

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE GRADUADOS



**CARACTERIZACION CITOGENETICA
Y MOLECULAR DE UN GRUPO DE PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA EN EL
NORESTE DE MEXICO.**

T E S I S
**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN GENÉTICA PRESENTA LA
M. EN C. MARTHA IMELDA DAVILA RODRIGUEZ**

MONTERREY, NUEVO LEON, A DICIEMBRE DE 2001

CARACTERIZACION CITOGENETICA Y MOLECULAR DE UN
GRUPO DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA
EN EL NORESTE DE MEXICO.

TD
RC643
.D3
2001
c.1

2001

MIUR



1080124434

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE GRADUADOS



CARACTERIZACIÓN CITOGÉNICA
Y MOLECULAR DE UN GRUPO DE PACIENTES
CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA EN EL
NORESTE DE MÉXICO.

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CON ESPECIALIDAD EN GENÉTICA PRESENTA LA
AL EN C. MARTHA IMELDA DAVILA RODRIGUEZ

MONTERREY, NUEVO LEÓN, A DICIEMBRE DE 2001



TD
RC643
-D3
2001

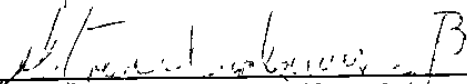
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Caracterización Citogenética y Molecular de un Grupo de
Pacientes con Leucemia Mieloide Crónica en el Noreste de
México.**

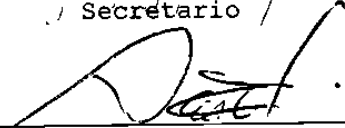
COMISIÓN DE TESIS:



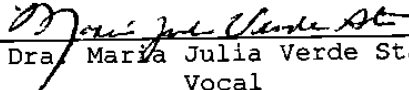
Dr. Mario Rodolfo Morales Vallarta
Director



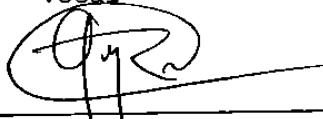
Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón
Secretario




Dr. Salvador L. Said y Fernández
Vocal



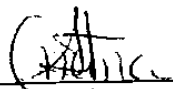
Dra. María Julia Verde Star
Vocal



Dr. Ricardo M. Cerda Flores
Vocal



M.en C. Carlos H. Leal Garza
Asesor Externo



Q.F.B. Rosa María Arana Trejo
Asesor Externo

Diciembre de 2001

LOCALIZACIÓN DEL PROYECTO

Laboratorio de Citogenética, División de Genética.
Centro de Investigación Biomédica del Noreste.
Instituto Mexicano del Seguro Social.
Monterrey, Nuevo León, México.

Departamento de Biología Celular y Genética.
Facultad de Ciencias Biológicas.
Universidad Autónoma de Nuevo León.
Monterrey, Nuevo León, México.

Servicio de Genética.
Hospital General de México.
Secretaría de Salubridad y Asistencia.
Distrito Federal, México.

Proyecto apoyado por el **Instituto Mexicano del Seguro Social**,
bajo el proyecto No. 97-364-0007, así como por el **Concejo
Nacional de Ciencia y Tecnología** con registro de beca
No.92066.

INDICE

i.	Lista de Abreviaturas	
iii.	Lista de figuras	
iv.	Lista de tablas	
v.	Dedicatoria	
vi.	Agradecimientos	
viii.	Autobiografía	
1.	RESUMEN	1
2.	ABSTRACT	2
3.	INTRODUCCIÓN	3
4.	ANTECEDENTES	5
4.1.	Características clínicas y epidemiológicas.....	5
4.2.	Panorama terapéutico.....	8
4.3.	Investigaciones citogenéticas	11
4.4.	Investigaciones moleculares.....	17
5.	HIPÓTESIS	22
6.	OBJETIVOS	23
7.	MATERIAL Y MÉTODOS	24
7.1.	Población estudiada.....	24
7.2.	Estudio citogenético.....	24
7.3.	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente.....	26
7.4.	Reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).....	27
7.5.	Análisis estadístico.....	28

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	30
8.1. Características de los pacientes estudiados.....	30
8.1.1 Edad y sexo.....	30
8.1.2 Tratamiento.....	30
8.1.3 Duración de la enfermedad.....	34
8.2. Alteración cromosómica primaria:	
determinación citogenética y molecular.....	34
8.2.1 Citogenética clásica.....	35
8.2.2 Citogenética molecular.....	36
8.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	37
8.3. Alteraciones cromosómicas secundarias:	
determinación citogenética.....	39
8.3.1 Frecuencia de alteraciones cromosómicas.....	39
8.3.2 Regiones cromosómicas alteradas.....	40
8.4. Descripción de la etapa de la enfermedad de acuerdo a	
las alteraciones cromosómicas y rearrreglos	
moleculares.....	43
8.4.1 Rearreglos moleculares de la alteración primaria...	43
8.4.2 Comportamiento citogenético transversal.....	47
8.4.3 Comportamiento citogenético longitudinal.....	47
8.4.4 Riesgo de la progresión de la enfermedad.....	52
8.4.5 Combinación de alteraciones cromosómicas	
secundarias.....	53
8.5. Comparación de frecuencias en los rearrreglos	
moleculares.....	55

9. CONCLUSIONES.....	56
10. PERSPECTIVAS E MPLICACIONES.....	57
11. BIBLIOGRAFÍA.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

a	etapa acelerada de la LMC
ABL	Abelson murine leukemia virus, gen homólogo
AEF	alteraciones extras al cromosoma Filadelfia
Al	alopurinol
AraC	cytarabina-C
alb-a11	exones del gen ABL
b	etapa blástica de la LMC
Bandas C	bandas centroméricas
Bandas G	bandas Giemsa
BCR	breakpoint cluster region, gen
BU	busulfan
b1-b5	exones en región M-BCR (mismos que exones e12-e16)
c	etapa crónica de la LMC
c-ABL	protooncogen ABL
CGAP	aberraciones cromosómicas en cáncer
c-MYC	avian myelocytomatosis virus, gen homólogo
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
der	derivativo, cromosoma
e2-e21	exones en el gen BCR
FISH	Hibridización <i>in situ</i> Fluorescente
FITC	isotiosanato de fluoresceína
HU	hydroxiurea
ID	identificación del paciente.
IFN	interferón alfa
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISCN	Sistema Internacional para la Nomenclatura de Citogenética Humana.
Kb	kilobases
LMC	leucemia mieloide crónica
LLA	leucemia linfobástica aguda
M-bcr	región con mayor número de rupturas en el gen BCR
m-bcr	región con menor número de rupturas en el gen BCR
MTX	metotrexate
pb	pares de bases nitrogenadas
p190	proteína de 190 kd, gen
p210	proteína de 210 kd, gen
p230	proteína de 230 kd, gen
p16	proteína de 16 kd, gen
p53	proteína de 53 kd, gen
PBS	solución amortiguadora de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
Ph	Filadelfia, cromosoma
RAS	rodent sarcoma virus, gen homólogo
RB	retinoblastoma, gen
RNA	ácido ribonucléico

RPMI	Roswell Park Memorial Institute, medio de cultivo
RR	riesgo relativo
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
SSC	solución de citrato de sodio
SM	sin metafases
μ -bcr	región con rupturas en el gen BCR
Vinb	vinblastina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de hematopoyesis.....	5
Figura 2. Translocación de t(9;22) (q34;q11), en Leucemia Mieloide Crónica.....	13
Figura 3. Rutas mayor y menor de la frecuencia y combinación de las alteraciones citogenéticas durante la fase blástica en pacientes con LMC.....	15
Figura 4. Puntos de rompimiento y unión de los genes BCR y ABL, para la formación del gen quimérico BCR-ABL en la t(9;22) (q34;q11) de la LMC.....	18
Figura 5. Fotografías de la detección del cromosoma Ph con técnicas de citogenética clásica y FISH, respectivamente.....	37
Figura 6. Gel de agarosa al 1% con amplificación del gen <i>bcr</i> , y los rearreglos b2a2 y b3a2.....	38
Figura 7. Distribución de los cromosomas afectados en las alteraciones secundarias al cromosoma Ph en pacientes con LMC.....	39
Figura 8. Cariotipos parciales que muestran las principales alteraciones cromosómicas secundarias al cromosoma Ph (idiograma y fotografía del cromosoma).....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla 1a. Edad, sexo, tratamiento y duración de la enfermedad en pacientes con LMC, con tratamiento de novo.....	31
Tabla 1b. Edad, sexo, tratamiento y duración de la enfermedad en pacientes con LMC, con previo Tratamiento al momento del estudio.....	33
Tabla 2. Complemento de las técnicas de citogenética clásica y FISH, para la caracterización citogenética de pacientes con LMC.....	35
Tabla 3. Rearreglo molecular del cromosoma Ph y la evolución clínica en pacientes con LMC.....	43
Tabla 4. Distribución del cariotipo inicial de acuerdo a la etapa de la enfermedad, en pacientes con LMC.....	45
Tabla 5. Comportamiento Citogenético en pacientes con LMC, de acuerdo al primero y al último cariotipo realizado en el estudio.....	48
Tabla 6. Riesgo relativo de la progresión de la enfermedad (RR) de acuerdo a la presencia de AEF en 15 pacientes con LMC, medidos longitudinalmente.....	52
Tabla 7. Alteraciones cromosómicas de pacientes con LMC, agrupadas de acuerdo a la ruta mayor de evolución citogenética (según Heim y Mitelman 1995).....	53
Tabla 8. Comparación de los rearrreglos del cromosoma Ph, en el presente estudio versus un estudio multicéntrico paralelo.....	55

A ti Cruz,

*que vas de mi mano
haciendo lo cotidiano extraordinario.*

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Mexicano del Seguro Social a través del Centro de Investigación Biomédica del Noreste y el Hospital de Especialidades No.25. A la Universidad Autónoma de Nuevo León a través de la Escuela de Graduado de la Facultad de Ciencias Biológicas. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Al Hospital General de México, SSA. a través del Servicio de Genética. Gracias, por brindarme la oportunidad de realizar la meta que un día me propuse, esperando que los frutos también sean para bien de estas nobles Instituciones.

Al Dr. Raúl Garza Chapa de quien recibí consejos y apoyo desde el inicio de mis estudios de postgrado.

AL M. en C. Carlos H. Leal Garza, por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y ser un pilar importante en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Mario Morales Vallarta, Dra. Ma. Teresa González Garza y Barrón, Dr. Salvador Said y Fernández, y Dra. María Julia Verde Star, por la dirección y revisión del presente trabajo.

Al Dr. Ricardo M. Cerda Flores, Dra. Elva I. Cortés Gutiérrez y Q.F.B. Rosa María Arana Trejo, por el gran privilegio de tenerlos como amigos y maestros en mi formación profesional.

Al Dr. Pascual Herrera Sánchez y al Dr. Enrique Báez de la Fuente, así como al equipo de enfermería del Depto. de hematología del Hosp. No.25, IMSS, por compartir su experiencia profesional y brindar las muestras hematológicas necesarias para el presente proyecto.

Al Dr. Antonio Luna por ofrecer su mejor esfuerzo profesional para el desarrollo gráfico incluido en el presente trabajo.

A mis amigas Elisamaría, Julie y Yolanda, porque a través del compañerismo logramos una amistad sólida.

A mis compañeros del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, gracias por hacer grato el trabajo diario.

A mi familia por su apoyo. A mi esposo por transmitirme su entusiasmo y optimismo. A mis padres por su ejemplo de trabajo y honestidad.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

M. en C. Martha Imelda Dávila Rodríguez

Fecha de nacimiento: 08 de Agosto de 1966

Educación: Biólogo, Febrero de 1990. Maestría en Ciencias con especialidad en Genética, Marzo de 1994.

Experiencia Profesional: Investigador Asociado del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS desde Junio de 2001 a la fecha.

Línea de Investigación: Genética de Poblaciones y Citogenética Molecular.

Publicaciones:

Gene Frequencies and Admixture Estimates for ABO, Rh0(D), and MN Blood Groups in Persons with Mono- and Polyphyletic Surnames in Monterrey, N.L., México. Garza-Chapa R, Dávila-Rodríguez MI, Leal-Garza CH, González-Quiroga G, and Rojas-Alvarado MdeL. *Am J of Hum Biol* 1995; 7:65-75.

Mosaicismo Diploide-Tetraploide. Estrella Garza M. Hernández Rivero RJ, Leal Garza CH, Cortés Gutiérrez EI, Dávila Rodríguez MI, Garza Pérez RM. *Rev Invest Med SS(Mex)* 1998; 3:85-86.

Estudio Citogenético de la Leucemia Mieloide Aguda. Dávila-Rodríguez MI, Cortés-Gutiérrez EI, Herrera-Sánchez P, Báez de la Fuente E, Leal-Garza CH. *Salud Pública y Nutrición* 2000;1. <http://www.uanl.mx/publicaciones/respyn/especiales/imms/007.htm>.

Natural Fertility in Northeastern Mexico: Genetic Structure by Year of Birth and Birthplace. Cerda-Flores RM and Dávila-Rodríguez MI. *Arch Med Res* 2000; 31:520-525.

Natural Fertility in Northeastern Mexico. Cerda-Flores RM and Dávila-Rodríguez MI. *Arch Med Res* 2000; 31:599-604.

1. RESUMEN

Introducción: La leucemia mieloide crónica (LMC), es una neoplasia hematológica que presenta el cromosoma Filadelfia (Ph), en aproximadamente el 95% de los casos. Dicho cromosoma es el resultado de una translocación entre el cromosoma 9 y 22, originándose diferentes rearrreglos moleculares como consecuencia de los diversos rompimientos en ambos cromosomas. Aunado a lo anterior, con el progreso de la enfermedad aproximadamente en el 80% de los casos se presentan otras alteraciones cromosómicas extras al cromosoma Ph (AEF), que no son al azar. **Hipótesis:** la distribución genética de los diversos tipos de rearrreglos moleculares del cromosoma Ph se comportan de manera homogénea en las poblaciones mestizas mexicanas con LMC. **Objetivo:** Determinar las alteraciones cromosómicas en 38 pacientes con LMC a través de la progresión de la enfermedad y los rearrreglos moleculares del cromosoma Ph, así como comparar la distribución genética de éstos rearrreglos, con la encontrada en un estudio multicéntrico paralelo. **Material y Métodos:** Se analizaron muestras de médula ósea y/o sangre periférica mediante técnicas de citogenética clásica e hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Además se amplificaron los rearrreglos moleculares involucrados en la formación del cromosoma Ph, obteniendo cDNA mediante transcryptasa reversa y posteriormente amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). **Resultados:** Los 38 pacientes presentaron cromosoma Ph, y en el 93% de ellos, los rearrreglos moleculares de dicho cromosoma fueron b3a2 ó b2a2. Las AEF en el cariotipo, se encuentran con mayor frecuencia combinadas y no en forma única. Los cromosomas que más frecuentemente se encontraron alterados fueron el 17, 8 y 19. En cuanto a la progresión de la enfermedad, los pacientes con AEF tuvieron un riesgo dos veces mayor de progresión que aquellos que no las presentaron; y por otro lado, aunque se presentó una gran variabilidad en el promedio de vida, aquellos pacientes cuyo rearrreglo molecular fue b3a2 el promedio fue menor. Los rearrreglos moleculares se distribuyeron homogéneamente con respecto a un estudio multicéntrico paralelo. **Conclusión:** La homogeneidad genética encontrada en esta enfermedad facilitará el muestreo sin detallar información de la residencia o migración en la población mexicana, creando la posibilidad de una fácil colecta de grandes series de casos para posteriormente aplicar estrategias de tratamiento y pronosis en este tipo de pacientes.

2. Abstract

Introduction: Chronic myeloid leukaemia (CML) is an hematological neoplasia that present the Philadelphia (Ph) chromosome in almost 95% of the cases. Ph chromosome is a translocation of the chromosome 9 and 22. This translocation has several molecular rearrangements with specific breakpoints. In almost 80% of the CML there are additional chromosome aberrations (ACA) during the progression of this disease. **Hypothesis:** The genetic distribution of the molecular rearrangements of the Ph chromosome in the Mexican mestizo population with CML is homogeneous. **Objective:** 1) To assess the ACA in 38 patients with CML according with the disease progression and with the molecular rearrangements of the Ph chromosome, 2) to compare the genetic distribution of these molecular rearrangements in the present study versus a multicentric study. **Material and Method:** Bone marrow or peripheral blood of 38 patients samples were analyzed by classical cytogenetic and fluorescence in situ hybridization (FISH) techniques. Amplifications of specific sequences on the Ph chromosome were performed by reverse transcription of cDNA, followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** All of the patients showed the Ph chromosome and 93% of the molecular rearrangements were b2a2 or b3a2. The ACA were registered in combination with others chromosomes. The chromosomes 17, 8, and 19 were the most often damaged. With respect to the disease progression, the patients with ACA had two time risk than the patients without these. The average survival of the patients varied, besides those patients with the b3a2 molecular rearrangement had a minor average survival with respect to the patients with b2a2. The distribution of the molecular rearrangements were similar between this study versus a multicentric study. **Conclusion:** The genetic homogeneity founded of this disease in Mexico will facilitate the sampling without detailed information of their residential history or inter-state migration history, leading to the possibility for easy collection of large cases series. Furthermore will facilitate the treatment and prognosis of patients with this disease.

3. INTRODUCCION

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una de las neoplasias más estudiadas en el aspecto citogenético y molecular. Fue la primera neoplasia en la que se encontró una asociación entre una alteración cromosómica con la etiología de la enfermedad (Nowell y Hungerford 1960). Esta anomalía cromosómica, se presenta en más del 95% de los casos, y es debida a una translocación entre los cromosomas 9 y 22, lo que da como resultado al llamado cromosoma Filadelfia (Ph) el cual se considera como la alteración primaria de la LMC (Rowley y Cols 1973).

El resultado molecular de dicha translocación, es la unión del gen c-ABL con el gen BCR, lo que da lugar a un gen quimérico, del cual resultan principalmente dos distintos híbridos, que dan origen a una misma proteína (Tanaka y Cols. 1993).

Con el avance de la enfermedad en el 80% de los casos, aparecen alteraciones cromosómicas secundarias o extras al cromosoma Ph, y se ha visto que se presentan en forma heterogénea geográficamente. En algunas de estas alteraciones, se han definido cuáles genes intervienen y su posible papel en la etiología de la enfermedad (Chopra y Cols. 1999).

La pregunta que aún no se ha contestado, es: ¿por qué razón la enfermedad en un tiempo promedio de cuatro años, progresa hacia una etapa en la que ya es incierto el promedio de vida? En la búsqueda de respuestas, las características citogenéticas y moleculares de la LMC contribuyen en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad, así como también en el conocimiento de la etiología.

El presente trabajo ofrece una caracterización tanto citogenética como molecular de 38 pacientes a través de las diferentes etapas de la LMC, cuyo diagnóstico se realizó en el departamento de hematología del hospital de especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, en Monterrey, Nuevo León, México.

4. ANTECEDENTES

4.1. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS

La LMC, es un desorden mieloproliferativo clonal de las células estaminales hematopoyéticas, que involucra a los componentes de la serie mieloide (eritropoyéticos, megacariocíticos y granulopoyéticos) y linfoide (linfocitos B y algunas veces linfocitos T) (Faderl y Cols. 1999b). En la Figura 1 se observa un esquema de la hematopoyesis (Poplack 1988).

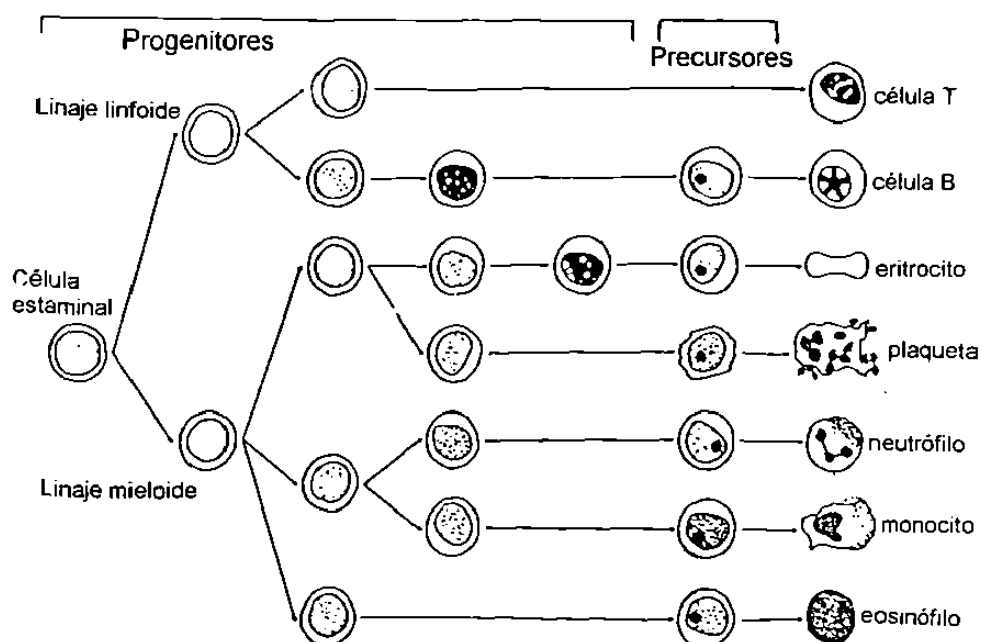


Figura 1. Esquema de Hematopoyesis.

La LMC es una enfermedad que se caracteriza por ser muy heterogénea o variable en su evolución clínica y se asocia frecuentemente con leucocitosis y esplenomegalia.

Esta enfermedad puede tener un curso clínico bifásico o trifásico (fase crónica, acelerada y/o blástica). Además, como ya se ha mencionado, se caracteriza por presentar desde el inicio de la enfermedad un marcador cromosómico llamado cromosoma Ph.

Desde el punto de vista de susceptibilidad, la LMC en población adulta afecta tanto a hombres como a mujeres en una proporción de 1.5:1.0, respectivamente y se presenta entre los 40 y 60 años de edad (*Aguilar y Cols. 1995, Chopra y Cols. 1999*). Cabe mencionar que del 12 al 30% de los pacientes son mayores de 60 años (*Faderl y Cols. 1999b, Greenberg y Cols. 1995*).

Al inicio de la enfermedad se presenta una fase crónica con un periodo aproximado de tres años, la cual es considerada benigna desde el punto de vista clínico. El paciente pasa posteriormente a una fase de aceleración e inmediatamente a una fase de crisis blástica. Los porcentajes de pacientes que mueren por complicaciones en la fase acelerada es del 20 al 25%. Similares porcentajes son encontrados en aquellos pacientes que desarrollan una fase blástica sin pasar por una fase acelerada intermedia (*Kantarjian y Cols. 1993*).

Lo siguiente criterios son considerados para definir la fase acelerada (adaptado de Sokal y Cols.1988):

Criterios comúnmente usados en la práctica clínica

- Blastos en médula o sangre periférica $\geq 10\%$
 - Basófilos y eosinófilos en médula o sangre periférica $\geq 20\%$
 - Incremento de reticulina o colágena en médula ósea
 - Leucocitosis ($>50 \times 10^9$ leucocitos/L), Anemia (hematocrito $<25\%$),
 - Trombocitopenia ($<100 \times 10^9$ trombocitos/L), no controlado con terapia antileucémica.
 - Trombocitosis marcada ($>1000 \times 10^9$ trombocitos/L)
 - Esplenomegalia progresiva sin respuesta a la terapia
 - Fiebre inexplicable o dolor en huesos
 - Requerimiento de mayores dosis de medicamento
-

Criterios derivados de análisis multivariante

- Blastos en sangre periférica $\geq 15\%$
 - Blastos y promielocitos en sangre periférica $\geq 30\%$
 - Basófilos en sangre periférica $\geq 20\%$
 - Trombocitopenia ($<100 \times 10^9$ trombocitos/L) no relacionados a la terapia
 - Evolución citogenética clonal
-

Por otro lado, se considera que un paciente se encuentra dentro de una fase blástica cuando presenta un 30% o más de células leucémicas en sangre periférica o bien cuando existe infiltración extramedular de células blásticas (Faderl y Cols. 1999b).

Cuando el paciente evoluciona de la fase crónica a la fase blástica, en el 80% de los casos, es hacia una forma mieloide aguda, y el resto pasa a una forma linfoide, eritroide o megacariocítica. Cabe señalar que en todos los casos hay un deterioro físico gradual que es utilizado por el médico para

categorizar al paciente en modelos de pronóstico y de tratamiento (*Kantarjian y Cols. 1993, Bernstein y Gale 1990*).

Los pacientes adultos con leucemia del Noreste de México son captados en el Hospital de Especialidades No. 25 del IMSS. De acuerdo a las estadísticas de dicho hospital, de 50 pacientes que llegan anualmente, el 25% de ellos presentan LMC.

La incidencia de LMC a nivel mundial es de 1 a 2 casos por cada 100,000 personas (*Faderl y Cols. 1999b*). En México, la tasa de mortalidad por esta enfermedad es de 3/100,000 habitantes (*Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiología 1997*).

4.2. PANORAMA TERAPÉUTICO

Durante la fase crónica los pacientes responden a distintas medidas terapéuticas siendo la quimioterapia en su modalidad de monodroga la más utilizada con agentes tales como Busulfan o Hidroxiurea.

El Busulfan es un agente alquilante que afecta a las células tallo primitivas en forma preferencial, por lo que induce remisión hematológica de duración variable, sin retornar en la mayoría de las veces a cantidades hematológicas normales en médula. Por otra parte, la Hidroxiurea inhibe a la enzima ribonucleótido reductasa la cual es requerida en la síntesis de DNA para los deoxinucleótidos siendo los resultados equivalentes al Busulfan (*Allan 1989, Chaplin 1985*).

El efecto de cualquiera de los agentes terapéuticos se considera que mejora la calidad de vida debido a que prolonga la etapa crónica de la enfermedad, llegando a una remisión hematológica completa, pero no a una remisión citogenética [no hay supresión total del cromosoma Ph] (Greenberg y Cols 1995).

A partir de 1983 se inició el uso del interferón alfa, el cual es una glicoproteína producida por células eucariotas en respuesta a una estimulación antigénica, con propiedades antiproliferativas y antiangiogénicas, (Faderl y Cols. 1999b).

El interferón alfa ha resultado ser más eficaz que los agentes anteriores, en la inducción y mantenimiento de la remisión hematológica y citogenética, aunque éste tampoco tiene la capacidad de erradicar la enfermedad residual [0% de células con cromosoma Ph] (Talpaz 1986, Ozer y Cols. 1993, Allan y Cols. 1995), sin embargo, hay datos de que demuestran lo contrario (Yoffe y Cols. 1987). Además, se ha informado en un estudio con 7 años de seguimiento, que con el uso crónico de interferón se logran remisiones citogenéticas sostenidas, a diferencia de la quimioterapia intensiva, cuya respuesta es transitoria y mínima (Talpaz y Kantarjian 1991). En términos generales el interferón induce remisión hematológica en el 70%, una respuesta citogenética en el 40% de los pacientes, mosaicismo en el 50% y del 10 al 20% de ellos obtiene supresión total de la clona (Shtalrid y Cols. 1993). Sin embargo su mecanismo preciso de acción en la LMC es desconocido (Faderl y Cols. 1999b).

Los procedimientos anteriores tratan de prolongar la fase crónica cuya duración promedio en términos generales sigue siendo muy similar a nivel mundial, a pesar de que del 20 al 25% de los pacientes permanecen con mayor respuesta citogenética (*Mills y Cols. 1991, Tanaka y Cols. 1993, Rodríguez y Cols. 1998, Stuppia y Cols. 1997, Kantarjian y Cols. 1993, Kumar 1999*). Aunado a lo anterior, cuando los pacientes entran a la fase de transformación que incluye la fase acelerada y/o la blástica, las células leucémicas son inmaduras y prácticamente ya no hay respuesta al tratamiento, y la mayoría de los pacientes recaen, después de un promedio de vida de seis meses (*Goldman 1994*).

La estrategia que ofrece oportunidades significativas para la cura de esta enfermedad es el trasplante de médula ósea o sangre periférica, durante la fase crónica.

El trasplante alogénico (células de un donante con histocompatibilidad idéntica) es limitado para su aplicación, debido principalmente a la edad, a la disponibilidad del donador, y a la etapa de la enfermedad en que se realice, ya que durante fases avanzadas el rango de recaída hematológica es muy alto (*Przepiorka D y Cols. 1999*). Se considera que con este procedimiento solamente se "curan" cerca del 15% de todos los pacientes con esta enfermedad (*Greenberg y Cols. 1995, Santos 1993, Melo 2000*). Al realizarse dicho trasplante el 50% de los pacientes alcanzan remisión total, con un promedio de 3 a 5 años sin recaída hematológica (*Przepiorka y Cols. 1999, Davies y Cols. 2001*).

Otra opción es el trasplante autólogo (células del propio paciente), que aunque implica procedimientos más laboriosos,

en algunas partes del mundo se realiza aproximadamente en el 80% de los casos (*Dunbar y Stewart 1992, Gratwohl y Cols. 1999*).

En México, el grupo pionero en trasplantes de médula ósea, inició su desarrollo a partir de 1980 (*Sosa y Cols. 1980*), y en 1992 se reportó el primer caso exitoso en cuanto al tiempo de supervivencia de un paciente con leucemia mieloide aguda, ya que después de tres años y cuatro meses del trasplante no presentó recaída (*León y Sosa 1992*). Hoy en día, de acuerdo a la experiencia de hospitales de referencia, hay un promedio de supervivencia después de tres años en el 50% de los pacientes elegidos a un trasplante, siendo los de tipo alogénicos los más practicados (*Vela-Ojeda y Cols. 2000, Ruiz-Argüelles 2001*).

Por otro lado, las investigaciones citogenéticas y por consecuencia las moleculares, se han venido utilizando durante los últimos 25 años, siendo éstas herramientas indispensables para el diagnóstico y estrategias terapéuticas en este tipo de pacientes, además de que han tenido una gran contribución en el conocimiento del origen de la enfermedad.

4.3. INVESTIGACIONES CITOGÉNÉTICAS

En las neoplasias hematológicas existen aberraciones cromosómicas que no son debidas al azar, a pesar de que existe gran heterogeneidad en diferentes poblaciones. La investigación citogenética de células neoplásicas ha revelado más de 600 alteraciones cromosómicas, asociadas a un tipo específico de tumor (*Mitelman 2000*).

En las neoplasias se presentan dos tipos de alteraciones:

a) **alteraciones cromosómicas primarias** que son los primeros cambios que se ven en una célula neoplásica y son específicamente asociadas a la enfermedad, por lo que se cree que son un factor esencial en su establecimiento.

b) **alteraciones secundarias**, raramente o nunca se encuentran en forma única, se desarrollan en las células aunadas a la anomalía primaria, y parecen depender de ésta para su distribución, por lo que se consideran importantes para la progresión de la enfermedad (*Jhansson y Cols. 1996*).

La LMC fue la primera neoplasia en relacionarse con una alteración cromosómica específica, llamada cromosoma Filadelfia (*Ph*), que es considerado como la alteración principal o primaria. Dicha alteración es el resultado del rompimiento de los cromosomas 9 y 22, con una translocación recíproca del material: $t(9;22)(q34;q11)$ (*Nowell y Hungerford 1960, Rowley y Cols. 1973*), esta translocación se presenta esquematizada en la **Figura 2**, donde la región que se transloca esta señalada como clara para el cromosoma 9 y sombreada para el cromosoma 22 (según *Heim y Mitelman, 1995*).

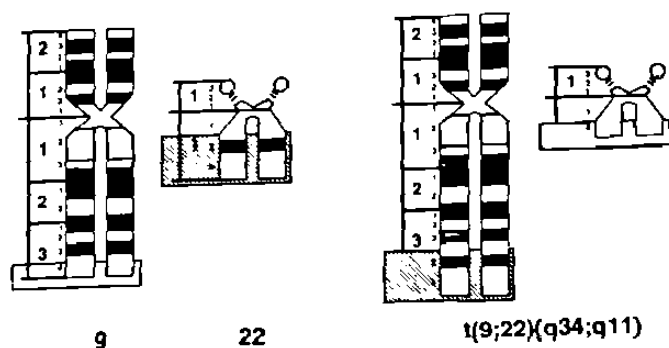


Figura 2 . Translocación de $t(9;22)(q34;q11)$, en Leucemia Mieloide Crónica.

En la formación del cromosoma Filadelfia, del 5 al 10% de los casos se involucran otros cromosomas diferentes a los cromosomas 9 y 22, dando lugar a translocaciones complejas, de modo que el DNA del tercer cromosoma generalmente es translocado al cromosoma 9, la porción terminal de éste al 22 y el segmento del 22 al tercer cromosoma. Sin embargo, clínica y hematológicamente los pacientes son idénticos en cualquiera de estas variantes. (Watmore y Cols. 1985, Heim y Cols. 1985, Heim y Mitelman 1995).

Mediante técnicas citogenéticas convencionales, la presencia del cromosoma Ph se observa entre el 90 y 95% de los pacientes de LMC, sin embargo cuando se aplican técnicas moleculares, aproximadamente el 40% de los casos que habían sido considerados negativos para la translocación $t(9;22)$, resultan ser positivos (Stuppia y Cols. 1997, Hagemeijer y Cols. 1993, Kurzrock y Talpaz 1995).

En el paciente con LMC, los síntomas clínicos de la crisis blástica, son similares a otras formas de la leucemia aguda, en cuanto a más del 30% de blastos en sangre periférica o médula ósea. Sin embargo ambas formas de leucemias son citogenéticamente distinguibles (Rooney y Czepulkowski 1992).

A partir de 1986, se ha venido aplicando una técnica de citogenética molecular denominada hibridación *in situ* fluorescente (siglas en inglés, FISH), que consiste en la utilización de sondas moleculares específicas marcadas con colorantes fluorescentes. Esta técnica ha resultado un complemento a la citogenética clásica, ya que ofrece la oportunidad de explorar no sólo a nivel cromosómico, sino a nivel molecular. (Pinkel y Cols. 1986).

Con la caracterización de los genes involucrados en la t(9;22), es posible su análisis mediante FISH. La técnica de FISH puede realizarse en cromosomas y en núcleos interfásicos, por lo que un diagnóstico rápido para este caso en particular, se realiza en un frotis de médula ósea o sangre periférica en un tiempo de 24 ó 48 horas. Además es posible determinar la frecuencia de las alteraciones de interés en mosaicismos tan bajos como un 1%, por disponer de cientos de células para su análisis (Schaffer 1993, Westbrook 1992).

A través del curso de la enfermedad en los pacientes con LMC, el cromosoma Ph se mantiene aproximadamente en el 20-25% de los casos como única alteración cromosómica, y entre el 75 y 80% presentan alteraciones cromosómicas secundarias o extras al Ph (AEF). Estas últimas indican en la mayoría de los casos

una progresión hacia la fase blástica o terminal de la enfermedad, por lo que pueden ser consideradas como indicadores pronósticos, aunque se requiere más investigación al respecto (Singh S y Cols. 1986, Chopra R y Cols. 1999).

Los resultados de diversos estudios citogenéticos realizados en un gran número de pacientes, fueron recopilados por Sverre Heim y Felix Mitelman (Heim y Mitelman 1995), para registrar la evolución citogenética de las AEF durante la fase blástica, y se organizaron en dos rutas de acuerdo a su frecuencia y combinación de alteraciones cromosómicas: la ruta mayor donde se incluyen el 70% de los casos y la ruta menor que incluye un 30%, (Figura 3).

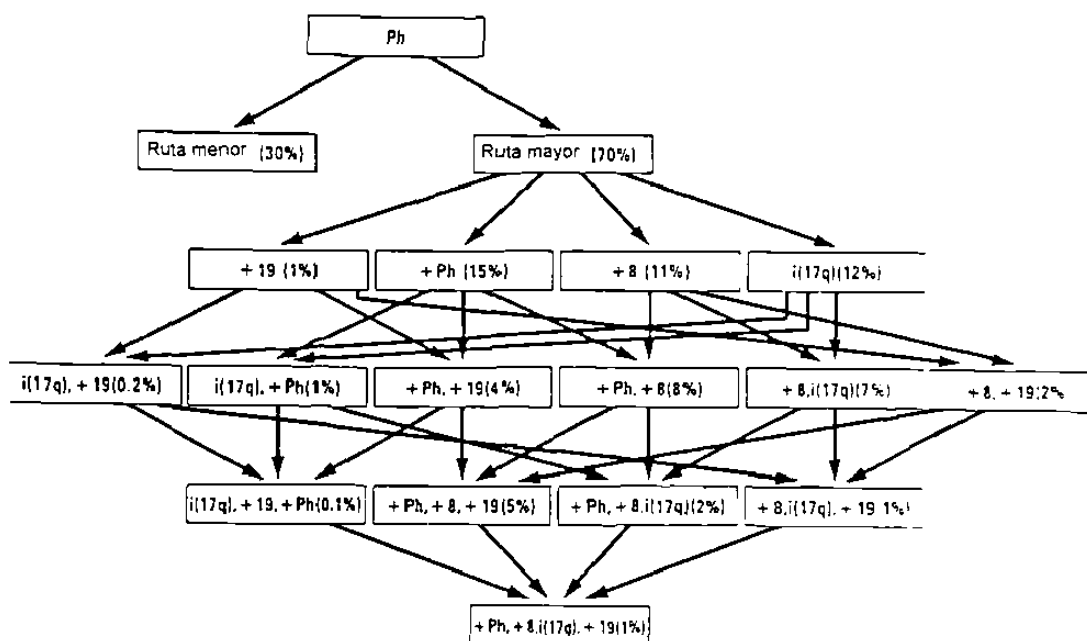


Figura 3. Ruta mayor y menor de la frecuencia y combinación de las alteraciones citogenéticas durante la fase blástica en pacientes con LMC.

Ruta mayor. La evolución del cariotipo fue con +8, +Ph o i(17q); el +19, por otro lado, se presenta más tardío, y usualmente en combinación con +8 y +Ph. El i(17q) en combinación con +8 es un fenómeno frecuente, mientras las combinaciones de i(17q),+19; +Ph,i(17q); +8,i(17q),+19; y +Ph, i(17q), y +19, son muy raras.

Ruta menor. Las alteraciones cromosómicas más frecuentes por encontrarse en más de la mitad de los casos, son cinco cambios numéricos (-Y, -7, -17, +17, y +21), y una translocación, t(3;21)(q26;q22).

Existe una gran heterogeneidad geográfica en la distribución de las aberraciones de la ruta mayor. La frecuencia de la trisomía 8 se ha encontrado en un 18% en el Norte de Europa y en un 49% en Japón, la frecuencia del i(17q) es de un 8% en los Estados del Atlántico Medio a un 33% en el Este de Europa, la frecuencia de la trisomía 19 es de un 7% en los Estados del Atlántico Medio y Este de Europa a un 21% en Japón, y la frecuencia del cromosoma Ph extra es de un 9% en el Este de Europa y de un 43% en Japón (Johansson y Cols. 1991). Esta variabilidad puede ser explicada por la diferencia en susceptibilidad y/o exposiciones genotóxicas (incluyendo regímenes de tratamiento) (Heim y Mitelman 1995).

4.4. INVESTIGACIONES MOLECULARES

Caracterización molecular del cromosoma Filadelfia. Existen descritas tres proteínas de fusión, que son el resultado de los diversos puntos de rompimiento en el gen bcr (siglas en inglés que significan breakpoint cluster region), por lo que las tres variantes se consideran citogenéticamente como Ph positivo. Uno de los rompimientos, ocurre en la zona m-bcr (m= menor), y origina la proteína quimérica p190, se presenta en pacientes con leucemia linfocítica aguda (LLA), en porcentajes del 25% en adultos y del 5% en los pacientes infantiles (*Chan y Cols 1987*). Un segundo rompimiento, ocurre en la zona M-bcr (M= mayor), y se presenta en aproximadamente el 98% de los pacientes con LMC y en cerca del 12% y 2% de los pacientes adultos y niños con LLA, respectivamente, originando la proteína quimérica p210 (*Gale y Canaani 1984; Chopra y Cols. 1999*). El tercer tipo de rompimiento, ocurre en la zona μ -bcr (μ = micro), y se presenta en pacientes con leucemia neutrofílica crónica, originando la proteína quimérica p230 (*Pane y Cols. 1996*). Las tres zonas de rompimiento, se esquematizan en la **Figura 4**.

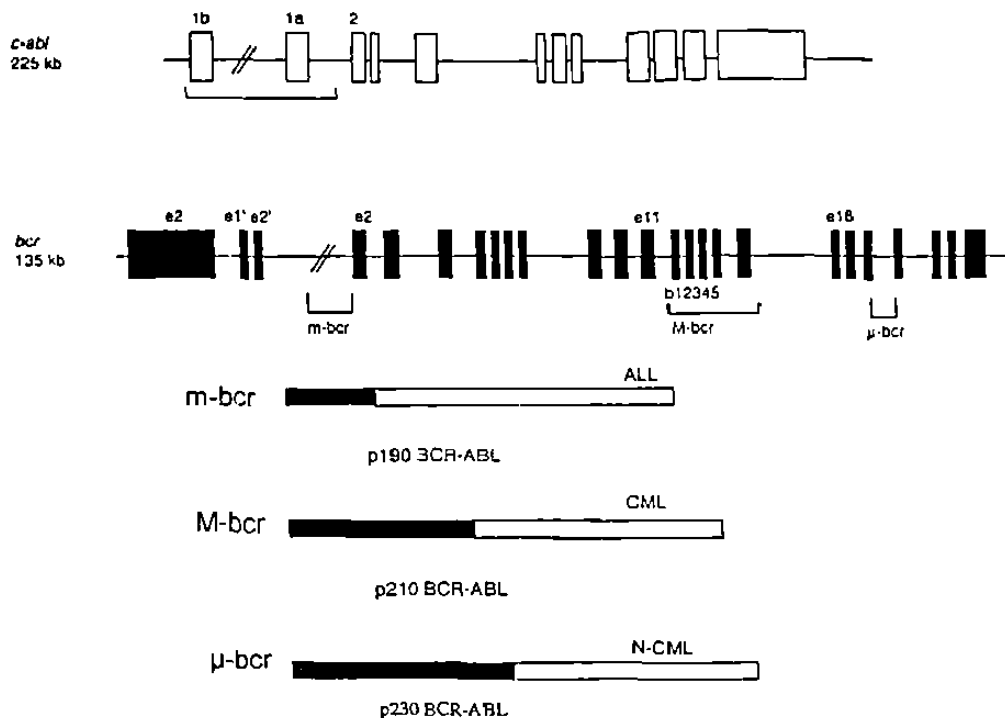


Figura 4. Puntos de rompimiento y unión de los genes BCR y ABL.

Alteración Cromosómica Primaria en la LMC. La caracterización molecular del cromosoma Filadelfia, fue facilitada por la localización del protooncogén *c-abl* en los brazos largos del cromosoma 9 (De Klein y Coles, 1982). Después se determinó que en dicho gen los rompimientos son a través de una larga región intrónica (200 Kb) en el extremo 5' entre el exón *alb* y el exón 2. Mientras que los rompimientos en el cromosoma 22 son en un área limitada de 5.8 Kb en el extremo 3' en la

llamada región M-bcr (M = mayor), que comprende de los exones 12 al 16, conocidos convencionalmente como b1 a b5, los rompimientos más frecuentes son entre el exón b2 y b3 o entre los exones b3 y b4. Después de la maduración (corte y pegado) del RNA, hay principalmente dos opciones en los transcritos resultantes: bcr exón b2 o b3 con abl exón a2, resultando en ambos casos un RNA mensajero de 8.5 Kb que codifica para una proteína quimérica llamada p210 por su peso molecular (Konopka y Cols. 1985). La composición de los transcritos BCR-ABL no depende sólo de la localización del rompimiento, sino es influenciado por los eventos alternativos de la maduración (corte y pegado) del RNA, por lo que un nuevo rearrreglo de DNA entre los exones b3 y b4 puede resultar a nivel de RNA en una unión b3-a2, pero alternativamente también el exón b2 o e1, pueden ser directamente unidos con a2 (Kurzrock y Talpaz 1995), por tal motivo también es factible encontrar los dos tipos de RNA en un mismo paciente, aunque se han reportado porcentajes muy variables, de 30.2% (Tanaka y Cols. 1993) y de 5% (Lichty y Cols.1998). En cuanto a la frecuencia de los rearrreglos, los diversos reportes indican mayor frecuencia de aquellos con el exón b3, o bien un 50% de frecuencia de cada uno (Mills y Cols. 1988, , Mills y Cols. 1991, Tanaka y Cols. 1993, Ruiz-Argüelles y Cols. 2001). En un estudio multicéntrico de población mexicana se registró mayor frecuencia del exón b2 y un 7.4% con ambos rearrreglos (Arana y Cols. 2002)

Se ha sugerido que la presencia o ausencia del exón b3, tiene un impacto sobre el curso clínico de los pacientes con LMC. Este punto continúa en controversia, ya que algunos reportes indican una correlación entre el sitio de rompimiento que incluya el exón b3, con una menor duración de la fase

crónica, mientras que otros no han encontrado dicha correlación, y a excepción de un estudio en Japón, los rompimientos muestran una distribución uniforme, a pesar de la amplia variación de localidades geográficas (Mills y Cols. 1991). La mayoría de los últimos estudios al respecto, plantean una influencia de los rearrreglos en el gen con el progreso de la enfermedad, pero una explicación en concreto aún no existe (Tanaka y Cols. 1993, Fioreto y Cols. 1993; Verschraegen y Cols. 1995; Kamel y Cols. 2000).

Alteraciones Cromosómicas Secundarias. Las consecuencias de las alteraciones cromosómicas durante un proceso neoplásico hematológico, incluyen puntos de rompimiento frecuentes, sitios frágiles y por consiguiente también genes alterados, que probablemente están implicados en la etiología (Mitelman 1984; Yunis y Soreng 1984; Mitelman 2000),

Se sabe que las anormalidades en otros protooncogenes o genes supresores de tumor durante la crisis blástica de LMC incluye deleciones y rearrreglos de los genes RAS, p53 (17p13), RB1(13q14), p16^{INK4}(9q21), así como amplificación de los genes c-MYC(8q24) y AML-1-EVI-1[t(3;21)]. Alteraciones epigenéticas tales como la metilación del promotor proximal de c-ABL, ha sido descrito en el cambio de fase crónica a fase acelerada de la LMC, y es asociada con la progresión de la enfermedad pero hasta el momento carece de significancia pronóstica. Sin embargo es necesario continuar estudiando el valor potencial pronóstico de estos eventos moleculares (Chopra y Cols. 1999).

En general, en las leucemias, las anormalidades adicionales son en su totalidad poco comunes y en la mayoría de los casos

durante la transformación de la enfermedad, las mutaciones sinérgicas son desconocidas (Chopra y cols. 1999). El análisis molecular de rearrreglos cromosómicos recurrentes, especialmente de translocaciones e inversiones, han proporcionado herramientas para investigar la patogénesis de las leucemias, sin embargo el número de genes identificados no va en aumento en comparación a las translocaciones encontradas. Es decir, que se ha encontrado que un gen está involucrado en más de una translocación, formando genes de fusión a su vez con otros genes, por lo que se plantea la existencia de una red con un "reciclaje" de genes en nuevas combinaciones de fusión, lo cual sugiere un número limitado de genes que se alteran en la leucemia (Bohlander 2000).

5. HIPÓTESIS

No existen diferencias en la distribución de los diversos tipos de rearrreglos moleculares del gen BCR-ABL del cromosoma Filadelfia en la población mestiza mexicana con leucemia mieloide crónica.

6. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones cromosómicas en 38 pacientes con LMC a través de la progresión de la enfermedad, y los rearrreglos moleculares del cromosoma Filadelfia, así como la distribución genética de éstos, en comparación a los de un estudio multicéntrico paralelo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Identificar el cromosoma Filadelfia, a nivel cromosómico y molecular.
- 2.- Identificar las alteraciones cromosómicas extras al cromosoma Filadelfia, mediante citogenética clásica.
- 3.- Descripción de la etapa de la enfermedad de acuerdo a:
 - a) los rearrreglos moleculares del cromosoma Filadelfia.
 - b) las alteraciones cromosómicas secundarias.
- 4.- Comparación de los rearrreglos moleculares del cromosoma Filadelfia de la población estudiada con los rearrreglos de otras poblaciones mexicanas con la misma enfermedad.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. POBLACIÓN ESTUDIADA

Se incluyeron 38 pacientes del Departamento de Hematología, del Hospital No. 25, del IMSS, cuyo diagnóstico clínico fue leucemia mieloide crónica, en cualquiera de las etapas de la enfermedad, en un período de tres años.

De la población estudiada, 17 pacientes fueron mujeres con una edad promedio de 43 años (rango 17-77) y 21 pacientes fueron varones con una edad promedio de 44 años (rango 24-60).

Las muestras consistieron de 3-5 ml de médula ósea y/o sangre periférica, referidas al laboratorio de Citogenética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS. El número de muestras analizadas de cada paciente a lo largo de la evolución de la enfermedad fue variado, y no fueron tomadas en lapsos determinados.

El protocolo de investigación para este estudio, fue aprobado por el comité de bioética del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, IMSS.

7.2. ESTUDIO CITOGÉNÉTICO

La obtención de cromosomas se llevó a cabo por la técnica habitual o directa.

Para el cultivo habitual se agregó medio RPMI suplementado con 15% de suero fetal de ternera y antibióticos

(estreptomicina-penicilina), y después de 24 ó 48 horas, se agregó colchicina (concentración final de 20 µg/ml), y después de 30 minutos se agregó una solución hipotónica y finalmente se realizaron lavados con solución Carnoy (metanol-ácido acético). Por otro lado, en la técnica directa la muestra se expuso directamente a colchicina y solución hipotónica, sin previo cultivo. Así mismo las muestras de sangre periférica fueron cultivadas por 72 horas tanto con y sin fitohemaglutinina (Rooney y Czepulkowski 1992).

Las laminillas se procesaron de acuerdo a los procedimientos convencionales, y se aplicaron técnicas de tinción de bandeo G a todas las preparaciones cromosómicas, y según los requerimientos de análisis, las muestras también se sometieron a la técnica de tinción de bandeo C (Verma y Babu 1989).

Se elaboró una hoja de análisis citogenético donde se registraron los cariotipos de acuerdo con el Sistema Internacional para la Nomenclatura de Citogenética Humana (ISCN1995). Así mismo, si la calidad de metafases lo permitió, se tomaron microfotografías de las alteraciones cromosómicas encontradas. Lo anterior permitió crear un banco de laminillas fijadas permanentemente de las cuales se cuenta con localizaciones de metafases representativas de cada caso.

El número de metafases analizadas se determinó de acuerdo a la calidad del cultivo celular, cuando fue posible se analizaron de 10 a 30 metafases.

La definición de una clona anormal, fue en base a los siguientes criterios (*Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1984*):

- Dos o más células que presenten la misma anormalidad estructural.
- Dos o más células que adquieran el mismo cromosoma (trisomías)
- Tres o más células que pierdan el mismo cromosoma (monosomías)

7.3. HIBRIDACIÓN *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

Se realizó esta técnica para confirmar a nivel cromosómico la presencia del rearrreglo M-bcr/abl en los pacientes.

Se utilizaron laminillas obtenidas mediante las técnicas de citogenética clásica, fijados en solución de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1), y envejecidas no más de un mes.

Técnica en términos generales:

- a) Primeramente se realizó la deshidratación de la muestra para lo que se sometieron a incubación a 37°C en 2X SSC y después a soluciones de 70,80 y 95% de etanol.
- b) Posteriormente para la hibridación, la laminilla se colocaron en una solución desnaturalizadora (formamida 70%, 20XSSC, agua deionizada estéril) a 70°C, para así abrir la doble cadena del ácido nucleico, inmediatamente después se introdujeron a baños de soluciones de etanol frío desde 70% hasta 100% sucesivamente. Después de esto se expuso el DNA de la muestra a una sonda específica para la t(9;22) (probe: M-bcr/abl Translocation, DNA probe, Cat. #: P5109-DC, ONCOR).

c) Finalmente después de un período de incubación a 37 °C en cámara húmeda, para realizar la detección, la muestra se lavó con una serie de soluciones de 2X, y 1X de SSC, y 1X de PBS. Se agregaron los colorantes fluorescentes (rodamina e isotiocianato de fluoresceína), dejándolo durante 30 minutos, para después eliminar el exceso y agregar el colorante fluorescente DAPI como contraste. La observación se realizó bajo microscopio epifluorescente a 100X (CARL ZEISS modelo Axiophot), empleando un filtro de triple banda (DAPI/FITC/Rojo Texas). Se realizó un conteo de 300 células según criterio establecido (Kuo y Cols. 1991).

7.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA REVERSA (PCR-RT)

Esta técnica se realizó para determinar los sitios de rompimiento que puedan existir en la región M-bcr del cromosoma 22, al participar en la t(9;22)(q34;q11).

Se realizó extracción de RNA total de médula ósea y/o sangre periférica, por el método de Fenol/Cloroformo/Isotiocianato de Guanidina (Chomczynski y Sachi 1987), y se evaluó su calidad mediante corrimiento electroforético en gel desnaturizante (Sambrook y Cols. 1989).

De acuerdo a metodologías previas, la síntesis de cDNA se realizó mediante la enzima transcriptasa reversa, con la posterior amplificación del rearreglo bcr/abl por reacción en cadena de la polimerasa [RT-PCR]. La detección de los rearreglos b2a2 y b3a2 fue por RT-PCR múltiple, incluyéndose como control interno el exón 2 del gen bcr normal (Cotter 1996).

La mezcla de PCR múltiple se amplificó por 30 a 35 ciclos a 96°C (desnaturalización) por 30 segundos, 60°C (anillamiento) por 50 segundos y 72°C (extensión) por 1 minuto, seguido por 10 minutos de extensión final a 72°C. Posteriormente se realizó su corrimiento en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con 0.2 µg/ml de bromuro de etidio.

Las bandas registradas fueron las siguientes:

808pb para el gen BCR normal (de B2B a C5e-), como control interno.

385pb y/o **310pb**, para b3a2 y b2a2, respectivamente (B2B a CA3-).

Secuencias de oligonucleótidos:

B2B	5' ACAGaATTCCGCTGACCATCAATAAG 3'
C5e-	5' ataggaTCCTTTGCAACCGGGTCTGAA 3'
NB1+	5' GAGCGTGCAGAGTGGAGGGAGAACA 3'
ABL3-	5' GGTACCAGGAGTGTTCCTCCAGACTG
B2A	5' TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT 3'
CA3-	5' TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG 3'

Los oligonucleótidos se seleccionaron de acuerdo a secuencias previamente descritas (Cotter 1996).

La totalidad de las reacciones por este método se realizaron en el Servicio de Genética del Hospital General de México, de la Secretaría de Salubridad y Asistencia.

7.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó la prueba de G (X^2 con 10,000 repeticiones) (Roff y Bentzen 1989), en la comparación de los rearrreglos moleculares del cromosoma Ph de la población bajo estudio con otro estudio multicéntrico.

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

8.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS.

En las **tablas 1a y 1b** se describe la edad, sexo, tratamiento y duración de la enfermedad, de los pacientes con tratamiento de novo y con tratamiento previo al momento del estudio, respectivamente.

8.1.1 Edad y Sexo. Al analizar a los pacientes de acuerdo a su edad y sexo respectivamente, no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$), lo cual se ha reportado previamente para otras poblaciones (Aguíar y Cols. 1995, Ch'ang y Cols. 1993, Chopra y Cols. 1999). Se registró un rango de edad entre 17 y 77 años, dentro del cual el 15.8% de los pacientes tuvieron una edad mayor a 55 años. Este porcentaje cae dentro de los rangos de 12 al 45% reportados previamente (Faderl y Cols. 1999b, Greenberg y Cols. 1995, Chaplin 1985).

8.1.2 Tratamiento. Se muestra, según sea el caso, el tratamiento recibido al momento del primero y del último cariotipo realizado durante el estudio, así como el recibido al momento del diagnóstico. Trece pacientes no habían recibido tratamiento (pacientes de Novo), descritos en la **tabla 1a** y 25 si lo habían recibido, descritos en la **tabla 1b**. Cabe mencionar que de los 13 pacientes de Novo, 7 de ellos continuaron en el estudio citogenético, por lo que se registró el tratamiento que recibieron posteriormente. El tratamiento consistió básicamente de quimioterapia

Tabla 1a. Edad, sexo, tratamiento y duración de la enfermedad, en pacientes con LMC, con tratamiento de novo al momento del estudio.

CARACTERÍSTICAS			T E R A P I A					TIEMPO		
ID	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO	ETAPA	CARIOTIPO 1	ETAPA	CARIOTIPO 2	ETAPA	CRÓNICA	TOTAL
1	M	31	NOVO	C	NOVO	C				
2	F	40	NOVO	C	NOVO	C				
6	F	60	NOVO	C	NOVO	C	IFN, BU	C		
9	F	35	NOVO	C	NOVO	C			04	18
10	M	44	NOVO	C	NOVO	C	IFN, BU	C	44	51
11	F	60	NOVO	C	NOVO	C				
15	F	46	NOVO	C	NOVO	C				
16	M	36	NOVO	C	NOVO	C			33	40
19	M	24	NOVO	C	NOVO	C	BU	a	12	14
20	M	34	NOVO	C	NOVO	C	IFN	a		
23	F	17	NOVO	C	NOVO	C	IFN	C		
28	M	41	NOVO	C	NOVO	C				
32	F	33	NOVO	C	NOVO	C				

ID=número de paciente, BU=Busulfán, IFN=interferón alfa, c=etapa crónica, a=etapa acelerada, F=femenino, M=masculino.

Tabla 1b. Edad, sexo, tratamiento y duración de la enfermedad, en pacientes con LMC, con tratamiento previo al momento del estudio.

CARACTERÍSTICAS		T E R A P I A							TIEMPO	
ID	SEXO	EDAD	DIAGNÓSTICO	ETAPA	CARIOTIPO 1	ETAPA	CARIOTIPO 2	ETAPA	CRÓNICA	TOTAL
3	M	37	MTX	c	BU, IFN	a			159	176
4	M	37	BU, IFN	c	BU	c	BU, IFN	a		
5	M	35	BU	c	BU	a				
7	F	42	HU	c	IFN	c	HU, BU, IFN	a	42	45
8	M	60	Ara-C, BU, IFN	c	Ara-C, BU, IFN	b			34	46
12	F	39	IFN, HU	c	IFN	c	HU, IFN, Ara-C	c		
13	M	43	IFN	c	IFN, B	c	IFN, BU	c		
14	F	37	HU, BU, IFN	c	HU, BU, IFN	c	HU, BU, IFN	c		
17	F	37	BU, IFN	c	IFN	c	IFN	a	22	31
18	M	49	BU, IFN	a	BU, Vinb	a			120	126
21	M	48	IFN	c	IFN	c	IFN	c		
22	M	54	BU	c	BU	a	Ara-C, BU	a	10	22

Tabla 1b (continuación).

24	M	43	BU	a	BU	a			105	113
25	F	35	BU, IFN	c	IFN	a			57	63
26	M	32	BU, IFN	c	BU, IFN	c				
27	F	33	BU	c	BU	c				
29	M	56	BU	c	BU, Al	c				
30	M	47	BU, Al	c	BU, Al	c	BU	a	24	30
31	F	54	IFN	c	HU	c				
33	F	37	BU	c	BU	a			18	26
34	M	50	BU	c	BU, IFN	c				
35	M	53	BU	c	BU	c			45	47
36	F	54	BU	c	BU	a			36	39
37	M	40	BU, IFN	c	BU, IFN	a			47	56
38	F	77	BU	a	BU	a	IFN	a	26	30

Al=Alopurinol, Ara-C=Cytarabina, BU=busulfan, IFN=interferon alfa, Vinb=vinblastina,
 MTX=Metotrexate, HU=Hydroxyurea, Vinb=vinblastina

[Busulfan (BU), Hidroxiurea (HU) y/o Cytarabina(Ara-C)] con interferón alfa (IFN) y/o la combinación de éstos. Dicho tratamiento es usual a nivel internacional (*Mills y Cols. 1991, Tanaka y Cols. 1993, Hochhaus y Cols. 1998, Cortes y Cols. 1998*)

8.1.3 Duración de la Enfermedad. A 23 de los pacientes se les registró su evolución de la enfermedad. Es decir, los meses transcurridos desde el momento del diagnóstico (etapa crónica) hasta el momento de la progresión de la enfermedad (etapa acelerada), registrándose en ellos un tiempo promedio de 44 meses (rango 4-159). Así mismo, en 19 de los pacientes el promedio de vida total (desde el diagnóstico de la enfermedad hasta su deceso) fue de 51 meses (rango 14-176). Lo anterior concuerda con los valores entre 50 y 55 meses, reportados para diversos países, entre los que se encuentran: Inglaterra, USA, España, Japón, Brasil e Italia (*Watmore y Cols. 1985, Cervantes y Cols. 1990, Tanaka y Cols. 1993, Aguiar y Cols. 1995, Stuppia y Cols. 1997, Faderl y Cols. 1999b, Rodríguez y Cols. 1998*).

8.2. ALTERACIÓN CROMOSÓMICA PRIMARIA: DETERMINACIÓN CITOGENÉTICA Y MOLECULAR.

El 100% de los pacientes presentaron cromosoma Ph positivo.

En la **tabla 2** se agrupan los pacientes en los que fue necesario complementar las técnicas de citogenética clásica y FISH, para obtener un resultado.

ID	Bandeo G Ph positivo (%/ # metafases)	FISH Ph positivo (%/ # células)
2	SM	83 (500)
9	SM	95 (330)
14	0	25 (270)
17	81 (16)	79 (520)
28	SM	70 (450)
37	94 (47)	87 (514)

ID-identificación de. paciente SM sin metafases

Tabla 2. Complemento de las técnicas de Citogenética Clásica y FISH, para la caracterización citogenética del cromosoma Ph en pacientes con LMC.

Se describen primero los hallazgos citogenéticos con las técnicas clásicas y posteriormente su complemento con la técnica de FISH.

8.2.1 Citogenética Clásica. De los 38 pacientes incluidos en el estudio en 35 de ellos se obtuvo buena calidad de metafases, de los cuales el 97% (34 /35) tuvieron cromosoma Ph positivo. Dicho porcentaje se incluye entre el 90 al 98% reportado en otras poblaciones (*Kurzrock y Talpaz 1995, Faderl y Cols. 1999b*). En 28 pacientes se encontró el cromosoma Ph en la totalidad de las células estudiadas, y en seis se encontró en forma de mosaico con porcentajes entre 62% y 94%. El hecho de haber encontrado el cromosoma Ph en forma de mosaico indicó un efecto del tratamiento ya que estos pacientes tenían entre 22 y 42 meses de diagnosticados.

Únicamente en uno de los pacientes su cariotipo resultó cromosoma Ph negativo (ID=14).

8.2.2 Citogenética Molecular (FISH). Los resultados de esta técnica concuerdan con los de citogenética clásica. Además se logró detectar el cromosoma Ph en el paciente con ID=14, que por citogenética clásica fue negativo. Según antecedentes al utilizar técnicas moleculares en dichos casos, resultan ser positivos entre el 40 y 50% de los pacientes (*Hagemeijer y Cols. 1993, Kurzrock y Talpaz 1995, Stuppia y Cols. 1997*). También se detectó a nivel interfase en los pacientes 2, 9 y 28, en los cuales no se obtuvieron metafases adecuadas para el análisis de citogenética clásica. Estos resultados de citogenética molecular remarcan que la técnica de FISH es un método más sensible que el análisis de bandeos G, y es una herramienta poderosa para realizar el análisis en células tumorales, donde es frecuente la ausencia de metafases adecuadas para su estudio. La técnica de FISH, debe usarse en complemento con las técnicas de citogenética clásica, las cuales son básicas en el diagnóstico y seguimiento de este tipo de pacientes.

Los resultados revelaron que en la formación del cromosoma Ph de la población estudiada intervinieron sólo los cromosomas 9 y 22, a diferencia de otros reportes donde se menciona que entre un 5 y 10% de los pacientes analizados existe la intervención de tres o cuatro cromosomas al formarse dicha alteración cromosómica. (*Watmore 1985, Heim 1985*). En la **figura 5**, se muestra una fotografía de la t(9:22) con bandeos G, así como una fotografía de FISH con sonda específica para la región M-bcr/abl.

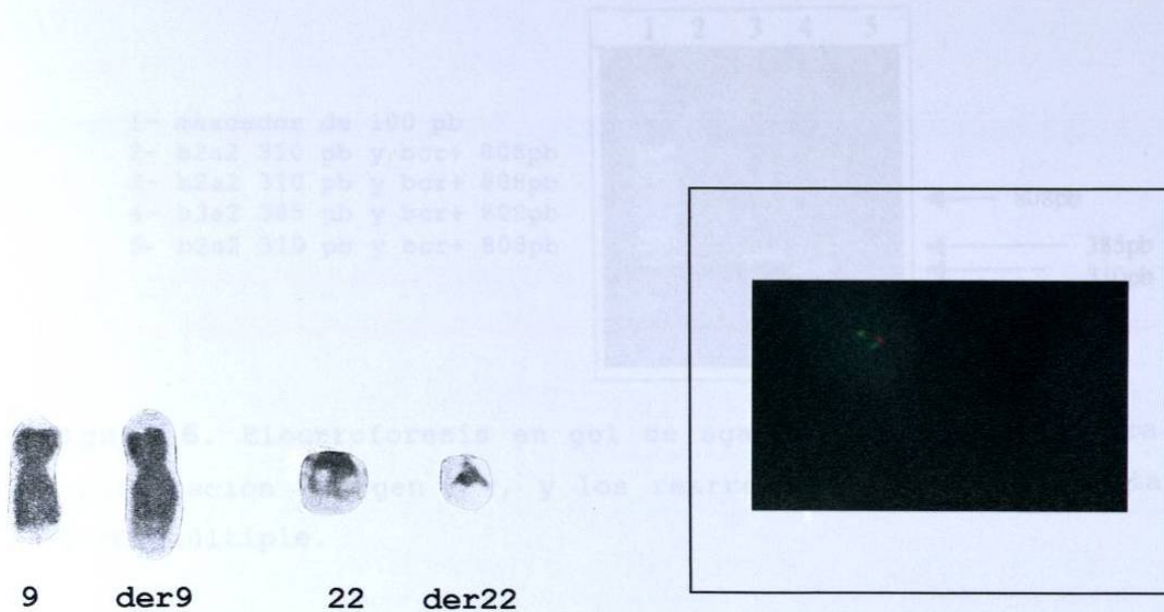


Figura 5. Fotografías de la detección del cromosoma Ph con técnicas de citogenética clásica y FISH (señal amarilla indica translocación, roja el gen *M-bcr* y señal verde el gen *abl*).

8.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

La **figura 6** muestra un gel de agarosa al 1% con amplificación de los rearrreglos b2a2 (310 pb) y b3a2 (385 pb) del cromosoma Ph, mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.

- 1- marcador de 100 pb
- 2- b2a2 310 pb y bcr+ 808pb
- 3- b2a2 310 pb y bcr+ 808pb
- 4- b3a2 385 pb y bcr+ 808pb
- 5- b2a2 310 pb y bcr+ 808pb

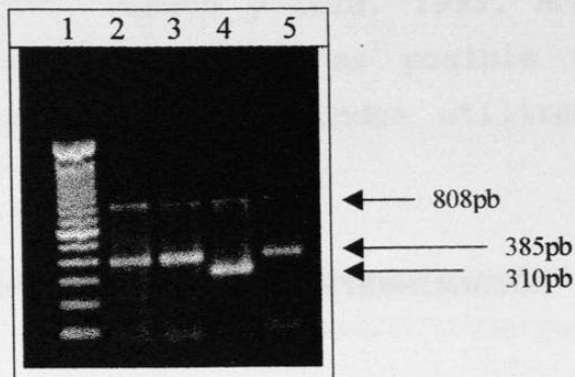


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la amplificación del gen bcr, y los rearrreglos b2a2 y b3a2 mediante RT-PCR múltiple.

Dichos rearrreglos se obtuvieron de un total de 16 pacientes, de los cuales 9 (56%) presentaron el rearrreglo *b2a2*, 6 (37%) el *b3a2*, y uno más (7%) en el que no se determinó el tipo de rearrreglo por que no amplificó para los puntos de rompimiento *a2b2* y *a2b3*, sólo amplificó para el gen BCR, lo que indica que presenta otro tipo de rearrreglo. Cabe mencionar que éste último paciente fue positivo para el cromosoma Ph, tanto en los dos cariotipos que se le realizaron, como en el análisis de FISH, el cromosoma Ph fue positivo en un 81% y 79% respectivamente (la presencia en mosaico fue quizás por efecto del tratamiento ya que las pruebas se realizaron despues de 22 meses del diagnóstico), estos datos se mostraron en la tabla 2. Existió un mayor porcentaje en el rearrreglo *b2a2*, tal como se registró en el estudio multicéntrico (Arana-Trejo y Cols. 2002, en prensa). Los porcentajes de los rearrreglos por otro lado, difieren de los reportados para poblaciones de otros países e incluso para uno de México, en donde las frecuencias entre ambos rearrreglos son muy similares, o bien hay una mayor frecuencia de *b3a2* (Mills y

Cols. 1988, Mills y Cols. 1991, Tanaka y Cols. 1993, Ruiz-Argüelles y cols. 2001). Sin embargo no es posible una comparación objetiva por los diferentes métodos utilizados para la determinación de los rearrreglos.

8.3. ALTERACIONES CROMÓSOMICAS SECUNDARIAS: DETERMINACIÓN CITOGÉNÉTICA.

8.3.1 Frecuencia de alteraciones cromosómicas. La distribución de los cromosomas afectados en las alteraciones secundarias al cromosoma Ph en pacientes con LMC, se muestran en la figura 7.

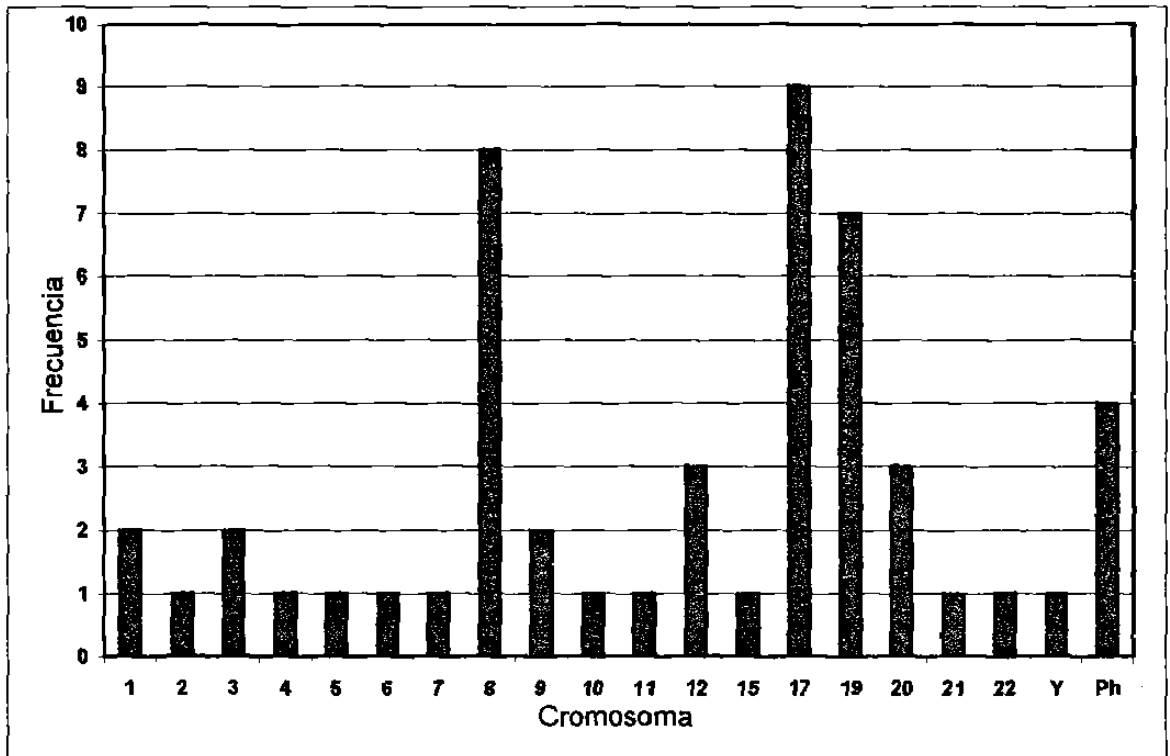


Figura 7. Distribución de los cromosomas afectados en las alteraciones secundarias al cromosoma Ph en pacientes con LMC.

Las barras más altas corresponden en orden descendiente a las alteraciones de los cromosomas 17, 8, 19 y Ph extra. Dichas alteraciones son las mismas que se reportan como AEF o alteraciones cromosómicas secundarias no aleatorias en otros estudios (Rooney y Czepulkowski 1992, Heim y Mitelman 1995).

8.3.2 Regiones Cromosómicas Alteradas

En la figura 8, se muestran los esquemas y las fotografías de cada una de las alteraciones cromosómicas encontradas en el presente estudio.

Figura 8. Cariotipos parciales que muestran las principales alteraciones cromosómicas secundarias al cromosoma Ph (idiograma y fotografía del cromosoma).

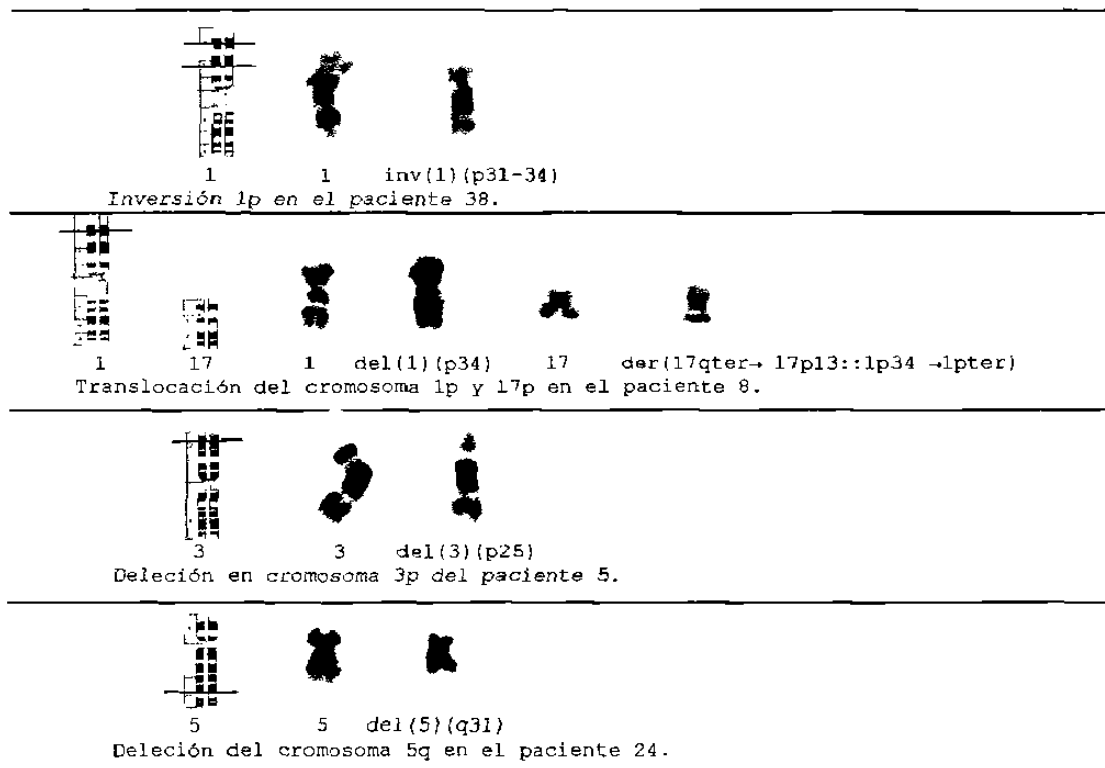
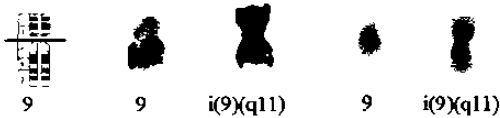


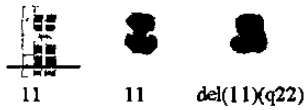
Figura 8 (continuación).



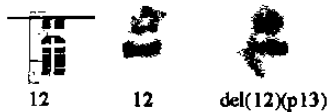
6 6 del(6)(q22)
Delección del cromosoma 6q en el paciente 19.



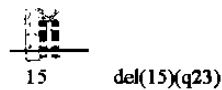
9 9 i(9)(q11) 9 i(9)(q11)
Isocromosoma del cromosoma 9q en el paciente 26 (técnica de bandas G y C, respectivamente).



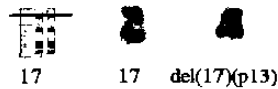
11 11 del(11)(q22)
Delección del cromosoma 11q en el paciente 38.



12 12 del(12)(p13)
Delección del cromosoma 12p en el paciente 6.



15 del(15)(q23)
Delección del cromosoma 15q en el paciente 23.(no fue posible obtener fotografía)



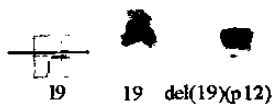
17 17 del(17)(p13)
Delección del cromosoma 17p en el paciente 19.



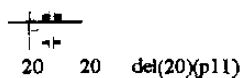
17 17 iso(17)(q11)
Isocromosoma del cromosoma 17q en el paciente 25.



17 17 del(17)(q23)
Delección del cromosoma 17q en el paciente 21.



19 19 del(19)(p12)
Delección del cromosoma 19p en el paciente 29.



20 20 del(20)(p11)
Delección del cromosoma 20p en el paciente 31.(no fue posible obtener fotografía)

Todas las alteraciones se compararon con aquellas que se encuentran como aberraciones recurrentes derivadas de la base de datos de aberraciones cromosómicas en cáncer (*Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, 2002*). Dicha base de datos incluye todos los cambios estructurales presentes en mínimo dos casos de la misma entidad morfológica (en este caso de LMC con Ph positivo).

Nuestros hallazgos muestran que en la base de datos mencionada, la mayoría de las alteraciones registradas, coinciden al menos con la región cromosómica involucrada. Se encontraron dos excepciones, la inversión 1p y el isocromosoma 9q. En referencias que consideran el cáncer en general, la región involucrada en la inversión 1p, presenta un gen homólogo para el oncogen v-JUN de aves, además de rompimientos frecuentes en diferentes tipos de cáncer, y respecto al cromosoma 9 aún no se menciona ningún dato (*Yunis y Soreng 1984, Human Gene Mapping 11, 1991*).

De acuerdo a reportes anteriores, las regiones cromosómicas alteradas que se registraron en este estudio (con las excepciones ya mencionadas), presentan puntos de rompimiento frecuentes para neoplasias hematológicas, sitios frágiles y genes alterados (genes supresores de tumor, protooncogenes) que probablemente están implicados en la etiología (*Mitelman, 1984; Hecht y Hecht 1984; Yunis y Soreng 1984; Mitelman, 2000*). Sin embargo hasta los datos más recientes, de pocas regiones cromosómicas involucradas se menciona con certeza el gen o genes que participan y cual puede ser su papel en la etiología de la enfermedad (*Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, 2002*).

8.4. DESCRIPCIÓN DE LA ETAPA DE LA LMC DE ACUERDO A LAS ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y REARREGLOS MOLECULARES.

Nuestros resultados confirman el diagnóstico de LMC, dada la presencia del cromosoma Ph en el 100% de los pacientes.

8.4.1 Rearreglos Moleculares de la alteración primaria

En la **tabla 3**, se muestran los datos de 15 pacientes con LMC, describiendo el rearreglo molecular y la evolución clínica de la enfermedad con el tiempo de la etapa crónica (del diagnóstico a inicio de la etapa acelerada y/o blastica), y el tiempo total de la enfermedad (desde el diagnóstico a su desceso).

ID	REARREGLO	*tiempo	
		CRÓNICA	TOTAL
1	b2a2	>32	>32
3	b2a2	159	176
7	b2a2	42	45
8	b2a2	34	46
13	b2a2	>72	>72
16	b2a2	33	40
31	b2a2	>16	>21
32	b2a2	>6	>6
34	b2a2	>30	>30
18	b3a2	120	126
19	b3a2	12	14
20	b3a2	26	>39
23	b3a2	>38	>38
6	b3a2	>41	>41
10	b3a2	44	51

*expresado en meses

Tabla 3. Rearreglo molecular del cromosoma Ph y evolución clínica, en pacientes con LMC.

Los promedios del tiempo de la etapa crónica y el tiempo total (diagnóstico a deceso) de la enfermedad en los pacientes con b2a2, fueron de 67(rango 33-120) y 77(rango 40-176) meses, respectivamente. Así mismo los promedios del tiempo de la etapa crónica y el tiempo total de la enfermedad en los pacientes con b3a2, fueron de 50.5(rango 12-120) y 64(rango 14-126) meses respectivamente (para los promedios no se incluyeron pacientes que al final del estudio su enfermedad estaba en curso). Nuestros datos muestran una duración menor en la enfermedad para aquellos pacientes cuyo rearreglo fue b3a2, lo cual coincide con reportes de otras poblaciones (Tanaka y Cols. 1993, Fioreto y Cols. 1993, Verschraegen y Cols. 1995, Kamel y Cols. 2000).

Sin embargo, para una conclusión definitiva, es necesario continuar estudiando nuestra población para aumentar el número de muestra. En la actualidad aún persiste la controversia de la posible influencia de los rearreglos en la progresión de la enfermedad.

Alteraciones Cromosómicas

Todas las alteraciones secundarias en el presente estudio, fueron determinadas mediante el uso de técnicas de citogenética clásica.

En la **tabla 4**, se observa la distribución del cariotipo inicial de los 38 pacientes estudiados, los cuales se agruparon de acuerdo a la etapa de la enfermedad (crónica o acelerada) al momento del estudio.

Tabla 4. Distribución del cariotipo inicial de acuerdo a la etapa de la enfermedad, en pacientes con LMC.

ID	ETAPA	EDAD	SEXO	TIEMPO	CARIOTIPO
23	c	17	F	0	46XX,t(9;22)(q34;q11)[27]
19	c	24	M	0	46XY,t(9;22)(q34;q11)[17]
1	c	31	M	0	46XY,t(9;22)(q34;q11)
26	c	32	M	50	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[8]/47,XY,t(9;22)+mar[3]
27	c	33	F	2	43-46XX,t(9;22)(q34;q11)[20]
32	c	33	F	0	46XX,t(9;22)(q34;q11)[27]
20	c	34	M	0	46XY[10]/46XYt(9;22)(q34;q11)[6]
9	c	35	F	0	SM
16	c	36	M	0	46XY,t(9;22)(q34;q11)[19]
4	c	37	M	11	46XYqh+,3qh-,(9;22)(q34;q11)[28]
14	c	37	F	17	46,XX [10]
17	c	37	F	17	46XX,t(9;22)(q34;q11)[30]
12	c	39	F	14	46XX,t(9;22)(q34;q11)[40]
2	c	40	F	0	SM
28	c	41	M	0	SM
7	c	42	F	42	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20]
13	c	43	M	13	46XY,t(9;22)(q34;q11)[20]
10	c	44	M	0	46XY,t(9;22)(q34;q11)

Tabla 4 (continuación).

15	c	46	F	0	46XX,t(9;22)(q34;q11)[42]
30	c	47	M	10	46XY,t(9;22)(q34;q11)[10]
21	c	48	M	33	46XY,t(9;22)(q34;q11)[31]
34	c	50	M	3	46XY,t(9;22)(q34;q11)[40]
35	c	53	M	43	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]
31	c	54	F	3	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[17]/46,XX,t(9;22),del(12)(p13),del(20)(p11)[9]
29	c	56	M	4	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[6]/46-49,XY,t(9;22),+18,del(19)(p12)[cp5]
6	c	60	F	0	46XX,t(9;22)(q34;q11)[18]
11	c	60	F	0	46XX,t(9;22)(q34;q11)
5	a	35	M	12	46,XY,del(3)(p25),t(9;22)(q34;q11)..[10]/48,idem+8,+der22t(9;22)[10]
25	a	35	F	45	42-43,XX,t(9;22)(q34;q11)[9],i(17)(q10)[9]/46,XX,t(9;22)[5]
3	a	37	M	161	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[11]/46,XX,t(9;22)+8-22[3]
33	a	37	F	27	46XX,t(9;22)(q34;q11)[24]
37	a	40	M	50	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[32]/38-45,XY,t(9;22),-21[9]/46,XY,t(9;22),i(17)(q10),+19[3]/46,XY[3]
24	a	43	M	109	50-56,XY,+4,del(5)(q22),+8,+9,t(9;22)(q34;q11)x2,del(12)(p12),+19+2xmar[cp20]
18	a	49	M	121	46,XY,+8,t(9;22)(q34;q11),i(17)(q10)[15]/46,XY,t(9;22),i(17)(q10)[6]
22	a	54	M	14	46XY,t(9;22)(q34;q11)[12]/50,XX,t(9;22)[4]
36	a	54	F	41	46-47,XX,t(9;22),+8[10],i(17)(q10)[4][cp14]
8	a	60	M	30	46,XY,t(1;17)(p32-p?),t(9;22)(q34;q11),16qh+[9]/46,XY,t(9;22),16qh+[2]
38	a	77	F	16	44-46,XX,t(9;22)(q34;q11),-10,del(11)(q21),-18,+19[cp16]

c=crónica, a=acelerada, F=femenino, M=masculino, SM=sin metafases

8.4.2 Comportamiento citogenético transversal. En la **tabla 4**, se analiza el comportamiento citogenético de los pacientes medidos de manera independiente (transversal). De los 24 pacientes en etapa crónica, el 83% (20/24) presentaron cariotipos únicamente con la alteración primaria mientras que de los 11 pacientes en etapa acelerada, el 9% presentaron únicamente la alteración primaria, ya que la mayoría de los casos (10/11) registraron además múltiples AEF (deleciones, inversiones, translocaciones, etc.). Las diferencias en las frecuencias encontradas en las etapas crónicas y aceleradas es un indicativo de que con la evolución de la enfermedad existe un incremento en el número de alteraciones citogenéticas.

8.4.3 Comportamiento citogenético longitudinal.

En la **tabla 5**, se observa el comportamiento citogenético de 15 pacientes a los cuales se les realizaron más de un cariotipo a través del estudio (longitudinal). Se destacan las siguientes características de la tabla 5:

a) Los pacientes en los que se presentó **AEF y evolución clínica** (ID 4, 7, 17, 19, 20, 22 y 38), mostraron en su totalidad por lo menos una de las alteraciones citogenéticas secundarias, que para otras poblaciones se asocian a la progresión de la enfermedad (Chopra y Cols. 1999), a pesar de que sólo uno de ellos estaba en fase aguda, y esta bien establecido que es en esta etapa cuando se presenta una evolución citogenética. Por lo que en estos pacientes se realizó una detección temprana indirecta de la próxima evolución clínica de la enfermedad.

Tabla 5. Comportamiento citogenético en pacientes con LMC, de acuerdo al primero y el último cariotipo realizado en el estudio.

ID	ETAPA	CARIOTIPO
4	c	46XYqh+,3qh-, (9;22) (q34;q11) [28]
	a	46XYqh+,3qh-, (9;22) (q34;q11) [35]
6	c	46XX,t(9;22) (q34;q11) [18]
	c	46,XX,t(9;22) (q34;q11),del(12)(p12) [10]
7	c	46,XX,t(9;22) (q34;q11) [20]
	b	51-52,XX,t(9;22) (q34;q11),+8,+7,+19,+20,+der(22)t(9;22),+2-3mar[cp9]/46,XX,t(9;22) [4]
10	c	46XY,t(9;22) (q34;q11)
	c	46XY,t(9;22) (q34;q11)
12	c	46XX,t(9;22) (q34;q11) [40]
	c	46XX,t(9;22) (q34;q11) [11]
13	c	46XY,t(9;22) (q34;q11) [20]
	c	46XY,t(9;22) (q34;q11) [18]
14	c	46,XX [10]
	c	46,XX [15]
17	c	46XX,t(9;22) (q34;q11) [30]
	a	44-47XX,t(9;22) (q34;q11) [12],+19[5] [12]/46,XX [4]
19	c	46XY,t(9;22) (q34;q11) [17]
	a	48,XY,del(6)(q21),t(9;22) (q34;q11),+der22t(9;22),del(17)(p12),+mar... [13]/49,idem+8 [5]
20	c	46XY [10]/46XYt(9;22) (q34;q11) [6]

Tabla 5 (continuación)

a	44-46,XY,-8,der(22)t(9;22),dic(9)(q11),del(17)(q23),-20[cp7]/45-46,XY,der(9)(pter--q34;q22q11--qter)?[cp6]/44-46,XY,t(9;22)[cp4]
21	c 46XY,t(9;22)(q34;q11)[31]
c	46,XY,del(17)(q23)[3]/15]/46,XY,t(9;22)(q34;q11),del(17)(q23)[2][11]
22	a 46XY,t(9;22)(q34;q11)[12]/50,XX,t(9;22)[4]
a	45-46,XY,t(9;22)(q34;q11)[24],-15[4],del(17)(p12)[3][cp24]
23	c 46XX,t(9;22)(q34;q11)[27]
c	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7],del(15)(q23)[4][cp11]
30	c 46XY,t(9;22)(q34;q11)[10]
a	46XY,t(9;22)(q34;q11)30]
38	a 44-46,XX,t(9;22)(q34;q11),-10,del(11)(q21),-18,+19 [cp16]
a	46,XX,inv(1)(p31-p34),t(9;22)(q34;q11),19p++[19]

c=crónica, a=acelerada, F=femenino, M=masculino

b) Por otro lado, los pacientes con **AEF y sin evolución clínica** (ID 6, 21 y 23), no registraron ninguna de las alteraciones cromosómicas antes mencionadas. De acuerdo a otros estudios, cuando los pacientes permanecen sin evolución clínica o en etapa crónica, se pueden presentar alteraciones cromosómicas que no son permanentes en el cariotipo, por lo que pueden desaparecer sin constituir una línea celular afectada (Watmore y Cols. 1985). Sin embargo cabe mencionar que es importante tomar en cuenta el tiempo de la enfermedad al momento en que se detecta una alteración cromosómica, ya que como se ha mencionado, conforme avanza la enfermedad aumentan las probabilidades de que éstas aparezcan y podrían servir de indicadores para la próxima fase blástica de la enfermedad, siendo necesario para ello realizar un monitoreo con toma de muestras a intervalos de cierta frecuencia (no mayores a seis meses). Los pacientes 6, 21 y 23 tenían 32, 12 y 22 meses respectivamente con su enfermedad al momento del cariotipo, sin embargo, no se puede hacer ninguna inferencia por no haberse realizado un monitoreo regular en las tomas de muestras. Otro aspecto a considerar es que estos pacientes tenían mínimo un año de recibir IFN como tratamiento lo cual también pudo tener efecto en la duración de la fase crónica y por lo tanto en el retraso de la aparición de las alteraciones secundarias asociadas al progreso de la enfermedad.

c) El 13% de los pacientes (ID 4 y 30), presentaron **evolución clínica y ausencia de AEF**. Esto también se ha reportado previamente, entre el 20 y 25% de los pacientes en otros estudios; hasta el momento no hay ninguna explicación al respecto, ya que estos pacientes no presentaron un comportamiento que marque una diferencia con el resto de los

casos (Heim y Mitelman 1995), hay algunos intentos de encontrar una explicación a esto en asociación al punto de rompimiento del cromosoma 22 al momento de la formación del cromosoma Filadelfia, sin embargo aún no se tienen conclusiones claras (Mills y Cols. 1991, Fioretos y Cols. 1993). Probablemente a nivel molecular existen genes que se alteren con la progresión de la enfermedad, y que no sean evidentes a nivel cromosómico, como se ha reportado con las mutaciones del gen p53 sin la alteración aparente del cromosoma 17 (Stuppia y Cols. 1997).

Las AEF, registradas en los pacientes analizados, están muy asociadas con la progresión de la enfermedad en otros estudios (Rooney y Czepulkowski 1992, Heim y Mitelman 1995). Esto corrobora nuestros resultados ya que estas alteraciones se presentaron en las etapas avanzadas de la enfermedad.

Los resultados del comportamiento citogenético longitudinal corroboraron que en forma progresiva hay un mayor número de alteraciones cromosómicas conforme avanza la enfermedad, y que al menos algunas de ellas no se presentan al azar. La gran variabilidad en el tiempo de evolución en meses, nos indican que además de las alteraciones citogenéticas se requieren factores intrínsecos y ambientales para la progresión de la LMC, tal como ya se ha propuesto previamente (Watermore 1985, Heim y Mitelman 1995, Epidemiologia 1997).

8.4.4 Riesgo de la progresión de la enfermedad.

En la **tabla 6**, se muestra el riesgo de la progresión (RR), de la enfermedad de acuerdo a la presencia de AEF, en 15 pacientes estudiados longitudinalmente.

Etapa	n	%	AEF		RR	Promedio (meses)
			SI (%)	NO (%)		
c → c	7	47.0	57.0	43.0	1.33	24
c → a	6	40.0	67.0	33.0	2.01	17
a → a	2	13.0	100.0	0.0	--	07

c=crónica a=acelerada AEF=alteraciones extras al cromosoma Ph

Tabla 6. Riesgo relativo de la progresión de la enfermedad (RR) de acuerdo a la presencia de AEF en 15 pacientes con LMC medidos longitudinalmente.

Los datos se organizaron según la etapa de la enfermedad al momento del cariotipo, por lo que se dividieron en tres grupos, dos grupos cuyos cariotipos se realizaron en la misma etapa (crónica o acelerada), y un tercer grupo cuyos cariotipos abarcaron ambas etapas.

Los pacientes que progresaron de la etapa crónica a la etapa acelerada, presentaron un RR de 2.01 (67%/33%), la cual indica que los pacientes con AEF tuvieron un riesgo dos veces mayor de progresar en su enfermedad que aquellos que no presentaron dichas alteraciones, esto se registró en un tiempo promedio de 17 meses entre ambos cariotipos. Los pacientes cuyos cariotipos se realizaron en la etapa crónica,

mostraron un RR de 1.33, indicando que no hay un incremento de riesgo en la progresión de la enfermedad entre un cariotipo y otro, el período promedio en que se registró esto fue de 24 meses. Con respecto al grupo cuyos cariotipos se realizaron en la etapa acelerada, no es posible determinar la proporción de riesgo, dado el pequeño tamaño de muestra.

8.4.5 Combinación de Alteraciones Cromosómicas Secundarias.

En la **tabla 7**, se muestra la **ruta mayor de la evolución citogenética** para las AEF registradas en la etapa acelerada o blástica de la enfermedad en 11 de los pacientes estudiados siguiendo el criterio propuesto por Heim y Mitelman en 1995, descrito previamente en antecedentes.

Paciente(s)	Alteración	Porcentaje de Ruta Mayor
17 y 38	+19	14.2
7 y 24	+8,+19,+Ph	14.2
18 y 36	+8, +I(17q)	14.2
5	+8, +Ph	7.1
19	+del(17p), +Ph, +8	7.1
22	+del(17p), +Ph	7.1
25	i(17q)	7.1
37	i(17q), +19	7.1

Tabla 7. Alteraciones cromosómicas de pacientes con LMC, agrupados de acuerdo a la ruta mayor de evolución citogenética (según Heim y Mitelman 1995).

Los porcentajes desglosados en el tabla 7 representaron el 78% de los pacientes que presentaron alguna AEF (11/14). Este porcentaje concuerda con lo reportado previamente, lo cual es producto de múltiples investigaciones en diversos países (Kantarjian y Cols. 1987, Sokal y Cols. 1988, Hashimoto y Cols. 1990, Hild y Fonatsch 1990, Kadam y Cols. 1991, Mitelman 2000). Esto ha sido validado estadísticamente (Hashimoto y Cols. 1990).

Analizando la ruta mayor, en la mayoría de los pacientes las alteraciones citogenéticas se presentan combinadas y no en forma única; además la trisomía del cromosoma 19 se presentó como única alteración en dos de los casos, así como también, dicho cromosoma se registró en combinación con un $i(17q)$, lo cual no está de acuerdo con lo reportado (Heim y Mitelman 1995).

Lo anterior indica que cada población puede presentar un comportamiento diferente, lo que hace imperativo el caracterizar a cada una, tal como ya se ha mencionado con la existencia de una heterogeneidad geográfica y alteraciones citogenéticas (Johansson 1991). Un punto importante radica en que las AEF determinan el tipo de la fase aguda en la enfermedad (principalmente mieloide y linfoide), y cada tipo difiere en su respuesta a la terapia, curso y pronóstico de la enfermedad (Canellos y Cols. 1976, Parriera y Cols. 1986, O'Malley y Cols. 1985, Yao 1985, Faderl y Cols. 1999a).

8.5. COMPARACIÓN DE FRECUENCIAS EN LOS REARREGLOS MOLECULARES.

Los pacientes analizados en el presente trabajo se compararon con los datos de un estudio multicéntrico de población mexicana (Arana-Trejo y Cols. 2002, en prensa). Los datos se muestran en la **tabla 8**.

Rearreglo	Estudio Paralelo		Estudio Actual	
	n	%	n	%
b2a2	116	47.74	9	56.25
b3a2	85	34.98	6	37.50
b2a2/b3a2	18	7.41	0	0.00
otros	24	9.88	1	6.25

G = 2.77, P= 0.606 (10,000 replicaciones)

Tabla 8. Comparación de las frecuencias de los rearreglos del cromosoma Ph en el presente estudio, versus un estudio multicéntrico paralelo.

La distribución de las frecuencias de los rearreglos fue similar entre ambos estudios. La frecuencia de los rearreglos fue más alta en b2a2 (9/15), que en b3a2(6/15), lo cual también sucede en el estudio multicéntrico.

9. CONCLUSIONES

Cromosoma Filadelfia. Tal como se ha visto en otras poblaciones, en el presente estudio el cromosoma Filadelfia fue la alteración cromosómica primaria, y en el 93% de los casos los rearrreglos moleculares de dicho cromosoma fueron b3a2 o b2a2. Se estableció que hay homogeneidad en la distribución de los rearrreglos moleculares de la población mestiza mexicana con LMC (datos en proceso de publicación).

Alteraciones extras al cromosoma Filadelfia. Las alteraciones extras al cromosoma Filadelfia se encontraron con mayor frecuencia combinadas y no como únicas en el cariotipo. Los cromosomas más frecuentemente involucrados en estas alteraciones fueron el 17, 8 y 19 (datos en proceso de publicación).

Tendencia clínica con respecto a la citogenética-molecular de la LMC. Como es característico de esta enfermedad, existió una gran variabilidad en la duración del promedio de vida de los pacientes. Se determinaron dos hallazgos importantes conforme progresó la enfermedad, por un lado los pacientes con AEF tuvieron un riesgo dos veces mayor de progresar, y por otro lado aquellos pacientes cuyo rearrreglo molecular fue b3a2 su enfermedad progresó más rápidamente por mostrar un menor promedio de vida (datos en proceso de publicación).

10. PERSPECTIVAS E IMPLICACIONES

La duración de las etapas de la enfermedad en pacientes con LMC, tienen una variabilidad muy amplia. Por lo que es necesario continuar con la búsqueda de técnicas de diagnóstico y detección de evolución mas sensibles, para conocer primeramente los perfiles genéticos y posteriormente estar en la posibilidad de brindar un tratamiento personalizado.

Es del conocimiento clínico que el cromosoma Ph es una alteración cromosómica determinante para el diagnóstico. Sin embargo el análisis molecular de los rearrreglos en dicha alteración nos muestra que no todos los pacientes tienen el mismo perfil genético. Dado lo anterior es de interés determinar si en dichos perfiles: a) la enfermedad se comporta diferente, y b) si el tratamiento tiene diferentes efectos.

Las AEF se observaron con mayor frecuencia en las etapas avanzadas de la enfermedad, por lo que sería necesario realizar una caracterización citogenética y molecular, en un diseño longitudinal, que permita verificar una asociación con mayor precisión. Las aberraciones cromosómicas son una fuente potencial para entender y controlar la progresión de la enfermedad, lo cual es un punto estratégico a nivel mundial, al crearse el proyecto de la Anatomía Genómica del Cáncer (*Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer, 2002*). El hecho de haber encontrado una distribución homogénea de los rearrreglos moleculares del cromosoma Ph del estudio multicéntrico y el presente estudio, tendrá importantes implicaciones en futuros estudios que se realicen en nuestro país, ya que se facilitará el muestreo de individuos afectados sin necesidad de detallar su

procedencia, lo que conduce a una fácil colecta de grandes series de casos.

11. BIBLIOGRAFÍA

Aguilar TR , Dahia MA, Bendit I, Beitler B, Dorlhiac P, Bydlowski, and Chamone D. Further Evidence for the Lack of Correlation Between the Breakpoint Site Within M-BCR and CML Prognosis and for the Occasional Involvement of p53 in Transformation. *Cancer genet Cytogenet* 1995; 84:105-112.

Allan NC. Therapeutic options in chronic myeloid leukemia. *Blood Rev* 1989; 4:279.

Allan NC, Richards SM, Shepherd PC. UK Medical interferon-alpha for chronic myeloid leukemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet* 1995; 345:1392-1397.

Arana-Trejo RM, Ruíz SE, Ignacio-Ibarra G, Báez de LE, Garces O, Gómez ME, Castro GM, Ovilla MR, Rubio-Borja ME, Madrid CV, Solís L, Herrera SP, Delgado LJ, Pizzuto CJ, Kofman S. BCR/ABL p210, p190 and Fusion Genes in 250 Mexican Patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML). *Clinical Laboratory and Hematology* 2002. En prensa

Bohlander SK. Fusion genes in leukemia: an emerging network. *Cytogenet Cell Genet* 2000; 91:52-56.

Bernstein R, Gale RP. Do chromosome abnormalities determine the type of acute leukemia that develops in CML?. *Leukemia* 1990; 4:65-68.

Canellos GP, De Vita VT, Whang-Peng J, Chamber BA, Schein PS, Young RC. Chemotherapy of the blastic phase of chronic granulocytic leukemia: hypodiploidy and response to therapy. *Blood* 1976; 47:1003-1009.

Cervantes F, Rokman M, Rosell J, Urbano-Ispizua A, Montserrat E, and Rozman C. A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology* 1990; 76:27-32.

Cortes J, Talpaz M, O'Brien S, Rios MB, Majlis A, Keating M, Freireich EJ, Kantarjian H. Suppression of cytogenetic clonal evolution with interferon alfa therapy in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol* 1998; 16:3279-3285.

Cotter FE. *Molecular Diagnosis of Cancer.* Humara Press Inc. USA 1996; pp. 25-30.

Ch'ang H-J, Tien H-F, Wang C-H, Chuang S-M, Chen Y-C, Shen M-C, Lin D-T, Lin K-H. Comparison of clinical and biologic features between myeloid and lymphoid transformation of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 71:87-93.

Chan LC, Karhi KK, Rayter SI, Heisterkamp N, Eridani S, Powles R, Lawler SD, Groffen J, Foulkes JG, Greaves MF, Wiedemann LM. A novel abl protein expressed in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 1987; 325:635-637.

Chaplin RE. *Chronic Myelogenous Leukemia: Recent Advances.* *Blood* 1985; 65:1039-1047.

Chomczynski P, Sachi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-59.

Chopra R, Pu QQ, Elefanty AG. Biology of BCR-ABL. *Blood Reviews* 1999; 13:211-229.

Davies SM, DeFor TE, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Equivalent outcomes in patients with chronic myelogenous leukemia after early transplantation of phenotypically matched bone marrow from related or unrelated donors. *Am J Med* 2001; 110:339-46.

de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson

JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. Nature 1982; 300:765-767.

Dunbar CE, Stewart FM: Separating the wheat from the chaff: selection of benign hematopoietic cells in chronic myeloid leukemia. Blood 1992; 79:1107-1110.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, Kantarjian HM, and Kurzrock R. Should polymerase chain reaction analysis to detect minimal residual disease in patients with chronic myelogenous leukemia be used in clinical decision making?. Blood 1999a; 93:2755-2759.

Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R and Kantarjian HM. The Biology of Chronic Myeloid Leukemia. N Engl J Med 1999b; 341:164-72.

Fioretos T, Nilsson P-G, Aman P, Heim S, Kristoffersson U, Malm C, Simonsson B, Turesson I, Mitelman F. Clinical impact of breakpoint position within M-bcr in chronic myeloid leukemia. Leukemia 1993; 7:1225-1231.

Fourth International Workshop on Chromosomes in leukemia 1982 (1984). Cancer Genet Cytogenet. 33:254.

Gale RP, Canaani E. An 8-kilobase abl RNA transcript in chronic myelogenous leukaemia. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81:5648-5652.

Goldman JM. Management of chronic myeloid leukaemia. Blood Rev 1994; 8:21-29.

Gratwohl A, Passweg J, Baldomero H, Hermans J. Blood and marrow transplantation activity in Europe 1997. European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant 1999; 24:231-45.

Greenberg P, O'Brien S, Goldman J, and Sawyers C. Myelodysplastic Syndromes and Myeloproliferative Disorders: Clinical, Therapeutic, and Molecular Advances. Hematology 1995. The American Society of Hematology Education Program Book. Washington, U.S.A. 1995; pp.10-21.

Hagemeijer A, Buijs A, Smit E, Janssen B, Creemers GJ, Vander Plas D, Grosveld G. Translocation of BCR to chromosome 9: a new cytogenetic variant detected by FISH in two Ph-negative, BCR-positive patients with chronic myeloid leukemia. Genes Chromosomes Cancer 1993; 8:237-245.

Hashimoto T, Ohtaki M, Kamada N, Yamamoto H, and Munaka M. Application of long-linear model in inference on karyotypic evolution in chronic myelocytic leukemia. Environmental Health Perspectives 1990; 87:135-141.

Hecht F, Hecht BK. Cis-trans position effect in cancer translocations. Cancer Genet Cytogenet 1984; 12:201-208.

Helmann R, Heimpel H, Hasford J, Kolb HJ, Pralle H, Hossfeld DK, Queiber W, Löffler H, Heinze B, Georgii A, Wussow PV, Bartram C, Griebhammer M, Bergmann L, Essers U, Falge C, Hochhaus A, Queiber U, Sick C, Meyer P, Schmitz N, Verpoort K, Eimermacher H, Walther F, Westerhausen M, Kleeberg UR, Heilein A, Käbisch A, Barz C, Zimmermann R, Meuret G, Tichelli A, Berdel WE, Kanz L, Anger B, Tigges FJ, Schmid L, Brockhaus W, Zankovich R, Schläfer U, Weibenfels I, Mainzer K, Tobler A, Perker M, Hohnloser J, Messener D, Thiele J, Buhr T, Ansari H, and the German CML Study Group. Randomized Comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia:prolongation of survival by hydroxyurea. Blood 1993; 182:398-407.

Heim S, Billström R, Kristoffersson U, Mandahal N, Strömbeck B, and Mitelman F. Variant Ph1 translocations in chronic myeloid leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 1985; 18:215-227.

Heim S, and Mitelman F. Cancer Cytogenetics. Second Edition, Wiley-Liss, USA. 1995; pp. 33-68.

Hild F, Fonatsch C. Cytogenetic peculiarities in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 47:197-217.

Hochhaus A, Reiter A, Skladny H, Reichert A, Saussele S, Hehlmann R. Molecular monitoring of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients after therapy. *Recent Results Cancer Res* 1998; 144:36-45.

Human gene mapping 11. London Conference (1991). Eleventh International Workshop on Human Gene Mapping. London, UK, August 18-22, 1991. *Cytogenet Cell Genet* 1991; 58:1-984.

ISCN: An international system for human cytogenetic nomenclature, Mitelman F (ed); Karger, Basel. 1995.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Geographic heterogeneity of neoplasia associated chromosome aberrations. *Genes Chrom Cancer* 1991; 3:1-7.

Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities-balanced rearrangements vs. genomic imbalances?. *Genes Chromosomes Cancer* 1996; 16:155-163.

Kadam PR, Nanjangud GJ, Advani SH, Nair C, Banavali S, Gopal R, Saikia T. Chromosomal characteristics of chronic and blastic phase of chronic myeloid leukemia. A study of 100 patients in India. *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 51:167-181.

Kamel AM, Shaker HM, GadAllah FH, Hamza MR, Mansour O, El Hattab OH, Moussa HS. A simple strategy for breakpoint fragment determination in chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 2000; 122:110-115.

Kantarjian HM, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, Smith TL, Cork A, McCredie KB, Freireich EJ. Chronic Myelogenous leukemia in blast crisis. Analysis of 242 patients. *Am J Med* 1987; 83:445-454.

Kantarjian HM, Dixon D, Keating MJ, Talpaz M, Walters RS, McCredie KB, Freirech EJ. Characteristics of accelerated disease in chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1988; 61:1441-1446.

Kartajian HM, Deisseroth A, Kurzrock R, Estrov Z and Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: A concise update. *Blood* 1993; 82:691-703.

Konopka JB, Watanabe SM, Singer JW, Collins SJ, Witte ON. Cell lines and clinical isolates derived from Ph1 positive chronic myelogenous leukaemia patients express c-abl proteins with a common structural alteration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1810-1814.

Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Patologías Humanas. Sexta Edición.* Mc Graw Hill, Interamericana. 1999; pp.372-429.

Kuo WL, Tenjin R, Segraves D, Pinkel D, Golbus MS, Gray J. Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18 or 21, by fluorescence in situ hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am J Hum Genet* 1991; 49:112-119.

Kurzrock R and Talpaz M. *Molecular Biology in Cancer Medicine.* University of Texas, MD Anderson Cancer Center Houston, Texas, USA. 1995; pp.128-142.

León RE y Sosa SR. Transplante de médula ósea en México. Informe del primer caso exitoso en leucemia aguda mieloblástica. *Rev Inv Clin* 1992; 44:383-386.

Lichty BD, Keating A, Callum J, Yee K, Croxford R, Corpus G, Nwachukwu B, Kim P, Guo J, Kamelreid S. Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukemia. *Br J Haematology* 1998; 103:711-715.

Margolis J, Borrello I, Flinn IW. New approaches to treating malignancies with stem cell transplantation. *Semin Oncol* 2000; 27:524-530.

Melo JV. CML:Molecular patophysiology and potencial new targets for therapy.In:Schechter GP, Berlinear N, Telen MJ (Editors): Hematology 2000. The American Society of Hematology Education Program Book. Washington,U.S.A. 2000; pp.90-94.

Mills KI, MacKenzie ED, Birnie GD. The site of the breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. Blood 1988; 72:1237-1241.

Mills KI, Benn P, and Birnie GD. Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature. Blood 1991; 78:1155-1161.

Mitelman F. Restricted number of chromosomal regions implicated in aetiology of human cancer and leukemia. Nature 1984; 310:325-327.

Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. Mutat Res 2000; 462:247-253.

Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer (2002). Mitelman F, Johansson B and Mertens F (Eds.), <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>.

Nowell PC, Hungerford DA: A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132:1497.

O'Malley FM, Garzón OM. Chronic granulocytic leukemia: correlation of blastic transformation type with karyotypic evolution. Am J Hematol 1985; 20:313-323.

Ozer H, George SL, Schiffer CA, Rao K, Rao PN, Wurster_Hill DH, Arthur DD, Powell B, Gottlieb A, Peterson BA. Prolonged subcutaneous administration of recombinant alfa 2b interferon in patients with previously untreated Philadelphia chromosome positive chronic-phase chronic myelogenous

leukemia: effect on remission duration and survival: CALGB study 8583. Blood 1993; 82:2975-2984.

Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, Rotoli B. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). Blood 1996; 88:2410-2414.

Parreira L, Kearney L, Rassool F, Babapulle VB, Matutes E, Parreira A, Tavares de Castro J, Goldman JM, Catovsky D. Correlation between chromosomal abnormalities and blast phenotype in the blast crisis of Ph-positive CGL. Cancer Genet Cytogenet 1986; 22:29-34.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci 1986; 83:2934-2938.

Poplack DG. The pediatric clinics of north America. W.B.Saunders Company. Philadelphia, PA., 1988. p.769.

Przepiorka D, Khouri I, Thall P, Mehra R, Lee MS, Ippoliti C, Giralt S, Gajewski J, van Besien K, Andersson B, Korbling M, Deisseroth AB, Champlin R. Thiotepa, busulfan and cyclophosphamide as a preparative regimen for allogeneic transplantation for advanced chronic myelogenous leukemia. Bone Marrow Transplant. 1999; 23:977-981.

Rodríguez J, Cortes J, Smith T, O'Brien S, Rios MB, Talpaz M and Kantarjian H. Determinants of prognosis in late Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia. Journal of Clinical Oncology 1998; 16:3782-3787.

Roff DA, Bentzen P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: X2 and the problem of small samples. Molec Biol Evol 1989; 6:539-545.

Rooney DE and **Czepulkowski BH**. Human Cytogenetics. A practical Approach. Volume II. Malignancy and Acquired Abnormalities. Second Edition. Oxford University Press, 1992; pp.22-66.

Rowley J. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and giemsa staining. Nature 1973; 243:290-293.

Ruiz-Argüelles GJ, **López-Martínez B**, **Ramírez-Cabrera JM**, **Reyes-Núñez V**, **Rodríguez-Cedeño HM**, **Garcés-Eisele J**. Molecular monitoring of the treatment of patients with BCR/ABL(+) chronic myelogenous leukemia. Rev Invest Clin 2001; 53:235-239.

Santos GW. Busulfan and cyclophosphamide versus cyclophosphamide and total body irradiation for marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia- a review. Leukemia and Lymphoma 1993; 11:201-24.

Sambrook J, **Fritsch E**, **Maniatis T**. Molecular cloning: a laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbord, N.Y.: Cold Spring Harbord Laboratory Press. 1989. pp.13.45-13.48.

Schaffer LG. "Overview of FISH", Latin American Fluorescent in situ Hybridization Workshop. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 1993; pp. 1-15.

Sokal JE, **Gomez GA**, **Baccarani M**, **Tura S**, **Clarkson BD**, **Cervantes F**, **Rozman C**, **Carbonell F**, **Anger B**, **Heimpel H**, **Nissen NI**, **Robertson JE**. Prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities at diagnosis of Philadelphia chromosome-positive chronic granulocytic leukemia. Blood 1988; 72:294-298.

Sosa-S R, **León-R E**, **Hurtado-M R**, **Labardini-M J**. Transplante de médula ósea en anemia aplástica: reporte del primer transplante en México. Rev Invest Clin 1980; 32:489-495.

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA.
Epidemiología 1997; Número 20, Volumen 14. México.

Singh S, Wass J, Vincent PC, Young GAR and Gunz FW. Significance of secondary cytogenetic changes in patients with Ph1 positive chronic granulocytic leukemia in the acute phase. Cancer Genet Cytogenet 1986; 21:209-220.

Shtalrid M, Lugassy G, Rosensaft J, Berrebi A. Treatment of chronic myeloid leukemia with interferon alpha (Roferon): results of the Israeli study group on LMC. Leukemia and Lymphoma 1993; 11:193-197.

Stuppia L, Guiuseppe C, Peila R, Guanciali-Franchi P, Morizio E, Spadano A, and Palka G. p53 Loss and point Mutations Are Associated with Supresión of Apoptosis and Progresión of CML into Myeloid Blastic Crisis. Cancer Genet Cytogenet 1997; 98:28-35.

Tanaka K, Hashimoto T, Oguma N, Dohy H, and Kamada N. Influence of M-BCR breakpoint sites on the duration of chronic phase in 100 patients whith chronic myelocytic leukemia. Cancer Genet Cytogenet 1993; 70:39-47.

Talpaz M. Hematologic remission and cytogenetic improvement induced by recombinant human interferon alfa in chronic myelogenous leukemia. N Engl J Med 1986; 1065-1069.

Talpaz M, Kantarjian HM. Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia philadelphia chromosome-positive patients. Ann Int Med. 1991; 114:532-538.

Van der Plas DC, Grosveld G, Hagemeyer A. Review of clinical, cytogenetic, and molecular aspects of Ph-negative CML. Cancer Genet Cytogenet 1991; 52:143-156.

Vela-Ojeda J, Tripp-Villanueva F, Sanchez-Cortes E, Ayala-Sanchez M, Rosas-Cabral A, Esparza MG, Garcia-Chavez J,

Garcia-Leon LD, Gonzalez-Llaven J. Allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: a single center experience. Arch Med Res 2000; 31:206-209.

Verma RS, Babu A. Specialized techniques in human chromosomes. Manual of basic techniques. Pergamon Press 1989; pp.129-131.

Verschraegen CF, Kantarjian HM, Hirsch-Ginsberg C, Lee MS, O'Brien S, Rios MB, Stass SA, Keating M, Talpaz M. The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Clinical, laboratory, and prognostic correlations. Cancer 1995; 76:992-997.

Watmore AE, Potter AM, Sokal RJ and Wood JK. Value of Cytogenetic Studies in Prediction of Acute Phase CML. Cancer Genetics and Cytogenetic 1985; 14:293-301.

Westbrook CA. The role of molecular techniques in the clinical management of leukemia. Lessons from the Philadelphia Chromosome. Cancer 1992; 70:1695-1700.

Yao E. Chromosomal abnormalities in lymphoid crisis of chronic myelogenous leukemia. Cancer Genet cytogenet 1985; 16:235-243.

Yoffe G, Blick M, Kartajian H, spitzer G, Gutterman J and Talpaz M. Molecular analysis of interferon-induced suppression of Philadelphia chromosome in patients with chronic myeloid leukemia. Blood 1987; 69:961-963.

Yunis JJ, Soreng AL. Constitutive fragile sites and cancer. Science 1984; 226:1199-1204.

Zitzelsberger H, Bauchinger M, Wilmanns W and Strauss PG. Cytogenetic and Molecular Analysis of a "Masked" Philadelphia Chromosome in Chronic and Blastic Phases of Chronic Myeloid Leukemia. Cancer Genet Cytogenet 1989; 47:219-225.



DONATIVO

