célula del sistema hematopoyético común para líneas linfoides y mieloides (27). Algo similar sucede en los pacientes con espondilitis anquilosante, quienes al ser tratados con radiación terapéutica, presentan años más tarde un incremento de 10 a 12 veces la incidencia normal de Leucemia (5,6).

Entre los daños cromosómicos que pueden producir las radiaciones ionizantes están principalmente los rearrreglos estructurales (deleciones, translocaciones, anillos, fragmentos dicéntricos, acéntricos, figuras tri y tetrarradiadas etc.) y marcadores cromosómicos adicionales (27-29).

También se ha propuesto que la radiación causa activación de virus endógenos. Sin embargo, este mecanismo no ha sido demostrado en humanos (30,31).

4.5.1.3. FACTORES QUIMICOS.

Algunos datos indican que los carcinógenos químicos desempeñarían una función etiológica en ciertos casos de Linfomas. El aumento en la incidencia de Linfomas entre los agricultores de Nebraska y Kansas (EE.UU.) se ha relacionado con el uso de fenoxiherbicidas y clorofenoles (5). Entre los trabajadores de materiales de la industria de cercar y de la carne de Nueva Zelanda se sugiere que los clorofenoles desempeñan un papel etiológico en muchos casos de Linfoma (5,32).

4.5.2. FACTORES GENETICOS.

Existen varias hipótesis que tratan el fenómeno del cáncer sobre bases genéticas. Una de ellas supone que el cáncer se puede deber a la acumulación de mutaciones somáticas en sitios susceptibles, causando una pérdida del control del crecimiento celular (19,33). La hipótesis de Knudson (1976) o de iniciación-promoción propone que en el caso de tumores hereditarios debe

ocurrir una primera mutación en células germinales (primer evento de la carcinogénesis), seguida de una mutación en células somáticas (segundo evento) (34,35). Por otra parte Matsunaga (1978) propone otra hipótesis, la cual sostiene que, en el caso de tumores embrionarios (como es el caso del retinoblastoma) estos dependen fundamentalmente de los factores de resistencia del huésped (36).

Es importante mencionar que las hipótesis acerca de las neoplasias embrionarias deben ser consideradas en la actualidad, en base a los recientes hallazgos acerca de los antioncogenes o genes supresores del tumor y a su funcionamiento (34-37).

Otra hipótesis sostiene que la mayoría de los cánceres se podrían originar por la inserción de material genético nuevo, como consecuencia de la infección de células normales por virus tumorales (38,39).

Si bien, ninguna de estas hipótesis explica completamente el origen del cáncer, no se excluyen mutuamente y es posible que estos procesos tengan un importante papel en la etiología del cáncer como en el caso de los Linfomas. (19,33)

4.5.2.1. FACTORES HEREDITARIOS.

Se sugiere influencia hereditaria en la aparición de los Linfomas por su elevada frecuencia en pacientes con deficiencias inmunes hereditarias y, por un pequeño aumento de su frecuencia en las familias de pacientes con trastornos inmunológicos. (5,33)

En un estudio se observó un aumento importante en la frecuencia de la enfermedad de Hodgkin en hermanos de un caso índice, en particular en los del mismo sexo (5). En numerosos grupos de pacientes con enfermedad colágena vascular se ha observado un leve aumento en la frecuencia de Linfomas, al compararlos con grupos de edades similares de la población general (5).

En pacientes inmunodeficientes como: con síndrome de Sjögren se tiene un aumento del 10%, en el desarrollo de Linfomas Difusos o sarcomas inmunoblásticos de duración prolongada. (5)

Los trastornos hereditarios ligados a cáncer incluyen la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Wiskott-Aldrich; la agammaglobulinemia congénita ligada al cromosoma X, el síndrome linfoproliferativo ligado al cromosoma X (inmunodeficiencia hereditaria de VEB) y el síndrome de Chediak-Higashi, entre otros (5,6). Los trastornos adquiridos asociados con una incidencia aumentada de neoplasia linfoideas malignas incluyen el síndrome de Sjögren, otros trastornos autoinmunes (sistemas inmunes hiperactivos), el tratamiento inmunosupresor (trasplantes cardíacos y renales) y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) o SIDA. (5)

Algunas de estas inmunodeficiencias también se asocian con un aumento de riesgo para el desarrollo de cánceres no linfoides, como el sarcoma de Kaposi en los pacientes con SIDA o en receptores de trasplantes. El incremento en la incidencia de procesos malignos linfoides se considera el resultado de trastornos de la inmunorregulación más que de la pérdida de los mecanismos de vigilancia inmunológica. Sólo se han analizado con cuidado pocos casos de Linfomas desarrollados en el contexto de una inmunodeficiencia, pero existen numerosas evidencias de que la mayoría de estos Linfomas se originan en células B y son provocados, por lo menos parcialmente por el VEB. (5,39)

4.5.2.2. ONCOGENES

A principios de este siglo se hallaron pruebas de que algunos tipos de virus provocaban tumores en animales, lo cual se confirmó con el descubrimiento del virus del Sarcoma de Roux en 1911, que pertenece a un grupo de virus tumorales de RNA, llamados retrovirus. Estos son portadores de oncogenes virales (v-onc), capaces de causar tumores malignos en animales de laboratorio y transformación celular *in vitro*. Los genes transformantes virales (v-onc) son homólogos a los genes celulares normales aparentemente en todas las especies que se han investigado. Cada oncogen se denomina con tres letras que definen el nombre del virus del cual fue aislado. (40,41)

La contraparte celular normal o la forma no activada de un oncogén es lo que se conoce

como proto-oncogén. Los proto-oncogenes están altamente conservados evolutivamente, lo que sugiere que su función es de importancia vital en la fisiología celular normal. (42)

El descubrimiento de que el genoma humano contiene secuencias de DNA homólogas a las de los genes transformadores del retrovirus determinó la posibilidad de que pudieran participar en la génesis de los tumores humanos. Sin embargo, también se sabe que tales oncogenes se encuentran implicados en la proliferación de los linfocitos normales. La expresión desordenada o desregulada de los oncogenes mediante translocaciones, amplificaciones o mutaciones puntuales contribuye a la transformación maligna (41,43).

Los pacientes con Linfoma de Burkitt presentan translocaciones cromosómicas no aleatorias características. En la mayoría de los casos, el segmento distal del brazo largo del cromosoma 8 humano se transloca a los cromosomas 14, 22 ó 2, los cuales portan los loci para las cadenas de Ig pesadas y ligeras, lambda y kappa respectivamente. Estas translocaciones son de gran interés, a causa del aparente papel integral desempeñado por el oncogén celular c-myc en el desarrollo de estas neoplasias. El oncogén c-myc, localizado en la banda q24 del cromosoma 8 es translocado a los loci de cadenas pesadas de Ig situado en el cromosoma 14 en la banda q32 en la t(8;14) (Figura No. 1). En las translocaciones variantes t(8;22) (Figura No. 2) y t(2;8) (Figura No. 3) el oncogén c-myc permanece sobre el cromosoma 8, mientras que las secuencias genéticas para las cadenas lambda y kappa son translocadas al cromosoma 8 (40,44). Todas estas translocaciones resultan en la desregulación de la expresión de c-myc y causan una producción aumentada de ARNm. No se sabe con certeza qué efectos causa la activación transcripcional del oncogén c-myc sobre la célula. El producto genético de c-myc es una nucleoproteína importante para la proliferación celular y podría ser uno de los factores que conducen a la proliferación neoplásica (5,41,43).

4.5.2.3. SITIOS FRAGILES.

Está bien establecido que los tumores humanos, particularmente Linfomas y Leucemias, se caracterizan por presentar anomalías cromosómicas específicas, que implican puntos de

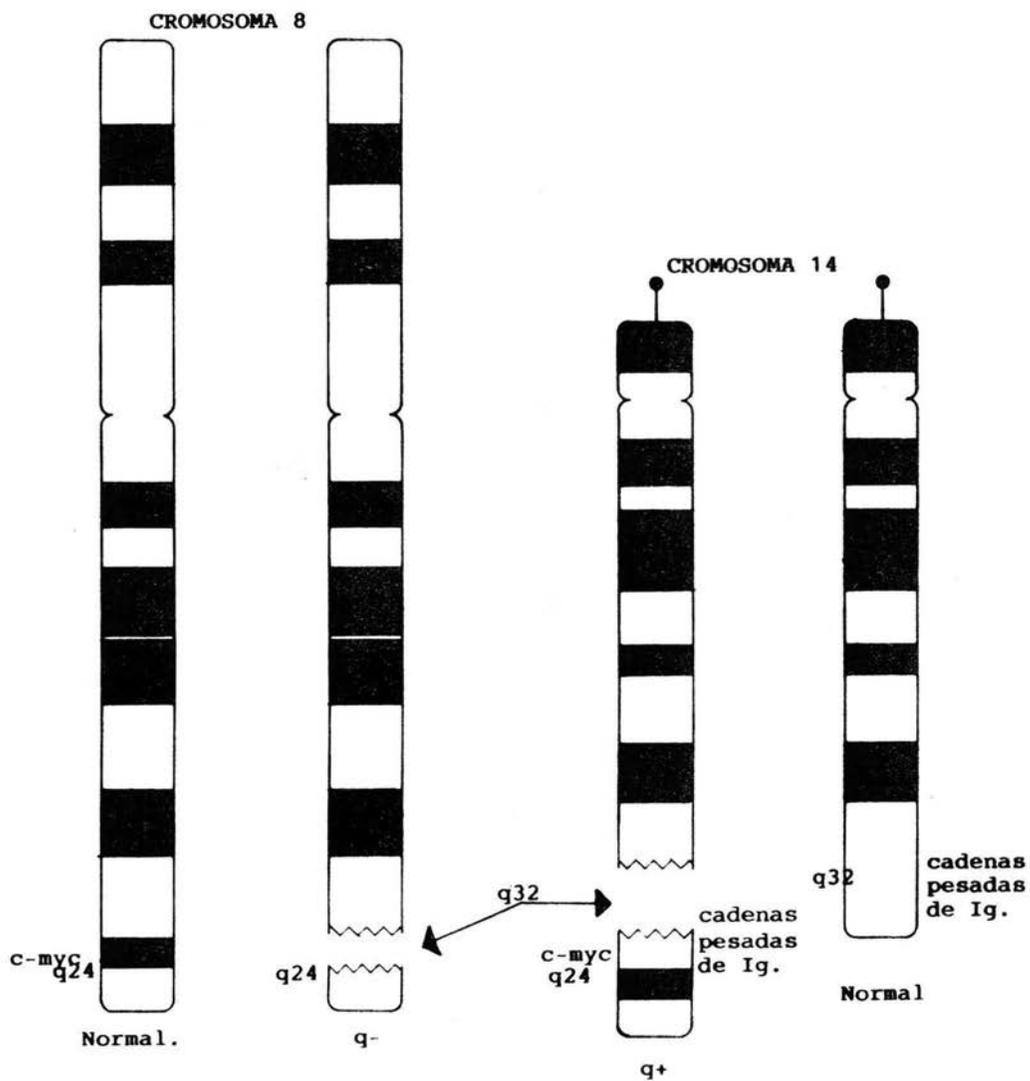


FIGURA 1: $t(8;14)(q24;q32)$

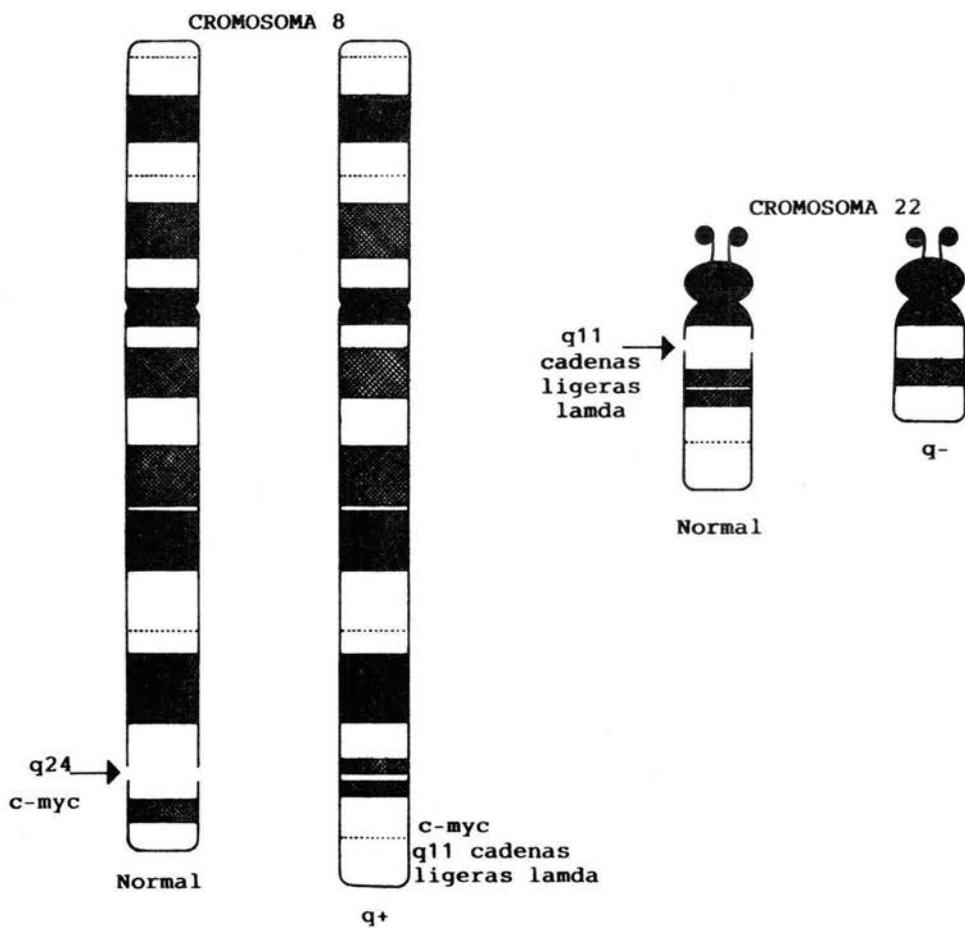


FIGURA 2: $t(8;22)(q24;q11)$

CROMOSOMA 2

CROMOSOMA 8

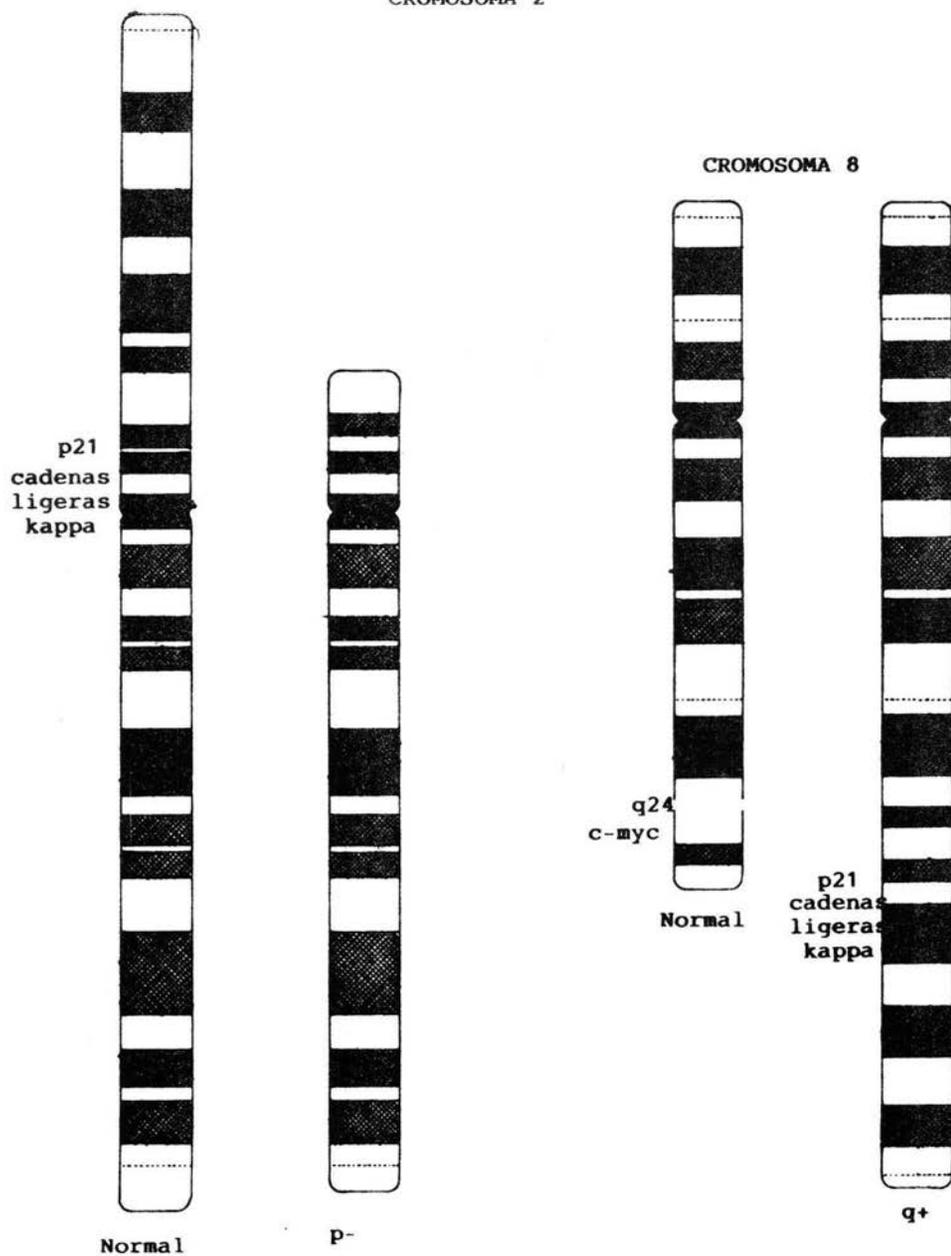


FIGURA 3: $t(2;8)(p21;q24)$

ruptura donde se localizan proto-oncogenes y genes muy activos para la diferenciación celular. Se ubican en o cerca de sitios hipersensibles o sitios frágiles, donde agentes carcinógenos pueden actuar y ocasionar rupturas y rearrreglos cromosómicos. Dichos rearrreglos cromosómicos pueden proveer a la célula una ventaja proliferativa, además pueden repetirse y caracterizar una enfermedad determinada. (45,46)

Varios autores han sugerido que puede existir una correspondencia entre los sitios frágiles y los puntos de ruptura cromosómicos no aleatorios vistos en las células cancerosas. La evidencia proviene de una correlación significativa entre la localización de los puntos de ruptura y las bandas cromosómicas en las cuales están presentes los sitios frágiles (45,46).

La clasificación principal de los sitios frágiles los divide en dos grupos principales: los sitios frágiles hereditarios o raros y los sitios frágiles comunes o constitutivos; además algunos autores manejan otro grupo que incluye los sitios frágiles controversiales o inclasificables (46,47).

Se han identificado 24 sitios frágiles heredables (h-fra) en el genoma humano: 23 localizados en los autosomas y uno en el cromosoma X (48,49). Actualmente se han encontrado 110 sitios frágiles comunes o constitutivos (c-fra) localizados en puntos precisos del genoma humano y de primates (45,46,49-51).

El mecanismo preciso de formación de los sitios frágiles es desconocido. Sin embargo, se ha sugerido que su origen esté a nivel de síntesis de ADN. Otra hipótesis propone que los sitios frágiles se forman por modificación viral del ADN afectando la condensación cromosómica. (46)

Algunos autores sugieren que los sitios frágiles incrementan la susceptibilidad a las rupturas y pueden causar predisposición para los rearrreglos cromosómicos en neoplasias. Se ha encontrado correlación entre los puntos de ruptura en varios rearrreglos cromosómicos en cáncer y la localización de sitios frágiles comunes o heredables (45,49,51). En el caso de una translocación o inversión, un sitio frágil puede ser parte o estar próximo a un proto-oncogen y el segundo sitio frágil puede ser parte o estar próximo a una secuencia reguladora de genes celulares que transforman al proto-oncogen en oncogen activo. En el caso de las deleciones, dos genes no oncogénicos pueden servir de base para la ruptura y reunión de segmentos cromosómicos con

pérdida de una secuencia de ADN, que incluya una secuencia crítica (45).

A pesar de las evidencias que existen respecto a la asociación entre rearrreglos cromosómicos específicos, oncogenes y sitios frágiles se requieren más estudios para determinar si los sitios frágiles son un factor predisponente en algunos cánceres (45). Los reportes de individuos con sitios frágiles y enfermedad maligna, en quienes los puntos de ruptura en sus células cancerosas, corresponden a los de sitios frágiles, sólo han sido anecdóticos. Si bien es de gran interés la aparente correspondencia de los sitios frágiles con los puntos de ruptura en cánceres no ha sido establecido si coinciden verdaderamente (52).

V. REARREGLOS CROMOSOMICOS EN LINFOMAS NO-HODGKIN

La investigación en el área de la genética, orientada al estudio de las neoplasias, ha sido fructífera no sólo porque ha permitido importantes avances en la comprensión del fenómeno de la transformación maligna, sino también porque ha descubierto alteraciones cromosómicas útiles en el diagnóstico y el pronóstico de las entidades neoplásicas. Además, con el conocimiento reciente acerca de los oncogenes y su funcionamiento, se han abierto perspectivas para la prevención y tratamiento del cáncer (53).

5.1. ANTECEDENTES HISTORICOS.

En los últimos años han aumentado los estudios sobre la función de los cambios cromosómicos en la transformación neoplásica. Estos estudios se inician en 1890, cuando se asociaron por primera vez anomalías nucleares y mitóticas con el crecimiento neoplásico (53). Basándose en esto al inicio de siglo, Boveri postuló su teoría sobre el origen cromosómico del cáncer (54).

Las ideas de Boveri quedaron olvidadas por mucho tiempo, ya que las técnicas citogenéticas empleadas en esos años no eran adecuadas. No fué sino hasta los años 50's cuando se realizaron descubrimientos vitales en metodología citogenética, tales como el efecto de la colchicina sobre la formación del huso acromático durante la mitosis. Además el tratamiento de las células mitóticas con solución hipotónica permitió la distensión celular y la separación individual de los cromosomas (1,55).

A partir de entonces, se desencadenó un período de expansión de la citogenética de mamíferos, destacando la descripción del número correcto de cromosomas en el hombre por Tjio y Levan en 1956 (56). Después Moorhead y cols. (1960) desarrollaron un método de cultivo de linfocitos de sangre periférica, rápido y eficiente (57).

Burnet (1974) consideraba claramente el origen monoclonal de las neoplasias. La hipótesis de la mutación somática del cáncer permitió explicar la asociación de estas entidades con la acción de agentes químicos o biológicos, como los virus oncogénicos y con el hecho de que en la mayoría de las neoplasias aumenta su frecuencia con la edad (58).

En el inicio de la década de los cincuenta se hizo ostensible que las células malignas presentan importantes cambios cromosómicos y en 1960 Nowell y Hungerford demuestran la primera alteración cromosómica asociada con una neoplasia específica: el cromosoma Philadelphia en la Leucemia Mieloide Crónica (56). Este hallazgo reforzó la hipótesis de Boveri, y estableció que una anomalía cromosómica adquirida es la causa directa de la neoplasia (1). Al relacionar aberraciones cromosómicas constantes con diversos tipos de tumores, se demostró que las alteraciones cromosómicas tienen gran relación con el desarrollo y progresión neoplásica (24,59).

El uso de técnicas de alta resolución permitió una definición más precisa de los rearrreglos cromosómicos (24,45,60) y con el advenimiento de las técnicas de Biología Molecular, así como la combinación con los progresos en otras áreas de la biología celular y tumoral, ha sido posible la localización de los oncogenes en los cromosomas humanos, así como la identificación de otros mecanismos implicados en la iniciación y progresión neoplásica (60).

5.2. NOMENCLATURA CITOGENETICA.

Regularmente se usa la nomenclatura propuesta por la Conferencia de París para la descripción de la morfología de los cromosomas humanos en los cariotipos. Señala, en primer lugar, el número total de cromosomas, seguido por los cromosomas sexuales y después los rearrreglos de los autosomas. Las letras "p" y "q" se refieren a los brazos cortos y largos del cromosoma respectivamente. Cuando se coloca un signo (+) o un signo (-) antes de un número indica ganancia o pérdida de un cromosoma y, cuando este se coloca después del cromosoma, en tanto que brazo indica ganancia o pérdida de un segmento del mismo. Las translocaciones

son identificadas por la letra "t" seguida de los cromosomas implicados en el primer paréntesis, así como las bandas del cromosoma en las que ocurrieron las rupturas son indicadas en el segundo paréntesis. Es así que se indica brazo "p" o "q", número de región, banda y subbanda. La incertidumbre respecto al cromosoma o banda implicados es denotado por un signo de interrogación (?). Otras anomalías estructurales se designan como: "i" isocromosoma, "r" cromosoma en anillo, "mar" marcador, "del" deleción, "ins" inserción, "inv" inversión, "dup" duplicación y "der" derivado (29,61,62).

5.2.1.CRITERIOS PARA DETERMINAR TIPOS DE REARREGLO CITOGENETICO.

Al observar al menos dos células "pseudodiploides" o "hiperdiploides", o tres células "hipodiploides" con la misma alteración, se manifiesta una clona anormal. A pacientes con células que no muestran alteraciones, o bien cuando las alteraciones no son constantes, se les considera normales, ya que, los cambios aislados pueden deberse a procesos técnicos o a errores mitóticos al azar (63).

Dentro de los innumerables estudios que se han publicado, sobre los cambios cromosómicos en las células cancerosas (1), el problema mayor es distinguir los eventos primarios de los secundarios, ya que a través de los cambios cromosómicos se puede diferenciar el crecimiento de las clonas tumorales (64).

Algunos investigadores, sugieren que las aberraciones cromosómicas en desórdenes neoplásicos son de tres tipos (65):

1.- Anormalidades primarias. Se encuentran frecuentemente como anomalía única en cáncer y se asocian específicamente con un tipo de tumor en particular, estas son el paso esencial en el establecimiento de la neoplasia.

2.- Anormalidades secundarias. Nunca se encuentran como cambios únicos, a menudo son adicionales a las anomalías primarias y son importantes en la progresión tumoral.

3.- Ruido citogenético. Constituyen cambios cromosómicos que son el último nivel de aberraciones no consecutivas y que no ejercen un papel trascendental en la progresión tumoral (1,64,65).

5.3. CITOGENETICA.

La citogenética ha avanzado considerablemente en los últimos años, gracias al desarrollo de diferentes métodos de bandedo que permiten la identificación individual de los cromosomas, la detección de anomalías numéricas, estructurales y la tinción de regiones específicas.(16)

El estudio citogenético de los Linfomas no-Hodgkin se realiza en un aspirado de médula ósea, el cual se procesa directamente o se cultiva por 24-72 horas (54,66). Es recomendable procesar una biopsia de ganglio linfático, cultivando por 24-96 horas, o bien, en caso de no ser posible la obtención de médula ósea o biopsia de ganglio linfático, se realiza un cultivo similar de sangre periférica (60). La actividad mitótica natural de la médula ósea es usada para el análisis cromosómico directo, y el estudio de estas células, representa poblaciones que se están dividiendo *in vivo* en el momento que se hizo el aspirado; mientras que en un cultivo (en este caso de sangre periférica, biopsia de ganglio linfático o médula ósea) la división celular se efectúa *in vitro* (67).

Las aberraciones cromosómicas han sido usadas como marcadores celulares en el estudio de la interrelación entre distintas poblaciones celulares. Se han encontrado varias ventajas del cultivo de células sobre el método directo, independientemente de que sean estimuladas (con fitohemaglutinina) o no (68,69). En los cultivos hay un incremento en el número de metafases producidas a favor de las células cromosómicamente anormales con respecto a las normales, quizás debido a que las primeras ejercen una inhibición de las células normales, o que estas células con alteraciones cromosómicas estén en ventaja proliferativa (67-70).

Realizando preparaciones cultivadas también se mejora la morfología de los cromosomas, lo que se refleja en el número de bandas obtenidas en los cultivos. Además un resultado positivo

se obtiene más probablemente de preparaciones cultivadas que de las directas. La ventaja más significativa del cultivo es que se detectan líneas celulares cromosómicamente anormales, las cuales, algunas veces, no son detectadas en preparaciones directas (68-70). Las preparaciones cromosómicas obtenidas, ya sea por cultivo o por método directo, se someten a técnicas de tinción que producen una serie de bandas características a lo largo de los cromosomas para su identificación. La técnica de bandeado más utilizada en el estudio de los Linfomas no-Hodgkin es la de bandas GTG (71). El método general para producir bandas GTG es el tratamiento con una solución de tripsina, y posteriormente tinción con Giemsa; de esta forma se pone de manifiesto la estructura cromomérica básica de los cromosomas en metafase. Las preparaciones son analizadas con un microscopio de luz convencional a 1000X (72).

5.4. HALLAZGOS CITOGENETICOS.

Como se mencionó anteriormente la evolución clínica de las neoplasias humanas, está asociada con una gran variedad de alteraciones cromosómicas recurrentes que proveen datos esenciales para el entendimiento del cáncer. Constantemente se encuentran translocaciones cromosómicas específicas en distintos tipos de tumores malignos. Se ha probado que los rearrreglos en estos puntos de ruptura provocan desregulaciones de oncogenes, lo que parece representar un evento patogénico primario en la generación de tumores (73).

La interpretación entre los numerosos sistemas de clasificación de los LNH fue un problema significativo, que impidió durante mucho tiempo la comparación y correlación entre las características citogenéticas e histopatológicas identificadas por diferentes centros de investigación (1), lo cual recientemente llevó a plantear la Nueva Formulación de Trabajo multinacional (New Working Formulation) para la nomenclatura de los LNH (Proyecto de clasificación de Linfomas Patológicos no-Hodgkin 1988). Para lo cual se realizó el análisis citogenético de casi 1000 casos de LNH. (4)

Estas investigaciones demostraron que la mayoría de LNH (probablemente 80 a 90% o más)

tienen anomalías cromosómicas clonales (74-77). En los 260 casos de LNH recopilados en el décimo quinto taller internacional de cromosomas en Leucemias-Linfomas, celebrado en 1984 en Japón, 85% de los casos estudiados tuvieron cariotipos anormales (1).

Levine y cols. (1985), en un estudio realizado en 120 pacientes con LNH encontraron anomalías cromosómicas clonales en 115 casos (76).

Estudios recientes han correlacionado translocaciones y otras anomalías cromosómicas, estructurales y numéricas con características clínicas, incluyendo respuestas a la terapia y diagnóstico del paciente, además de datos citogenéticos pre-tratamiento y pos-tratamiento (13).

5.4.1. REARREGLOS CROMOSOMICOS EN LNH DE BAJO GRADO.

En los pacientes estudiados con LNH, clasificado histológicamente como de bajo grado, las aberraciones más comunes, en orden decreciente de frecuencia fueron: translocaciones con puntos de ruptura en 14q32, 18q21, 1q21-23, 1p32-36, 6q21-25, trisomía 3, trisomía 18, trisomía 12, trisomía 7, trisomía 21, trisomía 11 y trisomía 5. Otras aberraciones fueron encontradas en menos de 5 % de los casos. De las translocaciones recíprocas la $t(14;18)(q32;q21)$ (Figura No. 4) se observó en aproximadamente 54 % de los pacientes con Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas (74-76).

5.4.1.1. REARREGLOS ESTRUCTURALES

La ocurrencia no azarosa de $t(14;18)(q32;q21)$ (Figura No. 4), fue el primer reporte hecho por Fukuhara y cols. en 1979 (1), quién estableció la translocación en 6 de 10 pacientes. La asociación entre la $t(14;18)$ y Linfomas Foliculares fue confirmada después y realmente la $t(14;18)$ ahora parece ser la anomalía cariotípica más común asociada a LNH (1,76). Yunis y cols (1984) (75) encontraron que los puntos de ruptura se encuentran en la subbanda 14q32.3 y en 18q21 a 18q21.1. Este rearreglo es la causa más frecuente de un marcador 14q+ en LNH-

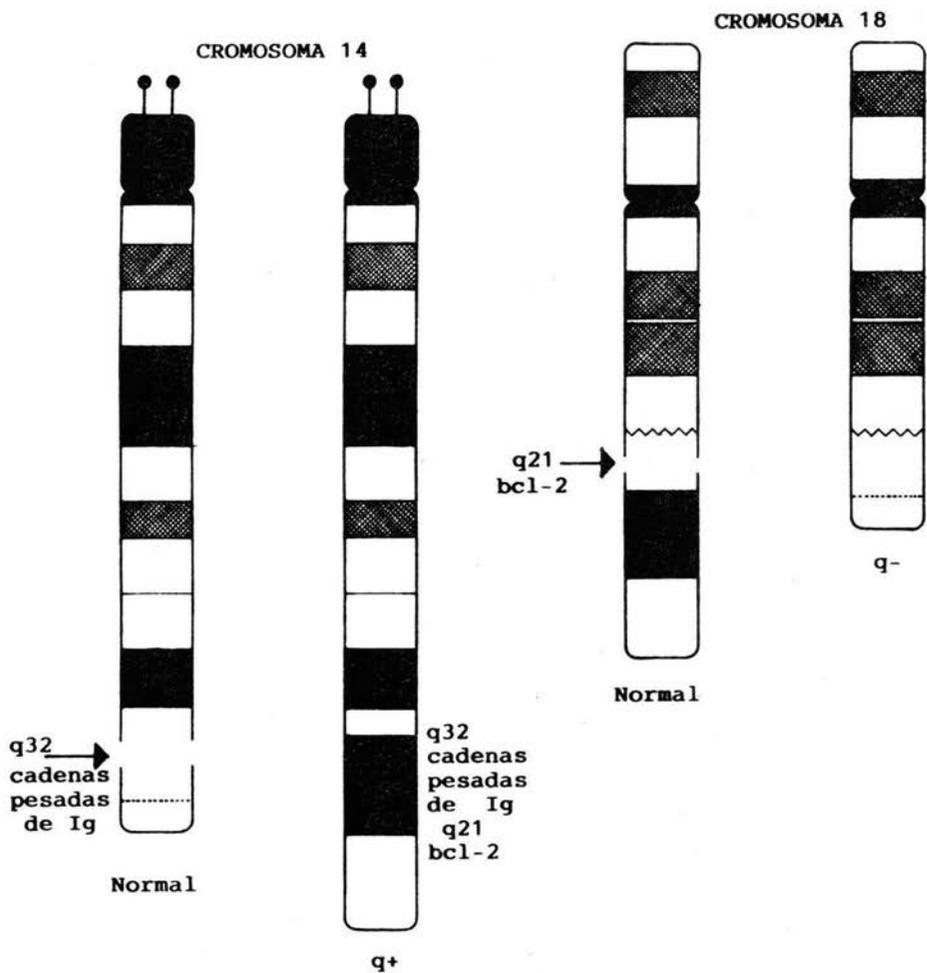


FIGURA 4: $t(14;18)(q32;q21)$

NB (75).

En un estudio realizado por Yunis y cols. (1987) (17) en 71 pacientes con LF en 85% de los casos se encontró una t(14;18) como única anomalía, específicamente en Linfoma Folicular de células pequeñas hendidas, lo que permitió establecer un mejor diagnóstico, al establecer la correlación entre el rearrreglo citogenético y este tipo de LNH. Estos pacientes no requirieron tratamiento, ya que este tipo de tumor tiene un curso inicial asintomático (17).

Tsujimoto y cols. (78,79) han examinado los detalles moleculares de la t(14;18), para ello clonaron la región del punto de ruptura 14q+ de una línea celular de Leucemia Linfoblástica Aguda conteniendo la t(14;18) y prepararon una biblioteca genómica. Una de las sondas del cromosoma 18 obtenida así, fue capaz de detectar rearrreglos en 18q21, al igual que en Linfomas Foliculares con t(14;18) (78,79). Esto llevó a los autores a sugerir que la prueba probablemente identificó un oncogen localizado en 18q21, pero translocado a 14q32 como resultado del rearrreglo citogenético, al oncogen se le dió el nombre de bcl-2 (Break cluster lymphoma). Este oncogen, codifica para una proteína de 25 KD, la cual promueve la supervivencia de las diferentes células hematopoyéticas. El mecanismo por el cual bcl-2 incrementa la supervivencia celular, es a través de su habilidad para interferir en la muerte celular programada ("apoptosis") (73,79).

Los puntos de ruptura en 14q32 se encontraron dentro del locus de cadenas pesadas de Ig, cerca del extremo 5' del segmento J, en donde los segmentos de diversidad (D) normalmente se combinan con segmentos J para producir un gen activo de cadenas pesadas. Así la t(14;18) es producto de un rearrreglo errático en la unión VDJ, y es mediado por maquinaria enzimática responsable del proceso de recombinación. La presencia de error desregula a bcl-2 llevándolo a estar bajo la influencia del "amplificador" del locus de Ig. Esta desregulación representa un paso crucial en la patogénesis del tumor folicular de las células B (79-85). Aún así, el mecanismo no es del todo claro, ya que por ejemplo en las investigaciones de Cleary y cols. (1986) se reporta la existencia de dos diferentes regiones de agrupación de punto de ruptura en 18q21, por lo cual

estos autores creen que pueden estar implicados dos diferentes mecanismos patogénicos en la t(14;18) de Linfomas Foliculares (80,86). A pesar de todas las dudas el esquema patogénico propuesto por Tsujimoto y cols. (78) es muy atractivo ya que explica el mal funcionamiento del mecanismo enzimático normal en células B, esta mutación podría servir tentativamente para explicar los rearrreglos neoplásicos dentro de la célula (77,86).

Las anomalías estructurales incluyendo 1q, y aún más frecuentemente a 1p han sido reportadas en 25% de los casos de LNH de Bajo Grado (1). Los rearrreglos son principalmente translocaciones, el punto de ruptura más frecuente es 1p36 (76).

Los rearrreglos en el cromosoma 6 en Linfomas de Bajo Grado son consistentes, pero como también frecuentemente se hallan en los otros tipos de LNH, algunos autores han sugerido que estos rearrreglos son de tipo secundario, ya que no existe evidente ocurrencia en algún subgrupo de LNH histopatológico en particular. (1)

5.4.1.2. REARRREGLOS NUMERICOS.

En la revisión del Primer Taller de Trabajo (First Workshop) se encontró trisomía 3 predominantemente en pacientes con Linfoma Folicular Mixto (1).

La Trisomía 18 ocurre en 10 a 15% de todos los LNH, y de este porcentaje una gran parte ocurre en los Linfomas de Bajo Grado (1). Es probable que esta trisomía en la mayoría de los casos ocurra como un cambio secundario natural, al igual que en otros cambios numéricos que ocurren en muchos otros cánceres humanos. Hasta el momento no hay suficientes datos que aclaren la contribución de este cromosoma extra al proceso neoplásico.(1)

5.4.1.3. OTROS REARRREGLOS CROMOSOMICOS EN LINFOMAS DE BAJO GRADO.

Dentro de este grupo de rearrreglos cromosómicos tenemos la trisomía de los cromosomas

12, 7, 21, 11 y 5, que se presentan en los Linfomas de Bajo Grado en menor frecuencia, o bien asociados a rearrreglos primarios. Estos rearrreglos regularmente son asociados a un mal pronóstico y una menor sobrevida (1). Se ha reportado que en los pacientes con t(14;18) y del(13q32), los cuales adquirieron, características hematológicas de Leucemia, la enfermedad se aceleró (17). Mediante el análisis de este tipo de estudios podemos determinar que sí existen anomalías secundarias para algunos subgrupos histológicos de LNH, las cuales están implicadas en una evolución más agresiva de la enfermedad (1).

La t(11;14)(q13;q32) es un rearrreglo no común en Linfoma Linfocítico difuso de células pequeñas que es la contraparte de la LLC-B, la cual está altamente determinada por un marcador 14q+ (1).

5.4.2. LINFOMAS DE GRADO INTERMEDIO.

En pacientes con LNH de Grado Intermedio, se ha encontrado frecuentemente un cromosoma anormal 3, 5 ó 17, así como trisomía 3, 5, 6, 7, 12, ó 18 (81). El análisis de estas anomalías cromosómicas resulta ser el factor pronóstico independiente que correlaciona más estrechamente con la sobrevida del paciente (1,87,88).

5.4.2.1. REARRREGLOS ESTRUCTURALES.

En las anomalías del cromosoma 17 que se han relacionado específicamente con histología difusa, se ha observado regularmente que los pacientes tienen una sobrevida muy corta (88). En un estudio inmunohistoquímico realizado por Said, Barrera y cols. (1992), se detectó la presencia de la proteína p53 cuyo gen se localiza en 17p13, en 14 de 46 LNH de grado intermedio, sugiriendo los autores que la presencia de esta proteína puede jugar un papel muy importante en la progresión del tumor (89).

Las anomalías del cromosoma 5 también son frecuentes en los Linfomas de grado

intermedio (87). En los Linfomas con del(6q), el grupo histológico es generalmente del Linfoma Folicular Mixto o de células grandes, el cual es más agresivo y frecuentemente evoluciona al Linfoma Folicular de células pequeñas (87). Gaidano y cols. (1992) (90) en un estudio molecular determinaron la asociación entre las deleciones de 6q y estos Linfomas. Este estudio permitió la detección de dos regiones distintas de deleción mínima en 6q25 a 6q27 y en 6q21 a 6q23, sugiriendo la existencia de dos genes tumor supresores (90).

En estos Linfomas la dup(2p) frecuentemente es acompañada con un curso clínico acelerado y una pobre respuesta al tratamiento (17,87).

Las deleciones de 16q se observan en el Linfoma Folicular Mixto y de células grandes, así como también en el Linfoma Difuso de células grandes y en el Linfoma Difuso Mixto. (17)

En los Linfomas Foliculares frecuentemente se presenta una dup(7p), en la parte media proximal del brazo corto del cromosoma, donde se ha mapeado el proto-oncogen erb B, localizado en 7p11-13. Este gen (PDGFRB), codifica para la cadena Beta del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Así esta duplicación podría contribuir a una ventaja en el crecimiento selectivo de células malignas (17).

5.4.2.2. REARREGLOS NUMERICOS.

Las trisomías 3, 18 ó 21, se han observado en fenotipos del Linfoma Folicular de células grandes (17). En los Linfomas con trisomía 3 o 12 el tipo histológico es generalmente del Linfoma Folicular Mixto o tipo histológico de células grandes, que frecuentemente también evoluciona al Linfoma Folicular de células pequeñas. En todos la etapa folicular con trisomía 2 frecuentemente determina un curso clínico acelerado y pobre respuesta al tratamiento. (17,91)

La trisomía 18, se observa tanto en el Linfoma Folicular Mixto y de células grandes, como en el Linfoma Difuso de células largas y en el Linfoma Difuso mixto (17).

En la revisión del primer taller de trabajo, se encontró +3 predominantemente en Linfomas

de morfología mixta y de células pequeñas y grandes (1).

Una trisomía 7 regularmente se presenta, al igual que en Linfomas Foliculares (1). Estos defectos pueden ubicarse dentro de un gen (o genes) que influyen en los mecanismos del control de crecimiento (87).

5.4.3. LINFOMAS DE ALTO GRADO.

Los rearrreglos cromosómicos en un tipo de LNH de alto grado, el Linfoma de Burkitt, han estado sujetos a estudios particularmente detallados, los rearrreglos cromosómicos en este tumor se sabe que son muy específicos, sus consecuencias moleculares también aparecen ocasionalmente reportados en otros pocos tumores malignos (1). El Linfoma de Burkitt como la LMC, entre las neoplasias no linfocíticas, asume un papel paradigmático en oncogenética, revelando uno de los mecanismos genético-moleculares, por el cual las anomalías citogenéticas contribuyen al proceso neoplásico (1,87,92).

5.4.3.1 REARREGLOS ESTRUCTURALES.

El primer estudio citogenético de LB, se reportó en 1963 por Jacobs y cols. (1), después de la introducción de las técnicas de bandeado, Manolov y Manolova (1979) describieron una banda adicional al final de 14q en 5 de 6 LB y en 7 de las 9 líneas celulares de tales tumores. Subsecuentemente se ha demostrado que el cambio cromosómico más consistente en todos los tumores de células B, es el marcador 14q+ (92).

La naturaleza de la anomalía específica en LB fue determinada por Zech y cols. (1976) quienes establecieron que el marcador 14q+ es el resultado de una $t(8;14)(q24;q32)$ (93). Basándose en estudios de alta resolución Manolova y cols. (1979) reportaron que la translocación fue recíproca (92). Estudios posteriores como el realizado por Zhang y cols. (1982) en células profase-prometáfase de LB permitieron mapear los puntos de ruptura en la

translocación en las subbandas 8q24.13 y 14q32.33 (94). Numerosos estudios han confirmado que la $t(8;14)(q24;q32)$ (Figura No.1) es en verdad un rearrreglo altamente consistente y específico en LB, ya que se presenta en 85% de los pacientes (95).

En 15 a 25% de los pacientes con LB se ha encontrado una de dos translocaciones variantes a la descrita anteriormente, en las cuales también se encuentra implicada la ruptura en 8q24 (1). Una de estas variantes, primero descrita por Berger y cols. en 1979, es una translocación recíproca entre 8q y 22q (Figura No.2), esto es una $t(8;22)(q24;q11)$ (87). En la otra variante, simultáneamente descrita por Miyoshi y cols. (1979) en Japón y Van Den Berghe y cols. (1979) en Bélgica, el cambio es entre el cromosoma 8 y el 2, esto es una $t(2;8)(p12;q24)$ (Figura No.3). La translocación (8;22) ocurre dos veces, más frecuente que la (2;8) (99).

Aún cuando la gran mayoría de los pacientes con LB presentan uno de estos tres rearrreglos específicos, la asociación no ha sido absoluta, ya que se han reportado casos tanto de LB en africanos como en no africanos que no los presentan. Por ejemplo, en un estudio realizado en 18 pacientes en E.U. en tres no se halló ninguna de las translocaciones recurrentes (87), así como en seis de catorce pacientes estudiados en Ghana (91). Por otra parte, Berger y colaboradores en 1985 encontraron uno de los rearrreglos específicos para LB en 31 de 33 pacientes europeos. Es interesante que las dos excepciones tuvieron deleciones en el brazo largo del cromosoma 6 (99).

Los rearrreglos asociados al LB tienen en común la ruptura en 8q24. El locus para las cadenas pesadas de Ig humanas está localizado en el cromosoma 14, mientras que los loci de las cadenas ligeras kappa y lambda de las Ig, están localizados en el cromosoma 2 y en el 22 respectivamente. El homólogo humano del oncogen del virus de la mielocitomatosis de las aves (c-myc) está localizado en la parte distal de 8q (8q24) y es translocado al cromosoma 14 en la $t(8;14)$ (95). Las interacciones entre c-myc y los loci de cadenas pesadas y ligeras de Ig parecen ser eventos claves en la patogénesis de LB (99-104).

El oncogén c-myc tiene tres exones: el primero, en el extremo 5' contiene codones de

terminación y no es traducido a proteína; los otros dos exones producen una proteína que tiene la propiedad de unirse al ADN. En la t(8;14) el sitio de ruptura en q24 es siempre proximal al exón II, por lo que toda la información que codifica para la proteína (exones II y III) es translocada a la banda q32 del cromosoma 14, región en la cual los rompimientos ocurren más frecuentemente en los sitios de encendido o unión, regiones S y J, de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. Por lo tanto en la translocación, c-myc se reubica en las proximidades de la región constante de las cadenas pesadas. Con este cambio se desreprime el oncogén y se producen cantidades excesivas de su proteína (105-107).

Morgan y cols. (1986) analizaron cuatro casos de Histiocitosis maligna y encontraron en tres de ellos una t(2;5)(p23;q35), en el cuarto caso se presentó otra translocación incluyendo 5q35, t(1;5)(p32;q35) (94). Se ha reportado también una translocación muy similar en un quinto paciente t(2;5) con Histiocitosis maligna (77). Por lo tanto, parece que la t(2;5) podría ser un nuevo rearrreglo específico, asociado a neoplasia, presentándose únicamente en Histiocitosis maligna. La aparente proximidad del punto de ruptura en 5q al sitio normal de c-fms es determinante, por lo que este oncogen celular podría ser un buen candidato para un papel patogénico en esta enfermedad (109).

Tres tipos de translocaciones han sido relacionados con neoplasias de células T por varios autores (79); la t(8;14)(q24;q11), la t(10;14)(q24;q11) y la t(11;14)(p13;q11). Las enfermedades hematológicas implicadas en la mayoría de los casos son LLA, algunos casos de Leucemia Linfocítica Crónica de Células T o la fase leucémica de los Linfomas de Células T. Además de la asociación con la línea de células T, no hay relación en los factores clínicos. Las tres implican una ruptura proximal en el brazo largo del cromosoma 14, en la banda q11 sucede en más casos, pero ocasionalmente la ruptura tiene lugar en una banda más distal, en la q32. Por técnicas de alta-resolución en neoplasias de células T con inv(14) y t(10;14), tentativamente se ha mapeado el punto de ruptura en la subbanda 14q11.2 (107).

Los genes para las cadenas alfa y delta del receptor de células-T (TCR) se localizan en

14(q11), que es la banda donde ocurre la ruptura en estas translocaciones. Algunos investigadores (1) independientemente demostraron que el gen alfa de TCR está relacionado con la t(11;14)(q13;q11) específica de la línea T. Este locus presenta homología secuencial con los genes de inmunoglobulinas, es decir tiene regiones variable (V), constante (C) y de unión (J), delimitadas por secuencias repetitivas. Estudiando el punto de ruptura en el locus se observó que ocurre entre las regiones V y C, por lo que las regiones J y C se translocan al derivado 11p+ y la región V permanece en el derivado 14q-. Estos resultados han permitido determinar la orientación de estas regiones, la cual es: centrómero-región V- región J- región C-telómero. La importancia del rearreglo en 11p13 es que produce la separación de regiones (110-114).

El oncogen Hras-1 se ha mapeado en 11p13-14 y parece ser que su expresión se incrementa o se modifica cuando se combina con el locus de cadenas alfa de TCR. El mecanismo de rearreglo entre estos genes se desconoce pero se ha denominado como bcl-1 (79,81,84,113). Esta hipótesis se originó al compararlo con el rearreglo que ocurre en neoplasias de células B con t(8;14)(q24;q32)(19). Este modelo de recombinación molecular se ha propuesto para la t(8;14)(q24;q11) en células T, donde el mismo sistema enzimático es responsable de la unión de V-J que participa en la recombinación de c-myc y TCR. Esta relación muestra como los rearreglos citogenéticos participan en el crecimiento neoplásico y las similitudes que existen entre dos tipos de moléculas de reconocimiento (Ig's y TCR) y las células que las producen (1,84).

Gödde-Salz y colaboradores (1981) han reportado la ocurrencia de trisomía 3 como única anomalía cariotípica en 2 casos de Linfoma de zona T, en un caso de Linfogranulomatosis X y en dos casos de Linfogranulomatosis epiteloide. Por esto parece que la trisomía 3 caracteriza un grupo relativamente pequeño de neoplasias crónicas de células T (114,115)

Mecucci y cols. (1986) han reportado rearreglos estructurales del brazo corto del cromosoma 6 en 4 pacientes con Linfoma de células T, en tres casos en forma de translocaciones y en el cuarto como una del(6)(p23;p24). Maseki y cols. (1986) agregaron

resultados de 3 pacientes, también con Linfoma de células T con delección intersticial (6)(p21;p23). Parece por lo tanto que las anomalías estructurales de 6p caracterizan un subgrupo citogenético de malignidades de células T no reconocido previamente. La aparente proximidad entre los puntos de ruptura y estas aberraciones con el locus de HLA, el cual se localiza en 6p21, es intrigante y apunta a la posibilidad de que la expresión alterada de HLA sea un factor en el proceso neoplásico. Otro gen de significancia patogenética potencial que también se localiza en 6p21 es el homólogo humano del oncogen pim-1. Esta circunstancia, en particular cuando se combinó con la observación de que pim-1 es algunas veces activado en los Linfomas de células T del ratón, apoya la posibilidad de que este oncogen tenga un papel en el desarrollo de los tumores humanos (1).

5.4.3.2. REARREGLOS NUMERICOS

No hay reportes específicos de alteraciones numéricas en Linfomas de Grado alto.

5.4.4. REARREGLOS SECUNDARIOS EN LINFOMAS NO-HODGKIN.

Las anomalías que no se encuentran como cambios únicos son denominadas anomalías secundarias, éstas a menudo son adicionales a las primarias, dentro de las cuales se incluyen los rearrreglos estructurales del cromosoma 1, los cuales son más frecuentes en "p" (hasta 50%) que en "q" (menos del 25%). Los rearrreglos son principalmente translocaciones y deleciones, algunas veces duplicaciones o isocromosomas de 1q. El punto de ruptura más frecuente es 1p36 (99,118). Las anomalías del cromosoma 1, casi siempre ocurren junto con otras aberraciones, que están asociadas más específicamente al Linfoma, por lo tanto son, probablemente, parte de la evolución de la célula tumoral (1).

Los cambios estructurales del cromosoma 3, ya sea del brazo corto o largo, se han observado en aproximadamente 25% de los casos de LNH. La considerable variabilidad en las posiciones

de los puntos de ruptura, hace a estos cambios menos específicos que la mayoría de los rearrreglos asociados a Linfomas. Sin embargo, se sabe que la banda distal del brazo largo (q29) está incluida a menudo, en la aceptación de segmentos translocados de otros cromosomas para producir un marcador 3q+ (67,99,119).

Las deleciones del brazo largo del cromosoma 6 frecuentemente se reportan como rearrreglos en los Linfomas como en otras malignidades linfáticas, nada indica que existan diferencias sistemáticas entre las del(6q) que ocurren en los diferentes contextos histopatológicos, pero cuando es rearrreglo secundario de una t(14;18) en Linfomas de grado intermedio, el curso de la enfermedad es acelerado y de mal pronóstico (120). En el material de la New Working Formulation. 15 % de todos los tumores analizados tenían 6q-. Parece probable, por lo tanto, que 6q- sea un rearrreglo secundario o no primario en los desórdenes Linfáticos (17,82,118,119).

VI. MATERIAL Y METODOLOGIA.

6.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Para realizar esta investigación se procesaron las muestras de Sangre Periférica (SP), Médula Osea (MO) y/o Ganglio Linfático (GL) de pacientes con Linfoma No-Hodgkin recibidas en el Servicio de Genética del Hospital General de México S.Sa., entre Enero de 1991 y Mayo de 1992.

Las muestras de SP fueron cultivadas por técnica habitual (57), las muestras de MO se procesaron con la técnica de Hozier y Linquist (1980) modificada, las muestras de GL se procesaron según la técnica propuesta por Yunis (1982) modificada. En los casos que fue posible el bandedo, este se realizó por técnica de bandas GTG (72).

Se analizaron de 3 a 20 mitosis, dependiendo de la calidad del cultivo y la preparación. Las alteraciones cromosómicas observadas se describen de acuerdo a la nomenclatura propuesta en la Conferencia de Paris (29). A la presencia de dos células "pseudodiploides" o "hiperdiploides" así como tres células hipodiploides con la misma alteración se le consideró como clona anormal y cuando en un caso se observó al menos una mitosis sin alteraciones se consideró ésta como una clona normal. Solo en algunos casos se obtuvieron mitosis apropiadas para el análisis, las cuales se examinaron y algunas de ellas se fotografiaron con un fotomicroscopio Carl Zeiss Fomi III con un aumento de 1250X.

6.2. CARIOTIPO EN SANGRE PERIFERICA (57).

- Las muestras de sangre se toman en condiciones estériles en una jeringa heparinizada.
- Colocar 0.5 ml de sangre en 4.5 ml de medio de cultivo (RPMI) suplementado con suero fetal de ternera (0.5 ml) y antibióticos (penicilina 2,000 U/ml + estreptomycin 275 mg/ml), en tubos cónicos para centrifuga de 15 ml. Las muestras se trabajan por duplicado.

- Incubar a 37°C durante 70.5 hrs. Adicionar 0.5 ml de solución de colchicina al 0.2% (en agua destilada estéril) e incubar nuevamente a 37°C durante 1.5 hrs.
- Pasado este tiempo los tubos se sacan de la incubadora y se centrifugan a 3,000 rpm durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón. Agregar 5 ml de solución hipotónica (KCl 0.075M) a 37°C agitando en el vortex. Dejar reposar durante 30 min. a 37°C.
- Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min, decantar el sobrenadante y agregar gota a gota, por las paredes del tubo, y agitando en el vortex, 5 ml de fijador recién preparado (metanol-ácido acético 3:1). Dejar reposar 30 min. a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min decantar el sobrenadante y resuspender en 5 ml de fijador. Repetir esta operación cuantas veces sea necesario para obtener un botón blanco y un sobrenadante claro (5 veces aproximadamente).
- Para hacer las preparaciones decantar el sobrenadante y adicionar 10 gotas de fijador para resuspender el botón. Tomar con una pipeta Pasteur y dejar caer 2 a 3 gotas de muestra sobre cada una de las laminillas, previamente limpiadas y desengrasadas, desde una altura de 20 a 30 cm. Dejar secar al aire.
- Teñir con Giemsa durante 5 min (3 ml de Giemsa 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8). Lavar con agua corriente y dejar secar.
- Observar al microscopio. Si las metafases están muy cerradas se pueden abrir haciendo las laminillas desde una altura mayor o dando más cambios de fijador. En ocasiones es necesario hacer las laminillas a la flama (sobre portaobjetos bañados en alcohol al 70% y pasando por la flama para secar). Si por el contrario las metafases están rotas, se refrigera el botón durante toda la noche para que se cierren las mitosis y después se hacen las laminillas.
- Algunas laminillas sin teñir se someten a técnica de bandas GTG, para un mejor análisis.

6.3. CARIOTIPO DE MEDULA OSEA TECNICA DIRECTA. (121)

- Agregar a un tubo cónico de centrifuga de 15 ml 9.0 ml de KCl 0.075 M, 1.0 ml de solución de tripsina-EDTA al 0.25 % y colchicina al 0.02 %.
- Agregar 0.5 a 1.0 ml de aspirado de médula ósea heparinizada.
- Esta suspensión de células se incuba a 37°C durante 30 min, pasado este tiempo se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante y resuspender el botón, fijar con una solución metanol-ácido acético 3:1 recién preparada, en igual forma que se hizo para SP. Dejar reposar 30 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3,000 rpm durante 5 min y resuspender de nuevo con fijador. Repetir cuantos cambios sean necesarios (10 aproximadamente)
- Las preparaciones se hacen goteando la suspensión de células desde una altura de 1.5 m sobre portaobjetos, obteniéndose mejores preparaciones a la flama.
- Se tiñen con Giemsa (3 ml de Giemsa + 47 ml de amortiguador de fosfatos pH 6.8) durante 5 a 8 min.
- Se observan al microscopio y se analizan.
- Parte de las laminillas preparadas pero no teñidas se someten a técnica de bandas GTG para obtener un análisis más preciso.

6.4. CARIOTIPO DE CELULAS DE GANGLIO LINFATICO. (87)

- Se coloca la muestra de tejido en una caja de Petri (la cual fue transportada en un frasquito ámbar inmersa en medio descontaminante GIBCO L-15).
- La muestra de tejido es fraccionada con una navaja de bisturí hasta obtener fragmentos muy pequeños.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur, se trasladan los fragmentos más pequeños inmersos en L-

15, a un tubo de centrifuga cónico de 15 ml estéril, teniendo cuidado de no transportar fragmentos mayores.

- Al tubo de centrifuga se le agregan 5 ml de medio L-15, y se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 min.

- A los fragmentos grandes que quedaron en la caja de Petri se les agrega 10 ml de medio L-15, y se sigue fraccionando.

- Después de centrifugar la primera muestra se decanta y se le agregan 10 ml de medio L-15 y se vuelve a centrifugar 5 min.

- Con respecto a los residuos de la caja de Petri, estos después de ser fragmentados se trasladan a otro tubo de centrifuga cónico de 15 ml y se centrifuga a 3,000 rpm durante 5 min, y se prosigue como en la muestra del primer tubo.

- Después de realizar 2 lavados con medio L-15, se decantan los tubos y se les agregan 10 ml de medio RPMI a cada uno, se homogenizan cuidadosamente.

- Del los tubos se toman alicuotas similares que son colocadas en tubos cónicos etiquetados en la siguiente forma: Tubo "A" técnica directa, tubo "B" 24 hrs, tubo "C" 48 hrs éste con fitohematoglutinina, tubo "D" 48 hrs sin estimulante, tubo "E" 72 hrs y tubo "F" a 96 hrs.

- A los fragmentos que quedaron en la caja de Petri sin L-15 se les agrega 10 ml de medio RPMI, y este contenido es trasladado a dos cajas de Petri más pequeñas, etiquetadas como "G" y "H" a 96 hrs.

- Al tubo "A" se le adiciona 9 ml de solución hipotónica, 0.5 ml de colchicina y 0.5 ml de tripsina, se homogeniza y se incuba en posición horizontal durante una hora a 37° C. A cada tubo de centrifuga restante previamente etiquetado y con la alicuota de muestra se le agregan 10 ml de medio RPMI.

- Todas las muestras se incuban a 37°C según el tiempo marcado en la etiqueta correspondiente.

- Una hora antes de cosechar (de acuerdo a los tiempos señalados en las etiquetas) se agregan 5 ml de colchicina a cada tubo a una concentración de 0.05 mg/ml y se incuban una hora más.

- Transcurrido este tiempo se sacan de la incubadora y se les agregan 5 ml de solución

hipotónica 0.0375 M y se incuban nuevamente durante 20 min. Después de este tiempo, se procesan fijándolos y con lavados en la misma forma como para la técnica que se usa con las muestras de médula ósea.

6.5. TECNICA DE BANDAS GTG (72).

Las bandas GTG son consideradas como un tipo de bandeo positivo, constituidos por estructuras de heterocromatina intercalar que comprende cerca del 50 % de las cromátidas. Se reconocen por sus propiedades cromofílicas especialmente para la solución Giemsa, Whright y otros colorantes básicos. Además son relativamente resistentes al tratamiento con calor y a la digestión con enzimas proteolíticas, urea y detergentes.

- Las preparaciones cromosómicas se secan al aire y se dejan envejecer durante una semana.
- Colocarlas en una solución de tripsina (3ml de tripsina al 1% + 47 ml de buffer de fosfatos pH 6.8) a 37° C aproximadamente durante 10 segundos o más según sea el caso.
- Lavar con solución salina isotónica.
- Teñir durante un minuto con Giemsa (3 ml de Giemsa + 47 ml de buffer de fosfatos pH 6.8).
- Lavar con agua corriente y dejar secar a temperatura ambiente.
- Analizar las metafases mejor bandeadas y fotografiar algunas.

6.6. PREPARACION DE SOLUCIONES.

COLCHICINA 0.02 %.

Colchicina (ZIGMA, Chemical Company Saint Louis Mo.)	0.02 g.
Agua destilada estéril	100 ml.

SOLUCION HIPOTONICA DE KCl 0.0375 M

KCl (ZIGMA, Chemical Company Saint Louis Mo.)	2.80 g.
Agua destilada	1.0 lt.

FLJADOR DE CARNOY (METANOL-ACIDO ACETICO, 3:1)

Metanol absoluto (Merck de México)	75 ml.
Acido acético glacial (Merck de México)	25 ml.

BUFFER DE FOSFATOS pH 6.8

Fosfato de Potasio Monobásico KH_2PO_4 (ZIGMA, Chemical Company Saint Louis Mo.)	6.63 g.
Fosfato de Sodio Dibásico Na_2HPO_4 (ZIGMA Chemical Company Saint Louis Mo.)	2.56 g.
Agua destilada	1.0 lt.

TRIPSINA 1 %*

Tripsina (GIBCO, BRL Gaithersburg MD. USA.)	1.0 g.
EDTA (ZIGMA, Chemical Company Saint Louis Mo.)	0.02 g.
Buffer de Fosfatos pH 6.8	100 ml.

*Nota: Mezclar y agitar durante 4 hrs a temperatura ambiente filtrar y guardar en el congelador en alicuotas pequeñas.

VII. RESULTADOS

Durante el periodo comprendido entre enero de 1991 y mayo de 1992 se recibieron 108 muestras de 55 pacientes con LNH, aunque solo en 23 casos fue posible el análisis citogenético. Las muestras analizadas provenían: 17 del Hospital de Oncología y 5 del Hospital de Especialidades (Hematología) del Centro Médico Nacional Siglo XXI. Sólo se obtuvo una del servicio de Hematología del Hospital General de México SSA.

Los datos clínicos y hallazgos citogenéticos de las muestras analizadas con la técnica habitual, tinción con Giemsa, se muestran en la tabla número 3. En la tabla número 4, se muestran los datos de los casos analizados con técnica de bandas GTG.

En los casos analizados se observó una mayor incidencia de población femenina (56.5%). La edad de estos pacientes se encuentra en un rango muy amplio (16-80 años), con una edad media de 53.7 años.

De los casos analizados 12 correspondían a un diagnóstico de LNH no específico para algún subtipo en particular (casos 7 al 14 y 20 al 23), dos secundario a SIDA (casos 17 y 18), y dos más como Linfoma de células grandes (5 y 15). Se presentó un solo caso diagnosticado con alguno de los siguientes subtipos: Linfoma Linfocítico de células pequeñas (caso 1), Linfoma Linfoblástico (caso 2), Linfoma Cutáneo (caso 3), Linfoma de células plasmáticas (caso 4), Linfoma Epidermotrópico de células grandes no hendidas (caso 6), Linfoma Linfocítico de células grandes (caso 16), Linfoma Mixto de células grandes y pequeñas (caso 17) y un Linfoma no clasificable (caso 19).

Se procesaron muestras de S.P., M.O. y/o G.L. en los 23 casos, obteniéndose sólo en un caso (número 10) material analizable de dos tipos de tejido (M.O. y G.L.), observándose en estos la misma alteración citogenética. Del total de muestras analizables 54.2% fueron de M.O., 29.1% de G.L. y 16.7% de S.P.

De los casos analizados, cuatro (casos 4, 6, 11 y 15) fueron citogenéticamente normales

(17.4%) y el resto (82.6%) presentaron rearrreglos cromosómicos. En ocho (casos 2, 7, 9, 12, 13, 20, 21 y 23) (34.8%) el rearrreglo primario fue una alteración numérica y en once casos (1, 3, 5, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19 y 22) (47.8%) la alteración citogenética primaria resultó ser estructural. Estos últimos seis (casos 1, 8, 10, 14, 16 y 19) además presentaron rearrreglos numéricos secundarios.

De los 23 casos, ocho (2, 5, 8, 9, 12, 15, 18, 23, 25, y 29) (34.8%) presentaron una clona normal junto con las anormales.

Algunas de las aberraciones cromosómicas encontradas se muestran en las fotos 1 a 4.

TABLA 3
CASOS ANALIZADOS CON TECNICA HABITUAL
TINCION CON GIEMSA

No. DE CASO	EDAD/ SEXO/ PROCEDENCIA	DIAGNOSTICO	MATERIAL ANALIZADO	No. DE CELULAS NORM./ANORM.	RESULTADO CITOGENETICO
1	41M/CMN-1	LNH-1	M.O.	0/4	46, XY, Dq-/47, XY, Dq-, +mar
2	71F/CMN-1	LNH-2	M.O.	6/4	46, XX/Hiperdiploidia > de 50
3	45F/CMN-2	LNH-3	M.O.	0/6	45, XX, -G, Dq-/46, XX, Dq-
4	57F/CMN-2	LNH-4	S.P.	8/0	46, XX
5	77F/CMN-1	LNH-5	M.O.	2/7	46, XX/46, XX, del(2p)(p23;?)
6	69M/CMN-1	LNH-6	M.O.	5/0	48, XY
7	40M/CMN-1	LNH	M.O.	0/4	Hiperdiploidia > 50
8	50M/CMN-1	LNH	M.O.	3/6	48, XY/46, XY, Dq+/Hiperdiploidia
9	54F/CMN-1	LNH	G.L.	1/4	46, XX/Hiperdiploidia > 50
10	60M/CMN-1	LNH	M.O./G.L.	0/13-0/7	46, XY, -G, +C/ Hipodiploidia (42-45)
11	63F/CMN-1	LNH	M.O.	6/0	48, XX
12	65F/HGM-H	LNH	G.L.	3/7	46, XX, Hiperdiploidia > 50
13	80F/CMN-1	LNH	G.L.	0/3	Hiperdiploidia > 50
14	58M/CMN-2	LNH	G.L.	0/6	46, XX, t(2q+;18q-)?, t(5q+;22q-)?

ABREVIATURAS
F= FEMENINO
M= MASCULINO
CMN-1= CENTRO MEDICO NACIONAL ONCOLOGIA
CMN-2= CENTRO MEDICO NACIONAL HEMATOLOGIA
HGM-H=HOSPITAL GENERAL DE MEXICO HEMATOLOGIA
LNH= LINFOMA NO HODGKIN

LNH-1= LINFOMA LINFOCITICO DE CELULAS PEQUENAS
LNH-2= LINFOMA LINFOBLASTICO
LNH-3= LINFOMA CUTANEO
LNH-4= LINFOMA DE CELULAS PLASMATICAS
LNH-5= LINFOMA DE CELULAS GRANDES
LNH-6=LINFOMA EPIDERMOTROPICO DE CELULAS GRANDES NO HENDIDAS

TABLA 4
CASOS ANALIZADOS CON TECNICA DE BANDAS GTG

No DE CASO	EDAD/SEXO/PROC.	DIAGNOSTICO	MAT. ANALIZADO	CEL NOR/ANOR.	RESULTADO CITOGENETICO
15	24/F/CMN-2	LNH-5	M.O.	0/15	46, XX
16	52/F/CMN-1	LNH-7	G.L.	0/9	46, XX, Inv(1q),+mar1,+mar2/Hipod iploidia (-7,-9,-10,+mar1, +mar2)
17	18/M/CMN-1	LNH-8	S.P.	0/14	46, XY/46, XY,t(1;12)(q21;q22),del(7)(q33;qter)/ 47, XY,t(1;12), del(7), +mar
18	45/M/CMN-1	LNH-9	S.P.	8/8	46, XY,2q+,t(2?)
19	48/M/CMN-1	LNH-10	G.L.	4/10	46, XY/46, XY,del(1)(q32;q42), del(2)(p11;pter), t(12;14)(q13;q32) #Hipodiploidia (23-39)
20	63/F/CMN-1	LNH	S.P.	0/5	Hipodiploidia (28-45)
21	67/M/CMN-1	LNH	G.L.	0/5	45, X-Y, +7,-17/ Hipodiploidia (-3,-8,-8,-15,-16,-17,-21,-X)
22	67/F/CMN-2	LNH	M.O.	0/10	46, XY, t(2;14)(q37;q32)
23	65/F/CMN-2	LNH	M.O.	1/11	46, XX, Hiperdiploidia (50-80)

ABREVIACIONES

F= FEMENINO

M= MASCULINO

CMN-1= CENTRO MEDICO NACIONAL ONCOLOGIA

CMN-2= CENTRO MEDICO NACIONAL HEMATOLOGIA

LNH= LINFOMA NO-HODGKIN

LNH-5= LINFOMA DE CELULAS GRANDES

LNH-6= LINFOMA EPIDERMOTROPICO DE CELULAS GRANDES NO HENDIDAS

LNH-7= LINFOMA LINFOCITICO DE CELULAS GRANDES

LNH-8= LINFOMA DE CELULAS GRANDES Y PEQUENAS Sx. 2o A SIDA

LNH-9= LN H 2o A SIDA

LNH-10= LINFOMA NO CLASIFICABLE

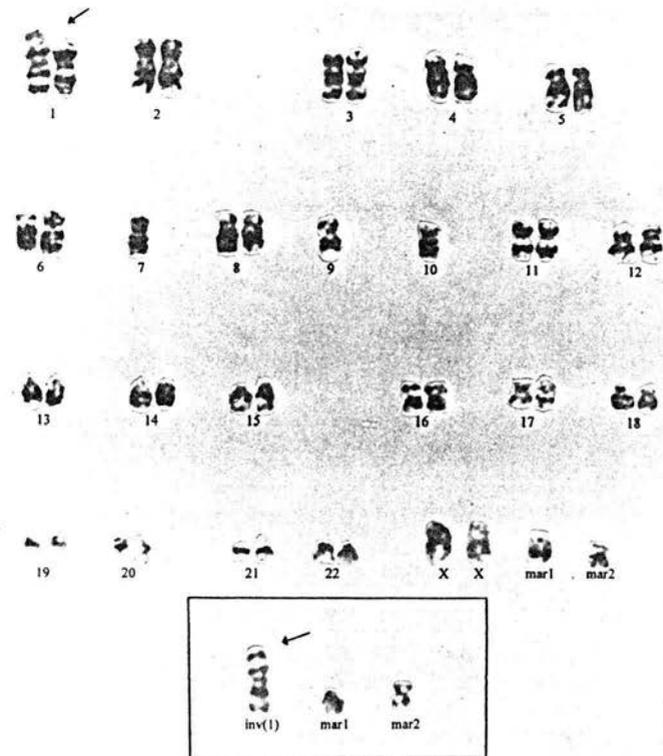


FOTO 1. CASO 16. CARIOTIPO: 48,XX, inv(1q), +mar 1, +mar 2

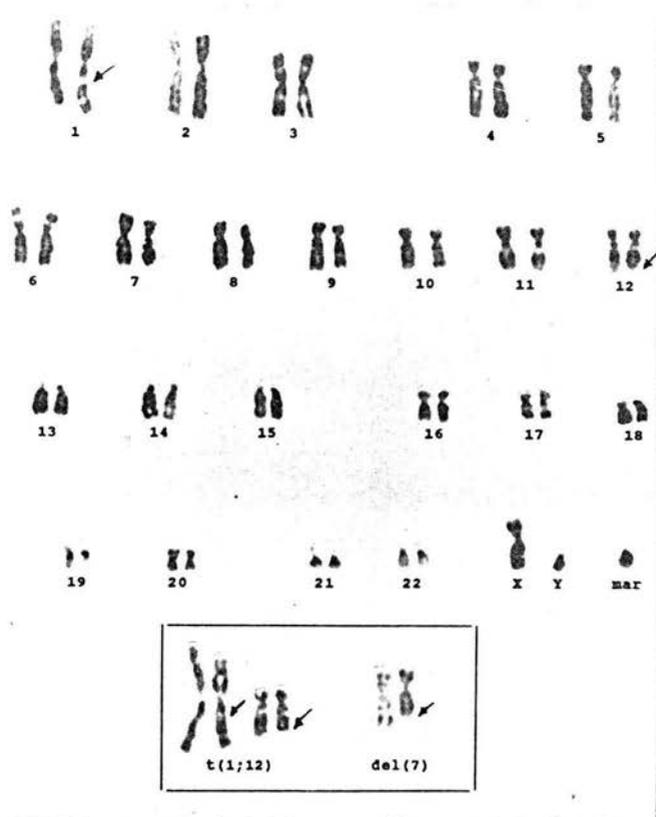


FOTO 2. CASO 17. CARIOTIPO: 47, XY, $t(1;12)(q21;q22)$, $del(7)(q33;qter)$, +mar.



FOTO 3. CASO 19. CARIOTIPO: 46, XY, *del(1)(q32;q42)*, *del(2)(p11;pter)*, *t(12;14)(q13;q32)*

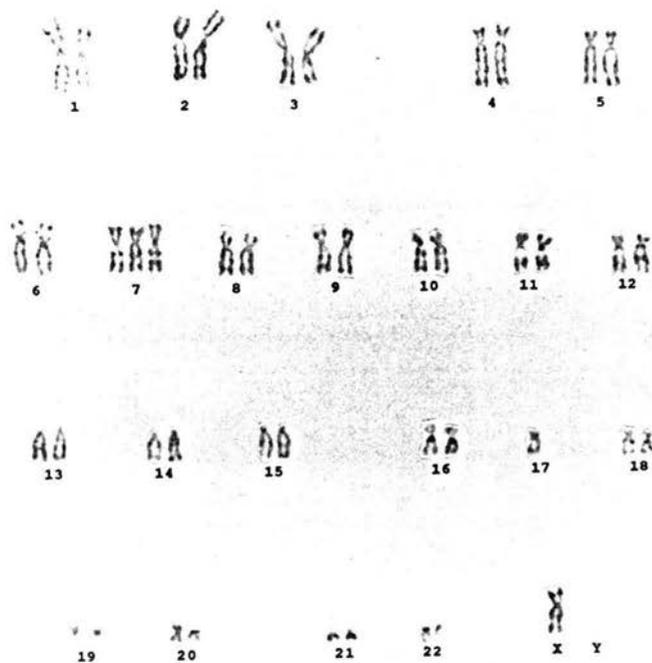


FOTO 4. CASO 21. CARIOTIPO: 45, X-Y, +7, -17.

VIII. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En nuestros pacientes analizados se observó un mayor número de casos femeninos (56.5%). Sin embargo, esto no demuestra una incidencia mayor del padecimiento en este sexo, si no simplemente, un mayor número de casos analizados satisfactoriamente. Además el número de pacientes estudiados es muy pequeño, por lo que quizás haciendo un estudio con un número mayor de casos se podría determinar si la incidencia de esta enfermedad muestra predominio del sexo femenino. Además en la literatura no se reporta predominancia de uno u otro sexo (1, 11, 15, 18).

Con respecto a la edad de los pacientes analizados, ésta se encuentra en un rango muy amplio (16-80 años), con una media es de 56.5 años. En las tablas 3 y 4 podemos observar que la moda es de 67 años, lo que nos hace concluir apoyados en la literatura (5,7), que esta enfermedad es un padecimiento que se presenta, regularmente en edad avanzada, debido a un deterioro de la respuesta del Sistema Inmune. En el caso de algunos pacientes jóvenes, esta alteración del Sistema Inmune ha sido causada por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el LNH lo presentan como síndrome secundario al SIDA.

Aún cuando en todos los casos se procesaron muestras de los tres tipos de tejido ya sea S.P., M.O. y/o G.L., sólo en un caso (número 10) se logró obtener material analizable de dos tipos de muestra (M.O. y G.L.). Desafortunadamente el análisis citogenético fue realizado únicamente por técnica estándar en ambas muestras, observándose la misma alteración cromosómica, hipodiploidia (menos de 43 cromosomas). El hecho de que esta alteración se presente en ambos tejidos era de esperarse, ya que la acumulación de linfocitos en M.O. en los LNH es creciente (5, 7).

El análisis se realizó en muestras de M.O. en 54.2% de los casos, en 29.1% de G.L. y en 16.7% de S.P., estos porcentajes nos hacen establecer que los mejores resultados se obtuvieron

de muestras de M.O. y G.L. Cabe señalar que se procesó un mayor número de muestras de S.P. Esta situación, así como el hecho de que para este trabajo se procesó material biológico de muchos otros pacientes es debida a que, en el caso de muestras de G.L., por ejemplo, éstas no se trasladaban inmediatamente después de haberse practicado la biopsia, o bien no se colocaban en el medio descontaminante L-15, y esto hacia que el tejido perdiera viabilidad. Por otra parte se tuvieron múltiples dificultades debido a que la técnica de cultivo, en este caso no estaba estandarizada y, además, faltaban algunos recursos materiales en el momento de iniciar el presente trabajo. En cuanto a los otros dos tipos de tejido (S.P. y M.O), algunas veces la toma de la muestra no era totalmente adecuada y las muestras llegaban coaguladas, no había células en division o no estaba infiltrado el tejido hematopoyético.

Aún así, los mejores resultados fueron obtenidos de M.O., procesada por técnica directa. En las muestras de G.L. observamos que los mejores se obtuvieron en los cultivos a 72 horas.

En cuanto a este punto en los casos analizados por técnica de bandas GTG, que se realizó en todas las muestras, sólo se obtuvo material analizable con bandas en 9 casos.

En el análisis citogenético, se detectaron cuatro casos normales (17.4%), lo cual concuerda con lo reportado en la literatura (1, 4, 10, 15). Sin embargo sólo se analizó uno de estos casos (15) por técnica de bandas y los otros tres (4, 6 y 11) unicamente por técnica estándar, tal vez en éstos existan rearrreglos estructurales no determinados, ya que esta técnica no es tan eficaz como la de bandas GTG para hacer evidentes este tipo de rearrreglos (72).

De los 14 casos analizados por técnica estándar, 5 casos (21.7%) presentaron anomalidades numéricas como rearrreglo primario, siendo éstas hiperdiploidías. La ganancia o pérdida de cromosomas en LNH como única anomalía es rara, ya que según los reportes de la literatura (74-76), sólo se presentan en 5% de los Linfomas de grado bajo y medio de malignidad, y no hay reportes en los de alto grado. Pero, no podemos descartar que existan en estos casos alteraciones estructurales que no fueron detectadas debido a que la metodología empleada, como explicamos anteriormente no evidencia eficazmente este tipo de rearrreglos.

El hecho de que en nuestros pacientes se presenten las alteraciones numéricas en un

porcentaje elevado, podría deberse a que éstos pertenecen a un grupo de población diferente con respecto a los pacientes analizados y reportados en la literatura que pertenecen a otros grupos étnicos o raciales. Lo cual fundamenta aún más la importancia de este tipo de estudios.

En 6 casos se presentaron rearrreglos estructurales, observándose en 3 de ellos (1, 3, 8) la alteración de brazo largo de un cromosoma del grupo "D", con pérdida de material en los casos 1 y 3, y ganancia en el caso 8. En estos tres casos se presenta también una alteración numérica como rearrreglo secundario. Si bien, mediante esta técnica no podemos observar y determinar en cual cromosoma específico de este grupo se encuentra la alteración puede que se trate de un cromosoma 14, siendo 14q+ resultado de una t(14;18), y éste paciente presente un subtipo de LNH Folicular, ya que este tipo de rearrreglo se presenta en 85%, según los reportes bibliográficos (93,94). En el caso de Dq- si este cromosoma del grupo "D" es un cromosoma 14, podríamos sugerir que los pacientes tienen un Linfoma de bajo grado, apoyándonos en los reportes en la literatura (74-76).

Otro cromosoma implicado en los rearrreglos estructurales observados en dos de nuestros pacientes fué el 2. En uno de ellos (caso 5) la alteración se encuentra en brazo corto y en el otro (caso 17) en brazo largo, asociado este último a Bq+ y 17q-, lo cual nos podría hacer sugerir que exista una translocación además de presentar una alteración numérica como cambio secundaria (hipodiploidia).

En la literatura revisada hay reportes específicos de los rearrreglos estructurales del cromosoma 2 como nosotros lo observamos. Fleischman et al (1989) reporta la del(2)(p23) en Linfoma Linfocítico de células pequeñas, nosotros también detectamos este rearrreglo en el caso 5, el cual fue diagnóstico, por otro lado el caso 19, que fue diagnosticado como LNH inclasificable, también presentó una del(2) pero el punto de ruptura se localizó en (p11pter). Fleischman et al reporta en 1979, este tipo de rearrreglo Linfoma Folicular de células pequeñas no hendidas (121), por lo cual sugerimos que este Linfoma (caso 5) puede pertenecer a este subtipo. Si bien otros reportes mencionan otros puntos de ruptura y rearrreglos diferentes (1,75,76,87,88,91).

En el caso restante del grupo de pacientes analizados por técnica estándar (caso 14) se

observaron dos tipos de translocaciones, $t(2q+;18q-)$ y $t(5q+;22q-)$, en la primera translocación se encuentra implicado un cromosoma número 2, este tipo de rearrreglo no está reportado en la literatura consultada (1,75,87,91,121), ya que en los reportes de esta translocación, siempre está involucrado el brazo corto de al menos uno de los cromosomas involucrados, (por ejemplo: $t(2;18)(p13;p21)$, $t(2;18)(p12;p21)$ y $t(2;18)(p12;q21)$) (121). Quizás porque este tipo de rearrreglos no son frecuentes en las poblaciones analizadas y reportada hasta ahora.

En los 9 casos analizados por técnica de bandas GTG, observamos que dos casos (15 y 16) no presentaron alteraciones cromosómicas. Tres (17, 19 y 23) presentaron una clona normal además de la anormal, en uno de estos pacientes (17) esto no concuerda para nada con lo reportado en la literatura (94,95), ya que tuvo un diagnóstico de alto grado de malignidad, en los cuales no se reportan clonas normales, sino al contrario células con gran número de rearrreglos cromosómicos estructurales, además de que el paciente presenta el LNH como síndrome secundario al SIDA en estado muy avanzado.

En otros tres casos (20, 21 y 23) observamos rearrreglos numéricos como única alteración. Si bien, éstos no fueron diagnosticados en un subgrupo específico, nosotros podemos determinar con el estudio citogenético y apoyándonos en las investigaciones recientes (94-102) que estos Linfomas corresponden a subtipos de bajo grado, ya que se ha reportado que el observar sólo rearrreglos numéricos, es de buen pronóstico para el paciente.

Es interesante observar que en tres casos (18, 19 y 22) de este grupo se presentaron alteraciones cromosómicas, en las cuales está implicado el cromosoma 2, tanto en translocaciones no específicas, como en deleciones asociadas a otras alteraciones, que tampoco se encuentran en los reportes bibliográficos, por lo que reiteramos la importancia de este tipo de estudios en pacientes de nuestra población con LNH, para establecer una clasificación en base a las anomalías cromosómicas. Además de establecer una correlación entre las diferentes áreas implicadas en la clasificación de este tipo de desórdenes.

Es importante señalar que el seguimiento citogenético de cada paciente sería determinante, para establecer la terapia adecuada a seguir por el clínico, el cual podría evaluar la evolución del

paciente. De tal manera que en los pacientes que se encuentran en remisión no se observaran clonas anormales, y la presencia de éstas sería indicativo de recaída, aún sin que el paciente presente sintomatología.

Además es necesario estudiar un número mayor de pacientes, tomando en cuenta que hemos encontrado alteraciones citogenéticas no reportadas en la literatura, y considerando que la frecuencia de las neoplasias presentan variaciones geográficas y étnicas determinadas por la respuesta de los individuos a factores ambientales regionales.

IX. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Heim, S., Mitelman, F. (1987). Cancer Cytogenetics. Alan R., Liss, Inc. New York. 201-265.
- 2.- Rappaport H. (1966). Tumors of the hematopoietic system. Atlas of Tumor Pathology. Sec 3 fasc 8.
- 3.- Lukes R. J., Collins R. D. (1974). Immunological characterization of human malignant lymphomas. Cancer 34, 1488-1503.
- 4.- The non-Hodgkin's lymphoma classification project: National Cancer Intitute sponsored study of clasification of non-Hodgkin's Lymphomas.(1982). Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. Cancer 49, 2112-2135.
- 5.- Principios de Medicina Interna. Harrison, M. L. Ed. en español McGraw-Hill. 1987. tomo II. 2585p.
- 6.- Patología. Rubin, E. Farber, L. J. Médica Panamericana, 1990 1420 p.
- 7.- Medicina Interna. Kelley, W. N. Medica Panamericana 1990 1598p.
- 8.- Urba, W. J., Longo, D. L. (1985). Cytology, immunologic and clinical diversity in non-Hodgkin Lymphomas: terapeutic implications. 12-25.
- 9.- Philip, T. Armitage, J. O. Spitzer G. et al. (1987). High-dose therapy and autologous bone marrow transplantation after failure of conventional chemotherapy in adults with intermediate-grade or high-grade non-Hodgkin's lymphoma. N Engl J Med 316, 1493-1498
- 10.-Schouten, H. C., Sanger, W. G., Weisenburger, D. D., Anderson J., Armitage, O. (1990) Cromosomal abnormalities in untreated patients with non-Hodgkin's linphoma: Associations

with histology clinical characteristics and treatment outcome. *Blood* 75:1841-1847.

11.-Department of Hematology section of lymphoma. The University of Texas M. C. Anderson Cancer Center 1515 Helcombe Blvd, Houston, TX 77030 (1989).

12.- *Medicina Interna*. Stein J. H. Salvat Editores S. A. México 1990 326p.

13.- *Tratado de Medicina Interna*. Uribe, M. E. Médica Panamericana. 1991 1312p.

14.- *Introducción a la Medicina Interna*. Martin A. L. Mendez Hernández. 1990 1206p.

15.-Kenneth, Offit K., Wong. (1991). Cytogenetic-Analysis of 434 consecutively Ascertained Specimens of non-Hodgkin's Lymphoma: Clinical Correlation. *Blood* 77,508-1515.

16.-Cervantes, P. A. Estructura Molecular de los cromosomas humanos: su correlacion con las técnicas de bandedo y su aplicación a la clínica. Tesis Facultad de Química UNAM 1983 315p.p.

17.-Yunis, J. J., Frizzera, G., Oken, M. M., McKenna, J., Theologides, A. and Arnesen, M. (1987). Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. A possible model for cancer. *N Engl J Med*. 316, 79-84.

18.- *Hematología*. Williams, J. W. Salvat. 1983 1475p.

19.- *Molecular Biology of the gene*. Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A., Weinur, A. M. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1988, 1006-1096.

20.- Gallo, R. C., Wong-Staal, F. (1982). Retroviruses as etiologic agents of some animal and human leukemias and lymphomas and as tools for elucidating the molecular mechanism of leukemogenesis. *Blood* 60, 545-557.

21.- Shiramizu, B., Barriga, F., Janet. (1990). Patterns of chromosomal

22.- Wong-Staal, F., Gallo, R. C. (1985). The family of human T lymphotropic leukemia viruses: HTLV-III as the cause of adult T cell leukemia and HTLV-III as the cause of acquired immunodeficiency syndrome. *Blood* 65, 253-263.

23.- Chosa, T., Tonaca, Y., Koyanagi, Y., Hinumo, Y. (1982). Effectivity in a human retrovirus

adult T-cell leukemia virus. *Blood* 73, 844-847.

24.- Franks, L. M., Teich, N. M. (1986). Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. Oxford University Press 458p.

25.- Torres, A., Martínez-Guibelalde, F. (1981). Conceptos actuales de la etiopatogenia de las leucemias agudas. *Sangre* 26, 700-717.

26.- Sandler, D., Collman, G. (1987) Citogenetic and environmental factors in the etiology of the acute leukemias in adults. *Am J Epidemiol* 126, 1017-1032.

27.- Amenomorro, T., Honda, T., Otake, M. (1988). Growth and differentiation of circulating hemopoietic stem cells with atomic bomb irradiation-induced chromosome abnormalities. *Exp Hematol* 16, 849-854.

28.- Santos E., Rodriguez, V. (1982). Radiaciones ionizantes de bajo nivel y sus efectos biológicos. En: El cáncer. ed Scientific american. Prensa científica, 26-35.

29.- ISCN. (1985). An international system for human cytogenetic nomenclature. In Birth Defects. Original Article Series 121.

30.- Ennis, J., Muirhead, C. R. (1985). X-Rays in Pregnancy and Risk of Childhood Cancer. *Lancet* 2, 1185.

31.- Marvelo, D., Offer, M., Rassomando, A. (1983). Induction of leukemia by both fractionated X-irradiation and radiation leukemia virus involves loci in the chromosome 2 segment H- 30-A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80, 162-166.

32.- Mitelman, F., Brandt, L., Nilsson, P. G. (1978). Relation among occupational exposure to potential mutagenic/carcinogenic agents, clinical findings and bone marrow chromosomes in acute nonlymphocytic leukemia. *Blood* 52, 1229-1237.

33.- Santos, E., Rodriguez, V. (1986). El Cáncer. Scientific American. Prensa Científica, 12-23.

34.- Knudson, A. G. (1976). Germinal and Somatic mutations in Cancer. In Proc 5th Int Congr.

Hum,Genet, México City. Excerpta Medica, 371-376.

35.- Knudson, A. G. (1976). Chromosomal Deletion and retinoblastoma. N. Engl J Med. 295:1120.

36.- Matsunaga, E. (1978). Hereditary retinoblastoma: Delayed mutation or host resistance?. Am J Hum Genet 30, 406.

37.- Salamanca, G. F. Citogenética Humana. Médica Panamericana México 1990. pág. 235-271.

38.- Epstein, C. H. I. (1986). The consequences of chromosome imbalance, principles, mechanisms and models. Cambridge University Press 344-365.

39.- Knudson, A. G. (1986). Genetics of Human Cancer. Ann Rev Genet 20, 231-251.

40.- El Cáncer. Retrovirus, factores de crecimiento y oncogénesis. Santos, E., Rodríguez, V. E. Scientific American. Prensa Científica. 2a ed 1986 117-123.

41.- Bishop, J. M. (1983). Celular oncogenes and retrovirus. Ann Rev Biochem 52, 301-354.

42.- Scriver, C. R. Beaudet, A. L., Sly, W. S., Valle, D. (1989). The metabolic basis of inherited disease. 6th ed Mc. Graw Hill USA.

43.- Pearson, M. Rowley, J. D. (1985). The relation of oncogenesis and cytogenetics in leukemia and lymphoma. Ann Rev Med 36, 471-483.

44.- Proteínas de oncogenes. En el cáncer. Hunter, T. Scientific american. ed 2º 1983, 86-97.

45.- Yunis, J. J. (1986). Cromosomal rearrangement, genes and fragil sites in cancer: Clinical and biology implications. In Important advances in oncology. Rosenberg Lippicott 93-128.

46.- Le Bau, M. M. (1986). Cromosomal fragile sites and cancer especific rearrangements. Blood 67, 849-858.

47.- Miro, R., Clemente, J. C., Foster, C., Egozcue, J. (1987). Fragile sites, chromosome evolution and human neoplasia. Human Genet 75, 345-349.

48.- Le Beau, M. M., Rowley, J. D. (1984). Heritable fragile sites in cancer. Science 308,

607-608.

49.- Mules, E. H., Testa. J. R. (1989). Cancer in relatives of leukemic patients with chromosomal rearrangements at rare (hereditary) fragile-site locations in their malignant cell. *Am J Human Genet* 44, 811-819.

50.- Nagesh, R. P., Heerema. N. A., Palmer, G. C. (1988). Expression of fragile sites in childhood acute lymphoblastic leukemia a patients and normal controls. *Hum Genet* 79, 329-334.

51.- Nowell, P. C., Hungerford. D. A. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science* 132, 1497-1503.

52.- Yunis, J. J. (1986). The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221, 227-236.

53.- Von Hansemann, D. (1991). Veber asymmetrische Zellteilung in Epithelkrebsen und deren biologische Bedeutung. *Vichows Arch. A. Pathol. Anat.* 119, 299-326.

54.- Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Gustav Fischer. Jena* 1-64.

55.- Hsu, T. C. (1979). Human and mammalian cytogenetics an historical perspective. Springer Verlag. New York. 326.

56.- Nowell, P. C. (1960). Phytohemagglutinin: An initiation of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462-466

57.- Moorhead, P. P., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., Hungerford, D. A. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultures of normal human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20, 613-616.

58.- Burnet, M. (1974). The biology of cancer. In *Chromosomes and cancer*, German, J. edit. Wiley and Sons New York: 17-95.

59.- Rowley, J. D. (1980). Chromosomes abnormalities in human leukemia. *Ann Rev Genet* 14, 17-39.

- 60.- Yunis, J. J. (1976). High resolution of human chromosomes. *Science* 191, 1268-1270.
- 61.- Yunis, J. J. (1981). Chromosomes and cancer: New nomenclature and future directions. *Human Pathology* 12, 494-502.
- 62.-Paris conf. 1971.(1972). Standarization in human cytogenetic. In: *Birth Defects. Original Article Series New York* 8, 7.
- 63.- Rowley, J. D., Testa, J. R. (1982). Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases. *Adv. Cancer Res.* 36, 103-148.
- 64.- Holliday, R. (1989). Chromosome Error Propagation and cancer. *TIG* 5, 42-45.
- 65.- Heim, S., Mitelman, F. (1987). Secondary chromosome aberrations in the acute leukemias. *Cancer Genetic Cytogenetic* 22, 331-338.
- 66.- Testa, J. R., Rowley, J. D. (1981). Chromosomes in leukemia and lymphoma with special emphasis in methodology. In: *The leukemic cell.* Catovsky, D. ed. Churchill Livingston. Edinburg and London 182-202.
- 67.- Yunis, J. J. (1981). New chromosome techniques in the study of human of human neoplasia. *Human Pathology* 12, 540-549.
- 68.- Fitzzyerald, P. H., Morris, C. M., Giles, L. M. (1982). Direct versus cultured preparation of bone marrow cell from 22 patients with acute myeloid leukemia. *Human. Genet* 60, 282-283.
- 69.- Carbonell, F., Fliedner, T. M., Kratt, E., Saverwein, K. (1979). Crecimiento de las células leucémicas en cultivo: selección de clones citogenéticamente anormales. *Sangre* 24, 1057-1060.
- 70.- Sandberg, A. (1980). *The chromosomes in human cancer and leukemia.* Elsevier North Holand 748p.
- 71.- Verma, R. S., Babu, A. (1989). *Human Chromosomes Manual of basic Techniques.* Pergamon Press, U. S. A. 240 p.
- 72.- Wang, H. C., Federoff, S. (1972). Banding in human chromosome treated with trypsin.

Nature New. Biol. 253, 52-54.

73.- Stanley, J. K. (1992). Bcl-2: An Antidote to Programmed Cell Death. *Cancer Surveys Oncogenes in the Development of Leukaemia* 15, 105.

74.- Kaneko, Y., Rowley, J. D., Variakojis, D., Haren, J. M., Ueshima, Y., Daly, K., Kluskens, L. F. (1983). Prognostic implications of karyotype and morphology in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 32, 683-692.

75.- Yunis, J. J., Oken, M. M., Theologides, A., Howe, R. B., Kaplan, M. E. (1984). Recurrent chromosomal defects are found in most patients with non-Hodgkin's-lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 13, 17-28.

76.- Levine, E. G., Arthur, D. C., Frizzera, G., Peterson, B. A., Hurd, D. D., Bloomfield, C. D. (1985). There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 66, 1414-1422.

77.- Kristoffersson, U., Heim, S., Olsson, H., Akerman, M., Mitelman, F. (1986). Cytogenetic studies in non-Hodgkin lymphomas- Results from surgical biopsies. *Hereditas* 104, 113.

78.- Tsujimoto, Y., Finger, L. R., Yunis, J., Nowell, P. C., Croce, C. M. (1985). Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1097-1099.

79.- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.

80.- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffe, E., Croce, C. M. (1985). The t(14;18) chromosomal translocations involved in B-cell neoplasms result from mistakes in VDJ Joining. *Science* 229, 1390-1393.

81.- Kondo, E., Nakamura, S., Onoue, H., Matsuo, Y., Yoshino, T., Aoki, H., Hayashi, K., Takahashi, K., Minowada, J., Npmura, S., et al. (1992). Detection of bcl-2 protein and bcl-2 messenger RNA in normal and neoplastic lymphoid tissues by immunohistochemistry and in situ

hybridization. *Blood* 80, 2044-51.

82.- Lida, S., S Daito, M., Okazaki, T., Seto, M., Yamamoto, K., Akao, Y., Ogura, M., Suzuki, H., Ariyoshi, Y., Koike, K., et al. (1992). Phenotypic and genotypic characterization of 14 leukemia and lymphoma cell lines with 11q23 translocations. *Leuk Res* 16, 12, 1155-63.

83.- Corbally, N., Grogan, L., Dervan, P., Carney, D. (1992). The detection of specific gene rearrangements in non-Hodgkin's lymphoma using the polymerase chain reaction. *Br J Cancer*. 66 (5), 805-9.

84.- Seite, P., Hillion, J., d'Agay, M., Gaulard, P., Cazals, D., Badoux, F., Berger, R., Larsen, C. (1993). BCL-2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases. *Leukemia* 7 (3), 410-7.

85.- Ye, B., Rao, P., Chaganti, R., Dalla-Favera, R. (1993). Cloning of bcl-6, the locus involved in chromosome translocations affecting band 3q27 in B-cell lymphoma. *Cancer Res*. 53 (12), 2732-5.

86.- Cleary, M. L., Galili, N., Sklar, J. (1986). Detection of a second t(14;18) breakpoint cluster region in human follicular lymphoma. *J Exp Med* 164, 315-320.

87.- Yunis, J. J., Oken, M. M., Kaplan, M. E., Ensrud, K. M., Howe, R. R., Theologides, A. (1982). Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 307, 1231-1236.

88.- Harry, c. s., Warren, G. S., Dennis, D. W., Anderson, J., Armitage, O. (1990). Chromosomal Abnormalities in Untrated Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma: Association With Histology, Clinical Characteristics, and Treatment Outcome. *Blood* 75, 1841-1847.

89.- Said, J., Barrera, R., Shintaku, I., Nakamura, H., Koeffler, H. (1992). Immunohistochemical analysis of p53 expression in malignant lymphomas. *Am J Pathol* 141 (6), 1343-8.

90.- Gaidano, G., Hauptschein, R., Parsa, N., Offit, K., Rao, P., Lenoir, G., Knowles, D., Chaganti, R., Dalla-Favera, R. (1992). Deletion involving two distinct regions of 6q in B-cell

non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 80(7), 1781-7.

91.- Sandberg, A. A. (1981). Chromosome Changes in the Lymphoma. *Hum Pathol* 12, 531-539.

92.-Manolova, Y., Manolov, G., Kieler, J., Levan, A. and Klein, G. (1979). Genesis of the 14q⁺ marker in Burkitt's lymphoma. *Hereditas* 90, 5-10.

93.- Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K. and Klein, G. (1976). Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17, 47-56.

94.- Zhang, S., Zech, L. and Klein, G. (1982). High-resolution analysis of chromosome markers in Burkitt lymphoma cell lines. *Int J Cancer* 29, 153-157.

95.- Berger, R., Bernheim, A., Weh, H. J., Flandrin, G., Daniel, M. T., Brouet, J. C. and Colbert, N. (1979). A new translocation in Burkitt's tumor cell. *Hum Genet* 53, 111-112.

96.-Miyoshi, I., Hiraki, S., Kimura, I., Miyamoto, K. and Sato, J. (1979). 2;8 translocation in a Japanese Burkitt's lymphoma. *Experientia* 35, 742-743.

97.- Van Den Berghe, H., Parloir, C., Gosseye, S., Englebienne, V., Cornu, G. and Sokal, G. (1979). Variant translocation in Burkitt lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1, 9-14.

98.- Douglass, E. C., Magrath, I. T., Lee, E. C. and Whang-Peng, J. (1980). Cytogenetic studies in non-African Burkitt lymphoma. *Blood* 55, 148-155.

99.- Berger, R. and Bernheim, A. (1985). Cytogenetics of Burkitt's lymphoma-leukemia: A review. In *Burkitt's Lymphoma: A Human Cancer Model* (eds. Lenoir, G. and Olweny, C. L. M.) IARC (Sci. Publ. No. 60), Lyon 65-80.

100.- Pelicci, P. G., Knowles II, D. M., Magrath, I. and Dalla-Favera, R. (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 83, 2984-2988

- 101.- Piechaczyk, M., A., Erick, D., Remmers, E., Yang, J. Q., Marcu, K., Jeanteur, P. and Blanchard, J. M. (1986). Altered c-myc RNA metabolism in Burkitt's lymphomas and mouse plasmacytomas. *Curr Top Microbiol Immunol* 132, 331-338.
- 102.- Piechaczyk, M., Yang, J. K., Blanchard, J. M., Jeanteur, P. and Marcu, K. (1985). Post-transcriptional mechanisms are responsible for accumulation of truncated c-myc RNAs in murine plasma cell tumors. *Cell* 42, 589-597.
- 103.- Sigaux, F., Berger, R., Bernheim, A., Valensi, F., Daniel, M T. and Flandrin, G. (1984). Malignant lymphomas band 8q24 chromosome abnormality: A morphologic continuum extending from Burkitt's to immunoblastic lymphoma. *Br J Hematol* 57, 393-405.
- 104.- Care, A., Cianetti, L., Giampaolo, A., Sposi, N. M., Zappavigna, V., Mavilio, F., Alimena, G., Amadori, S., Mendelli, F. and Peschle, C. (1986). Translocation of c-myc into the immunoglobulin heavy chain locus in human acute B- cell leukemia. A molecular analysis. *EMBO J* 5, 905-911.
- 105.- Bradley, J., Rothberg, P., Ladanyi, M., Chaganti, R. (1993). Hypermethylation of the MYC gene in diffuse large cell lymphomas with translocations involving band 8q24. *Genes Chromosom Cancer* 7(3), 128-30.
- 106.- Yano, T., Sander, C., Clark, H., Dolezal, M., Jaffe, E., Raffeld, M. (1993). Clustered mutations in the second exon of the MYC gene in sporadic Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 8(10), 2741-8.
- 107.- Nakamine, H., Masih, A., Chan, W., Sanger, W., Armitage, J., Weisenburger, D. (1993). Oncogene rearrangement in non-Hodgkin's lymphoma with a 14q+chromosome of unknown origin. *Leuk Lymphoma* 10(1-2), 79-88.
- 108.- Morgan, R., Hecht, b. k., Sandberg, a. a., Hecht, F., Smith, S. D. (1986). Chromosome 5q35 breakpoint in malignant histiocytosis. *N Engl J Med* 314:1322.
- 109.- Kristofferson, U., Heim, S., Olsson, H., Akerman, M., Mitelman, F. (1987).

Relationship between cytogenetic findings and histopathology in non-Hodgkin lymphoma. *Acta Pathol. Microbiol Immunol Scand* 95 (Sec A), 1-5.

110.- Haluska, F., Tsujimoto, Y., Croce, C. (1987). Mechanisms of chromosome translocation in B-cell and T-cell neoplasia. *Trends in Genetics (TIG)* 3, 11-15.

111.- Uckun, F., Gajil-Peczalskek, K., Provisor, A., Heerema, N. (1989). Immunophenotype-karyotype Associations in Human Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood* 73, 271-280.

112.- Miyamoto, K., Tomita, N. (1987). Specific abnormalities of chromosome 14 in patients with acutetype of adult T-cell leukemia lymphoma. *Int J Cancer* 40, 462-468.

113.- Boehm, T., Baer, R., Forster, A. (1988). The mechanism of chromosomal translocation t(11;14) involving the T-cell receptor Cdelta locus on human chromosome 14q11 and a transcribed region of chromosome 11p15. *The EMBO J* 7, 385-394.

114.- Gödde-Salz, E., Schwarze, E. W., Stein, H., Lennert, K. and Grote, W. (1981). Cytogenetic findings in T-Zone lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 101, 81-89.

115.- Göde-Salz, E., Feller, A. C. and Lennert, K. (1986). Cytogenetic and immunohistochemical analysis of lymphoepithelioid cell lymphoma (Lennert's lymphoma): Further substantiation of its T-cell nature. *Leukemia Res* 10, 313-323.

116.- Mecucci, C., Michaux, J. L., Tricot, G., Louwagie, A. and Van Den Berghe, H. (1986). Rearrangements of short arm of chromosome No. 6 in T-cell lymphomas. *Leukemia Res* 34, 1139-1148.

117.- Maseki, N., Kaneko, Y. and Sakurai, M. (1986). Interstitial deletion of the short arm of chromosome 6 as a new cytogenetic marker of T-cell lymphoma. *Jpn J Cancer Res (Gann)* 77, 334-337.

118.- Fukuhara, S., Rowley, J. D., Variakojis, D., Golomb, H. M. (1979). Chromosome abnormalities in poorly differentiated lymphocytic lymphoma. *Cancer Res* 39, 3119-3128.

119 - Hansmann, M. L., Gödde-Salz, E., Hui, P-K., Miller-Hrmlink, H. K. and Lennert, K.

(1986). Cytogenetic finding in nodular paragranuloma (Hodgki's disease with lymphocytic predominance: nodular and in progressively tranformed germinal centers. *Cancer Genet. Cytogenet.* 21, 319-325.

120.- Hozier, J., Linquist, L. (1980). Banded Karyotypes from bone marrow: a clinical useful approach. *Hum Genet* 53, 205-209.

121.- Mitelman, F. *Catalogo of Chromosome Aberrations in Cancer.* Ed Wiley-Liss. 4a E. (1991), 4214p.