

50524
49



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

**“Pérdida del gen RB1 en pacientes con leucemia
linfoblástica aguda con cromosoma Ph mediante
FISH”**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A
OLGA GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS
DRA. SILVIA VIDAL MILLÁN

ASESORA DE TESIS
Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN

MÉXICO, D.F.

2003





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.

RESUMEN

Los adultos con Leucemia Linfoblástica Aguda presentan aproximadamente en el 25 % la t(9;22) (q34;q11) conocido como cromosoma Ph+, este rearrreglo influye en la supervivencia del paciente, la cual es corta y presenta un mal pronóstico. El gen de retinoblastoma RB1 localizado en el cromosoma 13q14 es un gen supresor de tumor el cual se encuentra alterado en las LLC no siendo clara su alteración en las LLA. **Objetivo:** Buscar alteraciones del gen RB1 en núcleos interfásicos de pacientes adultos con LLA Ph+ para relacionar los hallazgos con la supervivencia. **Material y Métodos:** Analizar núcleos interfásicos de 18 pacientes con diagnóstico comprobado de LLA sin tratamiento cuyo valor de Ph va de 8.1 a 97 % mediante la técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) usando la sonda RB1 LSI espectro naranja, Vysis (TM). **Resultados:** De los 18 pacientes analizados, 17 presentan pérdida del gen RB1, con valores de 4.68 – 70.39 %. **Conclusiones:** Encontramos alteraciones en el gen RB1 en casi todos los pacientes, independientemente del porcentaje de Ph. No observamos relación entre Ph, RB1 y la supervivencia del paciente. Es importante mencionar que la supervivencia de los pacientes de nuestro estudio es menor a la reportada en la literatura. Se necesita estudiar a otros genes involucrados en la leucemogénesis, así como a una población más grande para observar la relación entre los eventos genéticos involucrados y la supervivencia en los pacientes con LLA Ph+

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES "ZARAGOZA"

JEFATURA DE LA CARRERA DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO BIÓLOGO

ASUNTO: ASIGNACIÓN DE SINODALES

ESTIMADOS MAESTROS:

La Dirección de la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza", ha nombrado a ustedes como Sinodales del Examen Profesional del (la) señor (ita):


GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ OLGA

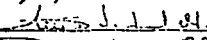
para obtener el Título de Químico Farmacéutico Biólogo.

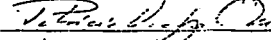
Les agradeceré se sirvan revisar el trabajo escrito intitulado: "Pérdida del gen RB1 en pacientes con leucemia linfoblástica aguda con cromosoma Ph mediante FISH"


Y asistir en la fecha que después se les hará saber al Examen de Recepción Profesional.

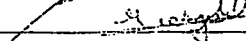
PRESIDENTE	DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA
VOCAL*	DRA. SILVIA VIDAL MILLÁN
SECRETARIO	Q.F.B. PATRICIA VIDAL MILLÁN
SUPLLENTE	Q.B.P. GUSTAVO MIRANDA CONTRERAS
SUPLLENTE	Q.F.B. GEORGINA E. RIOS OLIVERA











ATENTAMENTE.
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a, 14 de Mayo de 2003.


Q.F.B. ROBERTO CRUZ GONZÁLEZ MELÉNDEZ
JEFE DE LA CARRERA

ZARAGOZA
JEFATURA DE LA CARRERA
DE Q. F. B.

c.c.p. Departamento de Control de Egresados
c.c.p. Interesado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

A ese ser tan maravilloso que es Dios quién me ha permitido llegar hasta donde estoy gracias.

Con todo mi amor a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, todo su amor, cariño y comprensión, sin el cual no hubiera sido posible culminar mi meta gracias por todo.

Agradezco a Maite por que gracias a tus conocimientos, paciencia y apoyo trabajaste conmigo a pesar de las múltiples ocupaciones, siempre estuviste a mi lado en los momentos más difíciles y me ayudaste a culminar mi mayor logro.

A Silvia Vidal porque confiaste en mi y trabajaste conmigo compartiendo tus enseñanzas y experiencias.

A Patricia Vidal quién siempre ha sabido guiar a sus alumnos de la mejor manera y les brinda su apoyo incondicional.

A Eduardo Cervera por todo el apoyo que me ha dado y su valiosa colaboración para el desarrollo de este proyecto.

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Pedro Sobrevilla

Dra. Isabel Zeichner Gancz

Dr. Rubén Marroquín

Q.F.B: Patricia Vidal

Q.F.B. Georgina E. Ríos

Q.B.P. Gustavo Miranda

Por sus consejos y cooperación en la revisión y corrección de esta tesis.

A todos y cada uno de mis profesores por compartir sus conocimientos.

A Claudia, Diana y Honorio mis grandes amigos los cuales me enseñaron el verdadero valor de la amistad, gracias por escucharme, apoyarme, comprenderme y levantar mi animo, siempre estuvieron a mi lado.

A Oscar el amor de mi vida por todo tu amor y apoyo incondicional, me has enseñado a valorar todas y cada una de las cosas de la vida junto a ti.

A Judith, Vicky, Pili, Aurora, Ime, Alejandra, Miguel, Arturo, Mirna, Alejandro, con quién compartí momentos muy agradables con ustedes.

A todos mis tios, primos y sobrinos, mi familia quien siempre me ha dado su apoyo y cariño sin pedir nada a cambio.

MIL GRACIAS

Indice	1
1. Introducción	3
1.2 Ciclo celular	2
1.3 Ciclo celular y oncogenesis	4
1.3.1 Gen RB1 y el ciclo celular	8
1.4 Regulación de hematopoyesis	11
1.5 Leucemias	11
1.5.1 Leucemias linfoblásticas agudas	12
1.5.2 Leucemias linfoblásticas agudas con cromosoma Filadelfia positivo	14
1.6 Importancia de RB1 en las LLA	14
1.7 Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	15
2. Justificación	16
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo General	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. Hipótesis	17
5. Material y métodos	17
5.1 Diseño	17
5.2 Metodología	17
5.3 Población de estudio	18
5.4 Criterios de inclusión	18
5.5 Criterios de exclusión	18
5.6 Técnica de hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia	18
5.7 Controles experimentales	20
5.7.1 Controles positivos	20
5.7.2 Controles negativos	20
5.8 Análisis estadístico	20
6. Resultados	21
6.1 Demografía y origen de las muestras	21
6.2 Hallazgos hematológicos	21
6.3 Hallazgos clínicos	22
6.4 Resultados de Ph, RB1 por FISH así como la supervivencia encontrados en los tres grupos	22
6.5 Hallazgos citogenéticos convencionales y moleculares de los grupos A, B y C	23
6.6 Inmunofenotipo	23
6.7 Comparación de la expresión inmunofenotípica con el estado del cromosoma Ph y del gen RB1 en pacientes con LAL Ph+ y Ph-	24
6.8 Correlaciones	25
6.9 Resultados: Figuras, tablas e imágenes	26
7. Discusión de resultados	47
8. Conclusiones	51
9. Recomendaciones	51
Anexo 1 Hoja de captación de datos	52
10 Bibliografía	54

1. INTRODUCCION

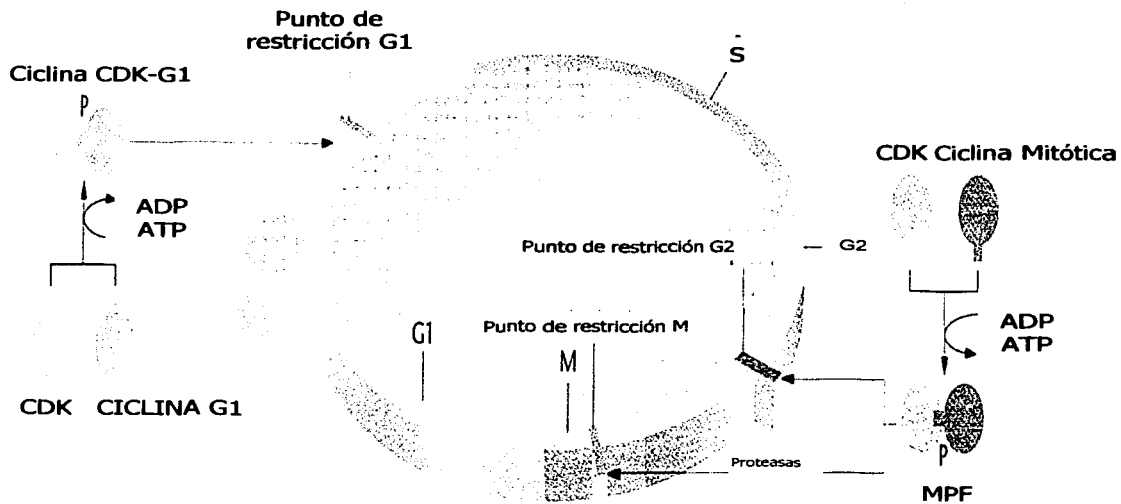
1.1 CICLO CELULAR

Por ciclo celular conocemos a la secuencia de eventos que ocurren entre divisiones mitóticas en una célula eucariótica. La semejanza de eventos para la duplicación celular en diversos organismos sugiere que el ciclo celular es gobernado por un programa genético, el cual se ha conservado a lo largo de la evolución (Elledge, 1996; Sherr, 1996)

El descubrimiento de mutaciones que interrumpen el ciclo celular y estudios subsecuentes sobre los efectos de estas mutaciones, fueron designadas como *cdc mutations (cell division cycle mutations)* (William K 2000). Se estableció que durante el ciclo celular existen como mínimo tres puntos de restricción donde la célula es monitoreada antes de proceder al siguiente estado del ciclo (Elledge, 1996). La Figura 1 identifica la localización de los tres puntos de restricción dentro del ciclo celular.

El primero es llamado **G1/S** el cual monitorea el tamaño que la célula alcanza después de una mitosis y si el DNA tiene algún daño. Si ambas condiciones son inicialmente normales, entonces se avanza en el ciclo y la célula procede a la fase **S**. El segundo punto de restricción es el **G2/M** donde las condiciones fisiológicas de la célula son monitoreadas antes de entrar a la mitosis. Si la replicación del DNA o reparación de algún daño a éste no son completados, el ciclo celular es arrestado hasta que estos procesos sean terminados. El punto final de restricción ocurre durante la mitosis y es llamado **M** en el cual se monitorea la formación del sistema de fibras del huso y la adhesión de éstas a los cinetocoros asociados con los centrómeros. Si las fibras del huso no se forman propiamente o la adhesión es inadecuada, la mitosis se arresta (Elledge, 1996; William K 2000).

Todo el proceso es controlado a través de dos clases de proteínas; una es un grupo de enzimas llamadas *proteínas cinasas* que fosforilan selectivamente proteínas blanco. El segundo grupo comprende proteínas llamadas *ciclínas*, las cuales están involucradas en controlar la progresión completa del ciclo celular. La interacción entre cinasas y ciclínas produce una molécula reguladora que controla la actividad de la célula durante el ciclo.

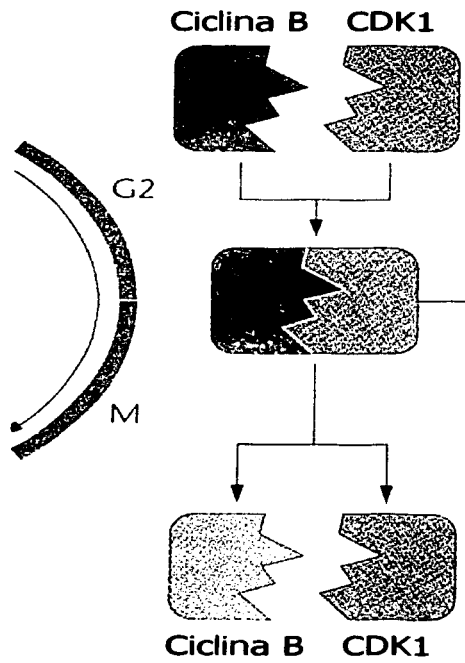


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 1 Ciclo celular y sus puntos de restricción

El inicio de la mitosis en algunas células eucarióticas es controlado por la cinasa CDK1 llamada así por sus siglas en inglés (cyclin-dependent kinase) (William K, 2000). Varios eventos marcan la entrada de **G2** a mitosis, incluyendo la condensación de la cromatina para formar los cromosomas, rompimiento de la membrana nuclear y reorganización del citoesqueleto. Los eventos principales en esta transición son regulados por la formación de un complejo activo llamado CDK1/ ciclina B. Cuando se enlaza a la ciclina B, el componente CDK1 cataliza la fosforilación, causando ruptura de la membrana nuclear y rearrreglos del citoesqueleto. También fosforila la histona H1, la cual juega un papel importante en la condensación de la cromatina (Figura 2). La función de ciclina B en este complejo no es muy claro, pero parece controlar la localización celular o la especificidad de la molécula blanco.

Mientras las acciones de las ciclinas B y CDK1 son las responsables para pasar a la fase M parece que otras ciclinas, incluyendo D y E pueden promover las células de **G1** a **S**. Diversos experimentos indican que la cinasa CDK1 está activa durante la fosforilación en **G1**, pero que en vez de combinarse con la ciclina B (la cual no está presente), CDK1 se combina con las ciclinas **G1**, dirigiendo la fosforilación de los sustratos específicos de las proteínas (William K, 2000).



- El complejo ciclina B/CDK1 resulta en:
- Ruptura de la membrana nuclear
 - Reorganización del citoesqueleto
 - Condensación de los cromosomas

Fig. 2 Resultados del complejo ciclina B/CDK1

1.2 CICLO CELULAR Y ONCOGENESIS

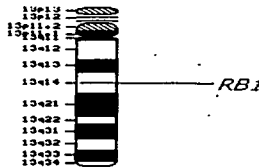
Los avances en el entendimiento de la regulación del ciclo celular han provisto de nuevos conocimientos acerca del papel que tiene en la oncogénesis humana (Moran, 1995; Sep, 1994.) Es conocido que la desregulación de la maquinaria genética que se encarga del funcionamiento del ciclo celular puede contribuir al desarrollo de neoplasias (Hunter, 1994; Hartwell, 1994; Kamb, 1995; Hangaishi, 1996).

Se conocen tres tipos de genes implicados en el desarrollo de las neoplasias, los cuales son: Oncogenes, genes supresores de tumor y genes encargados de mantener la estabilidad e integridad del genoma.

Los genes que presumiblemente son importantes en la patogénesis de enfermedades malignas actúan mediante dos mecanismos. El primero involucra alteraciones estructurales de proto-oncogenes para generar oncogenes que actúan predominantemente para inducir el fenotipo tumoral. El segundo involucra pérdida o inactivación de uno o más genes de la clase de los supresores tumorales o "anti-oncogenes". Los genes encargados de mantener la estabilidad e integridad del genoma adquieren mutaciones que pueden afectar a todos los genes, incluso los oncogenes y los genes supresores de tumor lo que predispone a una neoplasia (Ahuja, 1991).

1.3 GEN RB1

El gen de retinoblastoma (RB1), pertenece a la clase de genes supresores de tumor y se encuentra localizado en el cromosoma 13 q14 Ver figura 3 (Stiigenbauer, 1993; Ginsberg, 1991)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 3 Localización del gen RB1 en el cromosoma 13

El tumor de retinoblastoma es causado por mutación del gen RB1 en las células de la retina del ojo. Ocurre en una frecuencia de 1 en 15,000-20,000, aparece más a menudo entre la edad de 1 a 3 años (William S Klug 2000). En México la mayor incidencia fue reportada en 1991, 6.23×10^{-6} aproximadamente 1 caso por mes (Rodríguez M, 2002).

Se presenta en forma esporádica y hereditaria. Entre los tumores causados por alteración del gen RB1, 70 % son del tipo no heredado y la enfermedad es unilateral. Aproximadamente 30 % de los pacientes tienen retinoblastoma en forma heredada y se manifiesta de manera lateral o unilateral. La pérdida de las copias funcionales de RB1 pueden ocurrir en dos distintos puntos del ciclo de vida humana.

Según la teoría de Knudson (1979) En la concepción, un gameto podría contribuir a un gen RB1 defectuoso al formar el cigoto; la célula resultante es constitucionalmente hemicigota para la función de RB1.

El subsecuente desarrollo es esencialmente normal desde que el alelo intacto de RB1 esta presente en todas las células somáticas y así origina un desarrollo normal.

Sin embargo, en algunas células del feto un raro accidente somático mutacional puede ocurrir y priva a la célula del remanente alelo RB1 normal. Dando una célula RB1 nulicigota afectando el desarrollo de la retina, resultando el retinoblastoma.

Un mecanismo alternativo para generar el RB1 nulicigoto depende exclusivamente de eventos somáticos mutacionales. Los niños afectados con retinoblastoma esporádico son genéticamente normales en la concepción. En estos individuos, dos raras alteraciones genéticas ocurren dentro de la misma célula precursora retinal poniendo fuera las dos copias del gen RB1 (Weinberg, 1989).

1.3.1 GEN RB1 Y EL CICLO CELULAR

El producto del gen RB1 ha sido identificado como una fosfoproteína nuclear (p110), la cual es un sustrato para el complejo cdk-ciclina D y ejerce su efecto durante la fase G1 del ciclo celular que precede al punto de restricción (Chen,1990;Cheng, 1990). Estudios experimentales de la síntesis y modificaciones de la proteína RB1 durante la proliferación celular han indicado un papel importante de esta proteína en estadios específicos del ciclo celular (Mihara, 1989).

En células quiescentes o durante la primera parte de G1, RB1 se enlaza al factor de transcripción E₂F. Esto tiene dos efectos; primero, algunos genes cuyos productos son esenciales para la fase S dependen de la actividad de E₂F, así por secuestro de E₂F, RB1 asegura que la fase S no pueda iniciar. Segundo, el complejo E₂F-Rb reprime la transcripción de otros genes.

Antes de cerrar el punto de restricción, RB1 es fosforilado por cdk4, 6-ciclina D cinasa. La fosforilación causa que RB1 libere a E₂F el cual activa la transcripción de los genes cuya función es requerida para la fase S. La importancia de E₂F se ha demostrado ya que su expresión en células quiescentes es capaz de sintetizar el DNA.

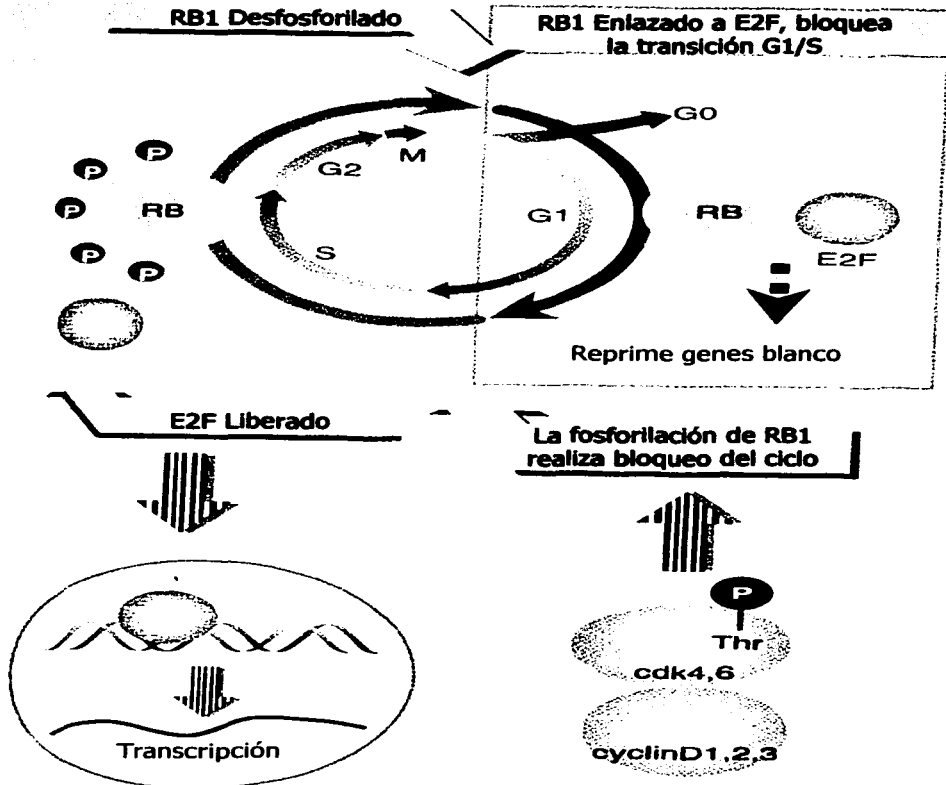
La proteína RB1 no fosforilada forma un complejo con las cdk-ciclinas. El complejo con cdk4, 6-ciclina D 1, 2, 3 es el más notorio, pero RB1 es también un sustrato para la cdk2-ciclina E. Hay una especial relación entre RB1 y la ciclina D1. La sobreexpresión

de D1 causa que las células entren a la fase S en un estadio más temprano. La inhibición de la expresión de D1 arresta las células antes de la fase S.

El papel de la ciclina D1 podría ser inactivar a RB1 y permitir la entrada de la fase S. Hay varios factores de transcripción relacionados en la familia E₂F. RB1 se enlaza a tres de estos factores. Dos proteínas más, p107 y p130, las cuales están relacionadas con RB1, conduciéndose en una vía similar y enlazando los otros miembros del grupo E₂F. Así a la vez RB1 y p107 pueden controlar la actividad de los factores del grupo E₂F.

RB1 es un blanco para vías que inhiben el crecimiento, y podría ser el medio para inhibir las señales de crecimiento que mantiene las células en G1 o G0. Varias de estas señales incluyendo el factor transformador del crecimiento TGFβ actúan a través de inhibidores de cdk-ciclinas cinasas. Los inhibidores son llamados **ckis** (Lewin, 1997). Estos se encuentran en forma de proteínas enlazadas a dímeros cdk-ciclinas en complejos inactivos, por ejemplo en células quiescentes. Para mantener el complejo cdk-ciclina en forma inactiva, éstos impiden la fosforilación de RB1 haciendo imposible liberar las células para entrar a la fase S. Han sido caracterizadas tres proteínas, llamadas por su peso molecular como (ink 4) p15/p16, (cip1/WAF1) p21 y (kip1) p27 [Los nombres comunes están en el paréntesis] (Fig. 4).

RB1 Y EL CICLO CELULAR



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 4 Papel del gen RB1 en uno de los puntos de restricción del ciclo celular

Las proteínas p15/p16 son codificadas por dos genes adyacentes y estrechamente relacionados, p16 se enlaza específicamente a cdk4 y cdk6. Esto sugiere una conexión con la transición G0/G1, p16 no puede inhibir la proliferación de las células que carecen de RB1, lo cual sugiere que funciona previniendo la actividad de cdk-ciclina cinasa usando RB1 como un sustrato. Por enlace a las subunidades cdk, p16 inhibe la unión de la cdk4-ciclina D y el complejo cdk6-ciclina D, podría también inhibir su actividad cinasa.

P21 es un inhibidor cdk universal que se enlaza a todos los complejos de cdk2, 4,6. Esto sugiere que es probable bloquear la progresión a través de todos los estados de G1/S (Lewin, 1997).

1.4 REGULACIÓN DE HEMATOPOYESIS

Una vez entendido el ciclo celular y sus más importantes componentes es necesario dar a conocer el proceso de la hematopoyesis para poder entender la leucemogénesis.

La supervivencia, proliferación, diferenciación y autorrenovación son cuatro procesos celulares que definen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH).

La supervivencia y la proliferación de las CPH están controladas por múltiples factores de crecimiento o citocinas con funciones que actúan individualmente o en combinación para regular la hematopoyesis (Leary y cols.1992)

Recientes estudios apoyan que tanto la interleucina 3 (IL-3) así como el factor estimulante de colonias granulocitos/macrófagos (GM-CSF) son requeridos para sostener la viabilidad de las CPH. Estas células también pueden ser reclutadas dentro de ciclos activos en respuesta a estas mismas citocinas o un segundo estímulo tal como el ligando c-kit (CKL), IL-6 o factores estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) (Ikebuchi K y cols. ,1988; Ogawa M. y cols. 1991; Bodine DM y cols. , 1992.). Las células progenitoras están controladas por citocinas linaje-específicas tales como eritropoyetina, factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), G-CSF e IL-5. Sin embargo IL-3 y el GM-CSF son los requeridos para la supervivencia de progenitores celulares tempranos latentes (Gibson FM y cols. ,1992), IL-3 aparentemente estimula células en un estadio más temprano de diferenciación que GM-CSF (Leary GA. y cols. ,1987)

1.5 LEUCEMIAS

En 1995, la Asociación Europea de Hematopatólogos (EAHP) y la Sociedad de Hematopatología (SH) desarrollaron para la organización mundial de la salud (WHO), la Clasificación de Enfermedades Hematológicas, la cual es una combinación de morfología, inmunofenotipo, características genéticas y síndromes clínicos.

La clasificación incluye neoplasias de células tronco, histiocíticas, leucemias mieloides y linfoides (Harris N.L. y cols.) , 1999).

Las leucemias se definen como enfermedades monoclonales que se originan de células individuales precursoras hematopoyéticas. Así como otros tipos de cáncer, las leucemias también presentan progresión en su historia natural de células que poseen un fenotipo que muestra un remanente de diferenciación normal con la pérdida

progresiva de la habilidad de maduración y el desarrollo de un fenotipo maligno agresivamente indiferenciado (Fúcar y cols, 1979). Una característica común de las neoplasias malignas, incluyendo las leucemias es la regulación alterada del crecimiento celular. Cabe resaltar que las CPH poseen algunas características favorables para las células malignas, entre ellas está la habilidad de proliferar, sobrevivir al tránsito intravascular y trasmigrar dentro de los tejidos, además de la capacidad de crecer en medios semisólidos (Irons, 1996).

Fouls L. en 1954, fue el primero en proponer una progresión de múltiples pasos en el cual una célula debe pasar a través de un número determinado de estadios intermedios distintos antes del desarrollo franco de la malignidad. Desde entonces, observaciones independientes apoyan la conclusión de que en general, una neoplasia es un proceso evolutivo en el cual están involucradas alteraciones genéticas independientes en proto-oncogenes y genes supresores de tumor junto con factores epigenéticos y ambientales que contribuyen al desarrollo del fenotipo maligno (Land H. y cols. ,1983; William CL, 1990; Irons y cols, 1996).

1.5.1 LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS

Las leucemias linfoblásticas agudas (LLA) son proliferaciones malignas de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico y aspecto linfoide, las cuales se acompañan de una disminución en la producción de los elementos hematopoyéticos normales.

El diagnóstico se basa en la observación de blastos linfoides en la medula ósea que iguale o supere el 20 % de la totalidad celular. La blastosis medular suele oscilar entre el 50 y el 100 % y su aspecto varía según el tipo morfológico.

El promedio de la incidencia de leucemia aguda en la población general es de 1 a 3 casos por cada 100,000 habitantes/año y se observa un ligero predominio masculino. La LLA en el adulto constituye, aproximadamente, el 15 – 20 % del total de las leucemias agudas. En niños existe una máxima incidencia entre los 2 y los 5 años de edad (McKenzie, 2000; Sans-sabrafen, 2001)

Característicamente las LLA expresan proteínas de superficie que caracterizan un fenotipo inmunológico, la mayoría son de línea " B " (85 %), seguida " T " (10 %) y el resto nulas o no " T " no " B " El fenómeno denominado " promiscuidad" o "heterogeneidad" de linaje hace posible también encontrar leucemia aguda de linaje mixto, con componentes tanto linfoides como mieloides (Hoelzer, 1994).

En cuanto a los aspectos citogenéticos se han identificado alteraciones tanto numéricas como estructurales que se relacionan con la fisiopatología de la enfermedad, además de correlacionarse con el pronóstico de la misma a) hiperdiploidia con 51-65 cromosomas está correlacionado con buen pronóstico y es visto solo en el 7 % de los casos b) hiperdiploidia entre 47-50 cromosomas está presente en pacientes que tienen un pronóstico moderado; c) hipodiploidia y cerca del haploide tienen un pronóstico adverso, d) pseudodiploidia definido como 46 cromosomas con anomalías numéricas y estructurales presentes en el 59 % de los casos y e) tetraploidías, las cuales tienen un mal pronóstico (Pui 1990;1998; Vera,2001). Las alteraciones estructurales se describen en la tabla 1

TABLA 1. ALTERACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES

CLASIFICACION	%	TRANSLOCACION	GENES AFECTADOS	
Pre-B-ALL	5	t(1;19)(q23;p13)	PBX1	E2A
		t(17;19)(q22;p13)	HLF	E2A
Pre-B-ALL/cALL	5	t(5;14)(q31;q32)	IL3	IGH
	5	t(4;11)(q21;q23)	?	HRX
		t(11;19)(q23;p13)	HRX	ENL
		t(9;11)(q21;q23)	-	HRX
	3	dcl(9)(p13-p24)	?	?
	2.7	del(6)(q13-14;q21-27)	?	?
	10	+21	?	?
		t(12;13)(p13;14)	?	?
LLA Adulto	25	t(9;22)(q34;q11)	ABL	BCR
LLA Niños	5	t(9;22)(q34;q11)	ABL	BCR
Linfoma Burkitt	90	t(8;14)(q24;q32)	Myc	IGH
	11	t(8;22)(q24;q11)	Myc	IGLλ
	8	t(2;8)(p12;q24)	Myc	IGLκ
T-ALL	10	t(1;14)(p32;q11)	Tal-1	TCRD
		t(1;7)(p32;q34)	Tcl-5/Scl	
		t(7;9)(q34;q32)	TCRB	Tal-2
		t(1;7)(p34;q34)	LCK	TCRB
		t(7;9)(p34;q34)	TCRB	TAN-1/tcl3
		t(7;10)(q34;q24)	TCRB	HOX 11
		t(10;14)(q24;q11)	HOX11	TCRD
		t(11;14)(p15;q11)	RBTN1	TCRD
		t(7;19)(q34;p13)	RBTN2	TCRD
		t(7;19)(q34;p13)	TCRB	LYL-1
		t(8;14)(q24;q11)	MYC	TCRA
		Inv(14)(q11;q32)	NA	
		t(14;14)(q32;q32)	NA	NA
		t(7;14)(q35;q32)	NA	NA

NA: No valorable

Modificada de Bailliere's Clinical Haematology 1994 Vol.7 Numero 2

1.5.2 LEUCEMIAS LINFOBLÁSTICAS AGUDAS CROMOSOMA FILADELFIA POSITIVO

En el 4 % de los casos con leucemia linfoblástica aguda infantil y 25% de leucemia linfoblástica aguda en adultos ocurre una translocación entre los cromosomas 9 y 22, cuyo resultado es el acortamiento del brazo q del cromosoma 22 conocido como cromosoma Filadelfia (Ph+), cuyo equivalente molecular es el gen de fusión BCR/ABL, siendo los puntos de ruptura (9q34;22q11.2).

Dependiendo del sitio de rompimiento del gen BCR, el producto de fusión varía en su tamaño de 185 a 230 Kd, la porción de ABL es la misma, pero difiere en el largo de la secuencia de BCR retenida.

Al momento se han descrito 3 sitios de rompimiento en BCR:

- Mayor (**M** o principal): Se observa en la leucemia Mielocítica Crónica en fase crónica y en un tercio de las leucemias Linfoblásticas Agudas Ph+. El rompimiento sucede entre los exones 12-16 (b1-b5), por lo que el exón b2 o b3 se fusiona con el a2 de ABL formando la fusión b2a2 o b3a2. La proteína resultante es de 210 Kd (p210).
- Menor (**m**): Sucede en el restante 75 % LLA Ph+ y rara vez en la LMC. La ruptura se da entre los exones e2'y e2. Se unen e1 a2 que codifica una proteína de 185 ó 190 Kd (p190).
- Micro (**μ**): Sucede hacia el exón 19 y codifica para una proteína de 230 Kd (p230), se vincula a la rara variedad de Leucemia Neutrofílica Crónica Ph+.

Diversos sustratos de BCR-ABL intervienen en eventos de transformación, crecimiento o muerte programada.

Los mecanismos propuestos para la transformación hacia un fenotipo leucémico son:

- Alteración de la adhesión del estroma: Causa pérdida de la regulación negativa de la proliferación celular
- Activación de la señal mitogénica: por vías como la cinasa MAP, Ras y a través de ésta, MYC, así como Jak, Stat y P13. También la activación directa mediante factores de crecimiento.
- Inhibición de apoptosis: Críticamente dependiente de la actividad de la tirosin cinasa y con la actividad de Ras. (Cervera E, 2002).

El pronóstico de las formas Ph+ tanto infantiles como en adultos es pobre, no sólo por el porcentaje que alcanza de remisión completa, (que puede ser similar a los casos Ph- si se utilizan esquemas intensivos), sino por su corta duración (7–10 meses) (Sans-Sabrafen, 2001).

1.6 IMPORTANCIA DE RB1 EN LAS LLA

En cuanto a la importancia de RB1 existen estudios controversiales acerca del papel que juega en la génesis o mantenimiento de las LLA. Por ejemplo, se han descrito alteraciones en la expresión de la proteína RB1, las cuales han sido demostradas en líneas celulares de leucemias (algunos casos de leucemia linfoblástica aguda de células T, así como en casos de leucemia mieloblástica aguda) (Cheng, 1990; Ginsberg, 1991;

Furukawa, 1991) implicando que pueden ocurrir anormalidades en el gen RB1 en algunas leucemias.

Por otro lado, la pérdida del gen RB1 se reporta en un pequeño porcentaje de pacientes con leucemias mediante la técnica de Southern Blot; en este estudio reportado por Chen Yao Chang en 1990, sólo 2 de 130 leucemias humanas tienen pérdida del gen RB1. En otro grupo de 20 pacientes con LLA analizados mediante la técnica de Southern Blot y bandas Q, Yiu y cols. (1994) encontraron cambios estructurales del gen RB1 solamente en un paciente, cuando se hibridó a la sonda pR 3.8 con fragmentos que miden 10.0, 6.2 y 2.1 kb, los cuales se encontraron completamente perdidos en células leucémicas, sugiriendo una pérdida grande de la parte 3' del gen RB1 en ambos alelos. Por otra parte se demostró que la región 5' del gen RB1 estaba intacta.

En 1990 Cheng y cols. indican que la mayoría de los tumores con defecto del gen RB1 no manifiestan pérdidas grandes del gen o rearrreglos del locus RB1 cuando se utiliza Southern Blot, ya que solo observan que 1 de 16 líneas celulares de leucemia humana tiene perdido el gen RB1.

En contraste con los estudios anteriores, Ahuja y cols en 1991 reportaron que alteraciones del gen RB1 eran comunes en el 15% de los casos de leucemias linfoblásticas agudas mediante la técnica de Southern Blot.

Las características biológicas de la enfermedad continúan siendo determinantes para la respuesta al tratamiento. El uso de métodos moleculares permite detectar rearrreglos genéticos (como por ejemplo BCR-ABL) presente aproximadamente en un 30 % de pacientes con leucemia linfoblástica aguda con una t(9;22) este rearrreglo influye en la supervivencia del paciente, observándose claramente inferior a otros que no tienen la mutación genética.

En la leucemogénesis pueden haber alteraciones en otros genes como RB1 y esto podría ser en parte responsable del pobre pronóstico de los pacientes.

1.7 HIBRIDACIÓN IN SITU CON FLUORESCENCIA

Debido a que estudios anteriores en la búsqueda de alteraciones en el gen RB1 son contradictorios, se decidió buscar el estado de este gen en una población mexicana, mediante la técnica hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH).

La hibridación *in situ* es una técnica que permite la visualización de secuencias definidas de ácidos nucleicos a nivel celular y subcelular. Esta técnica es parte de la nueva tecnología aplicada al diagnóstico genético ofreciendo una serie de ventajas notables como son rapidez (uno a tres días), sensibilidad (10^{-4}) y especificidad (Faderl, 1999). Además de tener un importante impacto dentro de la hemato-oncología para el pronóstico y diagnóstico de las neoplasias.

El fundamento de FISH está basado en la propiedad del ADN desnaturalizado en cadena única (sonda) para unirse con su ADN complementario (Blanco) sobre preparaciones citológicas, tales como cromosomas en metafase o núcleos en interfase, después de la hibridación se detecta la sonda fluorescente mediante un microscopio de fluorescencia. Se pueden marcar secuencias específicas como genes, regiones centroméricas, teloméricas o cromosomas con diferentes fluorocromos. (Swiger y cols. 1996). El uso de FISH es capaz de mostrar pérdidas de RB1 en un gran número de casos (Ginsberg, 1991). FISH puede detectar alteraciones desde 100 hasta 400 pares

de bases (pb), no requiere células en cultivo, para el caso de RB1, la sonda utilizada es de 220 kb y marca todo el gen RB1 el cual tiene 180 kb (Vysis).

Las aplicaciones del FISH incluyen enumeración de cromosomas específicos en células en interfase, identificación y verificación de translocaciones en los cromosomas, identificación de cromosomas marcadores en metafases, mapeo de genes en la investigación del genoma, e identificación de cambios cromosómicos debido a mutagénesis química (Vysis)

2. JUSTIFICACIÓN

En la LLA los adultos responden menos a la quimioterapia inicial que los niños, presentan mayores tasas de recaída, lo que sugiere que desarrollan resistencia temprana al tratamiento. Estas observaciones apuntan a que diferentes eventos etiológicos contribuyen a la patogénesis y probablemente a la progresión de la enfermedad en niños y adultos con LLA, eventos que parecen ser diferentes en la leucemogénesis de la infancia. Aunque se han descrito diferencias entre las características morfológicas e inmunológicas y más importantemente en los marcadores moleculares, no parece existir un sólo hallazgo entre las variables que existen a este respecto. Para los pacientes adultos, la edad, la cuenta de los leucocitos y la citogenética son factores para establecer el pronóstico, sin embargo, existe la necesidad de encontrar o identificar otros factores que puedan ayudar a la evaluación del pronóstico y posible manejo en este difícil y complejo grupo de pacientes.

Existen marcadores moleculares tales como el gen RB1, p53, p16 y p15, los cuales se encuentran alterados en otro tipo de neoplasias. Estas observaciones nos llevaron a investigar el estado del gen RB1 en pacientes adultos con LLA Ph positivo y Ph negativo para determinar cómo el comportamiento de este gen podría influir en la patogénesis y probable progresión de esta forma de leucemia.

Se empleó la técnica de FISH ya que es relativamente rápida (2 a 3 días) y en el laboratorio se cuenta con toda la infraestructura para realizarla.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Conocer el estado del gen RB1 en muestras de pacientes adultos con LLA Ph positivo y Ph negativo

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Identificar pérdida del gen RB1 en núcleos interfásicos usando la técnica de FISH.
- Determinar si el tiempo de supervivencia del paciente se ve afectado entre los pacientes con Ph- y Ph+
- Determinar la supervivencia global de estos grupos
- Conocer la relación entre la expresión inmunofenotípica y el estado de los genes RB1 y Ph.
- Relacionar el estado del gen RB1 contra la supervivencia encontrada.

4. HIPÓTESIS

4.1 HIPOTESIS NULA

Ho: La expresión alterada del gen RB1 no influye en el pronóstico de pacientes adultos con LLA, independientemente del estado del cromosoma Ph positivo o negativo ni de la expresión del inmunofenotipo.

4.2 HIPOTESIS ALTERNA

Ha: La expresión alterada del gen RB1 influye en el pronóstico de pacientes adultos con LLA, independientemente del estado del cromosoma Ph positivo o negativo ni de la expresión del inmunofenotipo.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 DISEÑO

Estudio de tipo transversal, retrolectivo, observacional, de cohortes definidas por la expresión de marcadores genéticos y su aplicación y correlación pronóstica. La parte experimental consistió en la identificación experimental de marcadores genéticos (RB1 y Ph+) y su aplicación y correlación pronóstica.

5.2 METODOLOGÍA

Las pruebas se realizaron en muestras de sangre periférica o médula ósea de pacientes adultos con LLA Ph positivo, por FISH, ya existentes en el banco de muestras del laboratorio de citogenética. En dichas muestras se detectó la alteración del gen RB1 mediante la técnica de FISH. De cada muestra se leyeron en promedio 1000 núcleos interfásicos por dos observadores, el resultado se obtuvo calculándose el promedio de ambas lecturas. El inmunofenotipo se realizó mediante un citómetro de flujo EPICS XL (Beckman Coulter), con un panel de anticuerpos monoclonales suficientes para establecer linaje hematopoyético y estado de diferenciación ontogénica (Baillieres). Estos datos se encuentran asentados en el documento fuente (expediente clínico). La remisión completa se determinó a nivel hematológico como menos del 5 % de blastos en médula ósea y biometría hemática normal. La supervivencia se evaluó a partir de la llegada del paciente al Instituto Nacional de Cancerología (INCan) hasta el último dato codificado o al año de seguimiento, lo que hubiera ocurrido primero. La historia clínica se capturó en la hoja de captación de datos (Anexo 1).

5.3 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Se analizaron 26 muestras de sangre periférica y/o médula ósea las cuales para su análisis se dividieron en tres grupos dependiendo de las siguientes consideraciones:

El Grupo A formado por pacientes con LLA Ph- (< 8 %)
El Grupo B formado por pacientes con LLA Ph+ (> 8 %)
El Grupo C formado por individuos sanos donadores del banco de sangre, como grupo control.

5.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de pacientes adultos con LLA Ph+, sin tratamiento previo.
Muestras de pacientes adultos con LLA Ph-, sin tratamiento previo, para fines comparativos.
Muestras de individuos sanos aceptados como donadores del banco de sangre, para integrar el grupo control.

5.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Pacientes cuyos datos no sean recuperables en el expediente para su análisis.

5.6 TÉCNICA DE HIBRIDACIÓN *IN SITU* CON FLUORESCENCIA (FISH)

5.6.1 PREPARACIÓN DE REACTIVOS

A) 20 X SSC.

Se mezclaron 132 g de 20 X SSC aforando a 500 ml de agua estéril, destilada. Se almacenó a temperatura ambiente

B) 2 X SSC.

Se mezclaron 100 ml de 20 X SSC con 850 ml de agua estéril, destilada midiendo el pH a 7.0 ajustando con NaOH y se aforó a 1 L con agua estéril destilada.

C) Solución de lavado 2 X SSC / 0.1 % NP-40.

Se mezclaron 100 ml de 20 X SSC con 850 ml de agua estéril, destilada, adicionando 1ml de NP-40, midiendo el pH y ajustando a 7 con NaOH, se adicionó agua estéril destilada hasta alcanzar el volumen final de 1 L.

D) Solución desnaturalizadora.

Se mezclaron 35 ml de formamida, 5 ml de 20 X SSC y 10 ml de agua estéril, destilada en un vaso de Coplin, midiendo pH de 7 a 8.

E) Alcoholes graduales 70%, 85%, 100%

Se prepararon v/v agua estéril, destilada y etanol.

F) 0.4 X SSC / 0.3 NP-40.

Se mezclaron 20 ml de 20 X SSC con 950 ml de agua estéril, destilada se adicionaron 3 ml de NP-40, se mezcló hasta que el detergente se disolvió, se midió el pH y se ajustó entre 7- 7.5 con NaOH, se adicionó agua estéril, destilada hasta volumen final de 1 L.

5.6.2 PREPARACIÓN DE LAMINILLAS

Se utilizaron laminillas limpias contenidas en etanol al 70 % en refrigeración. Se resuspendió el botón en unas gotas de Carnoy para obtener una densidad adecuada, la cual permitió un buen número de núcleos en un área determinada. Se colocó una gota

en el centro de la laminilla y al microscopio de contraste de fases se observó para determinar la calidad del material, con un lápiz diamante se marcó la zona adecuada para realizar la hibridación.

5.6.3 MADURACIÓN Y DESNATURALIZACIÓN DE LAS LAMINILLAS

Se colocaron las laminillas en 2 X SSC a 37 ° C por 30 min. El pH fue verificado, el cual fue de 7. Se pasaron las laminillas en etanol al 70 % por 2 min. al 85 % por 2 min. y al 100 % por 2 min. Se colocaron en solución de desnaturalización formamida al 70% / 2 XSSC a pH 7-7.5 por 5 min. a 73 ° C ±1. Se pasaron en etanol al 70 %, 85 % y al 100 % a - 20 ° C en cada uno por 2 min.

5.6.4 PREPARACIÓN DE LA MEZCLA DE HIBRIDACIÓN

Se utilizó la sonda RB1 LSI espectro naranja DNA # 32-190001 Vysis (™)

1. - En tubo de micro centrifuga ependorff se mezcló por cada laminilla:

3.5 µl de buffer de hibridación
0.5 µl de sonda
1 µl de agua estéril

Se colocó el tubo en el baño María a 73 ° C ± 1 por 5 min. Se centrifugó un pulso en la micro centrifuga.

5.6.5 APLICACIÓN DE LA SONDA

Se aplicó 5 µl de la mezcla de la sonda en cada blanco predeterminado con un lápiz diamante. Se colocó un cubreobjeto (18 x 18 mm) encima sin que existieran burbujas de aire. Se selló con rubber cement (Ross) las laminillas fueron colocadas en una cámara húmeda previamente a 37 ° C. Se dejó toda la noche para que hibridara.

5.6.7 LAVADOS POST HIBRIDACIÓN

Se quitó el rubber cement con unas pinzas y se pasaron las laminillas en una solución de 2 X SSC a temperatura ambiente con el objeto de que se soltara el cubreobjetos y este resbalara sin dañar el material. Se colocó en detergente 0.3 % NP-40 / 0.4 X SSC a 73 ° C. ± 1 por 2 min. y agitó por 5 segundos. Se sacaron las laminillas y se colocaron en 2 X SSC/ 0.1 % NP-40, durante 2 min.

5.6.8 VISUALIZACIÓN DE LA HIBRIDACIÓN

Se secaron las laminillas al aire en la oscuridad. Se aplicaron 7 µl de la contra tinción DAPI II (4,6 diamidino-2 fenilindol) en el área que fue hibridada y se colocó un cubreobjeto, sellándolo con rubber cement (Ross)

5.6.9 ANÁLISIS AL MICROSCOPIO

Se utilizó un microscopio de epifluorescencia NIKON con el filtro de triple banda cromática triple D/FTR/G1002 704 y un monofiltro G-2A DM580 NIKON rojo para el fluoróforo empleado en la hibridación. De cada muestra se leyeron en promedio 1000 núcleos interfásicos por dos observadores, calculándose el promedio de ambas lecturas. La imagen 1 nos muestra los núcleos interfásicos capturados con el analizador citovision considerados positivos y negativos.

5.7 CONTROLES EXPERIMENTALES

5.7.1 CONTROLES POSITIVOS

Se utilizó la muestra de un niño con diagnóstico comprobado de retinoblastoma, la cual al ser hibridada con la sonda RB1 mostró el 94 % de los núcleos con una señal roja. Se utilizó la muestra de un paciente con diagnóstico comprobado de LGC Ph+, la cual al ser hibridada con la sonda BCR/ABL mostró en un 68 % de los núcleos analizados la fusión de ambos genes observándose una señal amarilla, una roja y una verde.

5.7.2 CONTROLES NEGATIVOS

Se utilizaron cuatro muestras de individuos sanos los cuales fueron tamizados y aceptados como donadores en el banco de sangre, los cuales fueron hibridados con las sondas BCR/ABL y RB1.

5.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se describieron variables demográficas y clínicas de los pacientes. Los criterios de respuesta fueron los estándares internacionales. Las variables de interés se dividieron en continuas, para aquellas con expresión numérica; y discretas para las que se categorizarán los valores. Para el análisis se empleó una base de datos convencional y el uso del programa estadístico Stata (versión 7.0 año 2001).

5.8.1 VARIABLES CONTINUAS:

Las variables continuas independientes de interés expresadas en porcentaje fueron: Expresión de RB1, Ph+ e inmunofenotipo. La comparación entre dichas variables fue mediante T-student para muestras pareadas; se investigó la correlación entre ambos marcadores genéticos mediante el cálculo de la r Spearman. Para el primer caso se asignó significancia estadística a valores de $p < 0.05$; en el caso de la correlación esta fue considerada como de correlación con valores de $r > 0.80$.

5.8.2 VARIABLES DISCRETAS:

Las variables categóricas se exploraron mediante análisis univariado con χ^2 . En aquellas tablas de 2x2 con celdas de menos de tres eventos se elaboró prueba exacta de Fisher. El nivel de significancia estadística asignado fue de $p < 0.05$

La supervivencia total (con corte en la muerte debido a cualquier causa) y período libre de enfermedad (con corte en el caso de que no exista remisión completa desde el primer día, recaída o la muerte) se calculó con base en el método de Kaplan-Meier.

6. RESULTADOS

6.1 DEMOGRAFIA Y ORIGEN DE LAS MUESTRAS

GRUPO A

De Enero del 2000 a mayo del 2001 se revisaron las listas de pacientes adultos registrados en el INCAn, cuyo diagnóstico era LLA Ph- sin tratamiento previo. Así se incluyeron 4 muestras con diagnóstico confirmado de LLA Ph- según criterios de la (FAB).

De las 4 muestras elegidas para el estudio, 2 pertenecían a mujeres y 2 a hombres (50 %), cuyo rango de edad era 15 a 16 años (mediana 16 años), en todos ellos la muestra correspondió a médula ósea. (Tabla 2).

GRUPO B

De Enero del 2000 a mayo del 2001 se revisaron las listas de pacientes adultos registrados en el INCAn, cuyo diagnóstico era LLA Ph+ sin tratamiento previo. Así, se incluyeron 18 muestras con diagnóstico confirmado de LLA Ph+, según criterios de la (FAB).

De las 18 muestras elegidas para el estudio, 9 pertenecían a mujeres y 9 a hombres (50 %), cuyo rango de edad era de 15 a 50 años (mediana 30 años), 16 (88.9 %) eran médula ósea y 2 (11.1 %) fueron de sangre periférica (Tabla 2)

GRUPO C

Durante abril y mayo del 2002 se revisaron los datos de individuos sanos aceptados como donadores en el banco de sangre, de los cuales se incluyeron 4 muestras.

De las 4 muestras elegidas para el estudio, 1 (25%) pertenecía a mujer y 3 (75 %) a hombres cuyo rango de edad era de 30 a 44 años (Mediana 36 años), 4 (100%) eran sangre periférica. (Tabla 2) Este grupo no se describe en los apartados 6.2 y 6.3

6.2 HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS

GRUPO A

La biometría hemática indicó que los pacientes presentaban leucocitosis cuyo rango fue de 9 000 a 86 000 / mm³ (mediana 31 000 / mm³), así como trombocitopenia con valores de plaquetas de 11 000 a 33 000 / mm³ (mediana 18 700 / mm³), todos presentaban anemia ya que el rango de hemoglobina fue de 4.2 a 9.9 g/dl (mediana 7.7 g/dl), el hematocrito 11.9 a 29.5 % (mediana 22.4 %), deshidrogenasa láctica 141 a 3704 (U/L) (mediana 1202 U/L), por tratarse de un proceso maligno hematológico se encontraron valores de blastos en médula ósea de 86 a 89 % (mediana 87 %) (Tabla 3)

GRUPO B

La biometría hemática indicó que los pacientes presentaban leucocitosis, cuyo rango va de 3 000 a 408 000 / mm³ (mediana 131 000 / mm³), su cuenta plaquetaria de 18 000 a 311 000 / mm³ (mediana 44 000 / mm³), nos indica trombocitopenia, presentaban anemia ya que los valores de hemoglobina eran de 2.6 a 12.9 g/ dl (mediana 6.05 g/ dl), el hematocrito por consiguiente también estaba disminuido con rango de 8.9 a 40.1 % (mediana 19.4 %) , deshidrogenasa lactica en algunos casos estaba elevada con valores de 126 a 1984 (UI/L) (mediana 478 UI/L), por tratarse de un proceso maligno hematológico se encontraron valores de blastos en médula ósea de 44 a 100 % (mediana 78 %) (Tabla 3)

6.3 HALLAZGOS CLINICOS

GRUPO A

Cuatro pacientes (100 %) presentaron adenomegalia, hepatomegalia y esplenomegalia. De los cuatro 3 (75 %) presentaron fiebre como manifestación inicial. (Tabla 4).

GRUPO B

Diez (55.5 %) presentaron adenomegalia, trece (72.2 %) hepatomegalia, y nueve (50 %) esplenomegalia. De los 18 pacientes 14 (77.7 %) presentaron fiebre como manifestación inicial (Tabla 4).

6.4 RESULTADOS DE Ph, RB1 POR FISH ASI COMO LA SUPERVIVENCIA ENCONTRADOS EN LOS TRES GRUPOS.

GRUPO A

La tabla 5 nos muestra el grupo A formado por pacientes con LLA Ph- < 8 % cuyo rango es de 2.7 a 6 % (mediana 4.6 %) los cuales fueron considerados como pacientes Filadelfia negativo y el % de RB1 sin señal y con 1 señal encontrados, de los cuales tres presentaron pérdida total o parcial del gen RB1 en un porcentaje que va de 10.5 a 24.9 % (mediana 16.2 %) así como la supervivencia de estos pacientes, la cual fue de 7 a 365 días (mediana 195 días)

GRUPO B

La tabla 6 nos muestra el grupo B formado por pacientes con LLA Ph+ > 8 % cuyo rango va de 8.1 a 97 % (mediana 20.5 %) y el % de pérdida total o parcial de RB1 encontrado que va de 4.68 a 70.39 % (mediana 11.9%) así como una supervivencia que va de 3 a 365 días (mediana 151 días) (Figura 5)

De las 18 muestras hibridadas con el gen RB1, solo 1 no presentó pérdida del gen ya que el porcentaje fue de 0.5 % de pérdida, esto considerado como normal tomando en cuenta el porcentaje de pérdida encontrado en los individuos sanos (0.7 %) (Tabla 7) así mismo, podemos observar que la supervivencia de este paciente fue de 218 días.

GRUPO C

El grupo C formado por individuos sanos tamizados por banco de sangre y aceptados como donadores, cuyos porcentajes de Ph encontrados van de 2.1 a 6.3 % (mediana de 4.1 %), así como los de pérdida de RB1 que van de 0.2 a 1 % (mediana 0.7 %) (Tabla 7)

6.5 HALLAZGOS CITOGENÉTICOS CONVENCIONALES Y MOLECULARES DE LOS GRUPOS A, B Y C

La tabla 8 nos muestra el resultado de citogenética convencional, así como el de citogenética molecular de los grupos A, B Y C

GRUPO A

El cariotipo reportado nos indicó que en 1 muestra (25 %) no se obtuvo material para realizar el cariotipo, 2 (50%) presentaron cariotipo normal, 1(25%) hiperdiploidías.

El análisis de citogenética molecular mediante la técnica de FISH para observar la fusión de los genes BCR-ABL mostró que las muestras presentaban el gen de fusión con valores de 2.7 a 6 % (mediana 4.7 %) (Tabla 8)

GRUPO B

Del reporte del cariotipo se encontró que en 2 muestras (11.1 %) no se obtuvo material para realizar el cariotipo, 6(33.3 %) presentaron cariotipo normal, 6 (33.3 %) hiperdiploidías, 2 (11.1%) Cromosoma Filadelfia, 1(5.55 %) hipodiploidías, y 1 (5.55%) Ph e hiperdiploidías.

El análisis de citogenética molecular mediante la técnica de FISH para observar la fusión de los genes BCR-ABL mostró que las muestras presentaban el gen de fusión con valores de 8.1 a 97 % (mediana 20.5 %) (Tabla 8).

GRUPO C

E reporte del cariotipo indicó que 4 muestras (100%) presentaron cariotipo normal.

El análisis de citogenética molecular mediante la técnica de FISH para observar la fusión de los genes BCR-ABL mostró que las muestras presentaban el gen de fusión con valores de 2.1 a 6.3 % (mediana de 4.1 %) (Tabla 8).

6.6 INMUNOFENOTIPO

GRUPO A

El análisis de citometría de flujo, nos indicó que la expresión del linaje tipo B fue definido como positivo a los marcadores CD10, CD19, CD20 en 3 (75%). El linaje tipo T fue positivo a los marcadores CD5, CD2 y CD7 en 1 (25 %) (ver tabla 9). El antígeno común CALLA usando como referencia el marcador CD10 fue positivo en 3 (75%) de las muestras analizadas y 1 (25%) fue negativa para este marcador.

GRUPO B

El análisis de citometría de flujo, nos indicó que la expresión del linaje tipo B fue definido como positivo a los marcadores CD10, CD19, CD20, en 10 (61.4 %). El linaje tipo T fue positivo a los marcadores CD5, CD2 y CD7 en 2 (12.5 %). El linaje mixto se definió como marcadores de tipo linfocítico y a la vez más de dos marcadores de tipo mielocítico 4 (25.5 %). A dos (11.1 %) no se les hizo el análisis, esto debido a que la muestra fue insuficiente (Ver tabla 9). El antígeno común CALLA usando como referencia el marcador CD10 fue positivo en 12 (66%) de las muestras analizadas, tres (16.6%) fueron negativos para este marcador, y a tres (16.6%) no se les realizó el estudio.

En la tabla 9 se observa que el grupo B presenta pacientes que expresan inmunofenotipo variado, aunque un cierto predominio del tipo B común.

6.7 COMPARACION DE LA EXPRESION INMUNOFENOTIPICA CON EL ESTADO DEL CROMOSOMA Ph Y DEL GEN RB1 EN PACIENTES CON LAL Ph+ y Ph-

Se realizó la comparación de la expresión inmunofenotípica tipo B y T con la presencia de Ph+ y de la pérdida del gen RB1 entre los grupos A y B, no encontrando diferencias significativas en el análisis univariado (χ^2) y Prueba exacta de Fisher (Tabla 10).

Al realizar la comparación de la expresión inmunofenotípica tipo T y mixta con la presencia de Ph+ y de la pérdida del gen RB1 entre los grupos A y B, no se encontró diferencias significativas en el análisis univariado (χ^2) y Prueba exacta de Fisher (Tabla 11).

La tabla 12 nos muestra la comparación de la expresión inmunofenotípica tipo B y mixta con la presencia de Ph+ y de la pérdida del gen RB1 entre los grupos A y B, no encontrando diferencias significativas en el análisis univariado (χ^2) y Prueba exacta de Fisher.

Se realizaron correlaciones entre el perfil de inmunofenotipo ya reportado contra la expresión de Ph + y del gen RB1, no encontrando diferencias significativas en el análisis univariado (χ^2) y Prueba exacta de Fischer

De ahí que la expresión del perfil inmunofenotípico no parece guardar relación con la expresión del cromosoma Filadelfia ni con la del gen RB1 (Tabla 13)

La tabla 14 nos muestra los resultados obtenidos al realizar las correlaciones de la pérdida total o parcial del gen RB1 con la presencia del cromosoma Ph en individuos sanos y pacientes con LAL Ph+ y Ph- no encontrando diferencias significativas en el análisis univariado (χ^2) y prueba exacta de Fischer

Para este tipo de análisis, observamos que no existe relación entre la expresión del cromosoma Filadelfia con la pérdida total o parcial del gen RB1.

6.8 CORRELACIONES

La Fig. 7 nos muestra la correlación de la pérdida total o parcial del gen RB1 con la presencia del cromosoma Ph en individuos sanos, no encontrando correlación alguna mediante la prueba r^* Spearman.

Se realizó la correlación de la pérdida total o parcial del gen RB1 con la presencia de Ph en pacientes con LLA Ph- no encontrando correlación alguna mediante la prueba r^* Spearman (Fig. 8).

Se realizó la correlación de la pérdida total o parcial del gen RB1 con la presencia de Ph en individuos sanos y pacientes con Ph- no encontrando correlación alguna mediante la prueba r^* Spearman (Fig. 9).

Se realizó la correlación de la pérdida parcial o total del gen RB1 con la presencia de Ph en pacientes con LAL Ph+ y Ph- no encontrando correlación alguna mediante la prueba r^* Spearman (Fig. 10).

Se realizó correlación de la presencia de Ph con la supervivencia en pacientes con LAL Ph - y Ph + no encontrando correlación alguna mediante la prueba r^* Spearman (Fig. 11).

Se realizó la correlación de la pérdida total o parcial del gen RB1 con la supervivencia en pacientes con LAL Ph - y Ph + no encontrando correlación alguna mediante la prueba r^* Spearman (Fig.12).

6.9 TABLAS Y FIGURAS

TABLA 2 CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS DE LOS GRUPOS A, B Y C POR GÉNERO Y TIPO DE MUESTRA.

VARIABLE	GRUPO A [*] n (%)	GRUPO B [*] n (%)	GRUPO C [*] n (%)
MUESTRA Médula Ósea Sangre periférica	4 (100) 0 (0)	16 (.89) 2 (.11)	0 (0) 4 (100)
GENERO Femenino Masculino	2 (50) 2 (50)	9 (50%) 9 (50%)	1 (75) 3(75)

* Los individuos que forman cada grupo ya fueron indicados en el texto

TABLA 3 HALLAZGOS HEMATOLÓGICOS DE LOS GRUPOS A Y B. EL GRUPO C NO SE PRESENTA POR SER EL GRUPO CONTROL SANO.

VARIABLE	Mediana	Mínimo	Máximo
LEUCOCITOS (miles/ mm³)			
Grupo A	31	9	86
Grupo B	131	3	408
PLAQUETAS (miles/ mm³)			
Grupo A	18.7	11	33
Grupo B	44	18	311
HEMOGLOBINA (g/ dl)			
Grupo A	7.7	4.2	9.9
Grupo B	6.05	2.6	12.9
HEMATOCRITO (%)			
Grupo A	22.4	11.9	29.5
Grupo B	19.4	8.9	40.1
DHL (UI/L)			
Grupo A	1202	141	3704
Grupo B	478	126	1984
BLASTOS EN MÉDULA ÓSEA (%)			
Grupo A	87	86	89
Grupo B	78	44	100
Ph (BCR-ABL) (%)			
Grupo A	4.6	2.7	6
Grupo B	20.5	8.1	97

TABLA 4 CARACTERISTICAS CLINICAS DE LOS GRUPOS A, B Y C			
Variable Total	GRUPO A n (%) 4	GRUPO B n (%) 18	GRUPO C n (%) 4
ESPLENOMEGALIA Si No	4 (100) -----	9 (50) 9 (50)	----- 4(100)
HEPATOMEGALIA Si No	4 (100) -----	13 (.72) 5 (.27)	----- 4(100)
ADENOMEGALIA Si No	4 (100) -----	10 (55) 8 (44)	----- 4(100)
FIEBRE +	3 (75)	14(77)	-----

**TABLA 5 GRUPO A
PACIENTES CON Ph- < 8 %**

n = 4	% Ph por FISH	% de RB1 *sin señal y una señal por FISH	Supervivencia
			(Días)
1	2.7	13.26	365
2	4	10.52	365
3	6	24.9	7
4	6	2.08	42

*Sin señal y 1 señal será manejado como pérdida total o parcial del gen RB1 para los tres grupos.

**TABLA 6 GRUPO B
PACIENTES CON Ph + > 8 %**

n = 18	%Ph por FISH	% de RB1 sin señal y una señal por FISH	Supervivencia
			(Días)
1	8.1	9.77	9
2	8.2	70.39	23
3	8.6	0.5	218
4	10	5.5	34
5	11	5.4	12
6	13	25.98	177
7	14.5	62.19	365
8	17	6.3	365
9	19	5.4	276
10	22	7.92	11
11	22.5	10.35	35
12	23.4	20.17	3
13	25.6	5.8	81
14	27	7.3	365
15	28	7.9	285
16	38	6.98	160
17	41	6.6	142
18	97	4.68	163

SUPERVIVENCIA GLOBAL DEL GRUPO B

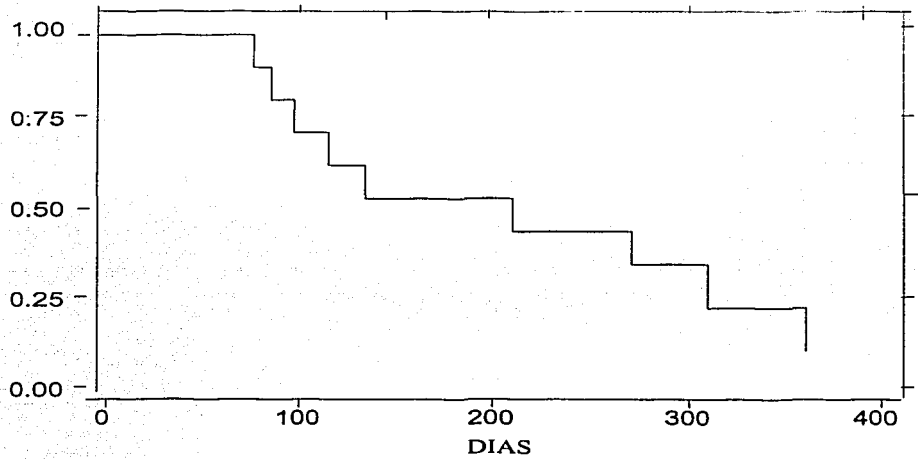


Fig. 5 Supervivencia global de los 18 pacientes del grupo B la cual va de 3 a 365 días (mediana de 151 días)

CURVA DE SUPERVIVENCIA GLOBAL GRUPO A Y B

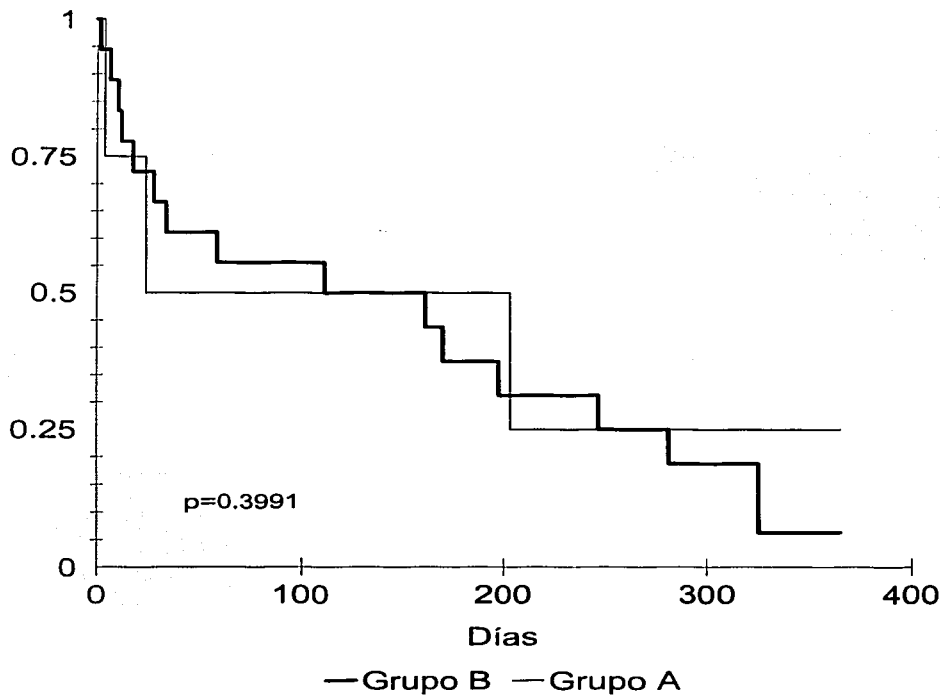


Fig. 6 Curva de supervivencia global de los grupos A y B en la cual no observamos diferencia referente a la supervivencia de ambos grupos.

TABLA 7 GRUPO C INDIVIDUOS SANOS		
n = 4	% Ph por FISH	% de RB1 sin señal y una señal por FISH
1	2.1	0.6
2	3	1
3	5	0.2
4	6.3	1

TABLA 8 COMPARACIÓN DE LOS RESULTADOS DE CITOGENÉTICA CONVENCIONAL (CARIOGRAMA), ASÍ COMO EL DE CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH) DE LOS GRUPOS A, B Y C.

	CARIOGRAMA	% PRESENCIA DE FILADELFIA POR FISH	% PÉRDIDA TOTAL O PARCIAL DEL GEN RB1 POR FISH
GRUPO A			
1	SR	6.0	2.0
2	46,XY	4.0	10.52
3	46,XY/ Hiperdiploidias	2.7	13.26
4	46,XX	6.0	10.5
GRUPO B			
1	46,XX, Ph (2)	8.1	9.77
2	46, XY	8.2	70.39
3	46, XY	8.6	0.5
4	46,XY/ Hiperdiploidias	10	5.5
5	46,XY/Hiperdiploidias	11	5.4
6	46,XY	13	25.98
7	46,XY : Ph / Hiperdiploidias	14.5	62.19
8	46,XY/Hiperdiploidias	17	6.3
9	46,XY	19	5.4
10	46,XY/Hiperdiploidias	22	7.92
11	SR	22.5	10.35
12	46,XX/Hiperdiploidias	23.4	20.17
13	46,XX	25.6	5.8
14	46,XX/Hipoloidias	27	7.3
15	46,XX	28	7.9
16	46,XX,t(9 :22)(q34 :q11)/46,XX	38	6.98
17	46,XX/48,XX+21+ ?/Hiperdiploidias	41	6.6
18	SR	97	4.68
GRUPO C			
1	46,XY	2.1	0.6
2	46,XX	3	1
3	46,XY	5	0.2
4	46,XY	6.3	1

SR= Sin respuesta

TABLA 9 INMUNOFENOTIPO DE LOS GRUPOS A Y B EXPRESADOS EN NÚMERO Y PORCENTAJE

INMUNOFENOTIPO	GRUPO A (n) = 4	%	GRUPO B (n) = 16	%
Pre-B	1	25	3	18.7
B común	2	50	6	37.5
B madura	0	0	1	6.25
T	1	25	2	12.5
*Mixta	0	0	4	25.5

*Mixta = Inmunofenotipo tipo Linfoide y Mieloide

TABLA 10 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOFENOTÍPICA TIPO B Y T CON LA PRESENCIA DE Ph+ Y DE LA PÉRDIDA DEL GEN RB1 ENTRE LOS GRUPOS A Y B

	INMUNOFENOTIPO B / T	OR	P
Grupo A n = 12	3 / 1	0.0 - 46.35	0.60 (Pba. Exacta de Fisher)
Grupo B n = 4	10 / 2		
*RB1 0,1 n = 6	5 / 1	0.06 - 46.27	0.69 (Pba. Exacta de Fisher)
**RB1 2,3 n = 10	8 / 2		

* RB1 (0,1) = Sin señal y 1 señal (Pérdida total o parcial de RB1)
 ** RB1 (2,3) = 2 señales y 3 señales (Sin pérdida de RB1)

TABLA 11 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOFENOTÍPICA TIPO T Y MIXTA CON LA PRESENCIA DE Ph+ Y DE LA PÉRDIDA DEL GEN RB1 ENTRE LOS GRUPOS A Y B

	INMUNOFENO TIPO T / Mixta	OR	P
Grupo A n = 6	1 / 0	0.0 – 16.16	0.42 (Pba. Exacta de Fisher)
Grupo B n = 1	2 / 4		
* RB1 0,1 n = 3	1 / 2	0.01 – 27.32	0.62 (Pba. Exacta de Fisher)
** RB1 2,3 n = 4	2 / 2		

* RB1 (0,1) = Sin señal y 1 señal (Pérdida total o parcial de RB1)

** RB1 (2,3) = 2 señales y 3 señales (Sin pérdida de RB1)

TABLA 12 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOFENOTÍPICA TIPO B Y MIXTA CON LA PRESENCIA DE Ph+ Y DE LA PÉRDIDA DEL GEN RB1 ENTRE LOS GRUPOS A Y B

	INMUNOFENOTIP O B / Mixta	OR	P
Grupo A n = 14	3 / 0	0.0 – 9.59	0.42 (Pba. Exacta de Fisher)
Grupo B n = 3	10 / 4		
*RB1 0,1 n = 7	5 / 2	0.04 – 9.50	0.55 (Pba. Exacta de Fisher)
**RB1 2,3 n = 10	8 / 2		

* RB1 (0,1) = Sin señal y 1 señal (Pérdida total o parcial de RB1)

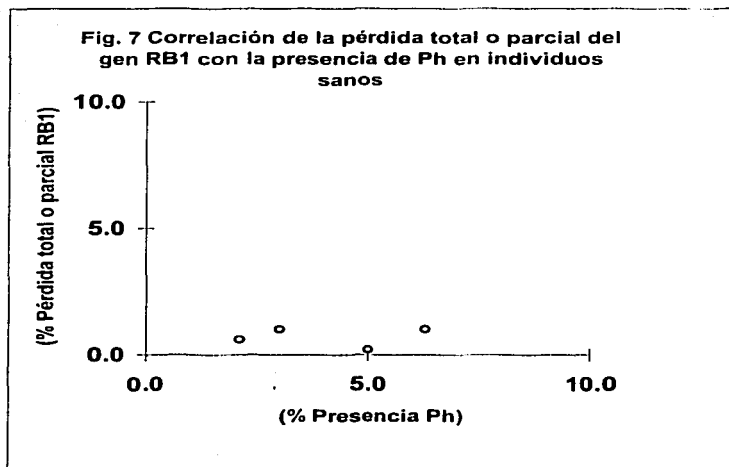
** RB1 (2,3) = 2 señales y 3 señales (Sin pérdida de RB1)

TABLA 13 COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN INMUNOFENOTÍPICA TIPO B, T Y MIXTA CON LA PRESENCIA DE Ph+ Y DE LA PÉRDIDA DEL GEN RB1 ENTRE LOS GRUPOS A Y B			
	INMUNOFENOTIPO B / T Y Mixta	OR	P
Grupo A n = 16	3 / 1	0.02 – 9.19	0.56 (Pba. Exacta de Fisher)
Grupo B n = 4	10 / 6		
* RB1 0,1 n = 8	5 / 3	0.09 – 7.81	0.60 (Pba. Exacta de Fisher)
**RB1 2,3 n = 12	8 / 4		

* RB1 (0,1) = Sin señal y 1 señal (Pérdida total o parcial de RB1)
 ** RB1 (2,3) = 2 señales y 3 señales (Sin pérdida de RB1)

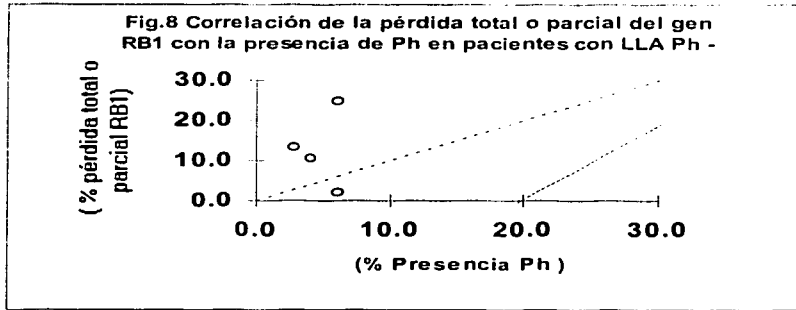
TABLA 14 COMPARACIÓN DE LA PÉRDIDA TOTAL O PARCIAL DEL GEN RB1 CON LA PRESENCIA DEL CROMOSOMA Ph EN INDIVIDUOS SANOS Y PACIENTES CON LAL Ph+ Y Ph -

	RB1 0,1 / 2,3	OR	P
Grupo B n = 18 Grupo C n = 4	5 / 13 0 / 4	0.0 - 6.12	0.32 (Pba. exacta de Fisher)
Grupo A n = 4 Grupo C n = 4	3 / 1 0 / 4	0.0 - 1.99	0.07 (Pba. Exacta de Fisher)
Grupo A y B n = 22 Grupo C n = 4	8 / 14 0 / 4	0.0 - 3.64	0.20 (Pba. Exacta de Fisher)
Grupo A n = 4 Grupo B n = 18	3 / 1 5 / 13	0.0 - 2.05	0.11 (Pba. Exacta de Fisher)



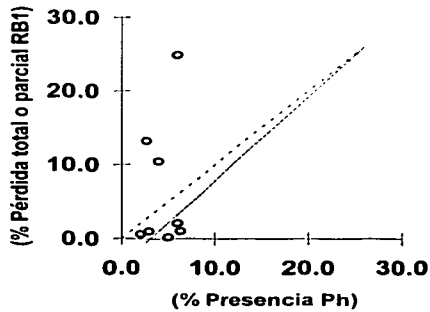
Pendiente 0.007 Intercepto: 0.669 Correlación 0.036

Grupo C n = 4	% Presencia Ph	% Pérdida total o parcial de RB1
1	2.1	0.6
2	3	1
3	5	0.2
4	6.3	1



Grupo A n = 4	% Presencia Ph	% Pérdida total o parcial de RB1
1	2.7	13.26
2	4	10.52
3	6	24.9
4	6	2.08

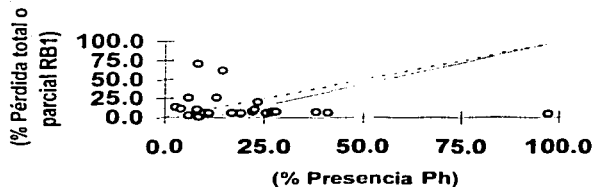
Fig. 9 Correlación de la pérdida total o parcial del gen RB1 en individuos sanos y pacientes con Ph - con la presencia de Ph



Pendiente: 0.842 Intercepto: 3.000 Correlación: 0.157

Grupos A Y C n = 8	% Presencia Ph	% Pérdida total o parcial RB
1	2.7	13.26
2	4	10.52
3	6	24.9
4	6	2.08
1	2.1	0.6
2	3	1
3	5	0.2
4	6.3	1

Fig. 10 Correlación de la pérdida parcial o total del gen RB1 con la presencia de Ph en pacientes LAL Ph+ y Ph -



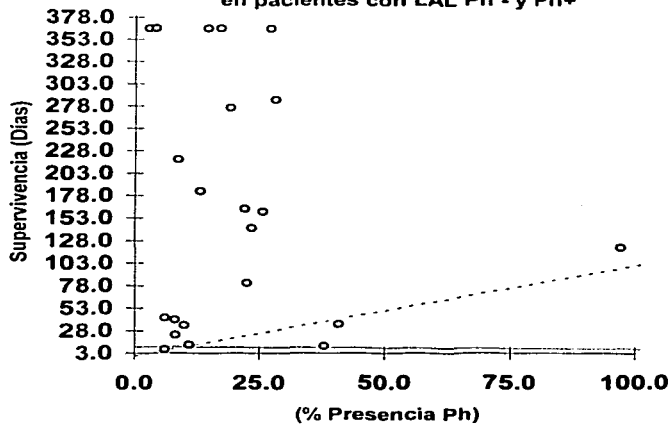
Pendiente: 0.884

Intercepto: 11.186

Correlación: 0.096

Grupos A Y B n = 22	% Presencia Ph	% Pérdida total o parcial RB1
1	2,7	13,26
2	4	10,52
3	6	24,9
4	6	2,08
1	8,1	9,77
2	8,2	70,39
3	8,6	0,5
4	10	5,5
5	11	5,4
6	13	25,98
7	14,5	62,19
8	17	6,3
9	19	5,4
10	22	7,92
11	22,5	10,35
12	23,4	20,17
13	25,6	5,8
14	27	7,3
15	28	7,9
16	38	6,98
17	41	6,6
18	97	4,68

Fig. 11 Correlación de la Presencia de Ph con la supervivencia en pacientes con LAL Ph - y Ph+



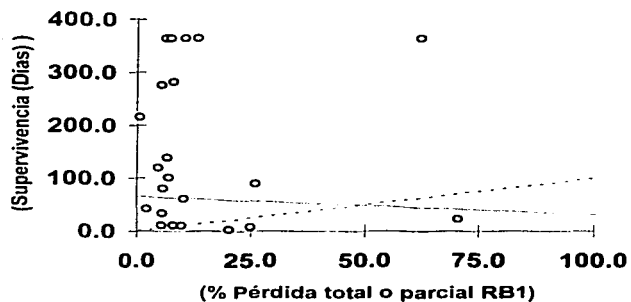
Pendiente: -44.35

Intercepto: 430.04

Correlación: -0.6925

Grupos A y B n = 22	% Presencia de Ph	Supervivencia (Días)
1	2,7	365
2	4	365
3	6	7
4	6	42
1	8,1	9
2	8,2	23
3	8,6	218
4	10	34
5	11	12
6	13	177
7	14,5	365
8	17	365
9	19	276
10	22	11
11	22,5	35
12	23,4	3
13	25,6	81
14	27	365
15	28	285
16	38	160
17	41	142
18	97	163

Fig. 12 Correlación de la pérdida total o parcial de RB1 con la supervivencia en pacientes LAL Ph+ y Ph -



Pendiente: -2.921

Intercepto: 191.205

Correlación: -0.5163

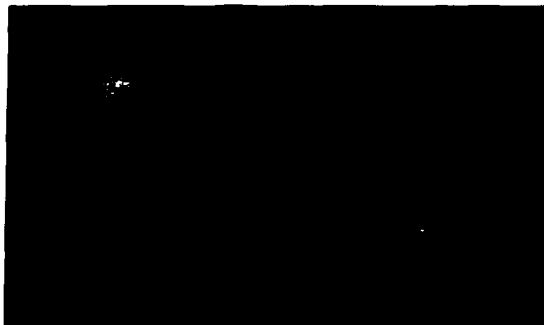
Grupos A y B n = 22	% Pérdida total o parcial RB1	Supervivencia (Días)
1	13.26	365
2	10.52	365
3	24.9	7
4	2.08	42
1	9.7	9
2	70.3	23
3	0.5	218
4	5.5	34
5	5.4	12
6	25.98	177
7	62.19	365
8	6.3	365
9	5.4	276
10	7.92	11
11	10.35	35
12	20.1	3
13	5.8	81
14	7.3	365
15	7.9	285
16	6.98	160
17	6.6	142
18	4.68	163

6.9 IMAGEN 1

NÚCLEOS INTERFÁSICOS HIBRIDADOS CON RB1 (ROJO) Y CONTRATEÑIDOS CON DAPI (AZUL)
SIN SEÑAL Y UNA SEÑAL CONSIDERADOS COMO PÉRDIDA TOTAL O PARCIAL DEL GEN RB1



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



NÚCLEOS INTERFÁSICOS HIBRIDADOS CON RB1 (ROJO) Y CONTRATEÑIDOS CON DAPI (AZUL)
CON DOS SEÑALES CONSIDERADOS SIN PERDIDA DEL GEN RB1

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Sabemos que la leucemogénesis es un proceso evolutivo en el cual múltiples eventos genéticos se involucran. Estos eventos consisten en alteraciones genéticas independientes en protooncogenes o genes supresores junto con factores epigenéticos y ambientales que contribuyen al desarrollo del fenotipo maligno (Rowley J, 1999)

Ciertas anormalidades cromosómicas, especialmente translocaciones se han vinculado específicamente con subtipos particulares de leucemia, linfoma e incluso sarcomas, además de translocaciones, han sido identificadas alteraciones recurrentes del tipo de ganancias, pérdidas parciales y totales de un cromosoma dado. Los genes localizados en estos cromosomas se piensa deben estar involucrados en la leucemogénesis, no obstante al momento desconocemos para la mayor parte de dichos cambios su vínculo directo con el desarrollo de la neoplasia.

Se han descrito alteraciones de diferentes genes en una gran proporción de pacientes con LLA y LMA; el detectar estas alteraciones ha provisto herramientas diagnósticas importantes en el seguimiento de pacientes leucémicos, pero también avances recientes en el descubrimiento de las alteraciones en la función de estos genes comparados con sus contrapartes normales ha motivado el diseño de nuevas estrategias terapéuticas, que se espera conlleven mejores respuestas clínicas con menor toxicidad. Actualmente se han logrado identificar más de 150 alteraciones genéticas vinculadas con diferentes formas de leucemia.

Es claro para algunos tumores sólidos que la pérdida de material cromosómico, particularmente la pérdida de la función de genes supresores de tumor, como RB1, p53 y BRCA1, se encuentran críticamente involucrados en la transformación maligna. Desafortunadamente, con la excepción de p16(CDKN2) en el brazo corto del cromosoma 9 ninguno de los genes involucrados en las pérdidas recurrentes en enfermedades hematopoyéticas han sido completamente identificados. (Rowley,J, 1999)

El propósito último se tiene que dirigir a identificar los genes que se relacionan en la ganancia o pérdida cromosómica que le dé a las células una ventaja proliferativa. Esta información combinada con la obtenida a partir de la ruptura y ensamble en las traslocaciones resultará en el mejor entendimiento del proceso de transformación maligna de múltiples pasos.

El estado del gen RB1 ha sido motivo de diversos estudios; hasta el momento se conoce la alteración de este gen en las leucemias linfocíticas crónicas cerca del 30 % (Stilgenbauer,1993), pero existe controversia en las leucemias linfoblásticas agudas; esto se considera importante ya que los pacientes con LLA presentan una supervivencia muy corta y tratamos de identificar las alteraciones genéticas que se encuentran involucradas en este grupo de pacientes.

Existen diversas metodologías para detectar alteraciones en RB1, en este trabajo se utilizó la técnica de FISH ya que es relativamente rápida (2 a 3 días) tiene una sensibilidad de 10^{-4} , es específica y en el laboratorio se cuenta con toda la infraestructura para realizarla.

Se encontraron alteraciones del gen RB1 en un porcentaje que va de 4.68 a 70.39 % (mediana 11.9 %) Ahuja y cols. en 1991 a pesar de no ser la misma técnica empleada (Southern Blot) ni el porcentaje de alteración encontrado, reporta pérdida del gen RB1

en un 15 % de los casos de leucemia linfoblástica aguda. En contraste con lo anterior Cheng y cols. en 1990 observaron que solo 1 de 16 líneas celulares de leucemia tiene perdido el gen *RB1* empleando la técnica de Southern blot, Chen Yao Chan en 1990, reporta que solo 2 de 130 leucemias tienen pérdida del gen *RB1* mediante la misma técnica.

No existe evidencia en la literatura de estudios anteriores por medio de la técnica de FISH para realizar una comparación y poder considerar como representativa esa pérdida del gen, por lo que utilizamos linfocitos de 4 individuos sanos, los cuales fueron hibridados con la misma sonda *RB1* encontrando pérdida del gen *RB1* en un promedio de 0.7 %. Se hibridaron también con la sonda *BCR/ABL*, encontrando valores promedio del gen de fusión de 4.1 %

Los resultados muestran una variación muy amplia en cuanto a la supervivencia encontrada en días, ya que existen valores que van de 3 a 365 días (mediana 151 días); comparada con lo asentado por Larson en (1995) donde la mediana fue de 1080 días, la supervivencia de los pacientes estudiados en este trabajo es menor.

La LLA como otras leucemias y cáncer, es una enfermedad clonal originada por mutaciones pero que a diferencia de la leucemia mieloide crónica donde una mutación única (fusión *BCR-ABL*) predomina, en la LLA hay una plétora de anomalías moleculares y quizá, aun más por ser descubiertas; las anomalías incluyen translocaciones, pérdidas y mutaciones puntuales. La mayoría de las alteraciones moleculares identificadas en la LLA (como también en la LMA) incluyen proteínas de unión al DNA, genes híbridos o fusionados que codifican factores de transcripción (con especificidad alterada) y para el caso de la LLA T asociado con genes del receptor de células T (presumiblemente expresado como proteínas ectópicas o anormalmente activadas). Esta desregulación de factores de transcripción puede alterar la diferenciación celular. También existen anomalías en vías de señalización extracelular (*N-RAS*, activación de *LCK*), cambios que implican directamente receptores o sus ligandos conocidos, cambios en reguladores del ciclo celular (*PRAD1*, gen de inmunoglobulina, ciclina *D1*) y otras proteínas codificadas por genes fusionados o mutantes que pueden inhibir la apoptosis. Un bloqueo en la apoptosis tiene implicaciones interesantes tanto para mecanismos de leucemogénesis como para respuesta terapéutica. El porqué de esta variedad de alteraciones se ha postulado por una combinación de las siguientes razones:

1. Algunos subtipos de LLA corresponden o se originan del desarrollo de diferentes compartimentos de la hematopoyesis o linfopoyesis, teniendo diferentes anomalías moleculares, reflejando ventajas selectivas de ciertos genes vinculados en la diferenciación.
2. Mutaciones en LLA, como se demostró en leucemias experimentales y otros cánceres, tiene efectos selectivos sinérgicos o que se combinan sobre ventajas clonales y así las LLA usualmente al diagnóstico, con progresión o remisión, adquieren varios tipos de mutaciones.
3. En la LLA, en común con LMC, cuando está entra a crisis linfoblástica (o mieloblástica) conlleva a una evolución clonal *divergente*; por ejemplo: anomalías moleculares secundarias, que en LLA pueden ser diversas (Testa, N;1997)

Los múltiples eventos que se involucran en el desarrollo de la leucemogénesis pueden presentarse sincrónicos, o metacrónicos y una vez despierta la vía, ésta se vuelve independiente a la señal original.

Ello podría explicar la alta tasa de anormalidad de RB1; su alteración pudo haber sido inducida por un evento pasado, ya no importante en el comportamiento actual. La pérdida de RB1 debió ser sobrepasada por otras vías leucemogénicas ahora independientes.

Las vías leucemogénicas pueden no estar mediadas directamente por el RB1, sino ser vías adicionales que se activan en conjunto con el Ph+ el cual tampoco conllevó un valor pronóstico, sugiriendo que la alteración en la expresión del RB1 parece ser un fenómeno constante en la LLA pero independiente de la expresión del cromosoma Filadelfia sin encontrarse valor pronóstico en la respuesta al tratamiento, (por lo menos en este grupo de pacientes)

Otro punto a considerar es que las alteraciones en la expresión de RB1 pueden modificar vías de señales supresoras o inhibitoras del desarrollo tumoral. Es evidente que alguna o algunas de estas vías pueden quedar inhibidas por la alteración de RB1. Se sabe que la cinasa de ABL es constitutivamente activa en la mutación BCR/ABL ya que pierde el primer exón hacia 5' de ABL de naturaleza represora. Al final tenemos que en un paciente con LAL Ph+ (con cinasa activada, y no reprimida) y alteración en la expresión de RB1, se han perdido mecanismos reguladores antitumorales. Para medir esto se requeriría medir sustratos fosforilados a partir de RB1 o BCR/ABL (como el caso de CRKL). No obstante no encontramos correlación en la expresión numérica de RB1 contra Ph+ por lo que de presentarse relación directa con la leucemogénesis estos deben ser fenómenos epigenéticos con participación por vías de señalización intracelular diferentes. (Willman, Ch; 2000)

La integridad del cromosoma y su infraestructura es esencial para el control global de los genes. La cromatina altamente ordenada formada como un resultado del DNA condensado esta en un estado constante de flujo, esencial para permitir la expresión y represión de todos los genes en un tiempo y manera regulada.

La dinámica de este sistema está gobernada por un número de complejos mecanismos interdependientes, incluyendo metilación, acetilación y deacetilación. La interrupción de tales sistemas consecuenciales conducen a la desregulación y resulta en una falla de diferenciación celular con el potencial para la transformación celular.

Sabemos que cada cromosoma en el núcleo contiene una molécula simple de DNA empacada por proteínas en espiral enrolladas llamadas histonas. Dos moléculas de cada histona H2A, H2B, H3 y H4, son enrolladas por el DNA para formar la estructura llamada el nucleosoma y la histona de enlace H1 dirige las vías de DNA entre nucleosomas adyacentes. La mayoría de estas estructuras están organizadas en dominios enlazados por enlaces dinámicos de bases tetrahédricas, una red de proteínas intranucleares, y esta estructura es llamada el andamio nuclear o matrix. Este aparato asegura que el movimiento del DNA sin el núcleo sea severamente restringido. La estructura también podría ser flexible, capaz de alojar la expresión, replicación, reparación y recombinación diferencial de los genes. Mediante el desenrollamiento de la cromatina se permite el acceso de proteínas reguladoras controlando sitios y la actividad de enzimas específicas. Dos tipos conformacionales de cromatina son encontrados en los núcleos interfásicos:

Abierta, activa o eucromatina

Cerrada, inactiva o heterocromatina.

Un factor que participa en la modificación de la cromatina es la metilación. La cual ocurre a nivel de DNA y proteínas, y representa una forma mayor de modificaciones epigenéticas, resultando en la adición covalente de un grupo metilo en la posición 5' de una citosina, usualmente con una isla CpG. Los sitios transcripcionales inician en muchos genes que contienen islas CpG que consiste de regiones ricas en CpG y GpG que abarcan aproximadamente 1 kb. La metilación juega un papel importante en la inactivación del cromosoma X en las mujeres, en el imprinting genómico y la supresión de efectos perjudiciales de secuencias de DNA repetitivo sobre la integridad del genoma. En general, la metilación de las islas CpG es raro en células normales con islas CpG metiladas correlacionando con inactivación y la no metilación con expresión genica. Un número de genes supresores de tumor incluyendo RB1, p53 y ETV6 contienen islas CpG en sus promotores. La metilación de novo y subsecuente silenciamiento de estos genes está asociada con un número de cánceres humanos y provee un mecanismo adicional para inactivación de supresores de tumor (Saha, V; 2002)

La estrecha relación en la actividad de RB1 y la preservación de la integridad del genoma, puede representar que pérdida de la función de RB1 permitió la modificación cromatínica que lleva a genotóxicidad y diferenciación de vías leucemogénicas.

Mención aparte requiere la no correlación de RB1, Ph+ con la expresión inmunofenotípica.

8. CONCLUSIONES

Encontramos alteraciones en el gen RB1 en casi todos los pacientes, independientemente del porcentaje de Ph.

No observamos relación entre Ph, RB1 y la supervivencia del paciente.

La supervivencia de los pacientes de nuestro estudio (mediana 151 días) es menor a la reportada en la literatura (mediana 1080 días, Larson, 1995)

9. RECOMENDACIONES

Estudiar a otros genes involucrados en la leucemogénesis, así como a una población más grande de individuos para observar la relación entre los eventos genéticos involucrados y la supervivencia en los pacientes con LLA independientemente del estatus del cromosoma Ph. Con el reciente desarrollo de la técnica llamada microarreglos, puede ser posible, ya que se pueden estudiar varios genes a la vez, los cuales se encuentran involucrados en el padecimiento y así contribuir con algunas técnicas convencionales de laboratorio (inmunofenotipo, citogenética, y diagnóstico molecular)

ANEXO 1

HOJA DE CAPTACION DE DATOS

Código Interno:

Nombre:

Expediente:

Fecha del diagnóstico:

Fecha de defunción:

Causa de defunción:

Edad: Sexo:

Ocupación:

Antecedentes familiares:

Domicilio:

Tipo de muestra:

Diagnóstico:

Cariograma:

FISH % Ph Positivo:

Radioterapia:

BIOMETRIA HEMATICA INICIAL

Leucocitos

Eritrocitos

Hemoglobina

Hematocrito

Volumen Corpuscular Medio

CMHb

CMHbC

Ancho de distribución Eritrocitaria

Plaquetas

VPM

Linfocitos

Monocitos

Eosinofilos

Basofilos

Segmentados

Bandas

Metamielocitos

Mielocitos

Blastos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INMUNOFENOTIPO

TIPO DE MUESTRA _____

CD5		CD10		CD13		CD41	
CD2		CD19		CD33		CD34	
CD7		CD20		CD14		IgMc	
HLA-DR		TdT		MP0c			

HISTOQUÍMICA

MILOPEROXIDASA:

ACIDO PERYÓDICO DE SCHIFF (P.A.S) :

ALFANAFTOLESTERASA (NHL):

	SI	NO
Sd. Anémico		
Sd. Hemorrágico		
Dolor óseo		
Hepatomegalia		
Esplenomegalia		
Fiebre		
Adenomegalias		

Celularidad		TEJIDO LINFOHISTIOCITARIO	
Megacariocitos		Linfocitos	
Relación E / L		Células plasmáticas	
		Monocitos	
TEJIDO ERITROIDE		Células reticulares	
Proeritroblastos		Blastos	
Eritroblastos		Otras Células	
TEJIDO GRANULOCITARIO		Otros Hallazgos:	
Promielocitos			
Juveniles			
Adultos			
Eosinófilos			
Basófilos			
Basófilos tisulares			

INTERPRETACIÓN Y DIAGNÓSTICO:

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

10. BIBLIOGRAFIA

- Ahuja HG, Jat PS, Foti A, Bar- Eli M, Cline M: Abnormalities of the retinoblastoma Gene in the pathogenesis of Acute Leukemia. *Blood* 1991; 78:12,329
- Bodine DM, Orlic D, Birkett NC, Seidel NE, Zsebokm: Stem cell factor increases colony-forming unit-spleen number in vitro in synergy with interleukin-6, and in vivo in S1/s1^d mice as a single factor. *Blood* 1992; 79: 913-919
- Cervera C E. Biología molecular y tratamiento de la Leucemia Mielocítica Crónica. *Gaceta Médica de México*. 2002;138:1
- Chen YCH, Chen PJ, Yeh SH, Tien HF, Wang CHH: Deletion of the Human Retinoblastoma Gene in Primary Leukemias. *Blood* 1990; 76:10,2060
- Cheng J, Scully P, Shew JY, Lee WH, Vila V: Homozygous Deletion of the Retinoblastoma Gene in an Acute Lymphoblastic Leukemia (T) Cell Line. *Blood* 1990; 3: 730
- Elledge, S J. Cell Cycle Checkpoints: Preventing an identity crisis. *Science* 1996; 274: 1664-1672.
- Faderl S. Minimal Residual Disease in Hematologic Disorders. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1030-1034
- Foucar K, McKenna RW, Bloofield CD, Bowers TK, Brunning RD: Therapy-related leukemia. *Cancer* 1979; 43: 1285-1296
- Foulds L: Neoplastic Development. New York, Academic Press 1969
- Foulds L: The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res*1954; 14:327-339
- Ginsberg AM, Raffeld M, Cossman J: Inactivation of the Retinoblastoma Gene in Human Lymphoid neoplasms. *Blood* 1991;77: 4, 833
- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller HK, Vardiman J, Lister TA: The World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues. *Ann of Oncol*.1999; 10:1419-1432
- Hartwell LH, Kastan MB, Cell Cycle Control and Cancer. *Science* 1994; 266:1821-1828
- Hoelzer, D. Clinical Haematology International Practice and Research 1994; 7:2
- Hunter T, Pines J: Cycklins and Cancer II. Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 1994; 79:573

Ikebuchi K, Clark SC, Ihle JN, Souza LM, Ogawa M: Granulocyte colony-stimulating factor enhances interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors. *Proc Natl* 1968

Irons R, Stillman W: The process of Leukemogenesis. *Env. Health Persp* 1996; 104: 6:1

Kamb A: Cell Cycle Regulators and Cancer. *Trend Genet* 11: 136, 1995.

Land H, Parada LF, Weinberg RA: Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983; 304: 596-602

Leary AG, Yang YC, Clark SC, Gasson JC, Golde DW, Ogawa M: Recombinant gibbon interleukin – 3 support formation of human multilineage colonies and blast cell colonies in culture: comparison with recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1987; 70: 1343-1348

Leary AG, Zeng HQ, Clark, Ogawa M: Growth factor requirements for survival in G₀ and entry into the cell cycle of primitive human hemopoietic progenitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4013-4017

Lewin, B. *Genes VI* U.S.A. Oxford University Press, 1997

Liu Y, Hermanson M, Grander D, Merup M, Wu X: 13 q Deletions in Lymphoid Malignancies. *Blood* 1995; 86:5, 1911

Liu Y, Söderhäll S, Heyman M, Grander D, Bröndum NK: Multiple genetic Events Involving RB1 Gene Deletion and Amplification of chromosome 21 in a case of Acute Lymphocytic Leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer* 1994; 9:72

Morgan DO: Principles of CDK regulation. *Nature* 1995; 374:131

Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi SJ, Kunisada T, Sudo T: Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1988; 174:63-71

Pérez P, Mujica M, Carnevale A, Rivera R, Paredes R: Cytogenetics in Acute Lymphoblastic Leukemia in Mexican Children: An Institutional Experience. *Arch of Medical Res* 2001; 32:202

Román, J: Avances en la biología y tratamiento de la leucemia mieloide crónica *Haematologica* 2001; 86:114

Rowley, Janet. The Role of Chromosome Translocations in Leukemogenesis. *Seminars in Hematology* 1999; 36:59-72

Saha, Vascar. Review. Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *British Journal of Haematology*, 2002; 118: 714-727

Sans SJ: Hematologia Clínica.4 a ed. Harcourt, España, 2001

Sherr CJ, G1 Phase progression: Cycling on cue. Cell 1994; 79: 551

Sherr, CJ. Cancer Cell Cycles. Science 1996; 274:1672-1677

Stilgenbauer S, Döhner H, Bulgay M, Weitz S, Bentz M: High Frequency of Monoallelic Retinoblastoma Gene Deletion in B-Cell Chronic Lymphoid Leukemia Shown by Interphase Cytogenetics. Blood 1993; 81:8, 2118

Swiger R, Tucker J: Fluorescence In Situ Hybridization: A Brief Review. Envir and Molec Mutagen 1996; 27: 24

Testa N, Lord B. Hematopoietic Lineages in Health and Disease. Marcel Dekker. U.S.A 1997.p 274

William CI, Whittaker MH. The Molecular biology of acute myeloid leukemia. Proto-oncogene expression and function in normal and neoplastic myeloid cells. Clin Lab Med 1990; 10: 769-796

William S Klug. Concepts of genetics 6a. ed. U.S.A, 2000

Willman, Cheryl. Biologic and Genetic Features of Acute Myelogenous Leukemia: New Insights for Therapy. American Society of Clinical Oncology. 2000 Educational Book. 36 ed. May 19-23 2000 New Orleans, LA.