

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

zej

FACULTAD DE QUIMICA

CONSEJO DE CREDITOS ACREDITADOS
FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO CITOGENETICO EN PACIENTES CON
SINDROME MIELODISPLASICO (SMD)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

IRMA CORTES MARTINEZ



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Pilar y Tomás por su amor y confianza.

A todos y cada uno de mis hermanos.

A Jesús Alejandro por su apoyo incondicional.

A la QFB Alicia Cervantes Peredo por compartir sus conocimientos

A la Dra. Susana Kofman por haberme dado la oportunidad de realizar el presente trabajo en el Servicio de Genética.

A mis amigos.

Jurado Asignado

Presidente: Prof. Gerardo Kono Yaiko.

Vocal: Prof. Marisol López López.

Secretario: Prof. Alicia Cervantes Peredo.

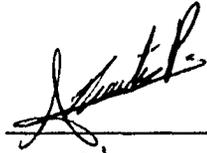
1er Suplente: Prof. María Estela Cevallos Ferriz.

2o Suplente: Prof. Eva Delia Calderón Garcidueñas

Sitio donde se desarrolló el tema:

Servicio de Genética. Hospital General de México Ssa.

Asesor del tema: QFB Alicia Cervantes Peredo



Asesor técnico: QFB Rosa María Arana Trejo



Sustentante: Irma Cortés Martínez



INDICE

	Pag
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	2
2.1 Antecedentes	2
2.2 Origen Monoclonal de los Síndromes Mielodisplásicos (SMD)	5
2.3 Características hematológicas de los SMD	6
2.3.1 Diseritropoyésis	6
2.3.2 Disgranulopoyésis	7
2.3.3 Dismegacariocitopoyésis	9
2.4 Clasificación del FAB de los SMD y modificaciones de acuerdo a otros criterios	9
2.4.1 Anemia refractaria (AR)	10
2.4.2 Anemia refractaria con sideroblastos en anillo (ARSA)	10
2.4.3 Anemia refractaria con exceso de blastos (AREB)	11
2.4.4 Anemia refractaria con exceso de blastos en transformación (AREB-t)	12
2.4.5 Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC)	12
2.5 Características morfológicas de los blastos en los SMD	13
2.6 Marcadores citoquímicos	15
2.7 Marcadores inmunológicos en SMD	21
2.8 Etiología de los SMD	25
2.9 Anormalidades cromosómicas en los SMD	30
2.9.1 Cromosoma 5	32
2.9.2 Anormalidades del cromosoma 7	33

2.9.3 Trisomía 8	36
2.9.4 Otras anormalidades	36
2.10 Anormalidades cromosómicas en SMD secundarios	38
2.11 Significado pronóstico de los SMD	39
2.12 Análisis molecular en los SMD	46
2.12.1 Protooncogen ras	46
2.12.2 Protooncogen fms	49
2.12.3 Rearreglo oncogénico bcr/abl	49
2.12.4 Gen tumor supresor p53	50
2.12.5 Análisis molecular del cromosoma 5	52
2.13 Tratamiento	57
2.13.1 Transfusiones	57
2.13.2 Terapia hormonal	58
2.13.3 Interferón	58
2.13.4 Quimioterapia	58
2.13.5 Acido retinóico	58
2.13.6 Danazol	59
2.13.7 Trasplante de médula ósea	59
2.13.8 Modificadores biológicos	60
2.13.8.1 Eritropoyetina	60
2.13.8.2 Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF)	61
3. Material y métodos	63
4. Resultados	67
5. Discusión y conclusiones	72
6. Bibliografía	80

ESTUDIO CITOGENETICO EN PACIENTES CON SINDROME MIELODISPLASICO.

1. INTRODUCCION

Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD) son un grupo heterogéneo de padecimientos que tienen múltiples expresiones clínicas y de laboratorio, mismas que varían con la evolución.

El grupo del FAB caracterizó estas entidades como 5 subtipos basándose en las características morfológicas de dichos síndromes. Sin embargo, esta clasificación se encuentra incompleta, y debe ser sustituida por una que englobe las características biológicas.

En los SMD frecuentemente se han encontrado alteraciones cromosómicas asociadas con el pronóstico y evolución de la enfermedad, el porcentaje de las alteraciones es muy variable ya que va desde 20 hasta 90%. Los rearrreglos cromosómicos, además de servir para indicarnos la naturaleza clonal de los SMD, tienen una relación directa con el pronóstico. mientras mayor sea el número de alteraciones citogenéticas, más pobre será el pronóstico, con una rápida transformación a leucemia aguda. Entre los rearrreglos más comunes se encuentran: monosomía total o parcial 7, del (5q) y trisomía 8.

2. MARCO TEORICO

En 1938 se realizaron las primeras observaciones de ciertas características en pacientes con alteraciones hematológicas no comunes y al paso del tiempo dichas características se repitieron y se agregaron otras, es por ello que se empezaron a hacer asociaciones para agrupar tales padecimientos en una enfermedad definida. Dichos hallazgos y asociaciones permitieron describir los Síndromes Mielodisplásicos (SMD).

2.1 ANTECEDENTES HISTORICOS

1938- Rhoades y Barker, describieron 100 pacientes que cursaban con anemia refractaria (AR) de los cuales 60 presentaban anemia refractaria primaria y 40 secundaria a alguna enfermedad hematológica (1).

1950- Hamilton-Peterson, introdujeron el término "Anemia pre-leucémica" al describir 3 casos de AR antecediendo a una leucemia mielocítica aguda (LMA) (2).

1953- Block y cols, dieron el término "Pre-leucemia" al describir 12 pacientes con citopenia refractaria con evolución a leucemia aguda, (3).

1956- Bjorkman, reportó 4 casos de AR asociada con sideroblastos en anillo en Médula Osea (MO), (4).

1963- Rheingold y cols, describieron una aparente variante de leucemia, al observar un bajo porcentaje de blastos en MO llamándolo " leucemia aguda latente", (5).

1969- Dameshek observa ciertas características en un paciente en el que se veía afectada la línea eritroide, (6).

1973- Saarni y Linman, observaron la presencia de rasgos mieloproliferativos en la producción en exceso de monocitos y granulocitos a lo que designaron con el nombre de síndrome preleucémico, (7).

1976- Dreyfus, observó pacientes con AR acompañada de más de 5% de mieloblastos en MO llamándola "Anemia Refractaria con exceso de Mieloblastos" (8).

El grupo cooperativo Franco Americano Británico (FAB), define a la AR con exceso de blastos y la leucemia mielomonocítica crónica como estados preleucémicos (9).

1982- El grupo del FAB define una clasificación para estas entidades y adopta el término (SMD), el cual incluye 5 subtipos (10,11).

AR -anemia refractaria
ARSA -anemia refractaria con sideroblastos en anillo
AREB -anemia refractaria con exceso de blastos
LMMC -leucemia mielomonocítica crónica
AREB-t -anemia refractaria con exceso de blastos en transformación.

1987- Por análisis de biología molecular se reportó que genes que codificaban para receptores y/o factores de crecimiento se localizaban en el brazo largo del cromosoma 5. y que estos genes se encontraban deletados en pacientes con anormalidades cromosómicas (5q-) y SMD. Además observó que estaban asociadas con la respuesta a la terapia y con la evolución a LMA. (12).

1990- Ridge por análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) encontró que los genes que codificaban para el receptor de superficie del factor estimulador de colonias 1 (CSF-1) conocido como (FMS) y el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Monocitos (CSF-1) estaban, "localizados en el cromosoma 5", ambos se asociaban a la transformación celular de las líneas que los expresaban. Se han reportado mutaciones en los codones 969 del gen FMS y 301 del gen CF-1 (13).

1992- Jacobs postuló que para que exista la expresión de una línea con maduración anormal debe existir una mutación puntual, la cual debe ocurrir en células pluripotenciales (Stem cell), por acción de

mutágenos externos. Las mutaciones en genes de la familia ras han sido las más estudiadas y se relacionan con SMD. (14).

2.2 ORIGEN MONOCLONAL DE LOS SMD

En los SMD se han observado características particulares que permiten señalar su posible origen, una de ellas fué una MO normo o hiper celular, la que llevó a pensar en la clonalidad de los SMD (15).

Dacie y cols (16) fueron los primeros en sospechar la clonalidad en los SMD, al notar una doble población de células eritroides observadas en un frotis de sangre periférica (SP) de un paciente con anemia refractaria sideroblástica (16). Estas características fueron comprobadas en estudios de clonalidad utilizando isoenzimas de glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G-6PD) en los que se determinaron polimorfismos en pacientes afectados. Estos estudios indicaron que células mieloides y linfoides tienen un origen ancestral común (17,18).

Otros estudios han demostrado la clonalidad en los SMD utilizando los patrones de metilación de fragmentos de restricción polimórficos (RFLPs) ligados al cromosoma X. Estos resultados mostraron que las poblaciones celulares en MO tienen un patrón monoclonal de inactivación del X. Por lo que se sugirió que los SMD

son desórdenes clonales debido a que las clonas anormales mieloides, monocíticas y linfoides tienen la capacidad de diferenciarse (19).

2.3 CARACTERISTICAS HEMATOLOGICAS

Uno de los parámetros que nos ayudan a evaluar los SMD es la identificación morfológica de células anormales en un frotis de SP y/o MO. Las características clínicas de cada paciente y los hallazgos citogenéticos muestran un panorama más amplio en cuanto a la evolución de la enfermedad.

En la figura 1 se muestra la diferenciación normal de las líneas celulares hematopoyéticas. La interrupción en alguna de ellas da origen a anomalías como las que se mencionan a continuación.

2.3.1 DISERITROPOYESIS: La característica cualitativa para evaluarla es la observación de sideroblastos en anillo, aunque éstos no son característicos de los SMD y se pueden encontrar en otros padecimientos hematológicos. También se encuentran fragmentos multinucleares, moteado internuclear, cromatina densa anormal o cromatina fina con citoplasma de características anormales como (basofilia intensa y cuerpos de Howell-Jolly) (10,15). En un frotis de sangre periférica se puede observar anisocitosis, poiquilocitosis,

eritrocitos nucleados y acantocitosis (21).

Los cambios cuantitativos incluyen un incremento en el porcentaje de sideroblastos en anillo, generalmente mayor de 15%. La proporción de células eritroides y sus precursores van de 5 a 50% en MO (10,15). Sin embargo, existen publicaciones en que el porcentaje varía, por ejemplo Juneja (22) reportó 20% de sideroblastos en anillo en pacientes con ARSA.

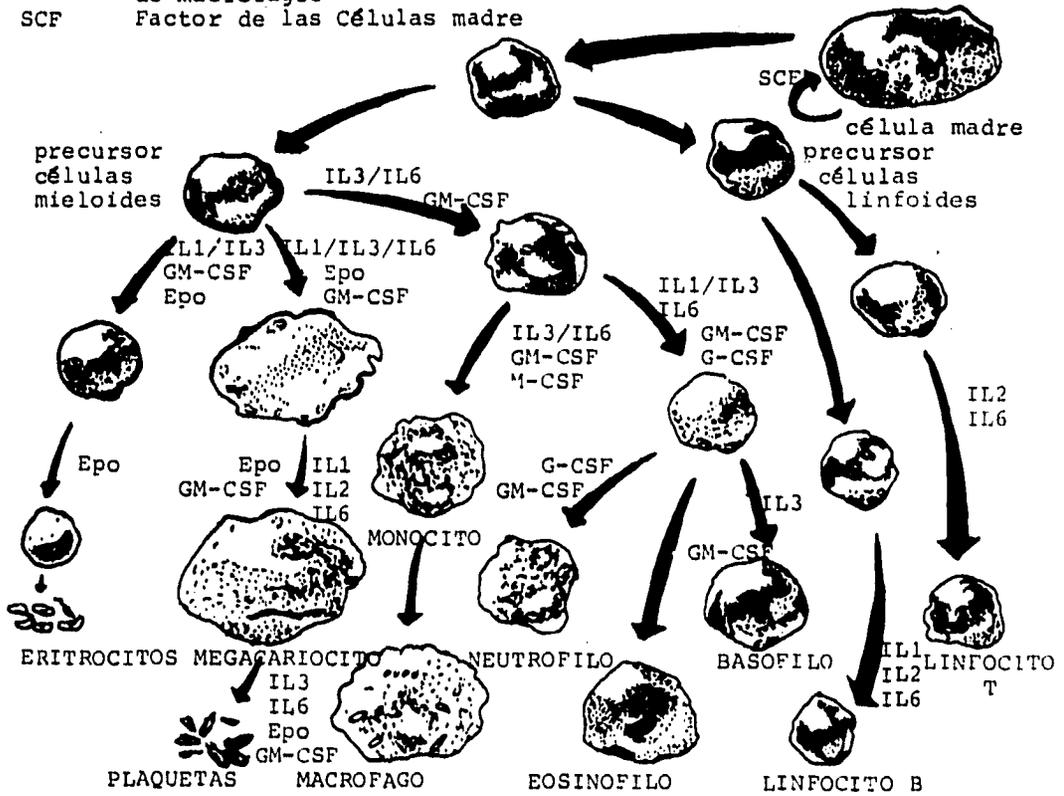
2.3.2 DISGRANULOPOYESIS: Las anomalías morfológicas en granulocitos se pueden observar tanto en SP como en MO. Las más comunes en SP son neutrófilos agranulares o hipogranulares los cuales podrían estar asociados con una reacción negativa de la peroxidasa y/o hiposegmentación de los polimorfonucleares (PMN) con cromatina condensada (anomalía de Pelger-Huet) (15). Se observan mielocitos en las primeras etapas de la enfermedad. En algunas ocasiones, la cromatina parece aglutinarse en bloques, separados por espacios claros dando la impresión de segmentación nuclear.

Gustke y cols (23) observaron, en dos pacientes, una aglutinación exagerada de la cromatina en células eritroides y granulocíticas. Esta anomalía nuclear la asociaron con un defecto en la producción celular en MO, ya que *in vitro*, los precursores granulocíticos y normoblastos incorporaban ³H-TdR pero no se dividían (23).

Otras características encontradas son: granulocitos con núcleos en

Fig. 1 Diferenciación normal de células hematopoyéticas (20).

IL1-6 Interleucina 1-6
 Epo Eritropoyetina
 GM-CSF Factor Estimulador de Colonias de granulocitos y monocitos
 M-CSF Factor Estimulador de Colonias de macrófagos
 SCF Factor de las Células madre



forma de anillo (24); en MO las células pueden presentar basofilia citoplasmática, así como gránulos azurófilos abundantes (15).

Boogaerts y cols (25) observaron que la función neutrofílica está alterada, al notar que la movilización granulocítica en el sitio de la lesión se vió afectada al existir decrementos en su adhesión, en su contenido enzimático, capacidad fagocítica, quimiotaxis y daño en su capacidad bactericida. Sin embargo, no existió relación entre la severidad de la enfermedad y la disfunción granulocítica, aunque un incremento en el número de blastos fué asociado con pérdida severa de su función (25).

2.3.3 DISMEGACARIOCITOPOYESIS: Las anomalías comunes son la observación de micromegacariocitos, núcleos pequeños múltiples separados por filamentos de material nuclear, células mononucleares grandes, núcleos dismórficos. Recientemente se han encontrado en los SMD megacariocitos hipogranulares (26,15).

2.4 CLASIFICACION DEL FAB DE LOS SMD Y MODIFICACIONES DE ACUERDO A OTROS CRITERIOS

El grupo cooperativo FAB ha caracterizado los SMD en 5 subgrupos, basándose en el reconocimiento de rasgos dismórficos comunes en todos los grupos y otros criterios que los distinguen entre sí (10,15).

2.4.1 ANEMIA REFRACTARIA (AR): Se caracteriza por ser una anemia refractaria, con niveles de reticulocitos bajos, la severidad no está relacionada con la edad. Puede o no presentar granulocitopenia y/o trombocitopenia. En MO se observa generalmente hiperplasia eritroide y dismegacariocitopoyesis. En algunas ocasiones en SP se pueden o no observar neutrófilos agranulares o hipogranulares. Es raro encontrar blastos y pueden ser menos de 1% en SP y menos de 5% en MO. La presencia de sideroblastos en anillo es rara (10,15).

2.4.2 ANEMIA REFRACTARIA CON SIDEROBLASTOS EN ANILLO (ARSA): Sus características son similares a AR excepto que se encuentran 15% de sideroblastos en anillo en MO. Además se presentan eritrocitos punteados y precursores eritroides con citoplasma laminar (15).

Sin embargo, Gatterman y cols. (27) hacen una diferencia entre anemia sideroblástica pura y ARSA, determinando una serie de análisis tales como: la morfología, sobrevida de los pacientes, transformación a LMA, causas de mortalidad, para cada entidad, así como crecimiento celular *in vitro* en cultivos de MO.

Los pacientes con Anemia Sideroblástica Pura (ASP), presentan diseritropoyesis, con las líneas granulocítica y megacariocítica normales, el promedio de sobrevida es de 45 meses. Su riesgo de transformación a LMA es de 1%. En cuanto al análisis de MO in

vitro, el crecimiento de las Unidades Formadoras de Colonias Granulocíticas Monocíticas (UFC-GM) no se vió significativamente alterado con respecto a ARSA (27).

Los pacientes con ARSA presentaron diseritropoyesis y las líneas granulocíticas y megacariocíticas estuvieron afectadas, el promedio de sobrevida fué de 18 meses, el desarrollo LMA de 24.4%, la evolución de los pacientes a AREB es mayor, el crecimiento de UFC-GM fué muy pobre además de una prevalencia de agregados de células pequeñas típicas de los SMD (27).

La diferenciación entre ASP y ARSA puede ser de gran ayuda en la decisión clínica, ya que pacientes con ASP tienen un mejor pronóstico que los pacientes con ARSA, ya que en éstos el pronóstico no es bueno por el mayor riesgo de evolución a AREB o a LMA (27).

2.4.3 ANEMIA REFRACTARIA CON EXCESO DE BLASTOS (AREB): se asocia con cambios en granulocitos los cuales pueden ser hipo o agranulares y en algunas ocasiones presentan anormalidades en la segmentación de la cromatina. La trombocitopenia es común. En SP los blastos son menos de 5%. La MO es usualmente hiper celular con 5 - 15% de blastos (10, 15).

Tricot y cols. (28) realizaron un trabajo en el que proponen otro parámetro en el diagnóstico, la Localización Anormal de Precursores

Mieloides Inmaduros (ALIP) en MO. En este estudio se correlacionaron la presencia de ALIP con los diferentes subtipos de la clasificación del FAB, el porcentaje de mieloblastos (mayor de 5%) en circulación y en MO, así como con la edad. La presencia de ALIP(+) se asoció predominantemente al subtipo AREB, con mieloblastos en circulación. Esto se relacionó con un peor pronóstico (28,29).

2.4.4 ANEMIA REFRACTARIA CON EXCESO DE BLASTOS EN TRANSFORMACION (AREB-T): Incluye rasgos dismórficos parecidos a AREB, pero el porcentaje de blastos en SP puede ser de hasta 5% y de 21 - 30% en MO tomando en cuenta el tipo de blastos presente (15). Se ha reportado la presencia de cuerpos de Auer en precursores granulocíticos, aunque éstos no son característicos (30).

Sanz y cols. (31) realizaron un trabajo en el que se asoció el tipo de blasto presente con la severidad de la enfermedad, encontrando que los blastos tipo I se relacionaron con el subtipo AREB-t y rápida progresión a LMA. Se piensa que los blastos tipo II son más diferenciados que los tipo I.

2.4.5 LEUCEMIA MIELOMONOCITICA CRONICA (LMMC): se caracteriza por la presencia de monocitosis ($1 \times 10^9/l$). Frecuentemente se ha asociado con granulocitos maduros con o sin disgranulopoyesis evidente (hipogranulares y/o formas de Pelger). El porcentaje de blastos en SP

es menor de 5%. En MO las características se parecen a AREB, pero muestra un incremento en precursores monocíticos (promonocitos) y 5% de blastos (10).

La presencia de monocitosis inexplicable con cromosoma Filadelfia negativo (Ph -) o falta de productos de fusión de los genes bcr y abl en pacientes con citopenia llevan a pensar en un diagnóstico de LMMC (15).

2.5 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE LOS BLASTOS EN LOS SMD

De acuerdo a la clasificación de SMD por el FAB, se establecieron criterios para definir los tipos blastos. Estas se basan en la presencia de gránulos citoplasmáticos, excluyéndose a promielocitos aparentemente normales, también a promonocitos, proeritroblastos y megacarioblastos (13).

Tipo I.- Se caracteriza por la ausencia de gránulos azurófilos, las células tienen un núcleo prominente y un patrón de cromatina no condensada, la relación núcleo/citoplasma es de aproximadamente 0.8 tendiendo a ser mayor (10,15).

Tipo II.- Los blastos tienen características del tipo I, distinguiéndose por la presencia de pocos gránulos azurófilos. El

grupo FAB no define un límite en cuanto al número de azurófilos presentes (15). La relación núcleo/ citoplasma tiende a ser baja y el núcleo ocupa una posición central (10).

Tipo III.- Son mieloblastos con más de 20 gránulos azurófilos en el citoplasma. La observación de prevalencia de mieloblastos hipergranulares (tipo III), se asocia con un pronóstico pobre en

relación a la sobrevida con respecto a pacientes con prevalencia de blastos tipo I y II (15).

La identificación del tipo de blasto es de gran ayuda para determinar grupos pronósticos entre los pacientes con algún subtipo de SMD (15).

San Miguel y cols. (32) proponen otro criterio en la identificación de blastos, el cual incluye análisis morfológico e inmunofenotipo. Así, determinan las posibles líneas celulares implicadas en los SMD y en su transformación a LMA, éstas pueden ser granulocítica, monocítica, eritroide, megacariocítica o linfoide. Utilizando marcadores inmunológicos característicos de cada línea, la presencia de cada uno de ellos se correlacionó con los subtipos de acuerdo a la clasificación del FAB. En los 5 subtipos están implicados un alto porcentaje los marcadores mieloides. Al asociarse con la sobrevida de los pacientes y su transformación a LMA, se observó que la

presencia de blastos tipo I esta asociada con un peor pronóstico y generalmente se encuentra implicada la línea mieloide.

2.6 MARCADORES CITOQUIMICOS

En un esfuerzo para identificar características que podrían ayudar en el diagnóstico de los SMD se han realizado estudios con varias tinciones citoquímicas. Estas han sido establecidas como auxiliares

en la identificación de los diversos subtipos celulares y para la demostración de deficiencias enzimáticas en algunos padecimientos hematológicos. Algunas de las técnicas empleadas para este fin están basadas en la demostración de ciertas enzimas y constituyentes químicos de las células, que caracterizan la tendencia y grado de diferenciación de las mismas. (33)

Con base en la clasificación del FAB se realizan las siguientes tinciones:

- Tinciones de fierro (prueba de Perls). Los sideroblastos son eritrocitos que se observan con acumulaciones de fierro (hemosiderina) Se encuentran en la anemia sideroblástica. El fierro se puede estimar por la cantidad de hemosiderina que se encuentra en la MO. La hemosiderina da una reacción positiva cuando reacciona con

el azul de Prusia (33,34).

- Reacción de Schiff con ácido peryódico (PAS). Esta reacción pone de manifiesto glucógeno, glucoproteínas y algunos mucopolisacáridos. El glucógeno fijado en la célula se observa como sedimento granuloso aterronado, localizándose exclusivamente en el citoplasma de las células, su concentración aumenta a medida que la célula madura. El ácido peryódico reacciona con los grupo glicol 1 y 2 que existen en cada residuo de glucosa de la molécula de glucógeno. Cuando éste es tratado con ácido peryódico, ambos miembros de cada grupo glicol proporcionan un aldehído, de tal manera que las cadenas polisacáridas del glucógeno se transforman en cadenas polialdehídicas. Estos aldehídos reaccionan con el reactivo de Schiff (leucofucsina) para formar un complejo color púrpura que puede ser identificado por microscopía de luz. En los blastos se observan como gránulos de color rojo en forma irregular (glucógeno) (36).

- Tinción de la peroxidasa. Esta tinción se utiliza para la detección de la deficiencia parcial o completa de mieloperoxidasa. Las peroxidasas son hemoproteínas de naturaleza enzimática que catalizan la oxidación por el peróxido de hidrógeno. La peroxidasa granulocítica (mieloperoxidasa) no se encuentra en los linfocitos. El principio de la reacción es un sustrato que produce un color intenso y estable. El sustrato más estable es la bencidina, que por oxidación

con el peróxido de hidrógeno produce un color café-verdoso derivado de la safranina en el sitio de acción. Todos los elementos eritroides jóvenes y adultos, así como los elementos granulocitarios,

en toda la gama de maduración son positivos a esta reacción. La intensidad de la coloración es directamente proporcional al grado de maduración de las células granulocíticas. Los eritrocitos, monoblastos y monocitos se tiñen en forma difusa, ya que estas células presentan poca actividad. El tejido linfático es negativo (35).

- Tinción de butirato, cloracetato y doble estearasa. Esta reacción pone de manifiesto la existencia de estereasas específicas de tejido granulocítico, siendo similar en sensibilidad al sudán negro B. La utilización de naftol cloracetato sobre las estearasas cloradas

del tejido granulocítico produce una precipitación de las mismas, evidenciada por una coloración en forma de gránulos gruesos de color rojo brillante fácilmente distinguibles al microscopio de luz (35,36).

-Tinción inmunocitoquímica. Se usan anticuerpos monoclonales HPI-ID los cuales reconocen los complejos de glicoproteínas IIb y IIIa en

megacariocitos. Se identifican micromegacariocitos atípicos como un rasgo de dismegacariocitopoyesis (33).

En la tabla I (33) se muestra la cuantificación de las reacciones anteriores de acuerdo a los subtipos del FAB.

Los sideroblastos en anillo se presentan en más de 15% de los eritrocitos nucleados de todos los casos de ARSA, aunque también en menor proporción se pueden observar en los otros subtipos de SMD. La tinción Pearls pone de manifiesto eritroblastos en todos los estadios, lo cual es de gran ayuda en el diagnóstico de la enfermedad (33,34).

La tinción de PAS, muestra patrones de tinción positivos para eritroblastos en 31% de los casos de SMD excepto para LMMC. Cuando existen marcadores positivos para la tinción de hierro y PAS positivo en eritroblastos esto indica diseritropoyésis (35).

La deficiencia parcial de mieloperoxidasa se observó en pocos casos de AR, lo cual indicó un riesgo de desarrollo a LMA después de algunos años. Sin embargo, en AREB-t la tinción fue positiva principalmente en el reconocimiento de cuerpos de Auer. Concluyendo que la actividad de mieloperoxidasa en neutrófilos no es de gran ayuda en el diagnóstico o clasificación de los SMD; excepto para identificar AREB-t, donde se identifican cuerpos de Auer y menos de 20% de blastos (35).

Las tinciones para butirato esterasa y cloroacetato estereasa son de gran ayuda para estimar la proporción de precursores neutrofilicos y monocitos, necesarios para el diagnóstico de LMMC. La presencia positiva de ambas tinciones en precursores mieloides se asocia con

leucemias agudas (33).

Las tinciones inmunocitoquímicas, fueron de gran ayuda para identificar micromegacariocitos y megacarioblastos raros. Los cuales fueron encontrados en 100% de los casos de AREB-t, en 95% de AREB, y en menor proporción en los otros subtipos (33).

Las tinciones citoquímicas proporcionan información para la identificación de precursores mieloides, linfoides, eritrocíticos y megacariocíticos, dando un panorama más amplio en el diagnóstico de los SMD. (32, 33, 34, 35, 36, 37).

Solé y cols. (38) encontraron la reacción de la mieloperoxidasa positiva en dos casos con i(17q). El hecho de que el i(17q) se relacione sólo con procesos mieloides, sugiere que al menos dos genes están implicados en la expresión del fenotipo mieloides: el gen G-CSF responsable de la maduración terminal de los granulocitos localizado en 17q11 y el gen de la mieloperoxidasa localizado en 17q21-24. Estos datos estarían de acuerdo con el resultado obtenido en las células con el i(17q) las cuales son mieloperoxidasa positivas. Estos pacientes tienen esta característica cuando tienen como única alteración i(17q) lo que permite separarlos de otros grupos (38).

MARCADORES CITOQUIMICOS E INMUNOCITOQUIMICOS EN PACIENTES CON SMD

PRUEBA	AR %	ARSA %	AREB %	AREB-t %	LMMC %	SMD-s %	Control
RS	46	100	62	65	57	73	0
PAS	25	6	43	42	0	45	0
DE	68	76	75	55	86	73	0
RS + PAS	18	6	29	25	0	45	0
RS + DE	39	76	46	45	57	45	0
PAS + DE	21	6	25	10	0	18	0
RS + PAS + DE	18	6	21	15	0	18	0
MoAb HP1-1D	50	59	95	100	0	100	0

RS Prueba de Pearls

PAS Reacción de Schiff

DE Reacción doble esterasa

MoAb HP1-1D Tinción inmunocitoquímica

AR Anemia refractaria, ARSA AR con sideroblastos en anillo

AREB AR con exceso de blastos , AREB-t AREB en transformación

LMMC Leucemia mielomonocítica crónica.

Tabla 1

2.7 MARCADORES INMUNOLOGICOS EN SMD

Se ha intentado realizar una clasificación más completa de los SMD que nos permita un mejor diagnóstico y pronóstico de la enfermedad. Así, varios autores utilizan otras características que modifiquen o amplíen la clasificación del FAB (39).

Kristensen y cols. (39) evaluaron la presencia de marcadores inmunológicos de células de MO, empleando un panel de anticuerpos monoclonales dirigidos a antígenos expresados en células maduras e inmaduras de pacientes con SMD. En la tabla II (39) se muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales los cuales ponen de manifiesto la maduración de las células.

En la tabla III (39) se muestra la cuantificación de marcadores inmunológicos en los SMD, se determinó el orden de expresión de antígenos, los resultados se obtuvieron a partir de una relación de anticuerpos monoclonales dirigidos a células mieloides maduras e inmaduras (MARS). Relacionando el porcentaje de reactividad positiva de una suspensión de células mononucleares de MO, multiplicados por un factor de corrección dependiente de la variabilidad de células positivas en SP. Los resultados mostraron que:

CD 13 se incrementa en AREB-t

CD 14 se incrementa en AR , AREB y AREB-t, excepto en ARSA donde disminuye. CD 33 aumenta notablemente en AREB y AREB-t.

PANEL DE REACTIVIDAD

MoAb	CD	REACTIVIDAD
MY7	13	Células mieloides maduras/inmaduras
MY9	33	Células mieloides inmaduras
NAT-9	--	Células mieloides maduras
MI4	14	Monocitos
AAS-1	--	HLA-DR, Células B y Monocitos
B1	20	Células B maduras
UCHT1	3	Células T maduras

Tabla 2

MARCADORES INMUNOLOGICOS EN SMD

Subtipo	MY7 % CD13	MY9 % CD33	MY4 % CD14	NAT-9 % None	UCHT1 % CD3	B1 % CD20	AAS-1 % None
AR	26.4	7.2	12.7	38.8	14.9	6.5	29.1
ARSA	11.9	19.7	5.2	54.3	13.4	4.5	19.3
AREB	25	34.6	14	30	19.5	7.9	31.2
AREB-t	43.3	42.4	15.3	31.9	15.1	6.1	46.3
AR-LMA	44.7	34.3	13.7	27.3	7.3	4.8	44.5

23

AR Anemia refractaria, ARSA AR con sideroblastos en anillo,
AREB AR con exceso de blastos, AREB-t AREB en transformación,
LMA Leucemia mielocítica aguda.

Anticuerpos monoclonales- MY7, MY9, MY4, NAT9, UCHT1 , B1, AAS-1.

Tabla 3

Las asociaciones en cuanto al pronóstico mostraron que los pacientes con AREB presentaron un mejor promedio de sobrevida respecto a otros trabajos (39).

Es interesante observar que los estudios de inmunofenotipos en líneas granulocíticas son parámetros que ayudarían a distinguir los pacientes con SMD verdaderos. Por ejemplo la razón de morbilidad y muerte de esos pacientes es la transformación a AREB y LMA.

En las primeras observaciones de AREB-t el grupo tenía un periodo de sobrevida de 3 a 13 meses, con un subgrupo en el cual la enfermedad evolucionó lentamente. El uso de MARS para el diagnóstico divide a los pacientes en dos grupos con periodos largos y cortos de sobrevida. Con el estudio de inmunofenotipos se formaron dos grupos de AREB-t en relación a los MARS, por ejemplo un grupo pequeño con periodo corto de sobrevida fueron diagnosticados morfológico/citoquímicamente como AREB/AREB-t con evolución a LMA.

Sin embargo con con el estudio inmunofenotipo estos pacientes fueron diagnosticados como LMA (39).

El uso de las relaciones de anticuerpos proporcionan parámetros que no se identificaban en pruebas comunes para la evaluación de la enfermedad, lo cual ayudaría a establecer tratamientos más adecuados (39,40,41).

Una alta relación de MARS: muestra un pronóstico pobre . La presencia de células CD 34+ circulando en MO se ha asociado con una progresión a LMA y un periodo corto de sobrevida (42).

2.8 ETIOLOGIA DE LOS SMD

Existen varios posibles orígenes de la enfermedad lo que implica que se trata de una enfermedad de tipo multifactorial, es decir que varios factores pueden predisponer a la enfermedad.

En los SMD las alteraciones cromosómicas mas comunes son las deleciones que afectan a los cromosomas 5 y 7. Esto se observó preferentemente en pacientes que habian recibido algún tipo de terapia relacionada con leucemias o que por su ocupación estuvieron en contacto con una variedad de compuestos potencialmente genotóxicos. Dichos compuestos inducen lesiones a nivel de células pluripotenciales, las cuales estan asociadas con un incremento en la

incidencia de SMD y LMA (34).

El riesgo de desarrollar alguna anormalidad hematológica depende de varios factores, tales como el tipo, tiempo y la frecuencia de la exposición, ya que estos pueden ser acumulativos. Por ejemplo se observó que dosis bajas de radiaciones ionizantes parecen ser más leucemógenas que dosis altas utilizadas como terapia. (34).

Existen agentes químicos que causan daño al DNA interaccionando directamente con él, provocando alteraciones como: pérdida de la actividad de algunos genes que actúan como tumor supresores, activación de protooncogenes, y modificación de la afinidad de receptores por factores de crecimiento (43).

Varios carcinógenos químicos provocan una lesión en el DNA ya sea directa o indirectamente. La mayoría de estas sustancias pertenecen a la familia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, por ejemplo, el benzo(a)pireno, el cual tiene una estructura muy reactiva. Estos compuestos necesitan de una activación metabólica para producir daño al formar centros electrofílicos (43).

La activación metabólica es llevada a cabo por enzimas que normalmente se encuentran en el organismo, especialmente en el hígado donde se lleva a cabo la detoxificación de sustancias (43).

Las drogas terapéuticas, insecticidas, hidrocarburos policíclicos y algunos productos naturales son frecuentemente solubles en grasas e insolubles en agua, por lo que se acumulan continuamente si el organismo no tiene un sistema de detoxificación. En el humano, está constituido por una serie de reacciones de oxidación catalizadas por el citocromo P-450. Estas enzimas se encuentran en la membrana del retículo endoplásmico y pueden oxidar una gran cantidad de sustancias tales como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los resultados

de la oxidación de éstos son la formación de epóxidos, los cuales son grupos electrofílicos muy reactivos (43).

Usualmente los epóxidos son rápidamente hidrolizados a grupos hidroxilo, los cuales pueden formar complejos con el ácido glucurónico para hacerlos solubles en agua. Ocasionalmente algunos compuestos son epoxidados en sitios donde no pueden ser hidroxilados, probablemente porque la enzima epóxido hidratasa no puede actuar. Tales compuestos se convierten en electrófilos altamente reactivos y sus precursores son moléculas que conocemos como carcinógenos. Estos pueden reaccionar con moléculas con centros de carga negativa como proteínas, RNA o DNA (43).

Varios autores han realizado trabajos en los que implican la exposición a genotóxicos y su relación con el daño en la maduración, diferenciación y proliferación de líneas mieloides (43).

Farrow y cols. (44), haciendo uso de cuestionarios y entrevistas proponen 70 sustancias asociadas a leucemias, detallando la naturaleza, intensidad y frecuencia de la exposición. Los principales compuestos químicos encontrados en asociación con SMD son: el petróleo y el diésel gas o líquido. Muchas de estas exposiciones fueron asociadas con trabajos en la industria del petróleo donde este y el gas diésel así como los diferentes derivados contienen un gran número de químicos con acción carcinogénica, lo cual eleva el riesgo de transformación a leucemia en los trabajadores de la petroquímica.

Este estudio demuestra que la posible etiología de los SMD y de otros desórdenes hematológicos o algunas enfermedades crónicas, es la exposición a químicos que causan una lesión directa o indirecta sobre el DNA (44).

Goldberg (45) estudió pacientes con SMD con exposición a benceno y algunos de sus derivados como los insecticidas y con antecedentes de quimio y/o radioterapia clasificándolos de acuerdo al FAB y excluyendo a pacientes con SMD secundarios, Se consideraron las características clínicas, grupo socioeconómico, edad e historia laboral. Se excluyeron datos cromosómicos. La exposición fue considerada significativa si la persona estuvo en contacto directo con el químico en el caso de insecticidas y pesticidas, así como la duración y frecuencia. Como resultado se obtuvo que una proporción cercana a 50% de los pacientes con SMD presentaban en su historia clínica exposición a pesticidas, y/o solventes orgánicos.

De los pacientes que estuvieron expuestos a pesticidas 58% fueron clasificados como AREB o AREB-t según el FAB. Esto tiene una importancia de valor pronóstico, porque es en estos grupos donde se tiene una alta frecuencia de progresión a LMA. Los compuestos químicos en cuestión fueron alcanos halogenados y alquenos utilizados en los insecticidas. Los más mencionados fueron el lindano y el malatión, el primero es un isómero del benceno hexaclorado y ha sido asociado con casos de agranulocitosis y anemia aplásica. El segundo es un insecticida de amplio espectro utilizado en el hogar y

jardinería (45).

Jacobs y cols (46), realizaron un estudio en el que relacionaron los hallazgos citogenéticos con el pronóstico de 49 pacientes con SMD clasificados de acuerdo al FAB. La edad promedio fué 62 años, y el mejor pronóstico se obtuvo en pacientes con AR y ARSA. Los peores pronósticos fueron para AREB y AREB-t por alto riesgo de transformación a LMA. En la historia de estos pacientes figuraban reportes de exposiciones a genotóxicos. por lo que se piensa que de alguna manera estas exposiciones son un factor de riesgo para adquirir alguna anomalía hematológica (46).

2.9 ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN SMD

Las técnicas citogenéticas hacen posible establecer patrones en los que se pueden determinar rearrreglos cromosómicos observables, a partir de preparaciones cromosómicas que se obtienen por cultivos de sangre periférica (Sp), médula ósea (mo), piel y otros tejidos e incluso de tumores sólidos. Para este análisis se cuenta con una variedad de técnicas basadas en diferentes tipos de tinciones que ponen de manifiesto algunas características de los cromosomas que los hacen identificables (47).

Dentro de las técnicas de bandeo específicas se encuentran las bandas G, Q, C, R, y NOR entre otras. Las que más se utilizan en citogenética para identificación de rearrreglos en leucemias y SMD son las bandas G y Q. Las primeras se obtienen por digestión de los cromosomas con tripsina, la cual es una enzima proteolítica, y posteriormente se tiñen con Giemsa. Comings (1978) (48) propone que las banda-G se producen porque los cromosomas en metafase contiene estructuras básicas (cromómeros) a las que se une fuertemente el colorante, y permite observarlas en un microscopio de luz. Las bandas Q ponen de manifiesto las mismas estructuras solo que éstas se revelan con un colorante fluorescente, la quinacrina, la cual se une a regiones ricas en G-T, haciendo fluorescer las regiones ricas en A-T del DNA. Para la observación de éstas se utiliza un microscopio de luz ultravioleta. La técnica que más se utiliza es la

de bandas G por su fácil manejo (47,49).

la información citogenética ayuda a evaluar el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad de acuerdo a las alteraciones cromosómicas encontradas.

Las anomalías que afectan a los cromosomas pueden ser tanto de tipo estructural como de tipo numérico y afectar a los autosomas o a los cromosomas sexuales.

Las anomalías de tipo estructural se producen al repararse anormalmente las roturas cromosómicas que se producen de forma espontánea (como consecuencia de los mecanismos celulares anormales, o por efecto de factores ambientales). Las más importantes en los SMD son las pérdidas o deleciones, las inversiones y las translocaciones. Las anomalías de tipo numérico se producen como consecuencia de errores en el reparto o segregación de los cromosomas durante la división celular. Las más importantes son las trisomías, monosomías, poliploidías, hipodiploidías e hiperdiploidías (50).

Se ha incrementado el número de anomalías cromosómicas específicas en los Síndromes Mielodisplásicos. Sin embargo la incidencia reportada en la literatura varía entre 23-78% (51,). Las anomalías más comunes son la pérdida parcial o total del cromosoma 7, la trisomía 8, la deleción parcial o total del cromosoma 5, y el isocromosoma 17q. Otras menos frecuentes son la deleción del brazo corto del cromosoma 12, la pérdida del cromosoma Y y el derivado del cromosoma 6 (51).

2.9.1 CROMOSOMA 5

La pérdida de la porción q31 del brazo largo del cromosoma 5 se ha observado relacionada con SMD y leucemias agudas. Recientemente en el cromosoma 5 se han localizado genes que codifican para factores de crecimiento y receptores de los factores de crecimiento y estos genes han sido perdidos en las anormalidades cromosómicas 5q- (51).

La deleción intersticial del brazo largo de este cromosoma fué descrita por primera vez por van den Berghe en 1974 , en tres pacientes con Anemia refractaria idiopática. En 1975 se reportaron dos pacientes con las mismas características estableciéndose la anormalidad 5q- (52).

Las anormalidades del cromosoma 5 son observadas en 15% de pacientes con SMD de novo (53).

Se ha observado -5 o del(5q) en todos los subtipos de la clasificación del FAB. La frecuencia de estas anormalidades varían, en AR(29%), en los subtipos: AREB y AREB-t (57%) y con menor frecuencia en ARSA (6%) y LMMC (2%). El comportamiento de un paciente con AR con del(5q) es diferente respecto a los que tienen AREB o AREB-t con la misma deleción. Estos últimos se caracterizan por ser más agresivos y con una incidencia mayor de progresión a LMA. Aunque varios pacientes mueren debido a complicaciones por infecciones y/o

hemorragias (54).

Los pacientes con -5/5q- como única anomalía tienen el mejor pronóstico. El tratamiento se basa principalmente en transfusiones sanguíneas y las condiciones de vida son buenas con un periodo de supervivencia de más de 18 meses. Además el riesgo de transformación a leucemia es bajo (10%) (51). Cuando ésta anomalía se presenta en los subtipos AREB o AREB-t, acompañada de otras anomalías el pronóstico es malo, con un periodo de supervivencia de 7.5 meses y un riesgo alto de transformación a leucemia (54).

2.9.2 ANORMALIDADES DEL CROMOSOMA 7

Otra de las alteraciones comunes en los SMD es la monosomía parcial o total del cromosoma 7. Si se tiene como única anomalía su pronóstico de supervivencia es de 15 meses con alta progresión a leucemia.

La monosomía parcial o completa de este cromosoma también ocurre en cariotipos complejos ya sea de SMD o de LMA primaria (55).

En un estudio realizado por Gerritsen (56) seleccionaron pacientes que presentaban monosomía 7. Se separaron las líneas linfocítica y mielocítica de acuerdo a marcadores específicos, utilizando anticuerpos monoclonales que reconocieran a células T (CD3), células B (CD20),

"natural killer" NK (CD57), granulocitos y monocitos con una baja expresión de CD11b, y progenitores mieloides (CD33). Los resultados mostraron una baja reactividad para la línea linfóide (menor de 5%), y de 23% a 91% de reactividad para la línea mielóide. Esto sugirió que la monosomía 7 no era usual en las subpoblaciones linfoides, sino que estaba restringida a células progenitoras comunes con la capacidad de diferenciarse hacia células mieloides maduras (56).

Es interesante la observación de la monosomía 7, como una anomalía común en pacientes pediátricos con SMD, y en algunos casos como una enfermedad de orden familiar (57).

Nair (57) estudió 16 niños con SMD clasificados de acuerdo al FAB, con edad promedio de 10.5 (2.5 a 16 años). Todos los pacientes cursaban con los subtipos más agresivos de SMD (7 con AREB, 6 con AREB-t y 3 con LMMC). En el análisis citogenético se encontró que 43% de los pacientes tenían anomalías cromosómicas y que éstas en su mayoría implicaban al cromosoma 7 y con menor frecuencia a los cromosomas 8 y 17. Sólo 5 de los pacientes evolucionaron a leucemia aguda. El promedio de supervivencia fue de 5.5 meses. El tratamiento con quimioterapia llevó a 5 de 6 pacientes a remisión. El predominio de los subtipos más agresivos de SMD en los niños lleva a la utilización de tratamientos muy agresivos y por su respuesta se propone primero el trasplante de MO y posteriormente la quimioterapia (57).

Alitalo y cols. (58) observaron otro rearrreglo que implicaba al cromosoma 7, y éste fué la translocación no balanceada (1;7) determinaron el punto de ruptura de ambos cromosomas, para esto se realizó una correlación cariotipo - fenotipo, con análisis citogenético. Los resultados obtenidos en dos pacientes que cursaban con SMD fueron: con bandas CBG se observó que la heterocromatina del cromosoma 1q se mantuvo durante la translocación lo que sugirió que la translocación ocurrió en el centrómero o en el brazo corto muy cerca de éste. En las pruebas de hibridización in situ utilizando sondas de DNA satélite se hibridió la región centromérica de la t(1;7) en ambos cromosomas, lo que sugiere que la translocación debería definirse como t(1;7)(cen;cen) (58).

Horiike y cols. (59) reportaron otro trabajo sobre la t(1;7) donde muestran que 6 de 97 pacientes con SMD tenían una translocación no balanceada entre los cromosomas 1 y 7 (-7,+der(1)t(1;7)(p11;p11)). Además de una serie de datos clínicos como macrocitosis, anemia normocítica, cuenta de plaquetas baja, mo hiper celular y en algunos casos normocelular. Una característica importante encontrada en estos pacientes fué hipergamaglobulinemia, las células plasmáticas estaban moderadamente incrementadas en MO, lo que podría explicar las infecciones recurrentes (59).

Una monosomía 7 es asociada con defectos en la quimiotaxis de neutrófilos causados por una anomalía en la síntesis de una

proteína de superficie (GP130) la cual probablemente es controlada por un gene localizado en el cromosoma 7q. Como una manifestación clínica inicial los pacientes mostraron piréxia y otros síntomas de infección (59).

2.9.3 TRISOMIA 8

Existen pocos datos sobre esta anormalidad en pacientes con SMD primario. En un estudio realizado por Jacobs (49) en 49 pacientes, 19 tenían anormalidades cromosómicas siendo la más frecuente la trisomía 8. En 18.6% de los casos, se observó que ocurrían cambios en la evolución de la enfermedad y +8 fué vista en casi todas los subtipos excepto en AR como anormalidad secundaria de acuerdo a la clasificación del FAB (46). La trisomía 8 fué asociada con la expresión alterada del gene c-myc aunque esto no ha sido confirmado (55).

2.9.4 OTRAS ANORMALIDADES

En los SMD se presentan otro tipo de anormalidades con menor frecuencia constituyendo en algunos casos anormalidades únicas entre estos se encuentran:

"Isocromosoma (17q)"

Se tienen pocos datos sobre esta alteración que generalmente se

acompaña de otras anormalidades, se ha asociado con un periodo corto de sobrevida en los pacientes aproximadamente 10 meses. Esta alteración se presenta en una variedad de enfermedades hematopoyéticas, usualmente asociada con otro tipo de alteraciones cariotípicas. Se ha demostrado recientemente que la anormalidad del iso(17q) se asocia con la pérdida de la función del gen tumor supresor p53 (55).

PERDIDA DEL CROMOSOMA Y

La pérdida del cromosoma sexual Y es un daño común en células de MO. Se ha reportado en pacientes con SMD, así como en otros padecimientos no neoplásicos. Así mismo, se ha asociado con la edad, ya que se ha encontrado en individuos normales mayores de 50 años, incrementandose el riesgo en padecimientos hematológicos, si se presenta como única anormalidad el pronóstico es bueno, pero si están comprometidos otras anormalidades el riesgo de progresión a leucemia aumenta (60,61).

Derivado (6p)

Esta es una aberración consistente que implica una $t(6;9)(p23;q34)$. Se ha reportado que su frecuencia es baja en los SMD. En los casos en que se observa una rápida progresión a leucemia. El punto de ruptura en 9q34 es proximal al punto de ruptura que se da en la $t(9;22)(q34,q22)$ de la leucemia mielocítica crónica (61).

2.10 ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN SMD SECUNDARIOS

Los síndromes mielodisplásicos constituyen un grupo heterogéneo de anomalías clonales adquiridas caracterizadas por una variable propensión hacia la conversión leucémica, y en cuya patogénesis se acepta algún tipo de mutación en una célula madre hematopoyética como evento inicial. Dicho proceso mutagénico puede tener lugar espontáneamente o estar inducido por un grupo heterogéneo de factores exógenos, entre los cuales destaca el tratamiento con radiaciones y/o fármacos citostáticos (fundamentalmente agentes alquilantes) (61).

Las anomalías cromosómicas que producen estos tratamientos, se han identificado en la mayoría de los casos de Síndromes Mielodisplásicos Secundarios (SMDs). Existen trabajos en los que se han reportado clones cromosómicamente anormales en 76% a 97% de los casos. La pérdida parcial o completa de los cromosomas 5 y 7 se han considerado hallazgos característicos y algunas instituciones las han reportado en 90% de los casos de SMDs (62).

La monosomía de los cromosomas 5 y 7, así como la del(7q-) se ha asociado (>85%) con quimioterapia (sola o con radioterapia), las anomalías citogenéticas se han correlacionado con la respuesta a la quimioterapia y el pronóstico de enfermedad (62,63).

Otros cromosomas implicados en los SMDs son el 21 y 11. La anomalía del brazo largo de cromosoma 21 fue reportada de una $t(3;21)(q26;q22)$. Los rearrreglos del cromosoma 11 implican la banda q23, en las $t(9;11)(p21;q23)$ y la $t(2;11)(p21;q23)$ (61).

Otra serie de cromosomas implicados son 3, 8, 9, 12, 18, y 19 (61,62). Aunque LeBeau y cols. (64) sugieren que anomalías de los cromosomas 1, 4, 5, 7, 12, 14, y 18 son realmente significativas en los SMDs por su frecuencia (63).

2.11 SIGNIFICADO PRONOSTICO DE LOS SMD

En varios trabajos se ha demostrado el valor pronóstico de los estudios cromosómicos en algunos desordenes hematológicos que llevan a un incremento en el riesgo del desarrollo subsecuente a leucemia.

En algunos trabajos se proponen factores pronósticos de transformación a leucemia teniendo en cuenta edad, cuenta de plaquetas, leucocitos, neutrófilos, porcentaje de blastos y tipo de estos en SP y MO, clasificándolos de acuerdo al FAB.

Autores como Tricot (28), Sanz (31), Horiike (59), Nowell (55) entre otros coinciden en los siguientes resultados.

La presencia de un porcentaje alto de blastos en MO y SP indican una clara disfunción de la hematopoyesis. El tipo de blasto presente, también tiene una fuerte relación con el pronóstico de la enfermedad, ya que depende del grado de maduración un mejor o peor pronóstico.

En la figura 2 se correlaciona el tiempo de sobrevida con el total de blastos presentes en MO. Se observa que con un porcentaje menor a 5% el periodo de sobrevida es mayor de 108 meses y con porcentaje de blastos de 21-30 la sobrevida disminuye hasta menos de 12 meses (31).

En la figura 3 se corelaciona la probabilidad de transformación a leucemia de acuerdo al porcentaje de blastos tipo I. La proporción de éste tipo de blatos en MO tiene un fuerte valor predictivo respecto a la transformación a LMA. La probabilidad de evolución a leucemia fué de 100%, para pacientes cuya cuenta de blastos tipo I está entre 20% y 30%, con un periodo de sobrevida de 30 meses. El límite entre AREB-t y LMA es arbitrario, para ello algunos autores toman en cuenta el tipo de blasto presente (31,59). Por ejemplo Sanz (31), afirma que los blastos tipo II en MO no tienen ninguna relación con el desarrollo de LMA. Sugiriendo que los blastos tipo II son células más diferenciadas o que los blastos tipo I y tipo II podrían derivar de clonas progenitoras distintas (31).

En la figura 4 se asocia el periodo de sobrevida de acuerdo al subtipo del FAB y se observa que pacientes con diagnóstico de AR o ARSA tienen mejores posibilidades en su calidad de vida con respecto a los que tienen un subtipo más agresivo (31).

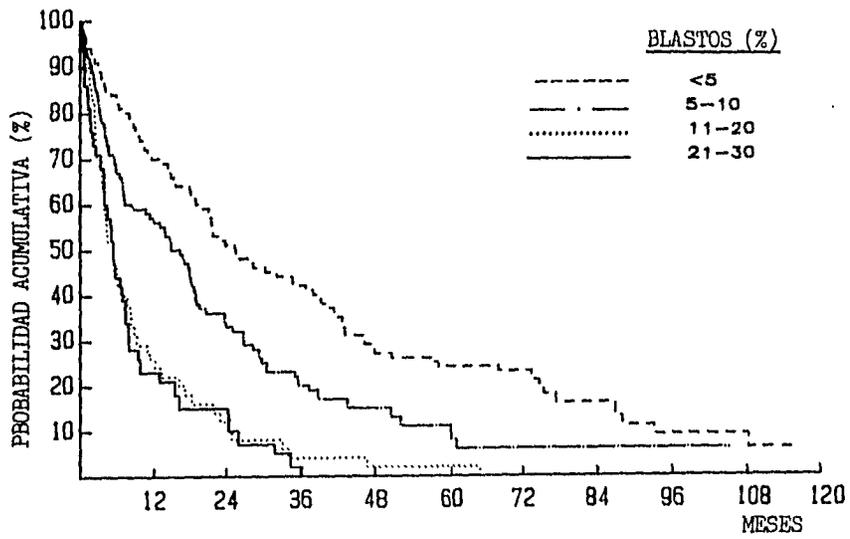


Fig. 2. Sobrevida de acuerdo al porcentaje de blastos en médula ósea en los pacientes con SMD.

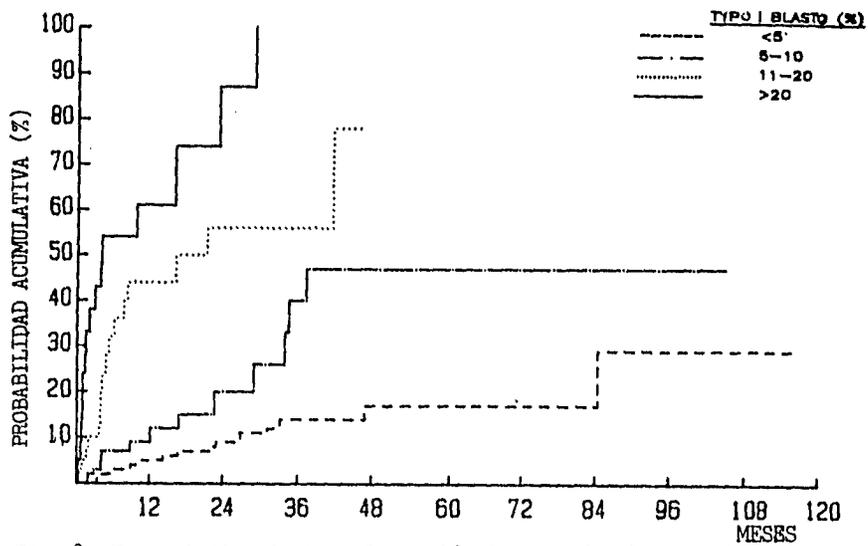


Fig. 3. Probabilidad de transformación de acuerdo al porcentaje de blastos tipo I en todos los pacientes con SMD.

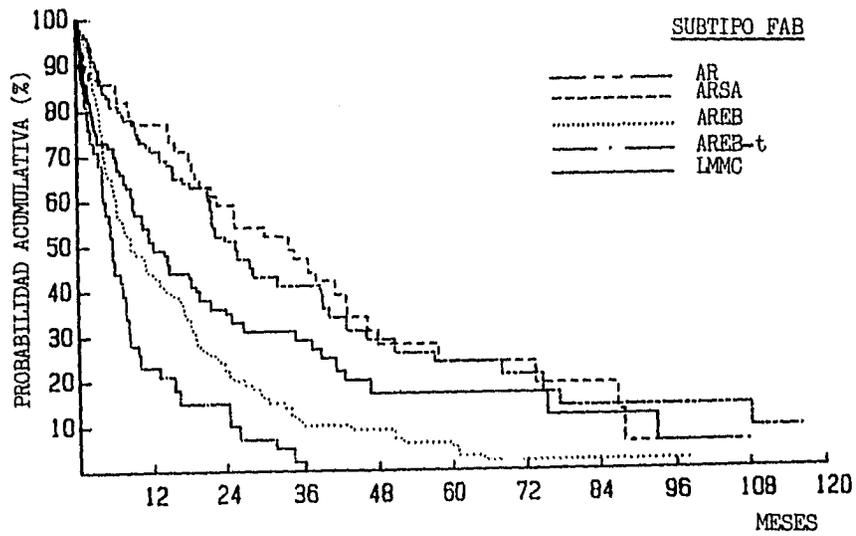


Fig. 4. Probabilidad de supervivencia de acuerdo a la clasificación del FAB.

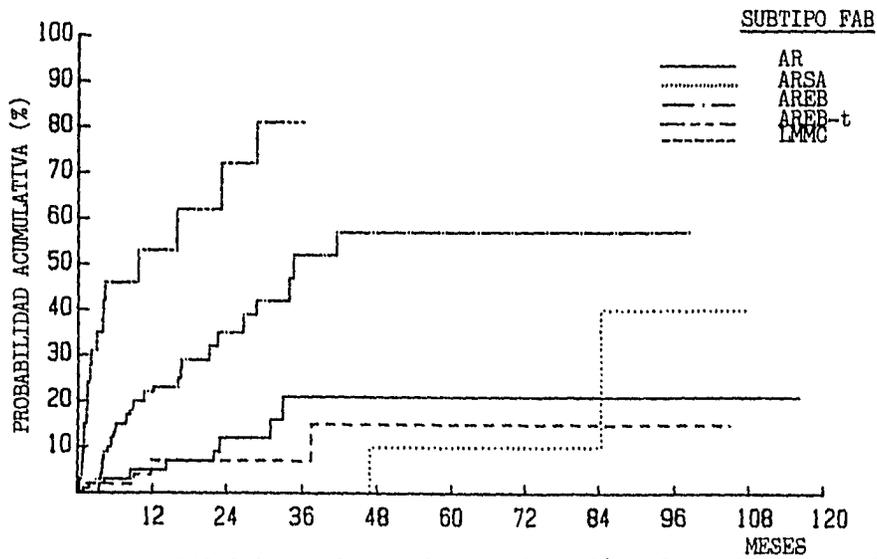


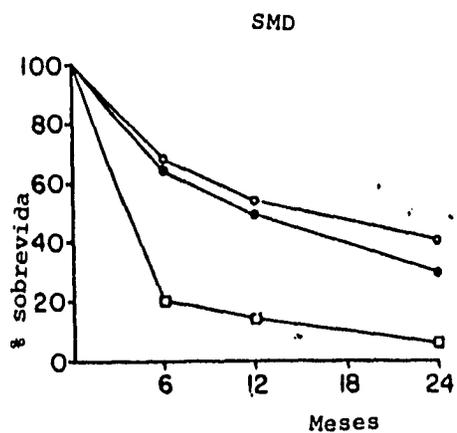
Fig. 5. Probabilidad acumulativa de transformación a leucemia de acuerdo a la clasificación del FAB en los pacientes con SMD.

En la figura 5 se relaciona el riesgo de transformación a leucemia con respecto a los subtipos del FAB, determinándose que pacientes con los subtipo AREB y AREB-t tienen un periodo de evolución a LMA más corto con respecto a los otros subtipos (29,31,55).

Otra relación importante es la sobrevida con respecto a las anormalidades cromosómicas presentes.

En la figura 6 se observa que pacientes que no presentan anormalidades cromosómicas o que sólo presentan una tienen un periodo de sobrevida mayor, respecto a aquellos con múltiples anormalidades cromosómicas (54). También es importante señalar que dentro de los diferentes, subtipos AREB y AREB-t se caracterizan por tener múltiples anormalidades cromosómicas, y que además son los de mayor riesgo de transformación a LMA (29,31,55,59).

Fig.6 Porcentaje de sobrevivida respecto a las anomalías cromosómicas (54).



- sin anomalías cromosómicas
- anomalía cromosómica única
- anomalías cromosómicas múltiples

FALTA PAGINA

Nº 45 a la 

2.12 ANALISIS MOLECULAR EN SMD

Los Síndromes Mielodisplásicos primarios, comprenden un grupo de desórdenes hematopoyéticos, caracterizados por defectos en la maduración megacariocítica, mieloide y eritroide, reflejando una citopenia progresiva. Es por ello que varios autores han intentado determinar las posibles etiologías de la enfermedad. Una de ellas es determinar el origen de la clonalidad de las aberraciones cromosómicas expresadas en dichos desórdenes hematológicos (18).

Se estudiaron 10 pacientes con SMD en los cuales se detectaron mutaciones puntuales somáticas de la familia de oncogenes ras. Estos implicaban la sustitución de un nucleótido en los codones 12 ó 13. Estas alteraciones genómicas sirvieron como marcadores clonales de diferentes poblaciones celulares. Detectando polimorfismos de DNA ligados al X y mutaciones en oncogenes ras como marcadores, se concluyó que la enfermedad es consecuencia de mutaciones somáticas que afectan a las células pluripotenciales comunes a las líneas linfoide y mieloide. (18).

2.12.1 Protooncogen RAS

La activación de proto-oncogenes representa un evento importante en el desarrollo de SMD, entre estos se encuentran los genes de la familia ras, la cual consta de 3 grupos de genes relacionados N-ras, K-ras y H-ras. Estos codifican para una proteína intermembranal

homóloga, una GTPasa de 21 KD de peso molecular. Los protooncogenes **ras** adquieren su potencial oncogénico cuando ocurre una mutación puntual en los codones 12, 13 o 61, resultando una sustitución de un aminoácido en la proteína homóloga. Esta proteína participa en la transducción de señales de ligandos extracelulares para el control de la proliferación celular. Estas mutaciones se han reportado en 6-40% de los SMD principalmente en el subtipo LMMC (65). Otros estudios han mostrado una relación entre la presencia de una mutación en **N-ras** y el riesgo de progresión a LMA, observando que la mutación no es un evento único para dicha evolución, sino que además deben existir otros factores que aumenten el riesgo de progresión (66).

Hirai (67) observó en dos casos que en la proliferación de blastos estos contenían la mutación en el codón 13 de **N-ras** y además estos pacientes evolucionaron a LMA por lo que sugirió que una mutación en **N-ras** es un rasgo que precede a la transformación a LMA (67).

Bar-Eli (68) demostró que el porcentaje de mutaciones varía dependiendo de la técnica utilizada. En sus resultados la frecuencia de mutación en una base del codón 12 de **N-ras**, aspartato por glicina, fue de 20-25% en pacientes con SMD (68).

Utilizando la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se encontró que las células de MO de estos pacientes presentaban al gen **N-ras** activo durante el proceso de conversión de SMD a LMA. Esto sugirió que las anormalidades cromosómicas podrían

preceder a la activación de N-ras y que ambos eventos contribuyen al desarrollo de la leucemia (68).

Lubbert y cols, (69) por la técnica de PCR realizaron un trabajo en el cual observaron mutaciones puntuales en las que participaba N-ras, y asociaron la activación de N-ras con los subtipos más agresivos de SMD y con pacientes con LMA. Encontraron que pacientes con SMD con monosomía 7 tenían mutaciones en N-ras y que algunos con LMA y monosomía 7 no la presentaban. Siguiendo el curso de la enfermedad en algunos casos se vió que en el estado de SMD tenían la mutación y al evolucionar a LMA algunos no la presentaban. Concluyendo que las mutaciones ras no son un evento necesario para la transformación a leucemia, pero que si son importantes en los estados preleucémicos para su evolución a LMA (69).

Hamen van Kamp y cols, (70) realizaron un estudio longitudinal en puntos donde se detectaron mutaciones del protooncogen N-ras en pacientes con SMD y se encontraron implicados los codones 12, 13 y 61, dos de ellos adquirieron la mutación durante la enfermedad y se asoció con un rápido deterioro y la progresión a leucemia, y el tercer paciente se mantuvo sin cambios durante 5 años. Sus resultados mostraron que la activación del proto-oncogene N-ras en los tres casos representa un fenómeno secundario asociado con la progresión de la enfermedad en algunos casos, pero compatible con la estabilidad de la enfermedad en otros (70).

2.12.2 Protooncogen FMS

Otro protooncogen que se ha asociado a SMD es el *fms*, el cual codifica para el receptor del CSF-1 se ha observado que en una mutación se implica el codon 301. El producto del gen es una proteína de superficie, la cual se expresa en líneas celulares de macrófagos y monocitos. Posee una actividad de tirosina cinasa. la cual está implicada en la proliferación celular autónoma. Debido a que el gen *fms* se encuentra localizado en la banda q31 del cromosoma 5, la pérdida de uno de los alelos *fms* ha sido demostrada en pacientes con AR y del (5q) (13,71).

2.12.3 Rearreglo oncogénico *bcr/abl*

El gene *abl* es miembro de una familia de genes que codifican para proteínas no receptoras con actividad de tirosín cinasas. Este gen *abl* ha sido mapeado en la región q34 del cromosoma 9, y el gen *bcr* en la región q11 del cromosoma 22. Ambos genes tienen su primer exon excepcionalmente largo, el primero cuenta con 200kb, y el segundo con 68kb. El producto de la fusión de estos genes *bcr/abl* es un RNAm que codifica para una proteína con actividad de tirosín cinasa (72).

Se han reportado casos de pacientes con SMD que presentan la aparición del cromosoma Ph principalmente en el subtipo AREB sin otro tipo de anormalidades cromosómica, lo que se ha asociado con una rápida progresión a leucemia (73,74).

2.12.4 Gen tumor supresor p53

En 1973 Tooze (75) realizó experimentos infectando un cultivo celular con (SV40) y observó que estas células tenían la habilidad de replicarse y producir tumores en animales singénicos. El virus tenía un oncogene que codificaba un producto que le confería el potencial de crecer aceleradamente a las células transformadas, al que llamaron Antígeno tumoral de células T. El antígeno T viral expresado en las células tumorales llevaba a la producción de anticuerpos que reconocían esta proteína. Por métodos de inmunoprecipitación se separó del antígeno T viral una proteína de 53000 daltons (p53) (75). Después se demostró que el antígeno T de SV40 podía regular los niveles de p53 en cultivos celulares. A una temperatura de 32°C a la cual el antígeno T de SV40 es sensible a sufrir mutaciones, encontrándose niveles altos de p53. Cuando el crecimiento celular se hizo a 39°C, a la cual el antígeno T de SV40 no es funcional y donde no hay transformación, los niveles de p53 fueron bajos (76).

Reich (77) observó que los tumores causados por virus, sustancias químicas o espontáneos que tenían la capacidad de transformar a la célula, producían o contenían niveles altos de la proteína p53. La mayoría de los mecanismos de regulación de los niveles de p53 en células normales o transformadas de alguna manera modulaban la estabilidad o la vida media de p53. Las células normales tenían niveles bajos de p53 con una vida media de cerca de 20 minutos, y las células transformadas frecuentemente tenían niveles de p53 altos con

una vida media de horas (77).

Raycroft en 1990 (78) plantea dos observaciones para explicar el funcionamiento de p53. la primera es que p53 participa como factor de transcripción, y la segunda como una proteína que regula los factores de transcripción en la célula (78).

Lane y Benchimol (79) plantean que p53 podría regular directa o indirectamente los genes o productos esenciales para entrar a la fase S del ciclo celular. Algunas evidencias indican la participación de p53 en la replicación del DNA o en la iniciación de la replicación regulando la unión al DNA de algunos complejos de replicación en la célula (79).

Rovinski (80) realizó estudios de tumores en modelos murinos con eritroleucemia inducidos por la infección del virus Friend, los cuales indicaron que la mutación de p53 elimina la función de éste, si ocurre en ambos alelos (80). En estas células ambos alelos de p53, pueden sufrir deleciones, inserciones o rearrreglos, los cuales sugieren la pérdida de la función selectiva en el tumor. En algunos casos un alelo mutado daría una proteína alterada y el otro alelo se pierde o se inactiva. Por estas observaciones se postuló que p53 podría actuar como un gene tumor supresor (81,82).

Ahora se conoce a p53 como un gene tumor supresor el cual actúa como un factor de transcripción que puede activar la expresión de algunos genes, y reprimir la transcripción de otros (79).

La fosfoproteína nuclear p53, es codificada por un gene mapeado en el cromosoma 17 en la región p13. y es considerada un regulador del

crecimiento celular y su inactivación podría constituir una etapa importante en la progresión de las neoplasias. Los principales puntos de mutación caen en un grupo de 5-8 exones donde se encuentran las 4 regiones filogenéticamente conservadas de p53 (79).

Jonveaux y cols. (83) realizaron un estudio, en el que observaron cambios citogenéticos que implicaban el brazo corto del cromosoma 17 en pacientes con SMD. En este trabajo se encontró una mutación de p53 en 5 de 151 (3.3%) pacientes con SMD. La mayoría de estas mutaciones están localizadas en regiones altamente conservadas entre especies. Las mutaciones ocurrieron exclusivamente en el par de bases Guanina - Citosina, donde se generó una transversión C por G y la transición G por A. Los 5 pacientes con la mutación en p53 tenían los subtipos AREB, AREB-t, LMMC con anormalidades cromosómicas múltiples. Además tres progresaron a LMA y el tiempo de sobrevida fue en promedio de 7 meses. El papel de la mutación en p53 en el desarrollo de SMD y su progresión no es una asociación definida (83).

2.12.5 ANALISIS MOLECULAR DEL CROMOSOMA 5

Las anormalidades del cromosoma 5 se han observado en 15% de los pacientes con SMD. La variabilidad de los puntos de ruptura que se muestran en la delección del cromosoma 5, sugiere que el evento es fundamental en la transformación maligna por la pérdida de secuencias

críticas de DNA. La deleción de este cromosoma se considera necesaria pero no suficiente para la transformación a leucemia (67). Estos

desórdenes tienen una variedad de manifestaciones clínicas, desde síntomas mínimos hasta estados más agresivos (84)

Los genes que codifican para factores de crecimiento y/o receptores para los mismos han sido mapeados en la región crítica de 5q, incluyendo la interleucina-3 (IL-3) y GM-CSF (5q23-31), receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), el receptor para andrógenos beta (Beta2 AR) y el factor de crecimiento endotelial (ECGF) (5q31-32). Otros genes mapeados en 5q23-31 son EGR1 el cual codifica para una proteína que actúa como factor de transcripción, además de un gen que codifica para CD14, el cual es un antígeno de membrana de células mieloides. Estos genes están deletados en pacientes con 5q- (85).

Huebner (85) determinó que el Factor Estimulador de Colonias (CSF) es una proteína que se requiere para la proliferación y diferenciación de progenitores celulares. Por una tinción diferencial en colonias derivadas de MO estimuladas por el Factor Estimulador de Colonias Granulocitos-Monocitos (GM-CSF), demostró que induce el crecimiento de colonias granulocíticas, granulocitos-macrófagos y eosinófilos. El metabolismo oxidativo en los neutrófilos es aumentado por GM-CSF. Sugiriendo una importante participación de éste mediador en la producción y función de granulocitos para la defensa del huésped.

El gene GM-CSF fué aislado de DNA normal para determinar su organización estructural. Utilizando DNA recombinante además de

hibridización "in situ" se localizó este gene en la región 5q21-5q32, la cual está implicada en la deleción intersticial de los SMD (85).

Boulwood y cols. (86) analizaron DNA de 10 pacientes con SMD que tenían deleción parcial del brazo largo del cromosoma 5, en éstos no se detectaron posibles rearrreglos en la estructura del gene GM-CSF. La sensibilidad de la técnica de Southern es suficiente para detectar rearrreglos de genes en una población celular menor a 5% y como los SMD son un desorden clonal se consideró que cualquier aberración en este gene debería ser detectada de existir. Cheng (87) propone que un rearrreglo en el gene del GM-CSF se podría usar como marcador de clonalidad en Leucemias agudas. Sin embargo, se desechó la idea de ser usado como marcador clonal, debido a que la estructura del gene GM-CSF fué normal en los pacientes con 5q-. Se propuso la hipótesis de que la deleción de un alelo puede enmascarar un alelo mutado en el cromosoma 5 homólogo (87).

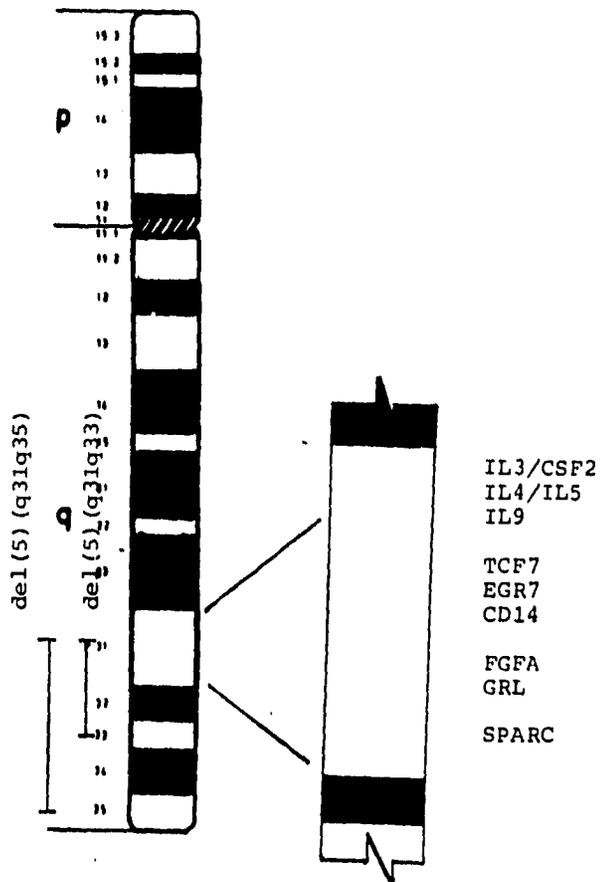
Además se han localizado los genes de la Interleucina-4 (IL-4 factor estimulador de células B) y la Interleucina-5 (IL-5, la cual es un factor de diferenciación y estimulador de colonias de eosinófilos) en la región crítica del cromosoma 5 q23-31 (88).

Neuman y cols (89) han propuesto que esta región contenga además un gene tumor-supresor que también esté implicado en la deleción. Utilizando la técnica de Southern e hibridización "in situ" fluorescente (FISH) se construyó un mapa dividido en cuatro regiones, esperando localizar genes en base a marcadores que ya han sido

mapeados. Con esto se determinó la distancia entre los genes localizados, observándose que los genes de IL-3, CSF2, IL4 e IL5 se encuentran en una región de 9kb (89).

En la figura 8 se muestra un esquema del cromosoma 5 en el cual se señalan los puntos de ruptura y los genes implicados.

Fig.8 Región crítica de 5q que muestra la localización de los genes (84).



IL Interleucina
 CSF Factor estimulador de colonias
 TCF7 Factor de transcripción de células T
 EGR Proteína de respuesta al crecimiento temprano
 CD14 Antígeno asociado a la diferenciación mieloide
 FGFA Factor de crecimiento de células endoteliales
 GRL Receptor de glucocorticoides
 SPARC Osteonectina

2.13 TRATAMIENTO

En los SMD se desconoce su fisiopatogenia exacta por lo tanto, hasta el momento no se tiene un tratamiento específico contra este desorden hematológico. Es por ello que se recurre a tratamientos que mejoren la calidad de vida de los pacientes.

2.13.1 TRANSFUSIONES

Este tratamiento mantiene a los pacientes con niveles óptimos de hemoglobina, sin embargo no en todos los casos es posible aplicarlo. Los pacientes con los subtipos AR y ARSA son los que mejor responden. Aunque no se debe abusar ya que estos pacientes no pueden eliminar el hierro que se transfunde, provocando una sobrecarga del mismo, teniendo alteraciones en múltiples órganos, siendo los más afectados el hígado y miocardio. Además existe el riesgo de transmisión de enfermedades virales e isoinmunización.

El uso de plaquetas en los pacientes con SMD está indicado sólo en caso de sangrado de órganos vitales como en sistema nervioso central y aparato respiratorio. En este caso tampoco se tiene una cifra ideal que indique el uso de transfusiones, se recomienda que el paciente sea transfundido con plaquetas de donador familiar y de preferencia con el método de plaquetoféresis (90).

2.13.2 TERAPIA HORMONAL. Los corticoesteroides fueron recomendados inicialmente en pacientes con SMD. Sin embargo estas drogas fueron contraindicadas porque incrementaban la susceptibilidad a infecciones (91).

2.13.3 INTERFERON. El interferon tiene una gran utilidad clínica en el tratamiento de tumores, leucemia granulocítica crónica, leucemia de células peludas. Sin embargo, en el tratamiento de los SMD no ha mostrado ser útil, en algunos estudios que se han realizado utilizando Interferon alfa recombinante no se ha observado ningún tipo de respuesta y sí mucha toxicidad (91,92)

2.13.4 QUIMIOTERAPIA. Tomando en consideración que estos son padecimientos clonales malignos, se ha usado la quimioterapia en idéntica forma y dosis a la que se utiliza para leucemia aguda. Los resultados son muy contradictorios, ya que en algunos informes se habla de hasta 60% de remisiones y en otros es menor a 10%. Se considera que el empleo de quimioterapia en los SMD sólo deberá hacerse en condiciones muy especiales (90,91).

2.13.5 ACIDO RETINOICO es un agente capaz de inducir la diferenciación de promielocitos malignos a células morfológica y funcionalmente normales de la serie mieloide.

La dosis empleada varía de 50 a 100 mg/día sin obtener una respuesta general. En dosis mayores a 100 mg se observaron efectos secundarios importantes (90,91).

En un trabajo realizado por Koeffler y cols. (93) estudiaron la acción de Acido 13 cis retinoico contra un placebo en pacientes con SMD en el cual se concluyó que éste no causó ningún beneficio en dichos pacientes (93).

2.13.6 DANAZOL. Stadtmuer (94), realiza un trabajo en el que pone de manifiesto la utilidad de este tratamiento. El Danazol es un andrógeno atenuado, su utilidad consiste en que detiene las hemorragias porque eleva los niveles de plaquetas. Además posteriormente se comprobó que el danazol podía ser útil porque modifica los requerimientos tranfusionales y prolonga la supervivencia de los pacientes (94).

2.13.7 TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA Este tratamiento es otra alternativa, ya que 50% de los pacientes tratados alcanzan una remisión completa, con regresión de las anormalidades cromosómicas y con una supervivencia superior a los 5 años. Deben considerarse puntos como el costo elevado, y la edad de los pacientes está restringida a menores de 50 años (<15% de lo pacientes con SMD) (90) sin embargo, en un reporte hecho por Appelbaun. (95) 3 pacientes mayores de 50 años respondieron al tratamiento teniendo una remisión completa.

Una buena respuesta depende no sólo de la edad, sino también de la histocompatibilidad del donador y del receptor en los que se realizan

estudios de HLA-A, B y DR por linfotoxicidad y de D por cultivo mixto de linfocitos. Además se requiere de regímenes preparativos del donador y del receptor con ciclofosfamida entre otros medicamentos. Entre los pacientes con mejor respuesta están los jóvenes, aunque también depende del subtipo implicado. Los subtipos menos agresivos como AR y ARSA tienen mejor respuesta que los subtipos más agresivos como AREB, AREB-t y LMMC. Sin embargo, debe considerarse que este es un procedimiento de costo elevado. En nuestro país este tratamiento está muy restringido (90,91,95,96).

2.13.8 MODIFICADORES BIOLÓGICOS. Estos son los que ofrecen más expectativas. Primero porque en los SMD existe una alteración de la maduración de la hematopoyesis y el uso de estas sustancias puede producir una maduración normal. En segundo término la toxicidad de dichos modificadores no es directamente sobre la MO y por lo mismo no produce mielosupresión grave (90).

2.13.8.1 ERITROPOYETINA. La eritropoyetina (Ep) regula la proliferación y diferenciación de células progenitoras eritroides, pero no se conocía con exactitud si actuaba sólo como factor de sobrevivencia o como mitógeno. En un trabajo realizado por Spivak y cols. (97) se utilizó una línea celular dependiente de eritropoyetina, (HCD-57) en la se midieron los efectos de esta hormona en diferentes fases de ciclo celular. La síntesis de DNA se midió después de la presencia de la hormona por la incorporación de timidina marcada. Se analizó el ciclo celular por citometría de flujo. El contenido de

DNA se incrementó después de la exposición a la Ep, lo que indica que actúa como mitógeno sobre esta línea celular (97).

En varios trabajos se ha intentado establecer la dosis de eritropoyetina recombinante que por vía subcutánea indique una buena respuesta en pacientes con SMD. Lo que se ha visto es que estas dosis varían desde 50 unidades(U) por Kg de peso hasta 640 U/Kg. Lo que se ha observado es que los pacientes responden a altas dosis de Ep tres veces a la semana incrementando los niveles de hemoglobina, lo que disminuye los requerimientos de transfusiones. Se ha observado que los subtipos menos agresivos son los que tienen mejor pronóstico, aunque existen excepciones, como en casos con AREB y AREB-t que también responden a la terapia (97,98,99).

2.13.8.2 FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE MACROFAGOS-GRANULOCITOS. (GM-CSFs). Los factores estimuladores de colonias son un grupo de glicoproteínas que regulan la hematopoyesis promoviendo la proliferación y la diferenciación de células hematopoyéticas progenitoras. El GM-CSF actúa a nivel de células pluripotenciales. También incrementa funciones de células mieloides tales como la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, e inhibición de la migración de neutrófilos. Se ha demostrado que induce la diferenciación de líneas de células leucémicas mieloides *in vitro* (100).

Con ayuda de la tecnología de DNA recombinante se ha podido producir una gran variedad de Factores estimuladores de colonias que se han empleado en investigaciones terapéuticas, empleándolos como promotores de la proliferación y maduración de progenitores hematopoyéticos normales en pacientes, recién transplantados (100).

En pacientes con SMD, en los que existe una maduración mieloide inefectiva, se ha intentado establecer la dosis terapéutica por lo que se han administrado cantidades desde 5 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ vía intravenosa, hasta 12 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$. La respuesta a dosis bajas es mejor, mejorando los niveles de neutrófilos y de leucocitos, disminuyendo los riesgos de infecciones, y en algunos pacientes reduciendo las requerimientos de transfusiones mejorando la calidad de vida. También se observó que con dosis altas de estos factores se incrementaba el riesgo de toxicidad extramedular. Este tratamiento es el que mejor responde a las necesidades de los pacientes, ya que 50 a 80% de ellos responden mejorando su pronóstico de vida (101,102,103).

3. MATERIAL Y METODOS

Se recibieron muestras de SP y/o MO de 35 pacientes con SMD; 3 del Hospital General de México SSA. y 32 del Centro Médico Nacional S XXI en el periodo comprendido entre 1991-1993. Las muestras heparinizadas se tomaron antes de que el paciente recibiera tratamiento. Las muestras de mo fueron procesadas por la técnica directa de Hozier y Linqvist (104) y las de SP por técnica de cultivo según Moorhead modificada (105).

Las preparaciones se analizaron con técnica bandas GTG (47).

Se leyeron de 5 a 15 metafases y algunos casos se analizaron por fotografía. Los SMD se clasificaron de acuerdo al FAB y se correlacionaron con las alteraciones citogenéticas.

CARIOTIPO EN MEDULA OSEA (104).

En un tubo de ensaye se pone 9ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M. + 0.5ml de una solución de tripsina-EDTA al 0.25%. + 0.5ml de una solución de colchicina a una concentración final de 0.02 %. Agregar 1ml de la muestra de aspirado de MO heparinizada.

. Incubar a 37°C durante 1 hr 30 min.

. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min. Decantar el sobrenadante y resuspender el botón en agitación vigorosa y constante, se fija con una solución de 3 partes de metanol por una de ácido acético. Dejar incubar a temperatura ambiente durante 30 min.

. Centrifugar a 3000 rpm por 5 min, resuspender nuevamente con la solución fijadora en agitación constante. Repetir 10 veces.

. Se preparan las laminillas goteando la suspensión de células a una altura adecuado sobre portaobjetos desengrasados. posteriormente se tiñen con Giemsa (3ml de colorante de Giemsa + 47ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8) de 3-5 min.

. Se observan al microscopio y se preparan laminillas para tratarlas posteriormente con tecnica de bandas GTG.

CARIOTIPO DE LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA (105).

. La muestra de sangre periférica se toma en condiciones estériles y en una jeringa heparinizada.

. Poner en un frasco esteril, 5ml medio de cultivo McCoy suplementado (Para 100ml de medio poner 10 ml de suero de ternera fetal + 1ml de una mezcla de antibióticos penicilina 2, 000U/ml + estreptomycinina 275mg/ml). + fitohemaglutinina (PHA) como mitógeno. Las muestras se trabajan por duplicado.

. Incubar a 37°C 70 hrs, y adicionar 0.5ml de solución de colchicina al 0.02%. Incubar a 37°C 2 hrs.

. El cultivo se transfiere a tubos de centrifuga y centrifugar a 3000 rpm durante 5 min.

. Decantar el sobrenadante y resuspender paquete celular, y agregar 5 ml de solución hipotónica de KCl 0.075 M en agitación constante e incubar a 37°C por 30 min.

. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante y agregar gota a gota una solución fijadora (3partes de metanol por una parte de ácido acético), e incubar por 30 min a temperatura ambiente.

. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y decantar el sobrenadante. Repetir la operación unas 5 veces.

. Las preparaciones se realizan goteando los portaobjetos limpios a una altura adecuada. y se dejan secar al aire.

. Teñir las preparaciones con Giemsa de 3-5 min. (3ml de Giemsa + 47 ml de solución amortiguadora de fosfatos pH 6.8).

. Observar al microscopio. Dependiendo de la calidad y del caso se realizan bandas GTG.

BANDAS GTG

Las bandas G son consideradas como un bandeo positivo, son estructuras constituidas por heterocromarina intercalar que comprenden cerca del 50% de las crmátides. Se reconocen por sus

cualidades cromofílicas especialmente para colorantes básicos como el Giemsa, además son relativamente resistentes al calor y a la digestión de algunas enzimas proteolíticas. (49).

TECNICA DE BANDAS GTG

. Las preparaciones se dejan envejecer por una semana. las laminallas se colcan de 5-10 min según requiera el caso en una solución de tripsina al 1% (3ml de solución de tripsina + 47 ml de solución de fosfatos pH de 6.8).

. Lavar en solución salina isotónica y posteriormente en agua corriente. Teñir durante 1 min en Giemsa (3ml de colorante de Giemsa + 47 ml de solución de fosfatos pH 6.8), lavar y secar al aire.

. analizar al microscopio y seleccionar metafases bien bandeadas para su análisis y posterior fotografía si es necesario.

4. RESULTADOS

Se analizaron 35 casos de pacientes con Síndrome Mielodisplásico. El promedio de edad fué 55.5 en un rango de 13-85 años, con una mediana de 61 años. El 82% tenían una edad mayor de 40 años y 18% fueron menores de 40 años. La distribución por sexos fué 22 femeninos y 13 masculinos. En la figura 7 se muestra la distribución de los pacientes de acuerdo a la clasificación del FAB. En ella se observan 18 pacientes con AREB, 11 con AR, 2 con ARSA, 2 con AREB-t y 2 sin clasificación.

En la tabla 4 se muestran las las características clínicas de los pacientes clasificados de acuerdo al FAB, se señalan las alteraciones citogenéticas primarios y secundarias.

En la tabla 5 se muestra el tratamiento, la repuesta a éste, evolución y periodo de sobrevida de los pacientes. Los tratamientos empleados fueron: transfusiones sanguíneas (Tfs), Prednisona (Pred), Arabinosa C (Ara C) y Danazol (Dan). La más empleada fué una mezcla de tres medicamentos Prednisona-Arabinosa C-Vincristina (PAO). Su respuesta fué referida como estable (Et), sin respuesta (SR) y remisión completa (RC). El periodo de sobrevida varió de acuerdo a su evolución. En la figura 8 se muestra el porcentaje de los pacientes clasificados de acuerdo al FAB que evolucionaron a LMA.

Es importante señalar que solo 20 de los 35 pacientes (57%) recibieron tratamiento, el resto no regresó a consulta o falleció.

CLASIFICACION DE LOS PACIENTES DE ACUERDO AL FAB

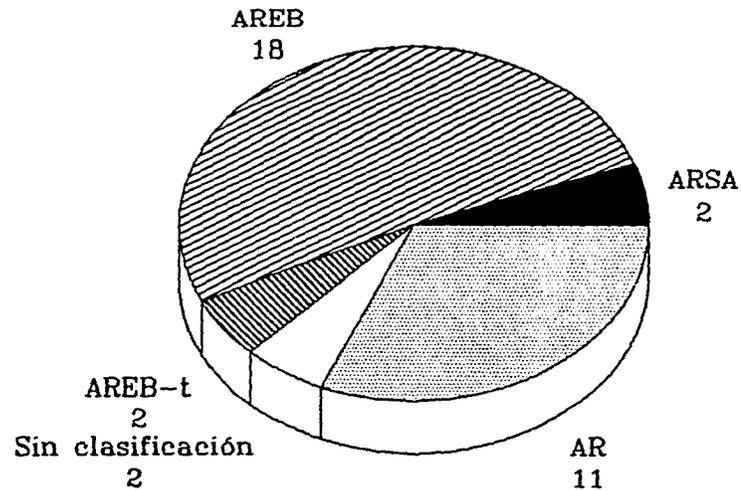


Figura 7

TABLA 4. CARACTERISTICAS CLINICAS Y CITOGENETICAS DE LOS PACIENTES CON SMD.

CASO E/S	SUBTIPO	MAT ANAL	CELS ANAL	CAR	No MIT A/N	ALTERACION PRIMARIA	ALTERACION SECUNDARIA
1	20/F	AR	MO	15	AN	7/8	
			SP	13	AA	13/0	
2	48/F	AR	MO	15	AN	8/7	
3	54/F	AR	SP	11	AN	10/1	
4	55/F	AR	MO	7	AN	4/3	
5	55/F	AR	MO	15	AA	15/0	
			SP	20	AN	11/9	
6	61/M	AR	MO	20	AA	20/0	
7	62/M	AR	MO	15	AN	9/6	hiper >50
8	63/F	AR	MO	15	AA	15/0	hiper >50
9	63/F	AR	MO	18	AN	6/12	+4
10	68/M	AR	MO	20	AN	15/5	
11	70/M	AR	MO	15	AN	11/4	
12	39/M	ARSA	MO	10	AN	8/2	hipo 43
13	58/F	ARSA	MO	15	AN	10/5	
14	15/M	AREB	MO	15	AN	7/8	
15	18/F	AREB	MO	17	AN	15/2	del(7q)(q32;q39)
16	34/F	AREB	MO	18	AA	18/0	
17	42/F	AREB	MO	11	AN	8/3	
			SP	8	AN	4/4	
18	57/M	AREB	MO	15	AN	9/6	hiper >50
19	58/F	AREB	MO	11	AA	11/0	
20	62/M	AREB	MO	13	AN	6/7	hiper >50
21	63/M	AREB	MO	14	AN	8/6	del(7)(q34)
22	63/F	AREB	MO	15	AN	9/6	hiper 47-50
23	65/M	AREB	MO	15	AN	4/11	+18, +marc, 17q+
			SP	15	AN	3/12	
24	70/F	AREB	MO	18	AN	8/10	t(1;12)
25	70/M	AREB	MO	18	AN	11/7	-5
26	72/F	AREB	MO	15	AN	6/9	hiper >50
27	73/F	AREB	MO	13	AA	13/0	
28	75/F	AREB	MO	19	AN	5/14	hiper >50
29	78/F	AREB	MO	15	AN	10/5	2q+
30	80/F	AREB	MO	15	AN	9/6	2q+
31	85/F	AREB	MO	13	AN	10/3	+16
			SP	15	AN	12/3	hiper >50
32	40/M	AREB-T	MO	11	AN	8/3	del(5)(q34)
			MO	11	AN	8/3	del(5)(q34)
33	70/F	AREB-T	MO	14	AN	10/4	del(6)(q24ter)
34	13/F	?	MO	19	AA	9/10	hipo 43-45
35	30/M	?	SP	11	AA	7/4	del(q22)(q13ter)
							-7
							hiper >50
							12q+

E/S Edad/Sexo, MAT ANAL Material analizado, CEL ANAL Número de células analizadas, CAR Cariotipo, MIT Número de mitosis.

Subtipo según la clasificación del FAB. AA Anormal, AN Anormal/Normal, ? Se desconoce.

Tabla 5. Tratamiento y respuesta a la enfermedad.

No. CASO	TRATAMIENTO	RESPUESTA	EVOLUCION A LEUCEMIA	SEGUIMIENTO (MESES)
1	?	ET	⊖	6
2	PAO	SR	LMA	6
3	TFS/PRED	RC	⊖	18
4	?	SR	?	⊕
5	?	?	?	S/S
6	DAN	RC	⊖	11
7	DAN	RC	⊖	10
8	TFS	RC	⊖	36
9	PAO	SR	LMA	⊕
10	?	?	?	S/S
11	?	?	?	S/S
12	?	?	?	S/S
13	PAO	SR	LMA	S/S
14	ARA-C	SR	LMA	S/S
15	PALIATIVO	SR	LMA	S/S
16	PAO	SR	LMA	4
17	?	?	?	S/S
18	PAO	SR	LMA	6
19	PAO	SR	LMA	6
20	DAN	RC	⊖	S/S
21	ARA-C	SR	LMA	S/S
22	PRED/ARA-C	SR	LMA	5
23	?	?	?	⊕
24	PAO	SR	LMA	6
25	PAO	SR	LMA	S/S
26	DAN	SR	LMA	S/S
27	?	?	?	S/S
28	?	?	?	S/S
29	?	?	?	S/S
30	DAN	ET	⊖	S/S
31	TFS	ET	⊖	S/S
32	PAO	SR	LMA	S/S
33	?	SR	LMA	S/S
34	?	?	?	S/S
35	?	SR	LMA	S/S

? Se desconoce, ET Estable, ⊖ Sin cambio, PAO Prednisona Arabinosa-C Oncovin, SR Sin respuesta, LMA Leucemia micelóctica aguda, TFS Transfusiones, PRED Prednisona, RC Remisión completa, ⊕ Defunción, DAN Danazol, S/S Sin seguimiento.

TRANSFORMACION EN LOS PACIENTES POR SUBTIPO DEL FAB

71

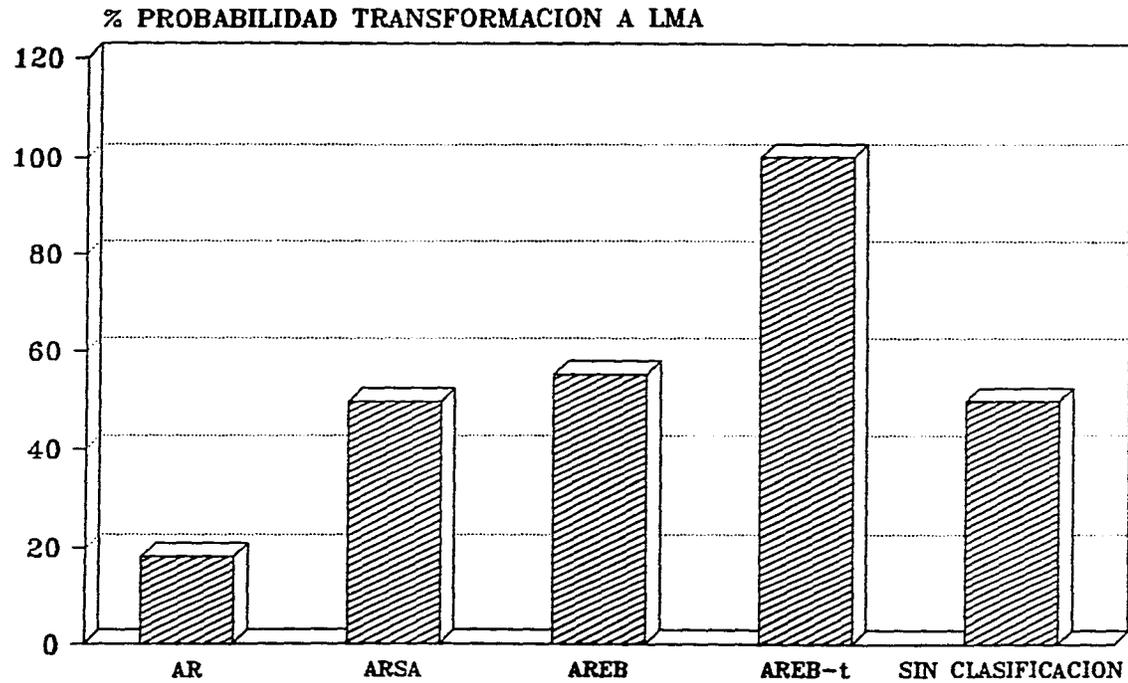


Figura 8

5. DISCUSION Y CONCLUSIONES

De acuerdo al FAB los SMD se dividen en 5 subtipos en base a sus características clínicas y citoquímicas. El tratamiento y pronóstico de los pacientes depende del subtipo de la enfermedad (10,15).

De acuerdo a nuestros resultados observamos que de 35 pacientes, 22 fueron mujeres y 13 hombres. No se ha reportado alguna asociación del sexo con la presentación o la evolución de los pacientes (15).

La edad sí es un factor pronóstico importante asociado a los SMD (31). En nuestros pacientes la edad promedio fué de 55.5 años con un rango de 13 a 85, de éstos 8 tenían menos de 50, de los cuales 37.5% evolucionaron a leucemia aguda. De los 35 pacientes 27 fueron mayores de 50 años, de éstos 55.5% evolucionaron a LMA. Esto concuerda con lo reportado que indica que los pacientes mayores de 50 años tienen una propensión mayor al desarrollo de la enfermedad y además presentan un alto riesgo de transformación a un subtipo mas agresivo o a leucemia aguda (31).

En los 35 casos se observaron anomalías citogenéticas. En 9 pacientes (24.2%) se encontró cariotipo anormal en todas las células y en 26 pacientes cariotipo mixto, de los cuales 68.6% (22 casos) tenía mayor número de células anormales y el resto de células normales.

Las anormalidades primarias de tipo numérico se presentaron en 34.28% (12) de los casos y en 65.71% (23) eran de tipo estructural. Además es importante señalar que también se presentaron anormalidades

secundarias en 40% de los casos, de los cuales en 78.5% (11 casos) fueron de tipo numérico y el resto (3 casos) de tipo estructural.

Las anomalías cromosómicas encontradas en SMD se asocian con los diferentes subtipos de acuerdo a la clasificación del FAB. También se han correlacionado con su evolución y pronóstico. Entre las anomalías más frecuentemente reportadas están: la monosomía parcial o total del cromosoma 5, la cual se ha observado en los subtipos ARSA, AREB y AREB-t con una frecuencia de 30 - 70%, su periodo de supervivencia mayor de 18 meses su evolución a LMA es raro (55,61).

La monosomía 7 y/o del(7q) se ha reportado como una aberración común en SMD secundario y en pacientes pediátricos con SMD.

Otra anomalía frecuentemente reportada en los SMD es la trisomía 8 se ha encontrado principalmente en los subtipos ARSA, LMMC y AREB con una frecuencia de 15-25%, su evolución a LMA es frecuente con un periodo de supervivencia de 18 meses (55,61).

Las anomalías cromosómicas primarias con mayor frecuencia encontradas en nuestros pacientes fueron:

La del 5(q-) en 5 pacientes de los cuales uno presentó el subtipo AR (caso 10) sin recibir tratamiento. Otro tenía el subtipo ARSA (caso 12) no regresó para su seguimiento. Los tres restantes tenían el subtipo AREB de éstos uno (caso 31) se mantuvo estable solo con transfusiones, otro sin tratamiento, y el tercero (caso 14) fué

tratado con Ara-c que evolucionó a LMA manteniéndose en mal estado. Cabe señalar que este paciente tenía 15 años, y de acuerdo a lo referido en la literatura se esperaba un mejor pronóstico como respuesta al tratamiento (31).

En tres pacientes con AREB se encontró monosomía 5 de éstos dos (casos 16 y 24) fueron tratados con PAO y evolucionaron a LMA teniendo un periodo de sobrevida de 4-6 meses. El tercer paciente (27) no fué tratado.

La -5/del(5q) se observa con mayor frecuencia en el subtipo AREB 6 de 8 casos, esto concuerda con lo citado anteriormente. Aunque se ha reportado un pronóstico favorable en la literatura (51), en nuestros pacientes el pronóstico no es muy bueno ya que de los 6, 3 evolucionaron a LMA (51).

La del 7q- se encontró en 3 pacientes, de éstos uno tenía el subtipo AR (caso 1) y no fué seguido. Los dos restantes presentaron el subtipo AREB, de los cuales uno (caso 22) fué tratado con prednisona / Ara-c y evolucionó a LMA teniendo un periodo de sobrevida de 5 meses, el otro (caso 17) se desconoce el tratamiento pero se mantuvo estable.

En 4 pacientes se presentó monosomía 7, 3 tenían el subtipo AREB, de los cuales dos (casos 19,25) fueron tratados con PAO y evolucionaron

a LMA teniendo un periodo de sobrevida de 4-6 meses. El tercero (caso 30) se trató con Danazol y se mantuvo estable, el cuarto paciente (caso 33) con el subtipo AREB-t evolucionó a LMA antes de recibir tratamiento y falleció.

De 7 casos que presentaron la anomalía $-7/del17q$ 5 tenían el subtipo AREB de los cuales 3 evolucionaron a LMA, cabe mencionar que uno de los pacientes (caso 1) tenía 20 años y se mantuvo estable aunque no se tuvo seguimiento, los demás tenían una edad mayor de 50 años. Según lo reportado en la literatura ésta anomalía es frecuente en pacientes pediátricos (51), sin embargo en nuestros pacientes ninguno tenía menos de 13 años. El pronóstico de los pacientes con SMD no es favorable, ya que su frecuencia de evolución a LMA es de 20-30% (55,61).

Se observó la hiperdiploidía con > 50 cromosomas en 5 pacientes, uno de ellos (caso 4) tenía el subtipo AR y falleció. Los otros 3 presentaron el subtipo AREB de éstos uno (caso 15) fué tratado con un paliativo y otro (caso 18) con PAO, ambos evolucionaron a LMA. El tercero fué tratado con Danazol y se encuentra en remisión completa. El quinto (caso 34) se desconoce el subtipo y el paciente no regresó. Entre mayor son los cromosomas afectados el pronóstico en los pacientes es más pobre. En la literatura no se ha reportado la hiperdiploidía > 50 como una anomalía característica de los SMD, sin embargo ésta se puede presentar en otras enfermedades hematológicas principalmente en LLA (51).

La hipodiploidía fué encontrada en 2 pacientes con AR uno de ellos (caso 2) con 31-35 cromosomas fué tratado con PAO y desarrolló LMA con un periodo de sobrevida de 6 meses. El otro (caso 9) con 26-45 cromosomas fué tratado con PAO y evolucionó a LMA con un periodo de sobrevida de 6 meses.

Tampoco esta anomalía es característica de los SMD en general se asocia con mal pronóstico y en otras anomalías hematológicas (51). En nuestro grupo los dos pacientes que la presentaron evolucionaron a LMA, porque parecería asociarse con mal pronóstico, Para unificar esto sería importante el seguimiento de estos casos y el análisis de otros.

Se encontraron anomalías que implican al cromosoma 17 en 2 pacientes, uno con AR (caso 11) $t(4;17)(q32;q22)$ que no regresó para su tratamiento. El otro (caso 21) con subtipo AREB y cariotipo 46, XY, $t(12;17)(q21;q11)$ fué tratado con ARA-C, y evolucionó a LMA desconociéndose su periodo de sobrevida.

Las anomalías que involucran al cromosoma 17 no son frecuentes en los SMD. Sin embargo se han observado con una frecuencia de 5-10% en todos los subtipos según la clasificación del FAB, su evolución a LMA es frecuente. Se piensa que este cromosoma es importante ya que se ha asociado con la pérdida de la función del gen tumor supresor p53 (51).

A pesar de que la trisomía 8 se reporta como una de las anomalías más frecuentes en SMD, principalmente en los subtipos ARSA, AREB y LMMC (51,61), nosotros solo la encontramos en un caso (caso 22) de AREB como anomalía secundaria. Este paciente fué tratado con Pred/Ara-c y evolucionó a LMA con un periodo de sobrevida de 5 meses. El pronóstico de estos pacientes según la literatura no es bueno por su frecuente evolución a LMA (51).

La delección 6(q23) se encontró en tres pacientes 2 con AR, uno de ellos (caso 5) no regresó para su seguimiento, el otro (caso 8) fué tratado con transfusiones sanguíneas manteniéndose estable. El tercero (caso 32) con subtipo AREB-t fué tratado con PAO, evolucionó a LMA y falleció.

Esta anomalía se ha reportado en 5-10% de los casos de LMA y el punto de ruptura 6q21-24 se ha asociado con el oncogen c-myb, sin embargo esta alteración es rara en los SMD y se desconoce su evolución. En nuestros pacientes no se correlacionó la evolución con la anomalía citogenética (51).

El caso 26 tuvo t(6,9)(p23,q34) este paciente fué tratado con danazol, evolucionó a LMA y se desconoce su periodo de sobrevida. Esta se ha encontrado frecuentemente en SMD con una rápida progresión LMA. Los pacientes son jóvenes y pueden presentar basofilia en MO (61), sin embargo nuestro paciente tenía más de 50 años.

Otras anormalidades encontradas no frecuentes en SMD.

La $t(2:18)(q34,q11)$ (caso 3) que se trató con transfusiones manteniéndose estable y con un periodo de sobrevida > de 18 meses.

En el caso 6 se encontró una $t(7,11)(q22,q23)$, fué tratado con Danazol y entró en remisión completa con un periodo de sobrevida > 11 meses.

En el caso 7 se identificó una $t(2,5)(q32,q34)$ y se trató con Danazol este paciente entró en remisión y su periodo de sobrevida de 10 meses.

Se observó monosomía 12 en el caso 13, el cual recibió PAO como tratamiento, evolucionó a LMA y tuvo un periodo de sobrevida de 3 meses. No se ha reportado en la literatura como frecuente en los SMD (55,61). Otro caso (35) del cual se desconoce el subtipo tenía $12q+$, se desconoce su tratamiento, evolucionó a LMA.

Un derivado $2q+$ se observó en los casos 28 y 29, ambos tenían el subtipo AREB, se desconoce su seguimiento.

Como anormalidades secundarias se encontraron: hiperdiploidía > 50 cromosomas (casos 6,7,21,24,26,30) de éstos el 21,24,26 evolucionaron a LMA. Otras anormalidades secundarias fueron la hipodiploidía en los casos 12 y 32 de éstos uno evolucionó a LMA y del otro se desconoce

su seguimiento. La del 7(q32,q39) casos 14 y 20 uno evolucionó a LMA y el otro entró en remisión. Con menor frecuencia se encuentran las anormalidades del caso 8 con una trisomía 4, se mantuvo estable. el caso 22 con trisomía 8, evolucionó a LMA. La trisomía del caso 16 se desconoce su tratamiento.

De 14 casos que presentaron anormalidades cromosómicas secundarias, 9 tenían el subtipo AREB de éstos 5 evolucionaron a LMA. Es importante señalar que a mayor número de anormalidades aumenta el riesgo de evolución a LMA y por lo tanto el pronóstico no es bueno.

Nuestros pacientes con los subtipos más agresivos como AREB y AREB-t fueron los que presentaron mayor propensión de evolución a unaleucemia aguda. Tal como se ha reportado (55,61) las anormalidades reportadas en la literatura son las mismas encontradas en nuestros pacientes, sin embargo, su respuesta a los diferentes tratamientos empleados no está bien definida ya que no se tienen parámetros de dosis-respuesta a los medicamentos y que los pacientes responden de diferente manera. Es importante señalar la importancia de los estudios citogenéticos en estos pacientes ya que dependiendo del resultado se realiza el tratamiento y su posterior seguimiento. El establecimiento temprano del diagnóstico de la enfermedad ayuda a proporcionar mayor oportunidad del empleo de tratamientos que ayuden en el mejoramiento de la calidad de vida.

ESTA TESIS NO DEBE
79 SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Rhoads CP, Barker WH. Refractory anemia: an analysis of one hundred cases. *JAMA* 110:794-796,1938.
- 2.-Hamilton-Peterson JL. Pre lleukemic anemia. *Acta Haematol* 2:309-316,1949.
- 3.-Block M, Jaccb LO, Bethard WF. Preleukemic acute human leukemia. *JAMA* 152:1018-1028,1953.
- 4.-Bjorkman SE. Chronic refractory anemia with sideroblastic bone marrow. A study of four cases. *Blood* 11:250-259,1956.
- 5.-Rheingold JJ, Kaufman R, Adelson E. Smoldering acute leukemia. *N Engl J Med* 268:812-815,1963.
- 6.-Dameshek W. DiGuglielmo syndrome revisited. *Blood* 34:567-572,1969.
- 7.-Saarni MI, Linman JW. Preleukemia: the hematologic syndrome preceding acute leukemia. *Am J Med* 55:38-48,1973.
- 8.-Dreyfus B. Preleukemic states I. Definition and classification. II.Refractory anemia with an excess of myeloblast in the bone marrow (smoldering acute leukemia). *Blood Cells* 2:33-35,1976.
- 9.-Bennett JM,Catovsky D, Daniel M-T. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 33:451-458,1976.
- 10.-Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T. Proposals for the classification of the myelodysplatic syndrome. *Br J Haematol* 51:189-199,1982.
- 11.-Seigneurin B. Refractory anemia with excess of blast in trnsformation: is a new category necessary? *Br J Haematol* 55:196-197,1983.
- 12.-Nimer DS, Golde WD| The 5q- abnormality. *Blood* 70:(6),1705-1712,1987.
- 13.-Ridge AS, Worwood M,Oscier D, Jacobs A, Padua AR. FMS mutations in myelodysplastic, leukemic and normal subjects.*Proc Natl Acad Sci USA* 87:1377-1380,1990
- 14.-Jacobs A, Gene mutations in myelodysplasia. *Leukemia Res* 16:47-50,1992.

- 15.-Goasguen JE, Bennett JM. Classification and morphologic features of the myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol* 19:4-13,1992.
- 16.-Dacie JV, Smith MD, White JC. Refractory normoblastic anemia: a clinical and haematological study of 7 cases. *Br J Haematol* 5:56-82,1989.
- 17.-Fialkow JM, Denham AM, Jacobson RL, Lowenthal MN. Chronic myelogenous leukemia: origin of some lymphocytes from leukemic stem cells. *J Clin Invest* 62:815,1978.
- 18.-Janssen JWG, Buschle M, Layton M, Drexler HG. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: evidence of multipotent stem cell origin. *Blood* 73:248-254,1989.
- 19.-Tefferi A, Thibodeau SN, Solberg LA Jr. Clonal studies in the myelodysplastic syndrome using X-linked restriction fragment length polymorphisms. *Blood* 75:1970-1973,1990.
- 20.-Nakauchi H, Gachelin G. Las células madre de la sangre. *Mundo científico* 13:619-623,1993.
- 21.-Doll DC, List AF, Dayhoff DA. Acanthocytosis associated with myelodysplastic. *J Clin Oncol* 7:1569-1572,1989.
- 22.-Juneja SK, Imbert M, Jouault H. Haematological features of primary myelodysplastic syndromes (PMDS) at initial presentation: a study of 118 cases. *J Clin Pathol* 36:1129-1135,1983.
- 23.-Gustke SS, Becker GA, Garancic CJ, Geimer FN, Piscotta VA. Chromatin clumping in mature leukocytes: a hitherto unrecognized abnormality. *Blood* 35: 637-658,1970.
- 24.-Van der Weide M, Sizoo W, Krefft J. Myelodysplastic syndromes: analysis of morphological features related to the FAB classification. *Eur J Haematol* 41:58-61,1988.
- 25.-Boogaerts MA, Nelissen V, Roelant C, Goossens W. Blood neutrophil function in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 55:217-227,1983.
- 26.-Wong KF, Chan JKC. Are dysplastic and hypogranular megakaryocytes specific markers for myelodysplastic syndromes? *Br J Haematol* 77:509-541,1991.
- 27.-Gatterman N, Aul C, Schneider W. Two types of acquired idiopathic sideroblastic anemia (AISA). *Br J Haematol* 74:45-52,1990.
- 28.-Tricot G, Vlietinck R, Boogaerts MA, Hendrickx B, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H, Verwilghen L. Prognostic factors in the myelodysplastic syndromes: importance of initial data on

peripheral blood counts, bone marrow cytology, trephine biopsy and chromosomal analysis. Br J Haematol 60:19-32,1985.

29.-Tricot G, Boogaerts MA, De Wolf-Peeters C, Van Den Berghe H. The myelodysplastic syndromes: different evolution patterns based on sequential morphological and cytogenetic investigations. Br J Haematol 59:659-670,1985.

30.-Weisdorf JD, Oken MM, Johnson JG, Rydell ER. Chronic myelodysplastic syndrome: short survival without evolution to acute leukaemia. Br J Haematol 55:691-700,1983.

31.-Sanz FG, Sanz MA, Vallespi T, Cañizo C, Torrabadella M, Garcia S, San Miguel JF. Two regression models and a scoring system for predicting survival and planning treatment in myelodysplastic syndromes: a multivariate analysis of prognostic factors in 370 patients. Blood 74:395-405,1980.

32.-San Miguel JM, Hernández R, González, Sarmiento M, González I, Sánchez A, Orfao MC, Cañizo C, López B. Acute leukemia after a primary myelodysplastic syndrome: immunophenotypic, genotypic and clinical characteristics. Blood 78:768-774,1991.

33.-In Sook S, Lung TY, Chin-Yang L, Myelodysplastic syndrome: diagnostic implications of cytochemical and immunocytochemical studies. Mayo Clin Proc 68:47-53,1993.

34.-List AF, Jacobs A. Biology and pathogenesis of the myelodysplastic syndrome. Semin Oncol 19:14-24,1992.

35.-Gutierrez Romero M. Manual de hematología. Servicio de hematología del Hosp. de México. SSA. 1990.

36.-Scott CS, Cahill A, Bynue AG, Ainley MJ, Hough D, Roberts BE. Esterase cytochemistry in primary myelodysplastic syndromes and megaloblastic anemias: demonstrations of abnormal staining patterns associated with dysmyelopoiesis. Br J Haematol 55:411-418,1983.

37.-Mufti GJ, Stevens JR, Oscier DG, Hamblin TJ, Machin D. Myelodysplastic syndromes: a scoring system with prognostic significance. Br J Haematol 59:425-433,1985.

38.-Solé F, Pérez A, Woessner S, Olmedo E, Florensa L, Sans J. Isocrosoma 17q como única alteración en los pacientes con síndrome mielodisplásico y su relación con la actividad mieloperoxidasa. Sangre 36:323-325,1991.

39.-Kristensen JS, Hokland P. Monoclonal antibody ratios in malignant myeloid diseases: diagnostic and prognostic use in myelodysplastic syndromes. Br J Haematol 74:270-276,1990.

40.-Cazzola M, Barosi G, Gobbi PG, Invernizzi R, Ricardi A, Ascarì E. Natural history of idiopathic refractory sideroblastic anemia. Blood 71:305-312,1988.

- 41.-Clark RE, Hoy TG, Jacobs A. Myeloid surface antigen abnormalities in myelodysplastic syndromes. *J Clin Pathol.* 38:301-304, 1985.
- 42.-Sanz AM, Bennett JM, Vallespi T, Hoelzer D. The study and treatment of the myelodysplastic patient. *Rev Invest Clin (Méx)*, 1994.
- 43.-Becker MW, Deamer WD. Cellular aspects of cancer of The world of the cell, edit. The Benjamin/Cummings, pp 718-738, 1981.
- 44.-Farrow A, Jacobs A, West RR. Myelodysplasia, chemical exposure and other environmental factors. *Leukemia* 3:33-35, 1989.
- 45.-Goldberg H, Lask E, Moore J, Nowlle, Besa RC. Survey of exposure to genotoxic agents in primary myelodysplastic syndrome: correlation with chromosome patterns and data on patients without hematological disease. *Cancer Res* 50:6876-6881, 1990.
- 46.-Jacobs RH, Cornbleet MA, Vardiman JW, Larson RA, Le Beau MM, Rowly JD. Prognostic implications of morphology and karyotype in primary myelodysplastic syndromes. *Blood* 67:1765-1772, 1986.
- 47.-Verma Ram S. Human Chromosomes, Pergamon 45-108, 1989.
- 48.-Comings DE. Mechanisms of chromosome banding and implications for chromosome structure. *Ann Rev Genet* 12:25-46, 1978.
- 49.-Arana TRM. Estudio Citogenético en Pacientes con Leucemia Aguda. Tesis profesional. Facultad de Química U.N.A.M. 1990.
- 50.-Estop AM, Santaló J, Pérez MM, Freika L. Origen de las anomalías cromosómicas. *Medicine* 48:3042-3048, 1988.
- 51.-Geddes AD, Browen TD, Jacobs A. Clonal karyotype abnormalities and clinical progress in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 76:192-202, 1990.
- 52.-van den Berghe H, Cassiman JJ, Fryns JP, Michaur JL, Socal G. Distinct haematological disorder with deletions of long arm of no. 5 chromosome. *Nature* 251:437, 1974.
- 53.-Nimer SD, Golde DW. The 5q- anomaly. *Blood* 70:1705-1712, 1987.
- 54.-Nowel PC, Besa EC, Stelma T. Chromosome studies in preleukemia states, prognostic significance of single versus multiple abnormalities. *Cancer* 58:2571-2575, 1986.
- 55.-Nowel PC. Chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes. *Semin Oncol* 19:25-33, 1992.

- 56.-Gerritsen WR, Donohve J, Bauman J, Jhanwar SC, Kernan NA, Castro-Maspina H, O'Reilly RJ, Bourthis J-H. Clonal analysis of myelodysplastic syndrome: monosomy 7 is expressed in the myeloid lineage is detected fluorescent in situ hybridization. *Blood* 80:217-224,1992.
- 57.-Nair R, Athale VA, Lyer RS, Nair CN, Pai SK, Korkure PA, Kadam PR. Childhood myelodysplastic syndromes: clinical features, cytogenetics and prognosis. *Indian J Pediatr* 59:443-448,1992.
- 58.-Alitalo T, Willard HF, de la Chapella A. Determination of the breakpoints of 1;7 translocations in myelodysplastic syndrome by in situ hybridization using chromosome-specific alpha satellite DNA from human chromosomes 1 and 7. *Cytogenet Cell Genet* 50:49-53, 1989.
- 59.-Horiike S, Taniwak M, Misawa S, Nishigaki H, Okuda T, Yokota S, Kashima K, Inazawa J, Abe T. The unbalanced 1;7 translocation in de novo myelodysplastic syndrome and its clinical implication. *Cancer* 65:1350-1354,1990.
- 60.-Griffiths MJ, Kitche C, Willat LR. Loss of the Y chromosome from normal and neoplastic bone marrows. *Genes, Chromosomes Cancer* 5:83-88 1992.
- 61.-Heim S. Cytogenetics findings in primary and secondary MDS. *Leukemia Res* 16:43-46,1992.
- 62.-Levine GE, Bloomfield DC. Leukemias and myelodysplastic syndrome, secondary to drug, radiation and environmental exposure. *Semin Oncol* 19:47-84 1992.
- 63.-Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Larsen SO. Chromosome aberrations an prognostic factors in therapy-related myelodysplasia and non lymphocytic leukemia. *Blood* 76:1083-1091, 1990.
- 64.-Le Beau MM, Albain KS, Larson RA. Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia| further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol* 4:325-345,1986.
- 65.-Mansoor A, Bharodwaj TPR, Sethuraman S, Chandy M, Pushpa V, Kamada N, Murthy PBK. Analysis of karyotype, SCN and point mutation of ras oncogene in indian MSD patients. *Cancer Genet Cytogenet* 65:12-20,1993.
- 66.-Lyons J, JanssenJWG, Bartham C, Layton M, Mufti HJ. Mutation of ki-ras and N-ras oncogenes in myelodysplastic syndromes. *Blood* 71:1707-1712,1988.

- 67.-Hirai H, Okada N, Mizoguchi H, Mano H, Kobayashi Y, Nishida J, Takaku F. Relationship between an activated N-ras oncogene and chromosomal abnormality during leukemic progression from myelodysplastic syndrome. *Blood* 71:256-258, 1988.
- 68.- Bar-Eli M, Ahuja H, González-Cadauid N, Foti A, Cline MJ. Analysis of N-ras exon-1 mutations in myelodysplastic syndromes by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Blood* 73:281-283, 1989.
- 69.-Lubbert M, Mirro JT, Kitchingmann F, Koeffler HP. Prevalence of N-ras mutations in children with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Oncogene* 7:263-268, 1992.
- 70.-van Kamp H, Pijper Ch, de Vries MV, Bos LJ, Leeksa CHW, Kerhofs H, Willemze R, Fibbe WE, Landegent JE. Longitudinal analysis of point mutations of the N-ras proto-oncogene in patients with myelodysplasia using archived blood smears. *Blood* 79:1266-1270, 1992.
- 71.-Le Beau MN, Westbrook CA, Diaz MO, Larson RA, Rowley JD, Gasson JC, Golde DW, Sherr CJ. Evidence for the involvement of GM-CSF and FMS in the deletion (5q) in myeloid disorders. *Science* 231:984-987, 1986.
- 72.-Litz CE, McClure, Coad JE, Goldfarb AN, Bronning RD. Methylations status of the major break point cluster region in Philadelphia chromosome negative leukemias. *Leukemia* 6:35-41, 1992.
- 73.-Nakamura K, Inaba T, Nishimura J, Morgan GJ. Molecular analysis of BCR/ABL products in a case of myelodysplastic syndrome with late appearing Philadelphia chromosome. *Br J Haematol* 78:130-132, 1991.
- 74.-Smadja N, Klulik M, Hagemeijer A, van der Plas DC, González CG, Gramont A. Cytogenetic and molecular studies of the Philadelphia translocations t(9;22) observed in a patient with myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 3:236-238, 1989.
- 75.-Tooze J. (ed) 1993. *Molecular biology of the tumor viruses*. pp350-403, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- 76.-Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen in SV40 transformed cells. *Cell* 17:43-52, 1979.
- 77.-Reich NC, Oren M, Levine AJ. Two distinct mechanisms regulate the levels of a cellular tumor antigen p53. *Mol Cell Biol* 3:2143-2150, 1983.

78.-Raycroft L, Wu H, Lozano G. Transcriptional activation by wildtype but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. *Science* 249:1049-1051, 1990.

79.-Lane DP, Beach M. p53: oncogene or antioncogene?. *Genes Dev* 4:1-8,1990.

80.-Rovinski B, Munroe D, Peacock J, Mowat M, Bernstein A, Beach M. Deletion of 5'-coding sequences of the cellular p53 gene in mouse erythroleukemia: a novel mechanism of oncogene regulation. *Mol Cell Biol* 7:847-853, 1987.

81.-Levine AJ. The p53 tumor suppressor gene and product. Tumor suppressor genes, the cell cycle and cancer. *Cancer Surv* 12:59-79,1992.

82.-Perry M, Levine AJ. Tumor suppressor p53 and the cycle. *Curr Opin Genet Dev* 3:50-54,1993.

83.-Jonveaux PH, Fenaux P, Quiquandon I, Pignon LM, Lai JL, Loucheux-Lafebre MT, Goossens M, Bauters F, Berger R. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. *Oncogene* 6:2243-2247,1991.

84.-Le Beau M. Deletions of chromosome 5 in malignant myeloid disorders. *Cancer Surv* 15:143-147,1992.

85.-Huebner K, Isobe M, Croce MC, Golde WD, Kaufman SE, Gasson JC. The human gene encoding GM-CSF is at 5q21-q32, the chromosome region deleted in the 5q- anomaly. *Science* 230:1282-1285,1985.

86.-Baultwood J, Abrahamson G, Buckle VJ, Rack K, Oscier DG, Wainscoat JS. Structure of the granulocyte macrophage colony-stimulating factor gene in patients with the myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 34:157-158,1990.

87.-Cheng GYM, Kellerheh CA, Miyanch J, Wang L, Wong SC, Clarke SC, McCulloch EA, Minden MD. Structure and expression of genes of GM-CSF and G-CSF in blast cells from patient with acute myeloblastic leukaemia. *Blood* 71:204-208,1988.

88.-Le Beau MM, Lemons RS, Espinoza III R, Larson RA, Arai N, Rowley JD. Interleukin-4 and interleukin-5 map to human chromosome 5 in a region encoding growth factors and receptors and are deleted in myeloid leukemias with a del(5q). *Blood* 73:647-650,1989.

89.-Neuman WL, Le Beau MM, Farber RA, Lindgren V, Westbrook CA. Somatic cell hybrid mapping of human chromosome band 5q31: a region important to hematopoiesis. *Cytogenet Cell Genet* 61:103-106,1992.

- 90.-Avilés-Miranda. Síndromes mielodiplásicos. Asociación de Medicina Interna de México, A.C. Clínica Medica Mexicanas 2:1-6, 1988.
- 91.-Cheson BD. The myelodysplastic syndromes: current approaches to therapy. *Annals of Internal Medicine* 112:932-941,1990.
- 92.-Elias L, Hoffman R, Boswell S. A trial of recombinant alfa interferon in the myelodysplastic syndromes. *Ann Intern Med* 103:105-110,1985.
- 93.-Koeffler PH. Randomized study of 13-cis retinoic acid vs placebo in the myelodysplastic disorders. *Blood* 71:703-708,1988.
- 94.-Stadtmauer AE, Cassileth AP, Edelstein M, Abrahm J, Schreiber DA, Nowell CP, Cines BD. Danazol treatment of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 77:502-508,1991.
- 95.-Appelbaum RF, Barral J, Strob R, Lloyd D, Fisher PhD, Schoch G. Bone marrow transplantation for patients with myelodysplasia. *Annals Internal Med* 112:590-597,1990.
- 96.-De Witte TF, Zwaan JH, Vernant HK, Vossen BL, Beelen D, Ferrant A, Gmür J, Liu Yin J, Troussard X, Cahn J, Van Lint M, Gratwohl A. Allogeneic bone marrow transplantation for secondary leukaemia and myelodysplastic syndrome: a survey by the leukaemia working party of the European Bone Marrow Transplantation Group (EBMTG). *Br J Haematol* 74:151-155,1990.
- 97.-Spivak JL, Thanh Pham, Isaacs M, Hankins D. Erythropoietin is both a mitogen and a survival factor. *Blood* 77:1228-1233,1991.
- 98.-Bowen D, Culligan D, Jacobs A. The treatment of anaemia in the myelodysplastic syndromes with recombinant human erythropoietin. *Br J Haematol* 77:419-423,1991.
- 99.-van Kamp H, Prinsze-Postema TC, Kluin PM, den Ottolander GJ, Beverstock GC, Willemze R, Fibbe WE. Effect of subcutaneously administered human recombinant erythropoietin on erythropoiesis in patients with myelodysplasia. *Br J Haematol* 78:488-493,1991.
- 100.-Heyman MR. Recent advances in biology and treatment of myelodysplasia. *Curr Op Oncol* 3:44-53,1991.
- 101.-Estey EH, Kurzrock R, Talpaz M, McCredie KB, O'Brien S, Kantarjian HM, Keating MJ, Deisseoth AB, Gutterman JU. Effects of low doses of recombinant human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 77:291-295,1991.
- 102.-Yoshida Y, Hirashima K, Asano S, Takaku F. A phase II trial of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 78:378-384,1991.

103.-Herrmann F, Lidemann A, Klein H, Lübbert M, Schulz G, Mertelsmann R. Effect of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in patients with myelodysplastic syndrome with excess blast. *Leukemia* 3:335-338,1989.