

**ESTUDIO CITOGÉNÉTICO EN PACIENTES CON LEUCEMIA DE UNA
POBLACION DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

MARY BOLAÑOS PALACIOS

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
ENFASIS GENETICA
POPAYAN
2009**

**ESTUDIO CITOGENÉTICO EN PACIENTES CON LEUCEMIA DE UNA
POBLACION DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA**

MARY BOLAÑOS PALACIOS

Trabajo de grado para optar al titulo de Bióloga.

**Directora
SULMA MUÑOZ BENITEZ**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACION
PROGRAMA DE BIOLOGIA
ENFASIS GENETICA
POPAYAN
2009**

Nota de aceptación:

FIRMA JURADOS

***A la lucha contra el cáncer y a la esperanza que miles de personas
acrecientan por la vida.***

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mis sentimientos de gratitud a Dios y a mi madre. Y doy mis mas sinceros agradecimientos a la profesora Sulma Muñoz Benitez jefe del laboratorio de Genética Humana quien es la directora de este trabajo de grado y quien guió cada uno de los pasos de este estudio, por su confianza, dedicación y por compartir su sapiencia y experiencia, igualmente al personal que labora en el laboratorio.

A esta universidad que hizo posible mi formación, por abrir sus puertas y permitir realizar en sus instalaciones este trabajo, a los profesores Luz Estella Hoyos, Silvio Carvajal y Harold Bolaños, a Patricia Mosquera de la unidad de microscopia, las demás personas que en algún momento me dieron su apoyo, contribuyeron en mi esfuerzo y solventaron mis inquietudes. Al Hospital Universitario San José, particularmente a la unidad de Hematología Especial, que aportaron con las muestras de los pacientes, especialmente al especialista Hematólogo Franklin Correa, a la bacterióloga y especialista hematóloga Julieta Montero y al personal que los acompaña, ya que me brindaron su colaboración, amabilidad, su apoyo e hicieron posible realizar las pruebas.

Mil gracias a los profesores Gonzalo Vásquez, Juan Carlos Herrera de la Universidad de Antioquia y Juan Bautista de la Universidad Nacional de Medellín en las asesorías en mi pasantía, que brindaron la seguridad y confianza de mi trabajo.

RESUMEN

Las leucemias son un tipo de cáncer, consiste en el crecimiento descontrolado de las células madre hematopoyéticas incapaces de madurar en leucocitos, eritrocitos y plaquetas. El análisis citogenético detecta alteraciones cromosómicas, que ocurren en la médula ósea de pacientes con leucemia, estas sirven de apoyo para el diagnóstico y pronóstico de pacientes, además ayudan a precisar el tratamiento adecuado y algunas veces a alcanzar la remisión completa. Se realizó un estudio citogenético en tejidos de médula ósea y sangre periférica de pacientes con leucemia, en el departamento del Cauca. Para ello se estandarizó la técnica de cultivo y se identificaron alteraciones cromosómicas mediante bandeo R, además se realizó un análisis sociodemográfico de la población de estudio mediante una encuesta. Se realizaron ajustes en la técnica de cultivo con el fin de obtener metafases analizables con cromosomas diferenciados, estos permitieron encontrar algunas alteraciones cromosómicas directamente asociadas a diferentes tipos de leucemia. Por otro lado se halló que el 51,9% de los pacientes estuvieron expuestos a plaguicidas durante un promedio de tiempo laboral de 27,10 años.

La técnica de cultivo permitió obtener metafases analizables, estas hicieron posible identificar alteraciones cromosómicas relacionadas a diferentes diagnósticos y con valor pronóstico, como los juegos cromosómicos hiperdiploides altos en LLA y el cromosoma Filadelfia en LMC, LP, LMA además se observaron rupturas cromatídicas y cromosómicas asociadas con la exposición a plaguicidas.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
1. INTRODUCCION	12
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
3. OBJETIVOS	16
3.1. OBJETIVO GENERAL:.....	16
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
4. JUSTIFICACIÓN	17
5. MARCO TEÓRICO.....	19
5.1 Clasificación de las leucemias.....	20
5.2. Incidencia de las Leucemias	21
5.3. Etiología de las leucemias	23
5.4 Citogenética.....	24
5.4.1. Bandeos Cromosómicos	25
5.4.2 Técnicas Moleculares Complementarias a la Citogenética.....	27
5.4.2. Aplicaciones y limitaciones de los estudios citogenéticos.....	29
5.4.2.1. Aplicaciones.....	29
5.4.2.2. Limitaciones.....	30
5.4.3. Retos en los estudios Citogenéticos en malignancias hematológicas.	31
5.4.4. Tipo de Muestra.....	32
5.4.4.1. Médula ósea	32
5.4.4.2. Sangre	33
5.4.5. Causas comunes de fallas.	34
5.5. Diagnóstico de Pacientes con Leucemia.....	37
5.5.1. Diagnóstico clínico.....	37
5.5.1.1. Hemograma	38
5.5.1.2. Aspirado de médula ósea	38
5.5.2. Diagnóstico citogenético.....	39
5.5.2.1 Cromosoma Filadelfia.....	40
5.5.2.2. Valor pronóstico de los hallazgos citogenéticos	42
5.6. Relación tipo de leucemia y Citogenética.....	44
5.6.1. Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	44
5.6.2. Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	47
5.6.3. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA).....	49
5.6.4. Leucemia Linfoblástica Crónica (LLC).....	51
5.6.5. Otras Neoplasias Hematológicas	53
5.6.5.1. Linfomas malignos.....	53
5.6.5.2. Enfermedad de Hodgkin.....	54
5.6.5.3. Linfomas no Hodgkinianos	54
5.6.5.4. Mieloma Múltiple (MM)	56
5.6.5.5. Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD)	56
5.6.5.6. Anemias megaloblásticas.....	59
6. METODOLOGÍA.....	61
6.1. Población Objeto de Estudio	61
6.2. Selección de la Muestra Objeto de Estudio.....	61
6.3. Toma de muestra	62
6.4. Estandarización de la Técnica de Cultivo de Médula Ósea y Sangre Periférica....	62

6.4.1	Constituyentes del Medio y Cultivo Celular	63
6.4.2	Siembra	63
6.4.3	Tratamientos de Cultivo.....	64
6.5.	Técnica de Bando "R" para Identificación de Alteraciones Cromosómicas.....	65
6.6.	Diseño Experimental	66
6.6.1.	Estandarización de la Técnica.....	66
6.6.2.	Tamaño de Muestra	67
6.6.3.	Registro de Alteraciones Cromosómicas	68
6.7.	Análisis de Resultados	68
6.7.1.	Técnica de cultivo.....	68
6.7.2.	Alteraciones cromosómicas.....	70
6.7.3.	Análisis Sociodemográfico	70
7.	RESULTADOS	71
7.1.	Características de la Población de Estudio.	71
7.1.1.	Características de riesgo asociadas a la población	73
7.1.2.	Estado del paciente y antecedentes familiares.	73
7.2.	Diagnósticos Obtenidos.....	74
7.3.	Técnica de Cultivo	76
7.3.1.	Calidad de Metafases Obtenidas	76
7.3.2.	Criterios de Evaluación Técnica de Cultivo	76
7.4.	Alteraciones cromosómicas.....	78
7.5.	Fotografías de metafases obtenidas.	80
7.5.1.	Fotografías de Alteraciones cromosómicas Encontradas	80
Nota:	Ver Cariotipos que muestran las alteraciones (Anexo 5).....	82
7.5.2.	Metafases obtenidas durante el proceso de estandarización.	83
8.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	86
8.1.	Análisis sociodemográfico de la población objeto de estudio	86
8.2.	Técnica de Cultivo	87
8.2.1.	Calidad de Metafases Obtenidas	87
8.2.2.	Criterios de evaluación de la Técnica de Cultivo.....	88
8.3.	Alteraciones Cromosómicas.....	95
9.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	97
10.	BIBLIOGRAFIA	101

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias.....	43
Tabla 2: Resumen Marco Teórico.....	60
Tabla 3: Ajustes realizados a la técnica de cultivo.....	67
Tabla 4: Criterios de evaluación de la Técnica de Cultivo	69
Tabla 5: Características sociodemográficas de la población de estudio.....	71
Tabla 6: Características de riesgo asociadas a la población	73
Tabla 7: Estado del Paciente y Antecedentes Familiares.....	74
Tabla 8: Diagnósticos Obtenidos.	75
Tabla 9: Calidad morfológica de metafases.	76
Tabla 10: Criterios de Evaluación Técnica de Cultivo	77
Tabla 11: Alteraciones Cromosómicas Encontradas.....	79

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Proceso hematopoyético: Linaje linfoide y mieloide.....	20
Figura 2: Tasas estandarizadas de mortalidad por leucemias. Colombia 1990. ...	22
Figura 3: Aspiración de médula ósea.....	39
Figura 4: Cromosoma Filadelfia (Ph). Add comment <i>Marzo 17, 2008</i>	41
Figura 5: Preparación medio de cultivo completo y Siembra.....	64
Figura 6: Aplicación de los tratamientos de cultivo durante el ciclo celular.....	65
Figura 7: Lugar de Procedencia Grupo de Estudio.....	72
Figura 8: Número de Metafases Observadas.....	78
Figura 9: Número de Metafases Analizables.....	78
Figura 10: Rangos de edad según diagnósticos.....	86
Figura 11: Diagnóstico vs. Proliferación.....	89
Figura 12: Diagnóstico vs. Presencia de Células en Metafase.....	90
Figura 13: Diagnostico vs. Morfología Cromosómica.....	90
Figura 14: Tipo de Muestra vs. Proliferación.....	91
Figura 15: Tipo de Muestra vs. Morfología Cromosómica.....	91
Figura 16: Calidad de la Muestra vs. Proliferación.....	92
Figura 17: Calidad de la Muestra vs. Presencia de Células en Metafase.....	92
Figura 18: Calidad de la Muestra vs.	92
Figura 19 Proliferación vs. Presencia de Células en Metafase.....	93

INDICE DE ANEXOS

	Pág.
ANEXO 1: Consentimiento Informado	107
ANEXO 2: Encuesta Estudio Citogenético	110
ANEXO 3: Registro de Alteraciones Cromosómicas	111
ANEXO 4: Resultados Criterios de Evaluación Técnica de Cultivo	112
ANEXO 5: Cariotipos.....	113

1. INTRODUCCION

Las leucemias son un tipo de cáncer, que consiste en el crecimiento descontrolado de las células hematopoyéticas o células madre formadoras de sangre incapaces de madurar adecuadamente y completamente en glóbulos blancos (leucocitos), glóbulos rojos (eritrocitos) y plaquetas. Se produce por acumulación de células mieloides y linfoideas sin madurar en la médula ósea, lo cual afecta el proceso normal de la proliferación o división de las células sanguíneas originadas ahí. En muchos casos se da la acumulación en sangre periférica, pero en la mayoría se produce una invasión intensa de los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos (Heim et al, 1995).

El análisis citogenético permite detectar alteraciones cromosómicas numéricas y/o estructurales, las cuales ayudan a clasificar los grupos de pacientes y a determinar el tipo de tratamiento adecuado. La correlación de los estudios citogenéticos con las leucemias ha permitido identificar alteraciones relacionadas específicamente en los cromosomas, con la biología de la enfermedad. También ayuda a comprender los procesos del desarrollo de la leucogénesis, como factores pronósticos independientes. (Harrison *et al*, 2001).

Aún cuando, se han establecido protocolos internacionales de técnicas citogenéticas para la obtención de cromosomas en linfocitos humanos; en las malignidades hematológicas, es necesario realizar variaciones en cada laboratorio para poner en práctica la técnica, puesto que no funciona igual en todos los casos. Por lo tanto, para poder optimizar los resultados, se debe ajustar y precisar la técnica, teniendo en cuenta sus condiciones, y así obtener resultados confiables (Swansbury, 2003).

En el Hospital Universitario San José y la Clínica la Estancia de la ciudad de Popayán – Cauca, se reportan un total de 24 diagnósticos de leucemias linfoideas y

mieloides en aproximadamente 1.280.000 habitantes durante el año 2006. Los pronósticos que se realizan se basan en estudios de hemogramas, biopsias y extendido del aspirado de médula ósea, antecedente familiar e historial clínico. Sin embargo, la información diagnóstica podría ser complementada y precisada, mediante los estudios citogenéticos de las personas que padecen de esta enfermedad.

Se realizó un estudio citogenético en pacientes con leucemia, remitidos por la Unidad de Hematología del Hospital Universitario San José con el objetivo de identificar alteraciones cromosómicas, mediante la estandarización de la técnica de cultivo de médula ósea y sangre periférica. Esto con el objetivo de fomentar la utilización de este tipo de estudio, como apoyo para el diagnóstico clínico, y así, poder tener mayores elementos de juicio en el reconocimiento y tratamiento oportuno de esta enfermedad.

Adicionalmente mediante la aplicación de una encuesta, se obtuvo información básica de la situación actual de esta patología, y se identificaron algunos factores de riesgo que se reconocen o pueden promover la aparición de la leucemia en la población.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leucemias se encuentran entre los cánceres de mayor incidencia y mortalidad a nivel mundial, con cerca de 300.000 nuevos casos y 222.000 muertes reportadas anualmente (Ferlay *et al*, 2005). El promedio anual de esta patología en Colombia (1995-1999) es de 2.711 nuevos casos y 2.009 muertes (Piñeros *et al*, 2006). En el departamento del Cauca, no se ha establecido estadísticas a cerca de la incidencia de esta patología, sin embargo, la Secretaría Departamental de Salud del Cauca tiene registrado, que la leucemia es la sexta causa de mortalidad total en la región.

Los cambios cromosómicos que ocurren en las células cancerígenas de la médula ósea en pacientes con leucemia tienen relación con la biología de la enfermedad y pueden indicar la ubicación de trastornos en el material genético durante el proceso de la leucogénesis. Dichas alteraciones definen subgrupos de pacientes, y deben tenerse en cuenta en la selección de la terapia (Harrison *et al*, 2001).

Diferentes alteraciones citogenéticas observadas en pacientes con leucemia, proporcionan valiosa información pronóstica, ya que permite estratificar los pacientes con leucemia teniendo en cuenta el estudio cariotípico, información que establece el tratamiento y mejora significativamente la supervivencia (Forestier *et al*, 1997).

Las técnicas citogenéticas de cultivo para obtener cromosomas de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina para estudios constitucionales han sido estandarizados para dar resultados repetibles y consistentes en casi todos los casos. Para células malignas de la sangre, sin embargo, estas adoptan un comportamiento inherente a la biología de la enfermedad, también al diagnóstico y al estado del paciente, originando que, muestras de diferentes pacientes con

leucemia puedan dar morfologías cromosómicas muy diferentes, aun procesadas al mismo tiempo. Esto se debe a que la morfología cromosómica depende de las condiciones genéticamente intrínsecas en cada individuo (Swansbury, 2003).

Los estudios citogenéticos de malignidades sobre patologías hematológicas poseen un reto técnico particular, y por lo tanto no es posible presentar una sola técnica que funcione con regularidad y sea confiable. Debido a esto, cada laboratorio debe implementar una ligera variación del procedimiento básico. Ya que estas técnicas citogenéticas, mediante la práctica, necesitan encontrar detalles de mejoramiento y precisión para la obtención de buenos resultados (Swansbury, 2003).

En el Hospital Universitario San José y la Clínica la Estancia de la ciudad de Popayán - Cauca se reportaron un total de 24 pacientes con diagnósticos de leucemias en aproximadamente 1.280.000 habitantes durante el año 2007. Los diagnósticos y pronósticos que se realizan en la Unidad Hematológica se basan en estudios de hemogramas, biopsias, aspirado de médula ósea, antecedente familiar e historial clínico. Sin embargo la información diagnóstica podría ser complementada y precisada mediante la realización de estudios citogenéticos. Estos podrían llevarse a cabo en el laboratorio de Genética Humana de la Universidad Cauca ya que cuenta con la infraestructura y la capacidad de realizar este tipo de análisis citogenético.

Este Trabajo de Grado realizó el primer estudio citogenético en pacientes con leucemia, realizado en el Departamento del Cauca. Con él se pretendió: 1. Estandarizar la técnica de cultivo de médula ósea y sangre periférica en el Laboratorio de Genética Humana, 2. Obtener información teórica sobre las alteraciones cromosómicas presentes en la población. 3. Adquirir información metodológica sobre la técnica de cultivo y sobre el análisis citogenético de los diferentes tipos de leucemia. Esta información, podrá servir de apoyo a los diagnósticos que se realizan en la Unidad Hematológica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Realizar un estudio citogenético en tejidos de médula ósea y sangre periférica de pacientes con leucemia, en una población del departamento del Cauca.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Estandarizar la técnica de cultivo de médula ósea y sangre periférica en pacientes con leucemia.
- Identificar alteraciones cromosómicas en pacientes con leucemia, mediante la técnica de bandas R.
- Identificar las características socio-demográficas de los pacientes con leucemia que participen en el estudio.

4. JUSTIFICACIÓN

La leucemia en Colombia reporta un promedio anual en hombres de 1427 casos nuevos y 1058 muertes; siendo en mujeres de 1284 casos nuevos y 951 muertes en 100.000 habitantes por año (Piñeros *et al*, 2006). Aun cuando se conoce que en el Cauca se ha calculado un promedio de 958 casos de cáncer en hombres y 852 casos de cáncer en mujeres por año en un total de, los promedios de leucemias en esta región aun no son claros. Sin embargo durante el año 2007 se reportaron 24 muertes por leucemia en 1.285.794 habitantes (Secretaria Departamental de Salud del Cauca).

Este estudio citogenético servirá de apoyo para el diagnóstico y pronóstico de pacientes que padezcan esta enfermedad. Además podrá generar un grupo interdisciplinario que facilite el aprovechamiento de muestras y el intercambio de recursos e información, con el propósito de tratar este problema de salud en el Departamento del Cauca. Evitando el traslado de las muestras a otras ciudades, con lo cual se ganaría tiempo y se disminuirían gastos, pero lo más importante, es que se brindaría apoyo para una atención más oportuna al paciente, con un diagnóstico mas aproximado a su estado clínico.

La realización de una encuesta permitirá observar las características sociodemográficas, de los pacientes que proporcionen muestras para la implementación de la técnica de cultivo de médula ósea y sangre periférica, permitiendo además indagar sobre la etiología y la distribución de los diferentes tipos de leucemia en la población caucana. Adicionalmente los resultados obtenidos de la encuesta, podrán ser utilizados para generar nueva medidas y estrategias de promo-prevención útiles en salud pública, que reduzcan o eliminen factores de riesgo a esta patología.

Este Trabajo de Grado, adicionalmente podrá generar una herramienta para iniciar estudios de seguimiento de los pacientes, que permitan establecer la probabilidad de alcanzar remisión completa, su duración y el tiempo de sobrevida. Incluso, fomentará la utilización de estudios citogenéticos, para el diagnóstico y pronóstico de otras enfermedades hematológicas y demás malignidades que afecten a la población.

5. MARCO TEÓRICO

Las leucemias son un tipo de cáncer, estas se producen por el crecimiento descontrolado de células hematopoyéticas o células madre (formadoras de sangre), incapaces de madurar adecuadamente, que llegan a invadir la mayor parte o la totalidad de la médula ósea, tras lo cual alcanzan la sangre periférica y, a veces, se producen focos extrahemáticos, en uno o varios órganos del cuerpo, que se comportan como tumores (Heim *et al*, 1995).

Hematopoyesis: Es el proceso dinámico de la producción y desarrollo de células sanguíneas; este sistema mantiene una población celular de eritrocitos, leucocitos y plaquetas a través de una compleja red de tejidos, órganos, *stem cells* (células madre), y factores de regulación. Esta red es responsable de la maduración y división de las *stem cell* hematopoyéticas en estadios comprometidos de linaje que transportan oxígeno y excretan dióxido de carbono (glóbulos rojos), combaten infecciones (granulocitos), realizan funciones inmunes (linfocitos), mantiene la homeostasia (plaquetas), entre otras.

La *stem cell* hematopoyética tiene la capacidad de auto replicarse y proliferar junto con la capacidad de diferenciarse en células comprometidas de linaje tanto mieloide como linfoide. Bajo la influencia de factores de crecimiento (interleuquinas), las células progenitoras se dividen y se diferencian para formar elementos maduros celulares de sangre periférica. El sistema hematopoyético esta formado por la médula ósea, hígado, bazo, nódulos linfoides y timo, tejidos y órganos involucrados en la producción, maduración y destrucción de las células sanguíneas; la **Figura 1** muestra el proceso hematopoyético y la diferenciación celular (Manascero, 2003).

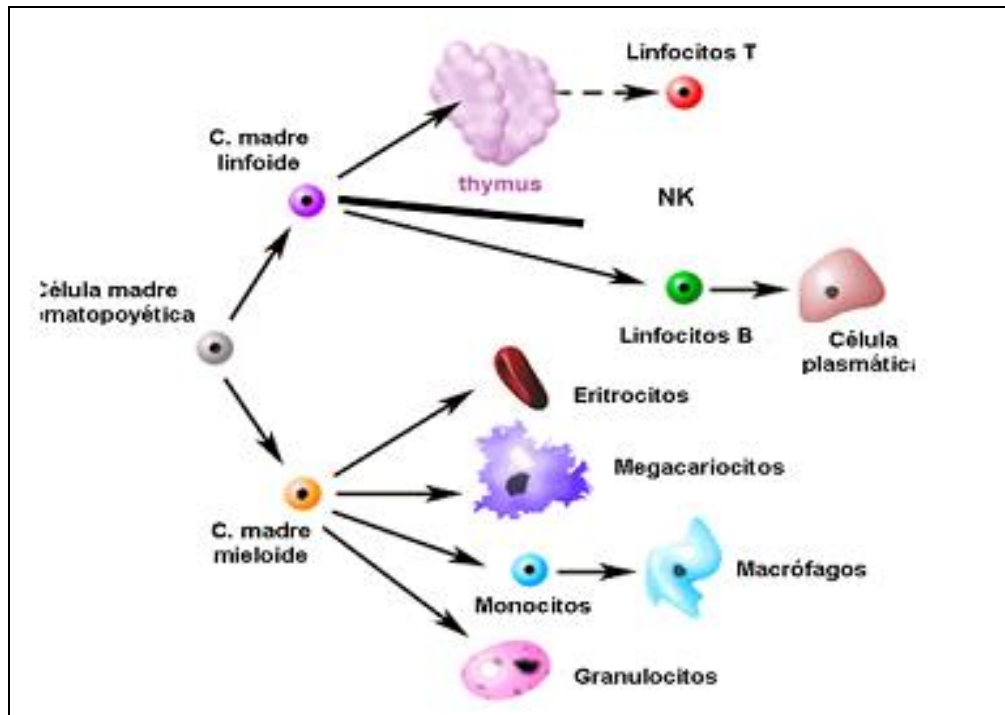


Figura 1: Proceso hematopoyético: Linaje linfóide y mieloide.

5.1 Clasificación de las leucemias.

Si el proceso de crecimiento descontrolado se realiza de forma muy rápida, de tal forma que se desarrollen extraordinariamente el número de células inmaduras (blastos), se denominará leucemia aguda. Si el proceso es más lento, presenta un mayor estadio madurativo de estas células, aunque no son células normales sino cancerosas, se denominará crónica (Brunning y Mckenna,. 1994).

Existen diferentes clasificaciones: La clasificación tradicional, permite determinar la naturaleza de la célula afectada, estableciendo dos tipos de leucemia la linfóide y mieloide. En la leucemia linfóide las células, que normalmente se transforman en linfocitos, se hacen cancerosas y rápidamente reemplazan a las células normales que se encuentran en la médula ósea. En la leucemia mieloide, los granulocitos no se desarrollan sino que, al igual que en la linfóide, se convierten en células cancerosas que invaden la médula ósea (Brunning y Mckenna,. 1994).

5.2. Incidencia de las Leucemias

Entre los casos de cáncer de mayor incidencia en el mundo, las leucemias ocupan el onceavo puesto, con un reporte de 300.000 nuevos casos y 222.000 muertes. Es más común en hombres (Incidencia: 171.037, mortalidad: 125.142) que en mujeres (Incidencia: 129.485, mortalidad: 97.364) (Ferlay *et al*, 2005). Sin embargo, los niveles de supervivencia difieren entre los tipos de leucemias, por ejemplo la mortalidad en las leucemias mieloides es significativamente mayor que en las linfocíticas, especialmente en niños (Brunning y Mckenna, 1994).

En Colombia las leucemias son la quinta causa de muerte por cáncer en hombres y la sexta en mujeres, con una incidencia de 1.427 y 1.284 nuevos casos (Piñeros *et al*, 2006). Por otra parte, es en los niños donde ocupan el primer lugar entre las malignidades. En el año 2005 se reportaron 93 nuevos casos de leucemia representando un 31% y en el 2006 un total de 57 casos con un 29.1% del total de los grupos de diagnóstico de cáncer en niños del país, según reporta el Instituto Nacional de Cancerología (2007). En 1990, este instituto estableció un atlas de mortalidad por cáncer que permite apreciar la sectorización de la leucemia por departamentos, tal como se muestra en la **Figura 2**.

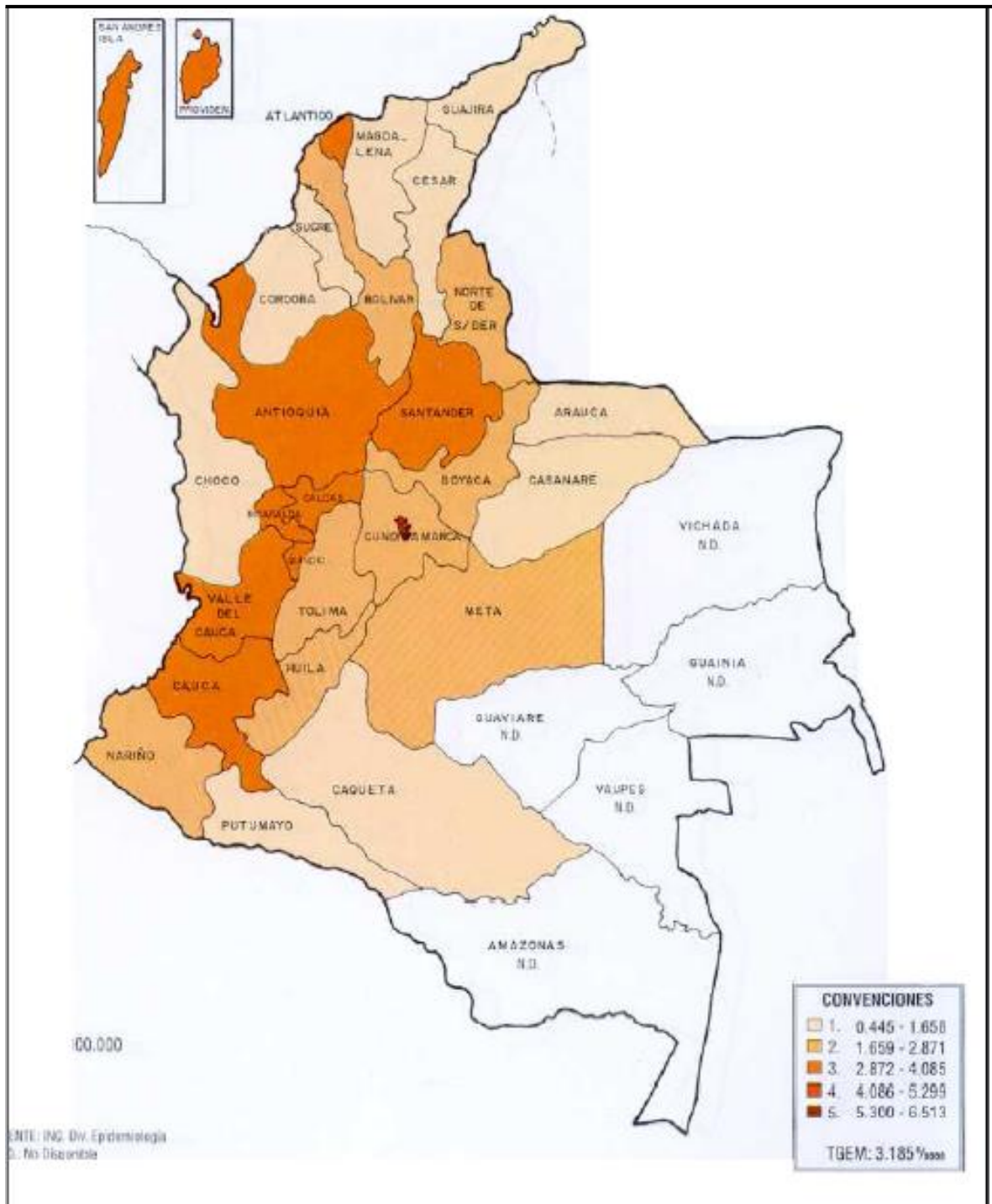


Figura 2: Tasas estandarizadas de mortalidad por leucemias. Según departamentos. Población total. (Tasas por 100.000). Colombia 1990.

5.3. Etiología de las leucemias

Hasta el momento las causas que originan las leucemias son desconocidas. A pesar de esto, existe una correlación entre el virus del HTLV, Epstein Barr y una forma de leucemia aguda linfocítica, además, las radiaciones ionizantes y sustancias químicas como el benceno y esta enfermedad.

Poco se conoce sobre el mecanismo de producción de las células habituales de la sangre que cambian a una producción de células leucémicas. Lo que se cree es que se produce una alteración celular a nivel del ADN que origina una serie de alteraciones. Se han realizado varios estudios para comprobar la relación entre leucemias y la exposición a campos electromagnéticos, rayos X, plaguicidas, herbicidas, contacto con químicos como el benceno, ciertos estilos de vida como el consumo del cigarrillo y la exposición a agentes infecciosos en etapa perinatal o pediátrica que se constituyen en factores de riesgo (Rosell *et al*, 2004; Ceballos *et al*, 2002).

Particularmente, se conoce que algunos tratamientos para ciertos tipos de cáncer, pueden hacer al paciente más vulnerable a desarrollar una leucemia mieloide aguda (Rosell *et al*, 2004). También se ha observado que hay una alta frecuencia de leucemia aguda linfocítica en niños que presentan determinados trastornos genéticos como el síndrome de Down, la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloom y mutaciones en el gen p53 (Vieira y Ozonoff, 2003).

5.3.1 Plaguicidas y Leucemia:

Los estudios epidemiológicos para identificar la responsabilidad en un proceso cancerígeno presentan dificultades dado que lo habitual es que los individuos estén expuestos a múltiples productos. Por lo anterior, se han establecido relaciones entre la exposición (laboral o no) a plaguicidas y determinados tipos de cáncer. Por ejemplo, un estudio encontró que los niños nacidos de madres que

habían usado plaguicidas durante los últimos meses del embarazo tienen un riesgo tres veces mayor de desarrollar leucemia en la niñez, mientras que los niños expuestos después de nacer presentaron un riesgo dos veces mayor (Leiss y Savitz, 1995).

Cullen *et al*, (1990) evidenció un incremento de leucemias no Hodgkin en niños y adultos residentes en zonas de elevada exposición a plaguicidas, no necesariamente ligado a su actividad laboral. Según estos investigadores, muchas veces no es la sustancia activa la que provoca la acción, sino los disolventes en las formulaciones, ya que existen evidencias de que algunos de los solventes utilizados presentan efectos carcinogénicos en el hombre y en otros animales. Algunos de estos solventes pueden ser: el benceno, el cloroformo, el tetracloruro de carbono, el 2-nitropropano, entre otros.

5.4 Citogenética

La existencia de alteraciones cromosómicas intrínsecas en las hemopatías malignas como las leucemias se conoce desde 1960 cuando se describió en la leucemia mieloide crónica (LMC) el cromosoma Filadelfia (Ph). En los años setenta, con la introducción de las técnicas de bandeamiento, se demostró que estos cambios no son aleatorios. Desde entonces la citogenética adquirió el carácter de marcador en las hemopatías malignas. El estudio citogenético de los pacientes con hemopatías puede realizarse mediante método directo o a través de cultivos de células de médula ósea, de ganglios linfáticos y bazo, o de sangre periférica (si contiene una cifra de leucocitos superior a $15 \times 10^9/L$ y un 10% de formas inmaduras). La tinción de los cromosomas se efectúa con bandas G (Giemsa), Q (quinacrina), C (constitucional heterocromatina) o R (revés). (Sandberg, 1996)

Las alteraciones que pueden encontrarse en las leucemias son de dos clases: *primarias*, cuando están ligadas específicamente a cada tipo de tumor, y

secundarias, cuando se añaden a las anteriores. Dos son también los tipos de alteraciones cromosómicas: *numéricas* y *estructurales*. Las primeras llevan consigo pérdida (hipoploidías) o ganancia (hiperploidías) de cromosomas. Las estructurales reordenan el material genético de uno o varios cromosomas (inserción, inversión), pierden o ganan material genético (deleción, duplicación, isocromosoma) o lo intercambian entre ellos (translocación).

La citogenética se aplica en la clínica no sólo para establecer el diagnóstico y pronóstico de las hemopatías, sino también para valorar su remisión completa y la eficacia del tratamiento y para evaluar las posibilidades de trasplante de médula ósea (Rooney y Czepulkowski 1990).

5.4.1. Bandeos Cromosómicos

Son técnicas que revelan bandas o regiones con tinción diferencial a lo largo de los brazos cromosómicos. Estas bandas ponen de manifiesto la diferenciación longitudinal de los cromosomas, la cual representa diferencias en su compleja organización a nivel molecular. Una de las aplicaciones más importantes de las técnicas de bandeo es la identificación inequívoca de los cromosomas de un cariotipo. El poder de resolución de estas técnicas permite no sólo la identificación de cromosomas enteros sino también el estudio detallado de los reordenamientos cromosómicos tales como las translocaciones y las deleciones (Panzera *et al*, 2004).

Las técnicas de bandeo cromosómico pueden agruparse en técnicas de bandeo morfológico y técnicas de bandeo dinámico.

Bandeos morfológicos:

Los bandeos morfológicos son inherentes a la heterogeneidad de la cromatina, relacionados a proteínas e interacciones ADN-proteínas y a la composición de bases del ADN. Pueden clasificarse, a su vez, en:

a) Técnicas de tinción diferencial, como las bandas G (Giemsa) utilizando tripsina y las bandas R (Reverse) empleando Bromuro de Etidio. Este último se intercala en fase de síntesis, para poder elongar la longitud del cromosoma. Este tipo de bandas revela un patrón de bandas longitudinales pero sólo en los cromosomas de aves y mamíferos.

b) Métodos de tinción selectiva, como las bandas C (tiñen la heterocromatina constitutiva), bandas NOR (tiñen los organizadores nucleolares) y bandas T (tiñen los telómeros).

c) Coloraciones con fluorocromos específicos aislados o combinados con colorantes no fluorescentes (DAPI, DAPI/Distamicina A, Cromomicina A3, Cromomicina A3/Distamicina). Estos fluorocromos pueden teñir regiones ricas en pares de bases AT o CG. A esta clasificación pueden agregarse los diferentes bandeos obtenidos con endonucleasas de restricción que reflejan la concentración diferencial de sitios de reconocimiento y/o accesibilidad de las mismas a lo largo del cromosoma.

Bandeos dinámicos:

Determinadas regiones cromosómicas inician y terminan la duplicación del ADN durante una pequeña fracción de la fase S constituyendo por lo tanto una unidad de replicación. Los bandeos de replicación involucran la incorporación selectiva de la 5-bromodeoxiuridina (BrdUrd), este es un análogo de la timidina, intercalante en el ADN que permite revelar las bandas. El tránsito de la célula a través de la fase

Se puede ser detenido mediante el empleo de altas concentraciones del mencionado análogo de base. Esto permite identificar las regiones que se replican sincrónicamente en los distintos momentos de la fase S (Panzera *et al*, 2004).

5.4.2 Técnicas Moleculares Complementarias a la Citogenética

El análisis molecular es la determinación de cambios en la secuencia o en la expresión de genes críticos en cáncer mediante técnicas de biología molecular como FISH, PCR, PCR cuantitativa y secuenciación. Estas técnicas permiten confirmar la presencia de una alteración que no se ha podido detectar mediante las técnicas citogenéticas.

4.4.2.1. Hibridación In Situ Fluorescente (F.I.S.H)

Hasta los años 90 la citogenética estaba limitada con lo que se podía visualizar con las técnicas de tinción de los cromosomas, observados al microscopio óptico. Los análisis citogenéticos de rutina se realizan en la mayoría de laboratorios con una resolución entre 400 y 550 bandas. La aparición de las técnicas de hibridación in situ fluorescente (FISH) proveyó de una potente herramienta para el diagnóstico de estos síndromes, poniendo de manifiesto deleciones submicroscópicas mediante la utilización de sondas de DNA para la región crítica de estos síndromes. El inconveniente de estas técnicas es su complejidad y elevado costo que no permite su utilización de forma indiscriminada.

5.4.2.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La Reacción en Cadena de la Polimerasa, conocida como **PCR** por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*, es una técnica de biología molecular descrita en 1985 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un

fragmento de ADN particular, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento.

Tipos de PCR utilizados en el diagnóstico de leucemias:

PCR Anidada:

Técnica muy sensible de PCR en la que el producto de una amplificación es utilizado como molde para realizar una segunda amplificación con cebadores que se ubican dentro de la primera secuencia amplificada. Este tipo de PCR es muy específica.

PCR Tiempo Real:

Reacción de PCR cuya principal característica es que permite cuantificar la cantidad de ADN o ARN presentes en la muestra original.

Se puede dividir en las técnicas basadas fluorocromos no específicos y en técnicas basadas en sondas específicas.

En las técnicas basadas en fluorocromos, el ADN, que ve multiplicada su cantidad con cada ciclo se une al fluorocromo (generalmente SYBR Green) produciendo fluorescencia que es medida por el termociclador apto para RealTime PCR. Permite cuantificar solo una secuencia por reacción pero tiene la ventaja de utilizar primers normales para su realización. Es mucho más económica que la realización de Realtime PCR con sondas específicas.

Las técnicas basadas en sondas específicas utilizan una *sonda* unida a dos fluorocromos que hibrida en la zona intermedia entre el cebador directo (*forward*) y el inverso (*reverse*), cuando la sonda está intacta, presentan una transferencia energética de fluorescencia por resonancia (FRET). Dicha FRET no se produce cuando la sonda está dañada y los dos fluorocromos están distantes, producto de

la actividad 5'-3' exonucleasa de la ADN polimerasa. Esto permite monitorizar el cambio del patrón de fluorescencia y deducir el nivel de amplificación del gen.

5.4.2. Aplicaciones y limitaciones de los estudios citogenéticos.

5.4.2.1. Aplicaciones

1. Establecer presencia de un clon maligno, casi siempre indica evidencia de malignidad, pero puede ser que no se encuentre clon maligno en un cariotipo de una malignidad diagnosticada.
2. El estudio citogenético es el mejor estandarte para realizar pruebas genéticas y el mas disponible actualmente para identificación de cariotipos completo. Aunque está sujeto a limitaciones que son superadas mediante el uso de nuevas técnicas complementarias como FISH Y PCR.
3. Al incrementar el riesgo de que aparezca una malignidad secundaria inducida por el tratamiento. Permite diferenciar el riesgo de utilizar un tratamiento intensivo a un paciente con buen pronóstico, comparado al de un paciente con mal pronóstico; o igualmente evitar imponer un tratamiento intensivo a un paciente anciano con pronóstico pobre.
4. Sirven para monitorear la remisión de los pacientes, sin embargo, los estudios citogenéticos se deben complementar para mayor seguridad con FISH y/o técnicas moleculares como PCR RT. Ya que, no son suficientes para detectar niveles bajos de clones y no debería de usarse para monitorear la remisión, entonces es recomendable utilizar FISH y/o técnicas de estudios moleculares.
5. Es útil establecer el momento de realizar el trasplante de médula ósea y a sí prever su donante.

6. Soporta estudios futuros, es decir que más hay por conocer. La rutina del laboratorio tiene poco tiempo libre para la investigación pura pero existen maneras para la investigación sea soportada dando información y reporte de hallazgos inusuales al dominio público, lo que hace posible relacionar las anomalías con las características clínicas asociadas, así en el caso de que la anomalía sea descubierta en otros pacientes, entonces hallazgos inusuales pueden indicar regiones importantes para realizar análisis detallados. Un área menos significativo pero no menos importante área de investigación tiene que ver con el efecto de anomalías cromosómicas secundarias.

5.4.2.2. Limitaciones

1. Solo las células que se dividen pueden ser analizadas y esto incluye a las células en división que se obtienen de la población maligna tanto como la no maligna. Si se conoce o sospecha, que alteración específica esta presente y hay suficientes evidencias disponibles, algún FISH y análisis molecular pueden ser usados para comprobar la presencia de dicha alteración en las células que no se dividen.
2. Puede no haber resultados de algunos pacientes si se encuentran pocas divisiones y estas no son analizables o por el contrario sólo se obtienen células normales. Por este motivo es importante tener una cantidad extra de muestra de médula ósea, la cual es necesario guardar en el refrigerador en caso de que no se obtenga buena división celular o proliferación, con el propósito de repetir el cultivo. También se debe tener en cuenta la cantidad de células del resultado de hemograma para decidir si aumentar el número de gotas a sembrar, y de este modo lograr una buena cantidad de metafases analizables que permitan obtener información y concluir con un diagnóstico citogenético.

3. Algunas veces la anormalidad encontrada no tiene significancia. Anormalidades raras o aparentemente únicas aún se encuentran, incluso en malignancias comunes y bien estudiadas; la determinación de su significado clínico se limita a tomar el dato, reportarlo en la literatura y esperar a que sea confirmado por otros investigadores.
4. La morfología cromosómica puede ser inadecuada para detectar algunas anormalidades. Además algunos reordenamientos genéticos intervienen en cambios cromosómicos muy sutiles y otros pueden deberse a inserción de genes con la ausencia de un rearrreglo cromosómico importante (Hiorns *et al*, 1994), estos se detectan por FISH y PCR – RT (Swansbury, 2003).

5.4.3. Retos en los estudios Citogenéticos en malignancias hematológicas.

En algunos casos es posible reconocer células con distintas calidades de metafases en el mismo extendido, siendo aquellas con buena morfología probablemente células normales y las células con pobre morfología presentando alguna anormalidad. Hace tiempo se pensaba que la pobre morfología por si sola, aún con la ausencia de una anormalidad, podría ser suficiente para identificar un clón como maligno; sin embargo dicha hipótesis no ha sido confirmada. Pero es necesario demostrar la presencia de un clon maligno para identificar la anormalidad genética adquirida (Swansbury, 2003).

Los altos niveles de variación en la calidad de los cromosomas es a menudo mayor que las implementaciones que se puedan hacer para intentar mejorar esa calidad de cromosomas (siempre va haber variabilidad). Las células de algunas muestras de pacientes simplemente crecen bien y dan buena calidad de cromosomas; y otras retan cualquier artilugio o truco en el repertorio de la citogenética, donde se obtienen cromosomas pequeños, mal definidos, superpuestos o amontonados, difícilmente bandeados y poco analizables.

Por lo anterior los estudios citogenéticos de malignidades poseen un reto técnico particular y no es posible presentar una sola técnica que garantice que funcione constantemente y sea confiable. Por ejemplo la solución hipotónica puede variar (rangos desde pocos segundos a 1 hora). No existe una técnica que funcione bien para todos. Como los resultados son tan variables, es difícil demostrar algún efecto real y consistente de las variaciones que se hagan sobre el procedimiento básico.

Es evidente que aquello que funcionó en un lugar podría no ser efectivo en otro, por ejemplo la dispersión de cromosomas se ha demostrado que se afecta por las condiciones atmosféricas y en algunos lugares por diferencias en el agua (destilada y/o desionizadas) usada para preparar la solución hipotónica.

5.4.4. Tipo de Muestra

5.4.4.1. Médula ósea

La mayoría de los estudios citogenéticos en hematología el tejido ampliamente preferido es la médula ósea por que es ahí donde se originan esta clase de trastornos como la leucemia; de igual manera las células madres en división de la médula son de linaje tanto linfoide como mieloide y poseen mayor capacidad de división, la cual permite una probabilidad superior en la obtención de clones. Se puede producir fallas en un resultado si la muestra de médula es muy pequeña o tiene un conteo celular demasiado alto; en cualquier caso es mejor pedir una muestra de sangre heparinizada (para evitar la coagulación).

Uno de los factores más importantes en la obtención de casos exitosos es la obtención de una buena morfología de los cromosomas para detectar las anomalías. Esta es una medida de creciente importancia que dan ahora los

médicos a los estudios citogenéticos en malignidades, sin embargo es importante que la muestra enviada este en buenas condiciones y sea adecuada.

Una porción generosa de la parte esponjosa de la biopsia puede ser enviada, usualmente 2-5 mL pueden ser suficientes. Sin embargo es el número de células blancas presentes lo que es más importante que el volumen de la muestra: cada cultivo necesita de 1 a 10 millones de células. En caso de ser escasa la muestra, cualquier célula dentro de la jeringa puede ser lavada con el medio de cultivo.

Las muestras con heparina de médula ósea pueden ser transportadas sin medio, sí alcanzan a llegar al laboratorio entre una hora o alrededor de ese tiempo y puede ser influenciado por el clima. El transporte de la muestra con el medio de cultivo puede reducir una posible pérdida de material por coagulación o secamiento, además los nutrientes pueden servir para preservar la viabilidad de las células cuando el conteo de estas es alto (Swansbury 2003).

Según Swansbury (2003), las causas usuales para que una muestra de médula ósea resulte inadecuada incluyen:

1. El paciente es un infante,
2. El hematólogo que toma la muestra sea inexperto.
3. El conteo de células es muy bajo
4. La médula ósea se volvió fibrosa.

5.4.4.2. Sangre

Las muestras de sangre generalmente, pueden fallar en la posibilidad de encontrar pocos clones, comparada con la muestra de la médula ósea donde se originan esta clase de malignancias; igualmente las divisiones derivan de células que ya han dejado la médula ósea y por eso no identifican el estado actual de la enfermedad. Por estas razones las muestras de sangre pueden dar resultados

confusos y difíciles de interpretar. Según la literatura recomienda tener prioridad la médula y como una última alternativa la sangre en lugar de que no se obtenga nada. Se dice, algunas veces, que un estudio de sangre es importante sólo si hay blastos en la circulación periférica, esto puede ser verdad generalmente, pero en ciertos laboratorios un clón ha sido detectado varias veces aún cuando no se han encontrado blastos.

Se puede considerar en el laboratorio si se posee los recursos en el mantener células viables en nitrógeno líquido o mediante extracción de DNA para realizar futuros estudios

5.4.5. Causas comunes de fallas.

Se han considerado fallas debido a limitaciones inherentes al tipo de muestra suministrado. Sería frustrante para un laboratorio tener que trabajar con material inadecuado y cualquiera de esas deficiencias debería de ser reportado al médico, sin embargo pueden aparecer fallas por errores de procedimientos del laboratorio y debe hacerse todo esfuerzo para minimizarlas. Muy a menudo en los estudios genéticos de malignidad no hay posibilidad de obtener una muestra de reemplazo: Puede haber solo un aspirado de MO que se tome antes de que el tratamiento inicie.

Como identificar posibles fallas

1. la contaminación es usualmente obvia si: los cultivos están nudosos y turbios y durante el proceso huelen desagradable; bajo el microscopio los extendidos muestran una infestación obvia de bacterias, hongos y otros microorganismos.

Si todos los cultivos de una muestra están infectados, pero aquellos de otra muestra procesada al mismo tiempo no, es posible que la muestra estaba contaminada desde donde se obtuvo.

Es posible que la infección aparezca después no durante el cultivo, podría venir de los reactivos utilizados durante la cosecha o el bandedo.

Los procedimientos que pueden prevenir la contaminación incluyen realizar esterilizaciones con soluciones de sal, esterilizaciones con filtro de miliporo de soluciones sensibles al calor y usar técnicas estériles para la realización de los cultivos.

2. Los reactivos debe ser preparados según las recomendaciones instrucción del fabricante. Un error en los reactivos puede ser difícil de detectar, si hay sospecha de ello, se deben descartar y preparar nuevos, antes que intentar encontrar exactamente cual es el que esta fallando.
3. Verificar que los reactivos no estén deteriorados; muchos tienen un tiempo limite de vida una vez halla sido abiertos y otros necesitan mantenerse en la oscuridad.
4. Si el inicio de una serie de fallas coincide con el uso de un nuevo paquete de medio, de suero, o de cualquier otro reactivo, o un cambio de procedimiento, esta información podría ser una pista para encontrar el problema.
5. Mirar que la incubadora este funcionando correctamente y no se haya sobrecalentado o enfriado. Tener en cuenta que el tiempo de cultivo sea el adecuado para este tipo de tejido.

6. Si no aparece ninguna metafase para el análisis, las posibles razones incluyen: el tejido no tuvo la capacidad de producir alguna célula (como ocurre con la mayoría de células de la sangre sin estimular), la división celular fue parada por exposición a extremo calor o frío, el medio de cultivo fue inactivado para soportar el crecimiento celular (por ejemplo un cambio en el pH), demasiadas células fueron adicionadas al cultivo, el agente colcemid o colchicina no fue efectivo, todas las células que se dividieron fueron lisadas por demasiada exposición a solución hipotónica, o que todos los cromosomas han sido digeridos del extendido por demasiada exposición a tripsina o BrdU.

7. Si hay divisiones pero los cromosomas son muy cortos, las posibles razones incluyen: alta concentración y/o exposición a colcemid, no obstante, se conoce que los cromosomas cortos también pueden ser una característica de la enfermedad. Los cromosomas de un clón hiperdiploide alto en LLA (Leucemia Linfocítica Aguda) pueden ser muy cortos en algunos casos, a pesar de todo esfuerzo que se haga por obtener cromosomas largos.

8. Si los cromosomas son largos y se superponen y están organizados en un círculo con los centrómeros o apuntando hacia el centro (conocido como anillo anafásico), entonces la concentración del agente de colcemid o colchicina fue muy baja.

9. Si los cromosomas no están bien esparcidos y están muy amontonados las posibles causas incluyen una solución hipotónica inefectiva o poca exposición a esta. También es posible que hallan fallas en la técnica de goteo, si el extendido se deja secar demasiado rápido luego de soltar las células, entonces los cromosomas no tienen oportunidad de esparcirse. Sin embargo si los cromosomas están o se encuentran también borrosos se debe a la pobre calidad intrínseca al hecho de ser malignos. Dichos casos

tienden a producir pobres cromosomas; sin importar la técnica que se use, y hay muy poco que se pueda hacer para mejorarlos.

10. Si los cromosomas no son analizables debido a la carencia de un patrón claro de bandas, esto es usualmente atribuido a una combinación de que tan viejas sean las preparaciones y por cuanto tiempo fueron expuestos a tripsina en caso de bandeado G. Los extendidos pueden ser envejecidos en un cuarto de temperatura por una semana, o por unas pocas horas en un horno o por unos pocos minutos en un microondas, pero este es un paso esencial para que el bandeado sea efectivo, además de las condiciones de los reactivos y la temperatura.

5.5. Diagnóstico de Pacientes con Leucemia

5.5.1. Diagnóstico clínico

Los análisis de sangre comunes, como el recuento completo de células sanguíneas, pueden proporcionar la primera prueba de leucemia. Para el diagnóstico se tienen en cuenta los signos y síntomas que presenta el paciente, pero serán necesarios una serie de análisis que detecten la presencia de las células anormales. Se determinarán los niveles de glóbulos rojos, blancos y plaquetas en un análisis de sangre o **hemograma**. Generalmente los glóbulos blancos pueden estar disminuidos, aunque su número también puede ser normal o elevado. Lo que será determinante, al examinarlos al microscopio, se observarán glóbulos blancos muy inmaduros, blastos, que normalmente no están presentes en la sangre circulante. Los glóbulos rojos y las plaquetas habrán disminuido en número (Merck & Co, 2005)

5.5.1.1. Hemograma

Se define como la evaluación numérica y descriptiva de los elementos celulares de la sangre. Constituye una de las pruebas mas solicitadas en el laboratorio clínico, ya que acompaña casi a todos los protocolos de diagnóstico, y es, talvez, con el avance tecnológico, la prueba de rutina que mas ha evolucionado, no solo en el número de parámetros si no de precisión, de exactitud y rapidez. (Berrio *et al*, 2003).

Para confirmar el diagnóstico se toma una **muestra de médula ósea**, a través de una aspiración, y se analizan las células presentes en ella. Otra prueba que puede realizarse en caso de haber alguna duda, es la punción lumbar con la que se extrae líquido cefalorraquídeo y se comprueba la presencia en éste de células leucémicas. Todas estas muestras sirven para analizar al microscopio, la cantidad y la forma de las células. Para un diagnóstico de leucemia se requiere detectar al menos un 30% de blastos o células inmaduras en la médula o en sangre periférica (Merck & Co, 2005).

5.5.1.2. Aspirado de médula ósea

En una aspiración de médula ósea se extrae una pequeña porción de la misma de la parte posterior del hueso pélvico o del esternón (**Figura 3**). La médula ósea se puede examinar para determinar la causa de la anemia, la presencia de leucemia u otro cáncer o la presencia de algunas "enfermedades de almacenamiento", en las cuales los productos metabólicos se almacenan en ciertas células de la médula (Manascero 2003).



Figura 3: Aspiración de médula ósea.

5.5.2. Diagnóstico citogenético

Las pruebas de citogenética y los estudios genéticos moleculares, sirven para diagnosticar algunos tipos de leucemias específicos, que será importante conocer para determinar el pronóstico del paciente. Algunas leucemias tienen un número anormal de cromosomas, por ejemplo, las células de la leucemia linfocítica aguda con más de 50 cromosomas son más sensibles a la quimioterapia, y aquellas que contienen menos de 46 cromosomas son más resistentes a la quimioterapia. Las pruebas de ADN pueden encontrar alteraciones en algunas partes de los cromosomas demasiado pequeñas como para verlas con la prueba citogenética clásica. Esta prueba se considera útil para clasificar la leucemia y predecir también así la respuesta al tratamiento (Calasanz, 2001).

El enorme avance en el conocimiento de las alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias ha permitido, no sólo conocer la importancia clínica de dichas alteraciones, sino también, caracterizar molecularmente muchas de ellas, identificando y clonando los genes implicados. Esto hace posible el diseño de

nuevas estrategias terapéuticas y de nuevos análisis moleculares para el correcto diagnóstico y monitorización de los pacientes (Calasanz, 2001).

5.5.2.1 Cromosoma Filadelfia

Cromosoma Filadelfia es la alteración cromosómica más antigua y estudiada. El fenómeno fue descubierto y descrito en 1960 en Filadelfia por los científicos de Peter Nowell, de la Escuela de Medicina de la Universidad de Pensilvania y David Hungerford del instituto Fox Chase Cancer Center, siéndole asignado el nombre de la ciudad donde se ubican ambos centros de investigación. En 1973, Janet D. Rowley identificó en la Universidad de Chicago la translocación genética como el origen de la anormalidad (Talpaz *et al*, 2006).

Esta anormalidad afecta a los cromosomas 9 y 22. El 95 por ciento de los enfermos de leucemia mieloide crónica (LMC) la presentan, mientras el resto de los enfermos padecen translocaciones crípticas invisibles a las preparaciones mediante método de banda R o G u otras translocaciones que afectan a otro u otros cromosomas de la misma forma que sucede con los cromosomas 9 y 22. También se encuentran casos de Cromosoma Filadelfia en enfermos de leucemia linfoblástica aguda (25 al 30 por ciento en adultos y 2 al 10 por ciento en niños), y ocasionalmente, en casos de leucemia mielocítica aguda (LMA) (Talpaz *et al*, 2006).

El defecto genético del cromosoma Filadelfia consiste en un fenómeno conocido como translocación. Partes de dos cromosomas, el 9 y el 22, intercambian sus posiciones. El resultado es que parte del gen de región de ruptura (BCR, Breakpoint Cluster Region, en inglés) del cromosoma 22 (región q11) se fusiona con parte del gen ABL del cromosoma 9 (región q34) (**Figura 4**). El gen ABL toma su nombre de «Abelson», el nombre de un virus causante de leucemias precursor de una proteína similar a la que produce este gen (Talpaz *et al*, 2006).

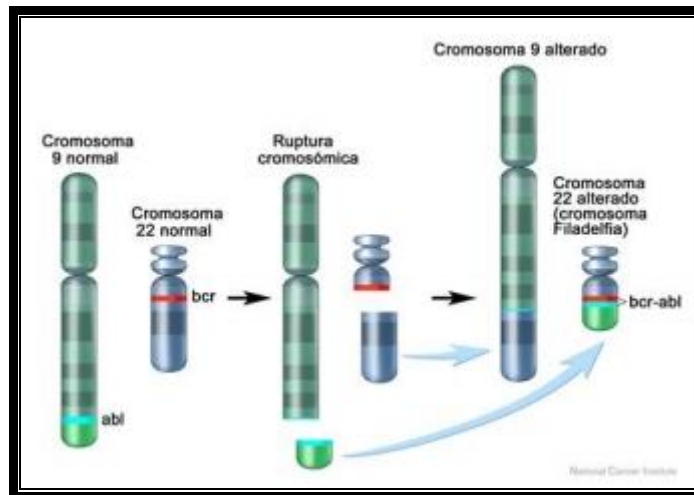


Figura 4: Cromosoma Filadelfia (Ph). Add comment *Marzo 17, 2008*

El resultado de esta translocación es la producción de una proteína de peso p210 o p185 (p es una medida de peso para proteínas celulares en unidades de masa atómica). Puesto que el código del gen ABL es capaz de añadir grupos fosfatados a residuos de tirosina (mediante la enzima Tirosincinasa), la fusión de los genes BCR-ABL también es una enzima Tirosincinasa (Aunque la región BCR del gen es también una enzima serina/treonina proteína-kinasa, la función de la tirosina kinasa es muy relevante para la terapia de esta enfermedad) (Talpaz *et al*, 2006).

La proteína resultante de la fusión BCR-ABL interactúa con la subunidad receptora Interleucina 3 beta. La transcripción del BCR-ABL permanece activa continuamente, sin necesidad de ser activado por otras proteínas mensajeras. En cambio, el BCR-ABL activa un número de proteínas y encimas controladoras del ciclo de división celular. Además, inhibe la reparación del ADN, causando la inestabilidad del genoma y siendo una potencial causante de la temida «crisis en cadena» de la leucemia mieloide crónica, con una alta tasa de mortalidad. (Espinet *et al*, 2005).

5.5.2.2. Valor pronóstico de los hallazgos citogenéticos

Los estudios citogenéticos realizados en neoplasias han mostrado una distribución no aleatoria de las alteraciones cromosómicas en el genoma, y es en los trastornos hematológicos donde mayores evidencias se han acumulado. Estos hallazgos permiten detectar anomalías cromosómicas y puntos específicos del genoma, estrechamente asociados al diagnóstico y/o pronóstico de las diferentes neoplasias hematológicas, lo cual indica el importante papel de los cambios cromosómicos en la aparición de aquellas (Heim S., Mitelman F., 1995).

Los resultados citogenéticos además de ser importantes para la precisa caracterización de las leucemias, también aportan información de valor pronóstico. Existen alteraciones que implican un pronóstico favorable, tales como la $t(8;21)(q22;q22)$ en la leucemia aguda no linfoblástica (LANL) M2 o la $inv(16)(p13q22)$ en la LANL M4 con eosinofilia medular (M4Eo), mientras otras alteraciones o la detección de cariotipos complejos (con más de tres alteraciones cromosómicas distintas) se relacionan con un pronóstico desfavorable, luego son los cambios cromosómicos los que por sí solos tienen valor pronóstico (Espinete *et al*, 2005). Existe mucha información a través de grandes series publicadas, y por la experiencia, no sólo de las alteraciones cromosómicas que se asocian específicamente a un determinado tipo de leucemia (Mitelman *et al*, 1997¹) (**Tabla 1**), sino también del valor pronóstico de las mismas (Grimwade *et al*, 1998).

¹ Mitelman tiene una colección en línea de todas las anomalías citogenéticas de malignancias publicadas: cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman.

	Alteración citogenética	Genes implicados
Mieloides:		
LMC	t(9;22)(q34;q11)	<i>ABL-BCR</i>
LMC crisis blástica	t(9;22)(q34;q11), +8,+19,+Ph,i(17q)	<i>ABL-BCR</i>
LANL-M2	t(8;21)(q22;q22)	<i>ETO-AML1</i>
LANL-M3	t(15;17)(q22;q11-12)	<i>PML-RARA</i>
LANL-M4Eo	inv(16)(p13q22) ó t(16;16)	<i>MYH11-CBFB</i>
LANL-M5	t(9;11)(p22;q23)	<i>AF10-MLL</i>
LANL	t(6;9)(p23;q34) t(3;3)(q21;q26) ó inv(3)(q21q26)	<i>DEK-CAN</i> <i>EVII</i>
LANL-secundaria	+8,-7,-5,del(5q),del(20q),12p -7,del(7q),-5,del(5q) t(11q23)	<i>MLL</i>
LMMC	t(5;12)(q33;p13)	<i>PDGFRB-TEL(ETV6)</i>
SMD	-7,del(7q),-5,del(5q), +8,del(11q),del(20q), del(11q),del(12p)	
Linfoides:		
LAL preB	t(1;19)(q23;p13) t(5;14)(q31;q32) t(12;21)(p13;q22)	<i>PBX1-E2A</i> <i>IL3-IGH</i> <i>TEL-AML1</i>
LAL B(Sig+)	t(8;14)(q24;q32) t(2;8)(p12;q24) t(8;22)(q24;q11)	<i>MYC-IGH</i> <i>IGK-MYC</i> <i>MYC-IGL</i>
LAL B o B-mieloide	t(9;22)(q34;q11) t(4;11)(q21;q23)	<i>ABL-BCR</i> <i>AF4-MLL</i>
LAL T	t(1;14)(p32;q11) t(1;7)(p34;q34) t(8;14)(q24;q11) t(7;9)(q35;q34) t(7;9)(q34;q34.3) t(7;10)(q35;q24) t(10;14)(q24;q11) t(11;14)(p13;q11) t(7;11)(q35;p13) t(11;14)(p15;q11)	<i>TAL1/SCL-TCRA</i> <i>LCK-TCRB</i> <i>MYC-TCRA</i> <i>TCRB-TAL2</i> <i>TCRB-TANI</i> <i>TCRB-HOX11</i> <i>HOX11-TCRA</i> <i>RBTN2/TTG2-TCRA/D</i> <i>TCRB-RBTN2/TTG2</i> <i>RBTN1/TTG1-TCRA/D</i>
LLC-B	del(9p),t(9p) t(14;18)(q32;q21) t(11;14)(q13;q32) t(14;19)(q32;q13) t(2;14)(p13;q32) +12,del(13q)	<i>IGH-BCL2</i> <i>BCL1-IGH</i> <i>IGH-BCL3</i> <i>BCL11A-IGH</i>
LLC-T	del(11)(q21q23) t(8;14)(q24;q11) t(14;14)(q11q32) inv(14)(q11q32)	<i>MYC-TCRA</i> <i>TCRA-TCL1</i> <i>TCRA-TCL1</i>
MM	t(11;14)(q13;q32) t(4;14)(p16;q32) t(14;16)(q32;q23) t(6;14)(p25;q32) t(1;14)(q21;q32) 1q, 13q,del(6q) del(7q)	<i>BCL1(CyclinD1)-IGH</i> <i>FGFR/MMSET3-IGH</i> <i>IGH-CMAF</i> <i>MUM1(IRF4)-IGH</i> <i>MUM2/3-IGH</i> <i>TNF</i> <i>GPI70</i>

Tabla 1: Alteraciones cromosómicas recurrentes en leucemias y genes implicados.²

² Lista completa de alteraciones cromosómicas y genes implicados en leucemias puede ser consultada en: (<http://www.ncbi.nlm.gov/CCAP>).

5.6. Relación tipo de leucemia y Citogenética.

5.6.1. Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

La LMA es el tipo de leucemia aguda más común en adultos y su incidencia aumenta con la edad. En Estados Unidos se reportó un número de 11930 casos nuevos y una mortalidad de 9040 casos en el año de 2006. Si bien la LMA es una enfermedad relativamente rara a nivel global, se espera un aumento de su incidencia a medida que la población envejezca. Aunque ya se han determinado ciertos factores de riesgo, aún no es específica la causa de esta LMA. Al igual que en las demás leucemias agudas, la LMA progresa rápidamente y puede ser fatal en semanas o meses si no es adecuadamente tratada (Slavustsky, 1999).

Clasificación Franco-Estadounidense-Británica (FAB) de la leucemia mieloide aguda (LMA)

La clasificación Franco-Estadounidense-Británica divide la LMA en 8 subtipos, desde el M0 al M7, basándose en el tipo de células leucémicas que aparecen y en su grado de madurez. Esto se lleva a cabo mediante un examen de la apariencia de las células leucémicas al microscopio óptico o mediante técnicas citogenéticas, con el fin de caracterizar las posibles anomalías cromosómicas. Los subtipos de LMA han mostrado diferencias en el pronóstico y en la respuesta a terapia. Aunque la clasificación de la OMS (véase más abajo) parece ser más útil en muchos aspectos, el sistema FAB sigue siendo ampliamente utilizado.

Los 8 subtipos de LMA según la FAB son:

- M0 Leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación localizada.
- M1 Leucemia mieloblástica aguda sin maduración.
- M2 Leucemia mieloblástica aguda con maduración.

- M3 Leucemia promielocítica aguda (con translocación t(15;17)).
- M4 Leucemia mielomonocítica aguda (LMMA).
- M4eo Leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia en médula ósea.
- M5 Leucemia monocítica aguda (LMoA).
- M5a LMoA sin diferenciación (monoblástica).
- M5b LMoA con diferenciación (monocítica).
- M6 Eritroleucemia aguda; son precursoras de globos rojos.
- M7 Leucemia megacariocítica aguda.

Clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de la Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) intenta ser más útil que la FAB desde el punto de vista clínico. Su objetivo es dar más información significativa relacionada con el pronóstico de la LMA. Cada una de las categorías de la OMS contiene numerosas subcategorías descriptivas de gran interés para el hematopatólogo y para el oncólogo. Sin embargo, la mayor parte de la información clínicamente significativa se encuentra categorizada en uno de los subtipos listado a continuación (Vardiman *et al*, 2002)

Los subtipos de LMA según la OMS son:

- Leucemia mieloide aguda, mínimamente diferenciada (M0).
- Leucemia mieloide aguda sin maduración (M1)
- Leucemia mieloide aguda con maduración (M2): Leucemia mieloide aguda con maduración con t(8;21)
- Leucemia promielocítica aguda (M3): Tipo hipergranular y Tipo microgranular.
- Leucemia mielomonocítica aguda (M4) : Leucemia mielomonocítica aguda con aumento de eosinófilos en médula (M4E0)
- Leucemia monocítica aguda (M5) : Leucemia monoblástica aguda (M5a) y Leucemia monocítica aguda con maduración (M5b)

- Eritroleucemia : Mieloide/Eritroide (M6a) y Eritroide pura (M6b)
- Leucemia megacarioblástica aguda (M7): Leucemia megacarioblástica aguda asociada a t(1;22).
- Leucemia basofílica aguda.
- Mielofibrosis aguda (Mielodisplasia aguda con mielofibrosis)
- Leucemia aguda con enfermedad mieloproliferativa en el síndrome de Down.
- Leucemia mieloide aguda hipocelular
- Sarcoma mieloide

Existen ocho clasificaciones de la FAB (French-American-British) para los diferentes tipos de LMA, algunas de las cuales son subdivididas después. Existen algunas anormalidades que ocurren en LMA que son extremadamente raras en otros desordenes, incluyendo t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q24;q21), y la inv(16)(p13q22). Puede no ser coincidencia que estas anormalidades están generalmente confinadas a células granulocíticas y están asociadas a un buen pronóstico, mientras que la mayoría de las otras anormalidades tienden a ocurrir en todos los tipos de células mieloides y están ampliamente asociadas con un pobre pronóstico (Swansbury, 2003).

En total, un clon se encuentra en aproximadamente el 60% de los casos con LMA mediante un estudio citogenético convencional. Las anormalidades genéticas en la mayoría del 30% de los casos restantes aun deben ser determinadas. En algunos casos los reordenamiento de los genes envueltos en las traslocaciones comunes han sido demostrados (Hiorns *et al*, 1994).

Los desordenes mieloides usualmente no presentan tantos retos técnicos como ocurre con LLA: los cromosomas son a menudo de una mejor calidad, y el conteo de células blancas de la sangre no son usualmente tan altos, excepto en LGC. A diferencia de los desordenes linfoides crónicos, no hay la necesidad de mitógenos

para incluir división celular. Sin embargo, aparte del cromosoma Ph en LGC, la frecuencia de detección de clones no es muy alta (Swansbury, 2003).

Debido a que el tiempo de ciclo celular es impredeciblemente afectado por la enfermedad, para LMA deberían prepararse varios cultivos si hay suficiente material disponible (Swansbury, 2003).

5.6.2. Leucemia Mieloide Crónica (LMC)

La leucemia mieloide crónica es la neoplasia humana mas estudiada, se considera una proliferación clonal con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas, ello viene apoyado por la presencia del cromosoma Ph considerándose como marcador citogenético de esta enfermedad, el cual se halla en células de la serie granulocítica, eritroide y megacariocítica (Cervantes, 2000).

Tres son los rasgos que la caracterizan:

- Intensa proliferación de la serie granulocítica, que se manifiesta en sangre, médula y órganos hematopoyéticos (fundamentalmente en el bazo).
- Evolución típicamente bifásica, con una fase crónica prolongada de duración aproximada de 3 años y de fácil control y una fase final (aceleración y crisis blástica) de curso agresivo y resistente a tratamiento, de duración media de 2 - 4 meses.
- Presencia de un marcador cromosómico (cromosoma Filadelfia) y/o un oncogén específico (BCR/ABL).

La LMC es a veces tomada como sinónimo de **Leucemia Granulocítica Crónica**. (LGC), pero en realidad también incluye desordenes raros tales como neutrofilia crónica, eosinofilia y leucemia basofílica, LMC juvenil y leucemia mielomonocítica Crónica. En todas ellas existe un exceso de células blancas de la sangre. La LGC

es a veces considerada por si misma como un carácter clínico y citogenético distinto, en lugar de ser parte de los síndromes mielodisplásicos. En mas del 90% de los casos el cromosoma Filadelfia está presente como una simple traslocación entre el cromosoma 9;22. En alrededor de la mitad de los casos remitidos donde el llamado Ph negativo en LGC, puede mostrarse por métodos moleculares que el mismo gen puede estar reorganizado aún cuando el cromosoma parece normal (Swansbury, 2003).

No ha habido acuerdo en el efecto pronóstico de una anomalía secundaria identificada en el diagnóstico, pero la mayoría de ellas no se piensa que sean signos clínicos adversos (Cervantes *et al*, 1990). Algunas anomalías, tales como la trisomía 8 y la ganancia de un der(22), han sido asociadas con un pobre pronóstico. Sin embargo, si se detectan anomalías secundarias durante el curso de la enfermedad, esta es una fuerte indicación de que la aceleración de la enfermedad es inminente. Los estudios citogenéticos de un gran número de divisiones han mostrado que en algunos casos estas anomalías secundarias han estado presentes en el diagnóstico, pero a una muy baja incidencia (Swansbury, 2003).

Muchas anomalías cromosómicas secundarias recurrentes han sido vistas en LGC, y estas tienden a acumularse en mayores y menores vías (Heim y Mitelman, 1995). Las anomalías mayores son +8, +19, + der(22) y i17q. Algunas anomalías están asociadas con distintos tipos de crisis blástica. Por ejemplo, el isocromosoma para los brazos largos del cromosoma 17 esta asociado con la crisis blástica mieloide, y las anomalías del 3q21 y / o 3q26 están asociados con la crisis blástica megacariocítica.

5.6.3. Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA)

La LLA se basa en el examen morfológico de la médula ósea al microscopio óptico. En la actualidad, la mayoría de los centros siguen los criterios establecidos por el grupo cooperativo franco-americano-británico (FAB), que reconoce tres variedades: LAL1, LAL2, y LAL3. El valor estimado del número de casos nuevos y de defunciones a causa de LLA en Estados Unidos en el año de 2005 fue de 3.970 y 1.490 respectivamente. Es más común en niños menores de 4 años. Además, aparece con una incidencia 1/100.000/año en adultos e incrementa con la edad. La quimioterapia puede curar el 80% de los niños que sufren de esta patología, pero solamente un 30% de los adultos (Forestier *et al*, 2000).

Los subtipos de LLA según la OMS son:

- 1) Leucemia linfoblástica aguda (L1/L2): LLA de célula precursora B y LLA de célula "precursora" T
- 2) Leucemia linfoblástica aguda de célula B (L3) (equivalente al linfoma de Burkitt en la fase leucémica)
- 3) Leucemia/Linfoma linfoblástico: De célula precursora B y De célula "precursora" T.

Los cromosomas de células anormales de muestras de muchos pacientes con LLA han tenido una notoria pobre morfología, especialmente aquellas con un clon hiperdiploide alto. Un análisis era (y algunas veces aun es) imposible, por lo que los citogenetistas tienen que contentarse con solamente contar cuantos cromosomas hay. Esto es prueba de algún valor clínico. Muchos de los casos de LLA infantil se ha encontrado que tienen células con más de 50 cromosomas, y, lo que es más importante, estos niños responden bien al tratamiento, con altos niveles de remisión y muchos teniendo una larga supervivencia libre de la enfermedad (Secker-Walker *et al*, 1978). Estas observaciones tempranas llevan a

la propuesta de una clasificación “ploide” que ha sido continuamente ampliada y aun tiene significado clínico:

- Diploide: 46 cromosomas normales (22 pares de autosomas mas 2 cromosomas X en mujeres o uno X y uno Y en hombres.
- Seudodiploide: 46 cromosomas con alguna anormalidad. Este término se ha convertido muy redundante ahora que se sabe más acerca de las anormalidades estructurales en LLA.
- Cerca a haploide: 25-29 cromosomas. Siempre hay uno de cada cromosoma, excepto el Y. Clones de este tipo son raros pero están asociados con un muy pobre pronóstico (Gibbons *et al*, 1991). Algunas veces un clon cerca de haploide sufre una duplicación de todos los cromosomas, lo que resulta en un conteo cromosómico en un alto rango hiperdiploide. Sin embargo, el patrón de ganancias pares sirve para distinguirlo del patrón típico del buen pronóstico hiperdiploide.
- Hipodiploide bajo: 30-40 cromosomas.
- Hipodiploide: 41-45 cromosomas.
- Hiperdiploide: 47-49 cromosomas. Algunos pacientes tienen un patrón regular, con ganancia de X, 6, 8, 10, 16, y/o 21. Otros no tienen patrones regulares de ganancia, y las anormalidades estructurales están presentes mas a menudo.
- Hiperdiploide alto: 50-58 cromosomas, con un patrón típico de ganancia, siendo los mas comunes el X, 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 (a menudo 2 y algunas veces tres cromosomas 21 extras). Este es el tipo de anormalidad más común encontrada en LLA en niños, ocurriendo en cerca del 12 % de los casos reportados. Este ha sido continuamente asociado con un buen pronostico (Bloomfield *et al*, 1989), aun con la presencia de anormalidades estructurales menos favorables. Algunas subdivisiones pronosticas de este grupo puede ocurrir: casos con 54-58 cromosomas, especialmente con +4, +10, y +17, parecen tener un pronóstico favorable, y aquellos con +5 un menor buen pronóstico (Heerema *et al*, 2000). Los pacientes con un

hiperdiploide alto usualmente tienen otros factores de buen pronóstico. Sin embargo, aun aquellos pacientes con un hiperdiploide alto que no tiene otros factores favorables tienden a responder relativamente bien al tratamiento. Los pacientes con más de 50 cromosomas pero sin el patrón típico de ganancias no tienen un buen pronóstico tan bueno.

- Cerca a triploide: 58-68 cromosomas. En LLA, los clones en este grupo no son usualmente verdaderos cerca triploides (con tres de cada cromosoma) sino que tienen el patrón hiperdiploide alto además de otras ganancias, siendo los mas comunes el 5 y el 8 (Moorma *et al*, 1995).
- Cerca a tetraploide: Alrededor de 92 cromosomas. Estos clones son raros y tienden a ser asociados con LLA de cell-T . (Heim *et al*, 1987). Se debe notar que unas pocas divisiones con tetraploides pueden hallarse en la mayoría de las muestras de médula ósea, y divisiones ocasionales pueden verse con niveles diploides mucho mayores, teniendo cientos de cromosomas. Estas células usualmente derivan de megacariocitos multinucleados.

La leucemia linfoblástica aguda es una enfermedad fascinante, por los muchos casos que poseen un clon detectable por citogenética o FISH, y porque la identificación de anormalidades provee información muy útil para el medico. Sin embargo, es también una enfermedad frustrante, ya que posee retos técnicos como una marcada tendencia para que la muestra se coagule durante el cultivo, frecuente morfología cromosómica pobre, y, especialmente en los casos de conteos altos, fallan en proveer división alguna para análisis (Swansbury, 2003).

5.6.4. Leucemia Linfoblástica Crónica (LLC).

En el año de 2005 Estados Unidos reportó 9.730 casos nuevos y 4.600 muertes a causa de está leucemia. Con el 31% de todos los casos documentados, la LLC es el tipo más común de leucemia en el mundo occidental. La LLC es una forma de cáncer de progreso lento, el cual no necesariamente lleva a la muerte del paciente

aun si no es tratado, las personas menores de 40 años a menudo sufren de LLC, pero el numero de casos se incrementa dramáticamente en personas por encima de los 50 (Losada, 1991).

La LLC, usualmente ocurre en edad avanzada (en un promedio de 62 años) y puede tener un curso prolongado, con pocos efectos adversos en el paciente; en muchos casos es insospechado y es descubierto solo durante la investigación de algún otro problema de salud. El tratamiento agresivo es generalmente contraindicado hasta que haya signos de enfermedad avanzada o atípica. Signos adversos incluye anormalidades que envuelven 14q32, 17p, y 11q, y la presencia de trisomia 12. La Trisomía 12, la cual ocurre en cerca del 20% de los casos, probablemente no es una anormalidad primaria asociada con la leucogénesis de la LLC, ya que se muestra en solo una proporción de las células con LLC. Esta está asociada con LLC atípica, con una combinación con LLC y con LLP (leucemia prolinfocítica), o con un progreso de la enfermedad. Es raro ver esta alteración en la LLC típica. A causa de esta conexión con un pronóstico pobre, especialmente cuando no es la única anormalidad presente, la Trisomía 12 ha sido señalada como indicadora para activar el tratamiento (Juliusson et al 1990). Las anormalidades del cromosoma 13, que usualmente envuelven la banda q14, son también comunes, ocurren en cerca de 10% de los casos mediante citogenética y el 50% de los casos mediante FISH, y tiende a asociarse con LLC típica y por consiguiente con un relativamente buen pronóstico. Las anormalidades del 13q son a menudo sutiles y puede ser necesario detectarlas con FISH, en lugar de con la citogenética convencional. Muy pocos casos han sido reportados que tengan tanto Trisomía 12 y la anormal 13q14, y generalmente estas dos anormalidades parecen ser mutuamente exclusivas. Estudios del 13q14, son de interés científico actual ya que posiblemente puede tratarse de una anormalidad primaria en la etiología de la LLC.

Un pequeño pero importante grupo de anormalidades son aquellas que envuelven el cromosoma 17p; estas se han demostrado que indican un muy pobre pronóstico (Lens et al, 1997. Dohner et al, 2000).

Los estudios citogenéticos convencionales de LLC son a menudo desalentadores porque frecuentemente no hay divisiones, y en los casos donde se hayan divisiones se ha encontrado que estas tienden a ser aparentemente normales. Consecuentemente, hay una tendencia a limitar el análisis genético rutinario a la detección por FISH y PCR-TR de ciertas anormalidades bien establecidas como lo son la trisomía 12, del(13)(q14), del(11)(q) y la pérdida de P53 en 17p1. Sin embargo otras anormalidades recurrentes aún están siendo descubiertas, las que cuyo significado clínico todavía debe determinarse (Swansbury, 2003).

5.6.5. Otras Neoplasias Hematológicas

5.6.5.1. Linfomas malignos

Reciben el nombre de linfomas malignos las neoplasias del sistema linfoide que se asientan preferentemente en los ganglios linfáticos. Las diferencias entre leucemia y linfoma resultan bastante arbitrarias. De hecho, para distinguirlas se recurre en muchos casos a criterios meramente topográficos: es leucemia la neoplasia linfoide que afecta la médula ósea y que se acompaña del paso a sangre periférica de células atípicas, y es linfoma el que queda localizado en los ganglios linfáticos u otros tejidos linfoides y carece –al menos inicialmente- del comportamiento leucémico. La dificultad para trazar las fronteras entre leucemias y linfomas se explica por la ubicuidad de las células linfoides, las cuales, si bien se sitúan sobre todo en los ganglios linfáticos, el timo, el bazo y el hígado, también se hallan en la médula ósea, la piel y la submucosa del aparato respiratorio y del tubo digestivo. Ello explica la posible –y de hecho frecuente- afección politópica de los síndromes linfoproliferativos.

5.6.5.2. Enfermedad de Hodgkin

Este es el tipo más común de linfoma, ocurre particularmente en pacientes hombres jóvenes. No hay anormalidades cromosómicas específicas asociadas con la enfermedad de Hodgkin, con la posible excepción de anormalidades que envuelven 4q25-27 (Atkin 1998).

En general, los estudios citogenéticos de la enfermedad de Hodgkin tienen un bajo porcentajes de éxitos y un bajo porcentaje de detección de clones. Algunas de las anormalidades que ocurren en los linfomas no Hodgkin son encontradas también en la enfermedad de Hodgkin, el 30 % de los casos teniendo anormalidades en el cromosoma 1, 20% teniendo traslocaciones 14q32, y 15% teniendo del(6)(q). Las anormalidades que envuelven 3q26-29, 7q, y 12p, son mas comunes en la enfermedad de Hodgkin que en los Linfomas no Hodgkin, estos incluyen también clones que tienen conteos cromosómicos cerca a triploide o cerca de tetraploides (Swansbury, 2003).

5.6.5.3. Linfomas no Hodgkinianos

Los linfomas no hodgkinianos (LNH) son un grupo heterogéneo de neoplasias que tienen su origen en la proliferación de células linfoides detenidas en diversas etapas de su desarrollo madurativo. Las características de los LNH dependen básicamente del tipo de célula proliferante, del lugar donde asienta el linfoma y del grado de masa tumoral. Entre los LNH se incluyen desde procesos sumamente indolentes, y que permiten al enfermo una larga supervivencia, hasta algunas de las neoplasias más agresivas que pueden afectar al hombre.

La variedad de clasificaciones usadas durante la última dos décadas han dificultado los intentos para correlacionar anormalidades cromosómicas con los tipos de linfomas. La situación es complicada más aun cuando la enfermedad en algunos pacientes evoluciona de un tipo a otro. En dichos casos, no es claro si la

anormalidad encontrada se relaciona a la primera enfermedad o a la segunda. En unos pocos casos, las anormalidades citogenéticas que están asociadas con diferentes tipos de linfomas pueden encontrarse juntas en el mismo clon, lo cual se piensa que es evidencia suficiente de la evolución de la enfermedad a través de diferentes tipos de linfomas. Existen muchas asociaciones fuertes entre la citogenética y los diagnósticos, pero ocasionalmente la aparición de ciertas anormalidades en tipos de linfomas inesperados conlleva al interrogante de si: 1- el diagnóstico fue incorrecto, 2- el sistema de clasificación fue inadecuado, 3- la enfermedad se ha transformada de un tipo a otro, ó 4- la enfermedad del paciente no es común. (Swansbury, 2003)

Los linfomas están relacionados con la LLA y algunas anormalidades citogenéticas ocurren en ambos tipos de enfermedades, especialmente del(6)(q). Sin embargo, aún algunas de las anormalidades clásicas que son particularmente asociadas con LLA, tales como $t(1;19)(q23;p13)$ y la $t(4;11)(q21;q23)$, han sido ocasionalmente reportadas en linfoma no-Hodgkin.

Anormalidades Citogenéticas Recurrentes Encontradas en Linfomas: Unas pocas anormalidades citogenéticas ocurren en casi todos los tipos de linfomas, y estas incluyen traslocaciones que envuelven el cromosoma 1, delección de parte de los brazos largos del cromosoma 6 (especialmente envolviendo las bandas q21 y 27), trisomía 12, y, particularmente en linfomas de células B, traslocaciones en la banda 14q32. Comparado con los clones encontrados en muchas leucemias, aquellos vistos en linfomas son a menudo complejos. Afortunadamente para los citogenetistas, la morfología de los cromosomas tiende a ser ligeramente mejor. Un clon complejo ha sido a menudo asociado con un pobre pronóstico, sin importar las anormalidades presentes.

5.6.5.4. Mieloma Múltiple (MM)

El mieloma múltiple, mielomatosis o enfermedad de Kahler, es el prototipo de gammapatía monoclonal maligna. Las manifestaciones se deben, por una parte, a la proliferación tumoral plasmocelular (lesiones esqueléticas, anemia, hipercalcemia e infiltración de diversos órganos y tejidos) y, por otra, a la producción de la proteína monoclonal por parte de las células mielomatosas (insuficiencia renal, predisposición a las infecciones, síndrome de hiperviscosidad).

El mieloma múltiple, está muy relacionado con el plasmacitoma y con la leucemia de células plasmáticas (LCP), una enfermedad con muy pobre pronóstico, las formas agresivas de MM pueden evolucionar en LCP. Relacionados pero menos severos son los desordenes inmunoproliferativos, tales como la macroglobulinemia de Waldenstrom, y algunos pacientes con gamopatía monoclonal de significancia desconocida (GMSD) con desarrollo tardío a MM. La severidad de estas condiciones se correlaciona con la incidencia de clones detectados citogenéticamente; Sin embargo, muchos otros factores influyen el porcentaje de detección de clones en MM. Estas incluyen el porcentaje de células plasmáticas presentes (es difícil encontrar clones cuando hay menos del 16% de células plasmáticas en la médula ósea), el tipo de morfología celular, el grado clínico (18% en grado bajo hasta 71% en alto grado) y el estado (47% en el diagnóstico hasta el 71% en la recaída). Además resultados citogenéticos son de valor pronostico independiente (Tricot *et al*, 1995), el éxito en detectar cualquier clon tiende a estar asociado con características clínicas de poco riesgo (Calasanz *et al*, 1997).

5.6.5.5. Los Síndromes Mielodisplásicos (SMD)

Históricamente ha habido muchos términos para estos desordenes, incluyendo síndrome dismielopoyético, preleucemia, leucemia subaguda, y leucemia latente, además de **mielodisplasias**. La transformación en leucemia aguda ocurre, pero

estos no son solamente condiciones preleucémicas; ellos son malignos, enfermedades clónales como tal. Estos desordenes tienen crecimiento anormal (displasia) o fallas en la maduración de uno o mas linajes celulares en la médula ósea, usualmente resultan en una deficiencia de uno o mas componentes celulares. Por ejemplo, la diseritropoyesis indica anormalidades de las células que producen eritrocitos, lo cual resulta en anemia. Los tres linajes pueden estar envueltos (displasia de los tres linajes), conduciendo a una pancitopenia (inadecuado número de todos los elementos celulares: células rojas, células blancas y plaquetas). Los SMD fueron inicialmente divididos en subgrupos de acuerdo a un esquema arbitrario pero generalmente útil basado en el porcentaje de blastos en la médula ósea: (1) Anemia refractaria (AR), la cual tiene mas de un 5 % de blastos; (2) AREB (AR con exceso de blastos) la cual tiene mas del 20%; y (3) AREBt (AREB en transformación) la cual tiene mas del 29 % (Bennet *et al*, 1982). Un Conteo de blastos de 30% definía una leucemia aguda. Otros tipos diferentes de enfermedades fueron también clasificadas como SMD, ARRS (Anemia refractaria con anillo sideroblasto); Leucemia mielomonocítica crónica (LMMC); el síndrome 5q (Van den Berghe *et al*, 1985), la cual es una condición relativamente leve, que posee el promedio de supervivencia mas largo de cualquier clase de SMD; y de la monosomía 7 juvenil (Passmore *et al*, 1995), la cual esta asociada con un pobre pronostico.

Sin embargo, esta clasificación bien establecida ha sido recientemente modificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y ahora es así:

1. Anemia refractaria ± sideroblastos: < 10 % granulocitos displásicos.
2. Cytopenia: Puede tener displasias de dos linajes o de los tres linajes pero tiene < 5% de blastos.
3. AREB: Con 5 – 10% blastos.
4. AREB 2: Con 11 -19% blastos.
5. LMMC en cualquiera de los SMD (Síndromes Mielodisplásicos) o DMP (Desordenes Mieloproliferativos).
6. Síndrome 5q.

Hay que notar que la clasificación AREBt ha sido abolida, de la misma manera que la presencia de un 20% de blastos ahora se define como leucemia. Como los DMPs, la mayoría de los SMDs son usualmente desordenes de evolución lenta in los cuales el tratamiento de soporte puede ser adecuado en los estados tempranos de la enfermedad; el tratamiento citotóxico agresivo raramente produce una remisión y es mas probable que induzca un fallo en la médula ósea u una aceleración en la progresión de la enfermedad. El riesgo de desarrolla Leucemia aguda (usualmente LMA) incrementa en cada subtipo de SMD, pero muchos pacientes eventualmente mueren por las consecuencias del fallo en la médula ósea asociado con los SMD sin llegar a progresar una leucemia (Swansbury, 2003).

En todas estas áreas de diagnóstico incierto, los estudios citogenéticas pueden ayudar, si se encuentra un clon cromosómico anormal, esta es una muy fuerte evidencia de que la condición es maligna. La incidencia de anormalidades cromosómicas clónales incrementa con cada subtipo, desde un 10 % hasta cerca de un 50%. El no poder encontrar un clon puede significar que no haya anormalidad citogenética presente, sino que puede estar a un nivel muy bajo como para poder ser detectado por un estudio de citogenética convencional (Swansbury, 2003).

En los SMD, como en otras enfermedades hematopoyéticas, algunas anormalidades citogenéticas están asociadas con un pobre pronóstico (por ejemplo, los clones complejos que incluyen perdida o defeción de una parte de los brazos largos de los cromosomas 5 y/o 7) y otros pueden indicar un curso relativamente benigno (por ejemplo, la defeción de una parte de los brazos largos del cromosoma 5 pero como la única anormalidad citogenética como parte del síndrome 5q) (Van den Berghe *et al*, 1985). Muchas de las anormalidades cromosómicas que se encuentran en LMA también ocurren en los SMD, pero algunas traslocaciones específicas se encuentran muy pocas veces o simplemente no se encuentran; estas incluyen t(8;21)(q22;q22), t(15;17)(q24;q21), y

inv(16)(p13q22). La última clasificación de la OMS define como LMA cualquier enfermedad que tenga estas traslocaciones aun si el número de blastos es < 20% (Swansbury, 2003).

5.6.5.6. Anemias megaloblásticas

Se denominan anemias megaloblásticas a las causadas por una alteración en la maduración de los precursores de la serie roja, que presentan una profunda anomalía en la síntesis del DNA. Las células precursoras de la serie roja (y también de las otras líneas hematopoyéticas) se caracterizan por una acusada asincronía entre la maduración nuclear, muy defectuosa, y la citoplasmática, con hemoglobinización correcta. Esta asincronía madurativa nucleocitoplasmática se expresa morfológicamente por la aparición de células de tamaño muy superior al normal en la médula ósea, de donde deriva el nombre de megaloblastos, y acaba por conducir a la muerte intramedular, fenómeno que se conoce con el nombre de eritropoyesis ineficaz.

Investigación	Relevancia Y/O Hallazgos	Modelo	Autor / Año
Incidencia Leucemia en el Mundo	Leucemias ocupan onceavo puesto de muerte por cáncer: 300.000 nuevos casos y 222.000 muertes por año.	Registros mortalidad cáncer.	Ferlay et al, 2005
Incidencia Leucemia en Colombia	Quinta causa de muerte por cáncer en hombres y sexta en mujeres: 1.427 y 1.284 nuevos casos en 100.000 personas por año, respectivamente. (Registros de mortalidad de cáncer en Colombia)	Registros mortalidad cáncer.	Piñeros et al, 2006
Etiología Leucemia	Relación leucemias y exposición a: campos electromagnéticos, rayos X, plaguicidas, químicos (benceno), consumo del cigarrillo y agentes infecciosos.	Encuestas, In Vitro, Ratones	Rosell et al, 2004; Ceballos et al, 2002
Etiología Leucemia	Alta frecuencia de LLA en niños con Síndrome de Down, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom y mutaciones en el gen p53	Registros Médicos	Vieira y Ozonoff, 2003
Plaguicidas y Leucemia	los niños nacidos de madres que han usado plaguicidas durante los últimos meses del embarazo tienen riesgo de desarrollar leucemia en la niñez.	Encuestas	Leiss y Savitz, 1995
Citogenética	Citogenética aplicación clínica en el diagnóstico, pronóstico de las hemopatías, remisión completa y eficacia del tratamiento de pacientes.	MO y Sangre	Rooney y Czepulkowski, 1990
Citogenética y Leucemia	Aplicaciones y limitaciones de los estudios citogenéticos	MO y Sangre	Swansbury, 2003
Citogenética y Leucemia	Retos en los estudios Citogenéticos en malignancias hematológicas. (Medula Ósea, Sangre)	MO y Sangre	Swansbury, 2003
Técnica de Cultivo	Falla comunes en los cultivos citogenéticos	MO y Sangre	Swansbury, 2003
Diagnóstico citogenético	La citogenética y estudios genéticos moleculares, sirven para diagnosticar tipos de leucemias específicos, importantes para determinar el pronóstico del paciente.	MO y Sangre	Calasanz, 2001
Valor pronóstico de los hallazgos citogenéticos	Las anomalías cromosómicas sobre puntos específicos del genoma, están asociadas al diagnóstico y/o pronóstico de las diferentes neoplasia hematológicas.	MO y Sangre	Heim S., Mitelman F., 1995; Grimwade et al, 1998.
Relación leucemia y alteraciones cromosómicas			
LMA	Un clon se encuentra en aproximadamente el 60% de los casos con LMA, en el 30% de los casos restantes aun deben ser determinadas.	MO y Sangre	Hiorns et al, 1994
LMC	En mas del 90% de los casos el cromosoma Filadelfia está presente como una simple traslocación entre el cromosoma 9;22.	MO y Sangre	Swansbury, 2003
LLA	Propuesta de una clasificación "ploide" que ha sido continuamente ampliada y aun tiene significado clínico.	MO y Sangre	Swansbury, 2003
LLC	Tendencia a limitar el análisis genético a la detección por FISH y PCR-TR de anomalías establecidas. Sin embargo otras anomalías recurrentes aún están siendo descubiertas.	Sangre	Swansbury, 2003
Relación tipo de leucemia y Técnica Citogenética			
LLA	Fascinante: por los muchos casos con clon detectable por citogenética, y porque estos proveen información muy útil para el medico. Frustrante, porque posee retos técnicos como una morfología cromosómica pobre.	MO y Sangre	Swansbury, 2003
LMA	Los desordenes mieloides no presentan tantos retos técnicos como en LLA: los cromosomas son de mejor calidad, y el conteo de células blancas no son tan altos.	MO y Sangre	Swansbury, 2003
LMC			
LLC	Los estudios citogenéticos a menudo desalentadores porque frecuentemente no hay divisiones, y cuando se hayan divisiones estas tienden ha ser normales.	MO y Sangre	Swansbury, 2003

Tabla 2: Resumen Marco Teórico

6. METODOLOGÍA

La estandarización de la técnica de cultivo de médula ósea y sangre periférica, de pacientes con leucemia, en el Laboratorio de Genética Humana; requirió la realización de variaciones en el procedimiento básico. Esto, con la finalidad de conseguir un buen número de células en metafase, con cromosomas bien diferenciados, que permitieron llevar a cabo un diagnóstico citogenético confiable. Para la identificación de las alteraciones cromosómicas de tipo estructural y numérico, fue necesario la aplicación de las técnicas de bandeo R.

6.1. Población Objeto de Estudio

Las personas que hicieron parte de este Trabajo de Grado, fueron aquellos pacientes diagnosticados con leucemia o con sospecha de ella en la unidad Hematológica del Hospital Universitario San José. Participaron pacientes que se encontraron hospitalizados o que apenas ingresaban al Hospital Universitario San José y la Clínica La Estancia en la ciudad de Popayán, departamento del Cauca.

6.2. Selección de la Muestra Objeto de Estudio

Para la obtención de muestras de médula o sangre periférica, se presentó a cada paciente un Consentimiento Informado, el cual fue explicado y se les indicó la importancia del estudio. Cada paciente que aceptó participar en el estudio, firmó dicho Consentimiento (**Anexo 1**). También aceptaron contestar la información que se les realizó mediante una encuesta sobre datos personales, estado de salud, diagnóstico, exposición, dieta, antecedentes familiares, entre otros (**Anexo 2**). Dicha encuesta permitió realizar la caracterización socio-demográfica de los pacientes.

Criterios de Inclusión:

- Hombres y mujeres sin distinción de edad, sexo o etnia.
- Pacientes que desearon participar voluntariamente.

Criterios de Exclusión:

- Pacientes con tratamiento quimioterapia o radioterapia.
- Infección VIH.
- Pacientes cuyo estado de salud no se lo permita.

6.3. Toma de muestra

La toma del aspirado de médula ósea fue realizada por el Hematólogo encargado de la Unidad de Hematología. La muestra de sangre periférica, generalmente la tomó la Bacterióloga o la Auxiliar del Laboratorio Clínico. Tanto la muestra de médula ósea y de sangre fueron tomadas con jeringas estériles y debidamente heparinizadas, para evitar la coagulación.

6.4. Estandarización de la Técnica de Cultivo de Médula Ósea y Sangre Periférica.

La técnica de cultivo de médula ósea y sangre periférica fue tomada de los protocolos internacionales (Swansbury, 2003). Estas técnicas fueron adquiriendo cambios, que permitieron acoplarla a las condiciones y los recursos del Laboratorio de Genética Humana de la Universidad del Cauca. Para la toma de decisiones de los cambios realizados, se tomaron en cuenta los resultados de las muestras anteriormente procesadas, la información bibliográfica pertinente, y la asesoría de la Directora del Trabajo de Grado, experta en citogenética.

El protocolo internacional tomado como base para la estandarización de la técnica de cultivo se describe a continuación:

6.4.1 Constituyentes del Medio y Cultivo Celular

Se utilizó el medio de cultivo HAM - F12 (N6760). Se complementó con Suero Bovino Fetal al 20%, Antibiótico (penicilina 10000 Unidades / ml + Estreptomina 10mg o (10000 µg/ml).

Para un litro del medio de cultivo HAM F 12, se vierte el contenido de medio del frasco (500xxx) en 800ml de agua tridestilada, se agrega 1.18g de NaHCO₃ (bicarbonato de sodio) y se completa con 200ml de agua tridestilada; se agita hasta diluir por completo, se lleva a un pH 7.15 – 7.20 con HCl 1N y NaOH 1N. Se agrega Antibiótico (penicilina 10.000 Unidades / ml + Estreptomina 10mg o (10.000 µg/ml). Se esteriliza inmediatamente por filtración de membrana con una porosidad de 0.22µm, antes de almacenar en frascos estériles de 50, 100 o 500ml se realiza un previo ensayo del medio para evaluar que no este contaminado. Este medio ya tiene incluida L- Glutamina, por lo cual para llegar a ser medio completo requiere solo de Suero Bovino Fetal (No.200-6140).

6.4.2. Siembra

Se adiciona a cada tubo 10ml de medio completo (8 mL de Medio HAM F 12 + 2mL de Suero Bovino Fetal) y 4 - 10 gotas de sangre (aprox. 0.5 ml). Se incuba a 37° C, en incubadora debidamente calibrada.

La descripción del procedimiento de preparación de cultivo completo y siembra se esquematiza en la **Figura 5**.

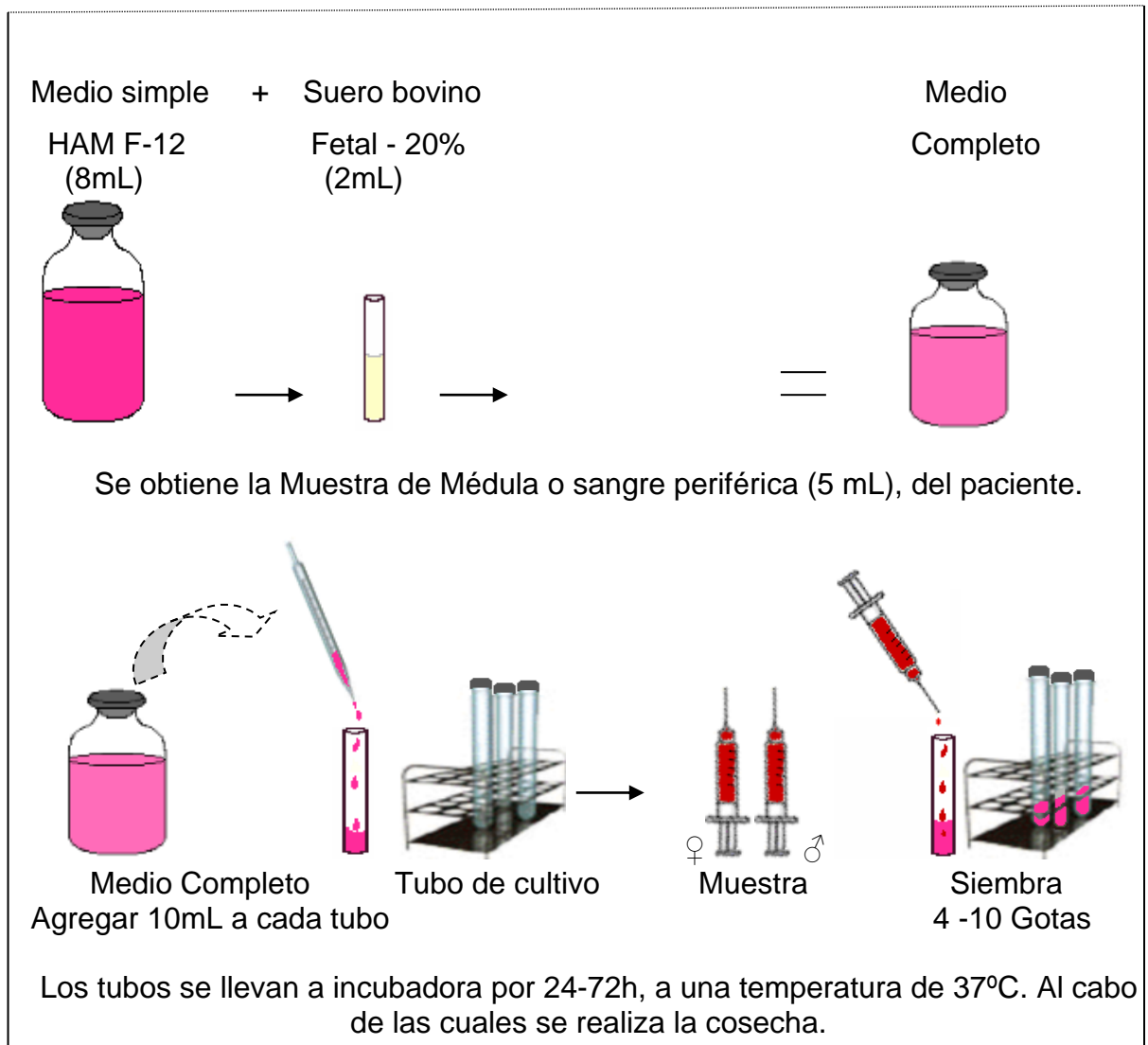


Figura 5: Preparación medio de cultivo completo y Siembra.

6.4.3. Tratamientos de Cultivo

Durante el tiempo de cultivo se adiciona 0.1mL de Bromodeoxiuridina (20mg/mL) 6.30h antes de la cosecha, Bromuro de Etidio (1mg/mL) 0,1 mL 1 hora antes, Colcemid 0,1mL 10 minutos antes y solución Hipotónica 1:3 (0,4% de Citrato de sodio: 0,075M de KCl) 35 minutos antes (**Figura 6**). Posteriormente, al pelet (botón celular) obtenido se le realizan lavados con fijador Carnoy 3:1 (Metanol: Ácido Acético). Finalmente, se prosigue a realizar el extendido o goteo de las

láminas con un día de anticipación para dar envejecimiento y llevar a cabo el bandeo “R”.

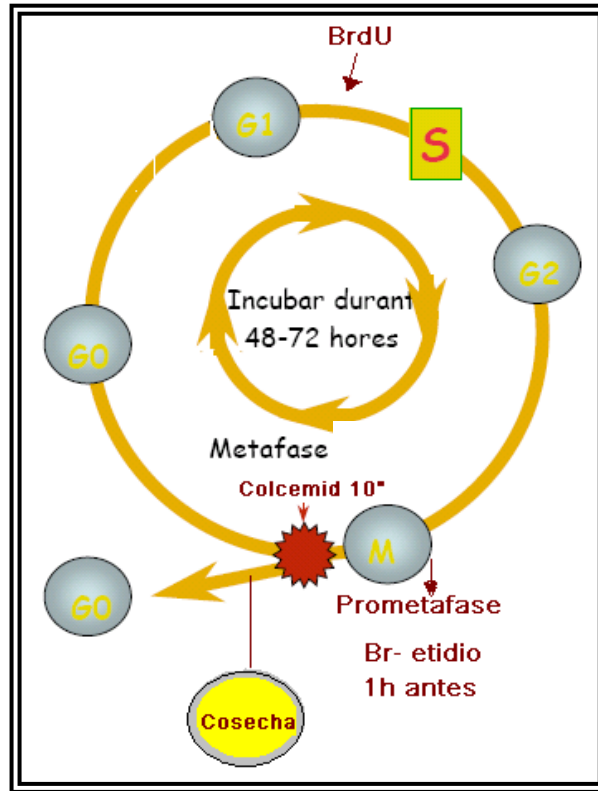


Figura 6: Aplicación de los tratamientos de cultivo durante el ciclo celular.

6.5. Técnica de Bando "R" para Identificación de Alteraciones Cromosómicas

El Bando R se utilizó para ayudar a la identificación de las alteraciones morfológicas presentes en los cromosomas. El protocolo para el bandeo cromosómico fue tomado del "Manual de Procedimientos, del Laboratorio de Genética Humana", estandarizado por la directora de este trabajo desde 1999 en la Universidad del Cauca.

Una vez hecho el goteo, las láminas, se someten a 60 °C por 30 minutos, posteriormente se sumergen en solución de Hoechst (33258) por 10 -15 minutos

(en oscuridad), luego se lava con agua destilada, posteriormente se adiciona 10-15 gotas de solución salina de citrato (2xSSC) colocando cubres y se expone a luz blanca por 45 minutos a 50°C, por último se colorea con Giemsa al 5%, por 2 minutos, se lava, seca y se sella las láminas con cubres y entellán.

6.6. Diseño Experimental

6.6.1. Estandarización de la Técnica

Para la estandarización de la técnica se hicieron variaciones en cuanto a tiempo y concentraciones de reactivos en el protocolo utilizado, que incluyeron BrdU, Bromuro de Etidio, Colcemid, e Hipotónica. Se requirió repetir los cultivos para observar qué podría mejorar o dañar la calidad de la morfología de los cromosomas.

En los primeros dos casos, se encontraron dos obstáculos: se obtuvo abundante material celular y cromosomas condensados. Para la condensación cromosómica, el tiempo, del cultivo con colcemid que en un inicio era de treinta minutos, se fue reduciendo hasta un tiempo mínimo de 10 minutos y/o 7 minutos. El abundante material celular obtenido, se diluyó con solución Carnoy, y también se tuvo en cuenta la cantidad de gotas de muestra a sembrar, puesto que si el paciente tenía más de 10.000 células blancas, la proliferación sería elevada y la cantidad de Colcemid no sería suficiente para detener las células en metafase. Igualmente se tuvo en cuenta la temperatura, la cantidad, la resuspensión y el tiempo de la solución hipotónica .

En los siguientes casos, el obstáculo fue el de encontrar metafases con cromosomas de buen tamaño, pero se encontraron juntos, pegados y traslapados, para lo cual se optó por quitar el Bromuro de Etidio, puesto que, este, los juntaba. Finalmente se tuvo en cuenta, realizar resuspensiones dinámicas en los lavados con Carnoy, para desechar residuos celulares, además se hicieron variaciones en el goteo de placas, para facilitar la observación y el análisis al microscopio.

Una vez obtenido cromosomas definidos, se realizaron bandas G y R, el bandeo G presentó dificultades y por lo tanto se optó por realizar bandeo R únicamente, sin embargo fue necesario realizar variados ensayos puesto que no se lograban bandas muy definidas, donde también influía la coloración, dejándolas oscuras, para lo que fue necesario variar la concentración del colorante Giemsa. En la **Tabla 3** se resumen los ajustes realizados a la técnica de cultivo para solventar los obstáculos que aparecieron durante la Estandarización.

Obstáculos Preliminares	Ajustes
Abundante material celular.	<ul style="list-style-type: none"> • Sembrar el número de gotas de muestra teniendo en cuenta el conteo celular (hemograma Mas de 5000 leucocitos). • Calidad, cantidad y temperatura de la solución Hipotónica y realizar una resuspensión dinámica (Aproximadamente 50 veces). • Fijación inmediata con Carnoy y lavados adecuados.
Cromosomas condensados o cortos.	<ul style="list-style-type: none"> • Exactitud en el tiempo de colcemid.
Residuos Celulares	<ul style="list-style-type: none"> • Solución Hipotónica y resuspensión.
Cromosomas aglomerados o superpuestos.	<ul style="list-style-type: none"> • Bromuro de Etidio como intercalante para elongar los cromosomas. Eliminación de este reactivo del protocolo porque junta o pega los cromosomas. • Cantidad de muestra en suspensión para el proceso de goteo. • Examinar las placas goteadas y hacer variaciones en el proceso de goteo según lo observado.

Tabla 3: Ajustes realizados a la técnica de cultivo.

6.6.2. Tamaño de Muestra

Para la estandarización de la técnica de cultivo, se tomó como base un tamaño de muestra de $n = 29$ casos, con diagnóstico de leucemia o sospecha de ella, de cada caso se hicieron 2 cultivos y de cada cultivo se hicieron 8 láminas, para un total de 16 láminas por caso. También se procesaron muestras de pacientes con

diagnósticos diferentes a leucemia como, linfoma no hodgkin, médula ósea megaloblástica, mieloma múltiple, entre otros.

6.6.3. Registro de Alteraciones Cromosómicas

Una vez procesadas las muestras hematológicas de los pacientes, se observaron las láminas de cada uno en un microscopio con objetivos de 10X y 100X, para encontrar *metafases analizables*. Es decir metafases en las que puedan observarse cromosomas con buena morfología, con pocos sobrepuestos o traslapados y bandeados. Se tomaron en cuenta estas características, ya que permiten en forma confiable y precisa, identificar alteraciones en el número y la estructura de los cromosomas.

Aquellas alteraciones que se encuentren en las metafases analizables, serán registradas en una tabla de alteraciones cromosómicas (**Anexo 3**).

6.7. Análisis de Resultados

6.7.1. Técnica de cultivo

Los resultados particulares de cada muestra fueron evaluados en base al criterio cualitativo de metafases analizables. En una tabla se señalaron criterios de evaluación cómo: diagnóstico de los pacientes que fueron incluidos en este estudio, la proliferación, la presencia de células en metafase y la morfología cromosómica, entre otros (**Anexo 4**). Utilizando esta información y apoyándose con la información bibliográfica consultada y la asesoría de la directora de este Trabajo de Grado experta en citogenética, se intentó identificar las causas para los resultados observados y con base en ello se realizaron ajustes a la técnica para aplicarlos a la próxima muestra; y con ello procurar obtener mejores resultados. Por otra parte, los criterios de evaluación serán comparados entre sí, con la

finalidad de identificar posibles patrones que expliquen los resultados obtenidos. Los criterios para la evaluación de la técnica se definen en la **Tabla 4**.

Criterio	Descripción	Niveles			
Diagnóstico	Diagnóstico reportado por el hematólogo.				
Tipo de muestra	Tipo de tejido.	Medula Ósea		Sangre Periférica	
Calidad de la Muestra	Estado en el que se recibió la muestra de sangre o médula ósea.	Buena		Coagulada Células necrosadas.	
Proliferación	Se refiere a si hubo crecimiento celular.	Nula Ninguna Célula.	Baja Algunas Células.	Buena Cantidad. Adecuada	Alta Demasiadas Células.
Presencia de células en metafase	Se refiere a si se observan células en metafase en las láminas.	Nula 0	Baja <20	Buena ≥20	
Numero de metafases observadas	Número de metafases que se observaron en las placas por cada caso.	Se registraron las encontradas en 8 placas de cada caso, incluyendo cada cambio realizado de cada cultivo.			
Morfología cromosómica	Evaluación de la calidad de la morfología cromosómica.	Mala* Cromosomas condensados, poco definidos.	Regular* Tinción pálida, bandas no definidas.	Buena* Definición de Cromosomas y bandas.	
Numero de metafases analizables	Número de metafases observadas en las placas con cromosomas bien diferenciados, definidos y bandeados.	En general se registró las metafases encontradas en las 8 placas por cultivo de cada paciente.			

* Una mejor descripción de los niveles de calidad de la morfología cromosómica se encuentra a continuación.

Tabla 4: Criterios de evaluación de la Técnica de Cultivo

Niveles de calidad de la morfología cromosómica:

- Mala Morfología: los cromosomas estuvieron pequeños y gruesos (es decir condensados), y/o muy aglomerados (Juntos).
- Regular Morfología: se hace a alusión a que no hubo presencia de bandas definidas, en algunos casos cromosomas un poco aglomerados o cortos.

- Buena morfología: cromosomas de buen tamaño, con buena distribución, definidos y sobre todo con bandas.

6.7.2. Alteraciones cromosómicas

Se hizo un análisis descriptivo de las alteraciones encontradas en las muestras hematológicas de los pacientes con leucemia. Estas alteraciones fueron comparadas con los reportes citogenéticos de alteraciones de diferentes publicaciones que se han asociado con los diagnósticos. Por otra parte en los casos donde no se halló asociación, se investigaron otras posibles razones para la presencia de dichas alteraciones.

6.7.3. Análisis Sociodemográfico

Utilizando la información obtenida de la encuesta, se realizó un análisis descriptivo de las características demográficas de los casos reportados, y se comparó con lo reportado en trabajos similares a nivel mundial.

Los análisis estadísticos fueron efectuados mediante el programa estadístico para computador SPSS Versión: 14.11.

7. RESULTADOS

7.1. Características de la Población de Estudio.

Un total de 29 pacientes fueron remitidas de la unidad de Hematología especial del Hospital Universitario San José de la ciudad de Popayán, dos de ellos no pudieron ser tomados en cuenta para la identificación de las características socio demográficas y factores asociados (pero se tuvieron en cuenta para el estudio citogenético).

La **Tabla 5** indica las características sociodemográficas de la población. Se puede destacar que la edad promedio de los pacientes fue de $44,0 \pm 22,691$ años, siendo la mayoría de estos hombres (77,8%). El 51,9% de los casos son nacidos en localidades urbanas. La agricultura fue la mayor ocupación con un 51,9% de los casos seguida de las amas de casa con un 14,8%.

Características	Casos
Total	27
Edad	
Media \pm DE	44,00 \pm 22,691
Sexo	
Masculino:	21 (77,8)
Femenino:	6 (22,2)
Lugar de Nacimiento	
Urbano:	14 (51,9)
Rural:	13 (48,1)
Lugar de residencia	
Urbano:	8 (29,6)
Rural:	19 (70,4)
Ocupación	
Agricultor:	14 (51,9)
Ama de Casa:	4 (14,8)
Constructor:	2 (7,4)
Estudiante:	3 (11,1)
Ganadero:	1(3,7)
Motorista:	2 (7,4)
Secretario:	1(3,7)
Raza	
Mestizo:	23 (85,2)
Negro:	4 (14,8)
Hermanos Gemelos	
Si:	1 (3,7)
No:	26 (96,3)

Tabla 5: Características sociodemográficas de la población de estudio.

En el sector rural se presentó el mayor lugar de procedencia de los pacientes con un 70.4%. La ubicación de la procedencia de los casos se puede observar en la **Figura 7**. La ciudad de Popayán presentó el mayor número de casos con un total de 4, en relación a los demás sectores del departamento del Cauca. En la figura, los números representan el total de casos muestreados por municipio.

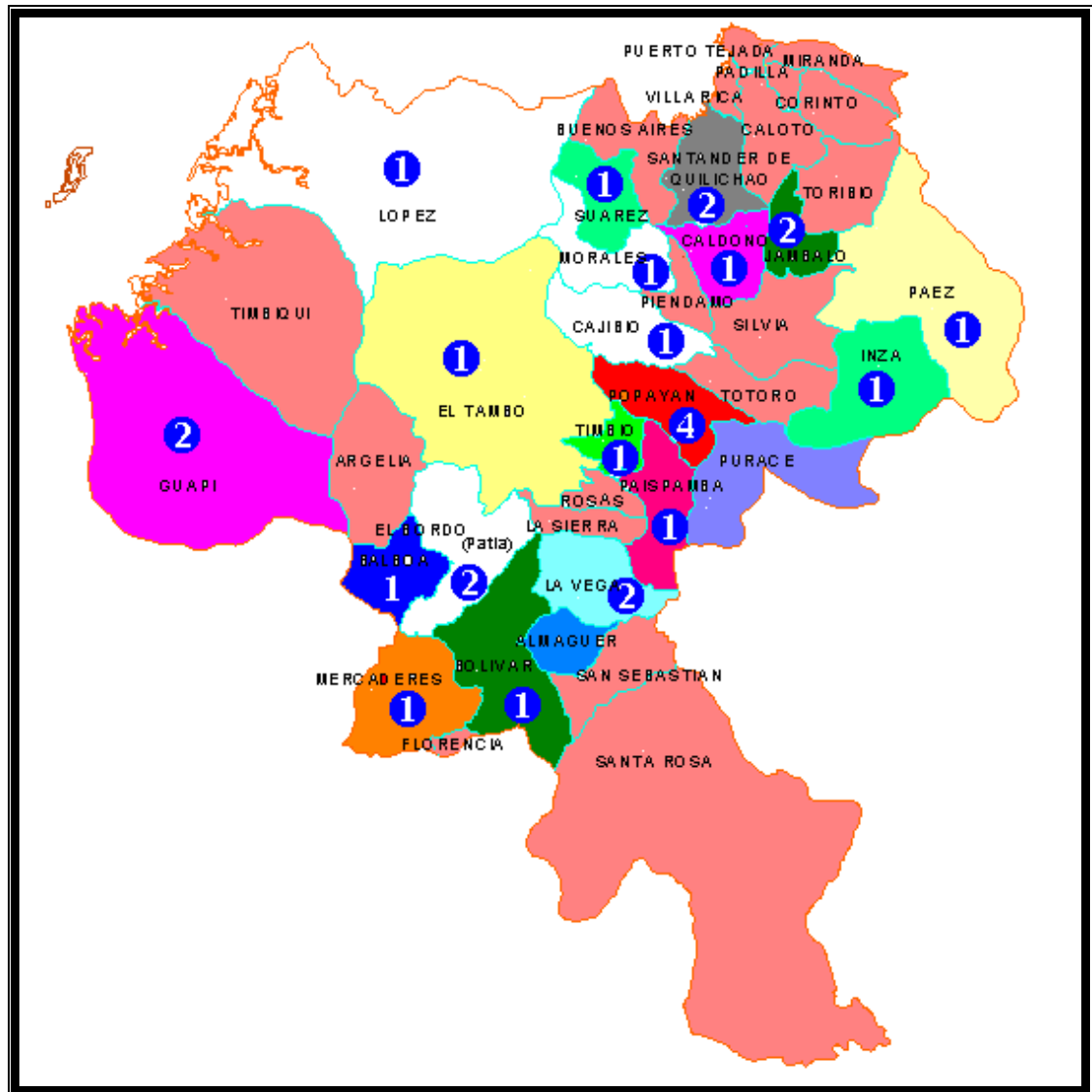


Figura 7: Lugar de Procedencia Grupo de Estudio.

7.1.1. Características de riesgo asociadas a la población

Entre las características que se tomaron en cuenta se encontró que el 85.2% de los casos tienen exposición al humo de leña y el 40.7% eran fumadores. El 51,9% de los reportes tenían exposición a plaguicidas y a líneas de alto voltaje 11.1%. El promedio de tiempo laboral fue 27.10 ± 21.20 años. Se evaluó el consumo de verduras entres categorías: nunca, rara vez y siempre, dando proporciones de 48.1%, 37.0% y 14.8% respectivamente, ver **Tabla 6**.

Variable	Casos (%)
Total	27
Humo de Leña	
Si:	23 (85,2)
No:	4 (14,8)
Fuma	
Si:	11 (40,7)
No:	16 (59,3)
Rayos X	
Si:	12 (44,4)
No:	15 (55,6)
Plaguicidas	
Si:	14 (51,9)
No:	13 (48,1)
Líneas de Alto Voltaje	
Si:	3 (11,1)
No:	24 (88,9)
Tiempo Laboral	
Media \pm DE	$27,10 \pm 21,20$
Consumo de Verduras	
Nunca:	13 (48,1)
Rara Vez:	10 (37,0)
Siempre:	4 (14,8)

Tabla 6: Características de riesgo asociadas a la población

7.1.2. Estado del paciente y antecedentes familiares.

Se consideraron algunos datos del estado del paciente y de los antecedentes familiares: el tiempo promedio de estar enfermos los pacientes fue 17.10 ± 28.575 semanas. Un 33.3% de los casos habían recibido algún tipo de tratamiento y un 40.7% estaban recibiendo tratamiento. De los pacientes encuestados el 38.5% habían padecido algún tipo de enfermedad infecciosa como hepatitis B y C, fiebre

amarilla, e infecciones urinaria, de la sangre y nariz. En los antecedentes familiares se presentó en un 37.0% de los casos anemia; 22.2% cáncer (Estomago, riñón, mama, piel); y 3.7% leucemia. También se encontraron otras enfermedades como: hepatitis, diabetes, asma, pulmonía además de hipertensión, enfermedades renales y de corazón (**Tabla 7**).

Variable	Casos (%)
Total	27
Tiempo de Estar Enfermo	
Media ± DE	17,10 ± 28,575
Recibió Tratamientos	
Si:	9 (33,3)
No:	18 (66,7)
Recibe Tratamientos	
Si:	11 (40,7)
No:	16 (59,3)
Enfermedades Infecciosas	
Si:	10 (37,0)
No:	17 (63,0)
Anemia Familiar	
Si:	10 (37,0)
No:	17 (63,0)
Cáncer Familiar	
Si:	6 (22,2)
No:	21 (77,8)
Leucemia Familiar	
Si:	1 (3,7)
No:	26 (96,3)

Tabla 7: Estado del Paciente y Antecedentes Familiares

7.2. Diagnósticos Obtenidos.

En la **Tabla 8** se pueden ver los diagnósticos obtenidos, de un total de 22 leucemias, en los cuales el diagnóstico mas frecuente fue la leucemia linfoide aguda (LLA) con 10 casos reportados, seguida por la leucemia mieloide aguda (LMA) con 4 casos, la leucemia linfoide crónica (LLC) y la leucemia mieloide crónica (LMC) continúan con 3 casos cada una, finalizando con una leucemia promielocítica aguda (LPA) y una leucemia promielocítica (LP). Además se obtuvieron 10 desordenes hematológicos, de los cuales 3 pertenecían a Linfoma no Hodgkin (LNH), 2 mielomas múltiples (MM), un caso de enfermedad de Hodgkin (HD: Hodgkin's Disease), además de una mielodisplasia (Mielod), una médula ósea megacarioblástica (MOM), una trombocitopenia (Tromb), una

hiperplasia eritroide megacarioblástica (HEM), y finalmente una muestra de médula ósea no diagnóstica (No DX). Del total de casos (29 pacientes), se obtuvieron 33 muestras procesadas, donde para un caso se procesaron dos muestras de médula ósea y para otros 3 se procesó médula ósea y sangre periférica.

Diagnostico	Casos (%)
Leucemia Linfoide Aguda (LLA)	10 (30.3)
Leucemia Linfoide Crónica (LLC)	3 (9.1)
Leucemia Mieloide Aguda (LMA)	4 (12.1)
Leucemia Mieloide Crónica (LMC)	3 (9.1)
Leucemia Promielocítica Aguda (LPA)	1 (3.0)
Leucemia Promielocítica (LP)	1 (3.0)
Linfoma No Hodgkin (LNH)	3 (9.1)
Enfermedad de Hodgkin (Hodgkin's Disease) (HD)	1 (3.0)
Mieloma Multiple (MM)	2 (6.1)
Mielodisplasia (Mielod)	1 (3.0)
Médula Ósea Megacarioblástica (MOM)	1 (3.0)
Trombocitopenia (Tromb)	1 (3.0)
Hiperplasia Eritroide Megaloblástica (HEM)	1 (3.0)
Médula Ósea No Diagnóstica (No DX)	1 (3.0)
Total	33

Tabla 8: Diagnósticos Obtenidos.

7.3. Técnica de Cultivo

7.3.1. Calidad de Metafases Obtenidas

En seis de los casos cultivados no hubo proliferación, y en uno de ellos, aún cuando proliferó, no se encontraron metafases. En la **Tabla 9** se puede ver la calidad morfológica obtenida en los casos en los que sí se encontraron metafases. Sin embargo, vale la pena mencionar que durante la observación de los casos se encontró que en una misma placa existe mucha variabilidad, ya que se encontraron metafases con diferentes morfologías, es decir metafases malas, regulares y buenas. Las metafases regulares sirvieron de ayuda en caso de no obtener nada, puesto que se prestaron para realizar un análisis numérico de los cromosomas.

Calidad	Casos (%)
Mala Morfología	4 (15,4%)
Regular Morfología	7 (26,9%)
Buena morfología	15 (57,7%)
Total	26

Tabla 9: Calidad morfológica de metafases.

7.3.2. Criterios de Evaluación Técnica de Cultivo

En la **Tabla 10** podemos observar que la proliferación fue generalmente buena en 23 de los casos (69.7%), fue nula en 6 (18,2%), baja en 1 (3%) y alta en 3 (9,1%). La Presencia de Células en Metafase lamentablemente fue nula en 1 caso (3,7%), significativamente baja en 7 (26.9%) y buena en 15 (57.7%). La morfología cromosómica fue mala en 4 casos, regular en 7 y buena en 15 (15,4%; 26,9%; 57,7% respectivamente). En 10 casos no se realizó bandeado cromosómico debido a

una proliferación nula (6 casos), la no presencia de células en metafase (1 caso) y una muy mala morfología (3 casos); 5 de los casos no presentaron bandas definidas; y con bandas definidas 18.

Variable	Casos (%)
Total	33
Tipo de Muestra	
MO	27 (81.8)
Periférica	6 (18.2)
Calidad de la Muestra	
Buena	30 (90.9)
Coagulada	3 (9.1)
Proliferación	
Nula	6 (18.2)
Baja	1 (3.0)
Buena	24 (72.7)
Alta	3 (9.1)
Presencia de Células en Metafase (n=26)	
Nula	1 (3,7)
Baja	7 (25.9)
Buena	15 (57.7)
Morfología Cromosómica (n=26)	
Mala	4 (15.4)
Regular	7 (26.9)
Buena	15 (57.7)
Bandas	
No se realizo	5 (15.2)
No definidas	18 (54.5)
Definidas	10 (30.3)
Número de Metafases Observadas	
Media \pm DE	63.48 \pm 14.036
Número de Metafases Analizables	
Media \pm DE	27.97 \pm 8.162

Tabla 10: Criterios de Evaluación Técnica de Cultivo

Las frecuencias del número de metafases observadas y del número de metafases analizables se muestran en las **Figuras 8 y 9**. En 21 de los casos se observaron menos de 50 metafases, mientras que en 12 de los casos se obtuvieron más de 50 metafases, alcanzando un máximo de 281 metafases observadas en uno de los casos en una LMC y 276 en un caso de médula ósea Megaloblástica; de la misma manera se obtuvieron menos de 50 metafases analizables en 27 de los casos y en sólo 6 se obtuvo más de 50, llegando a obtenerse un máximo 233 metafases analizables en el diagnóstico de la LMC y 123 en la Médula Ósea Megaloblástica.

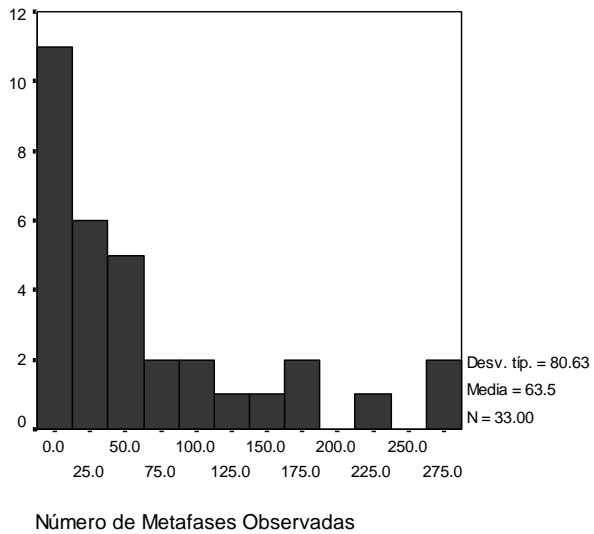


Figura 8: Número de Metafases Observadas

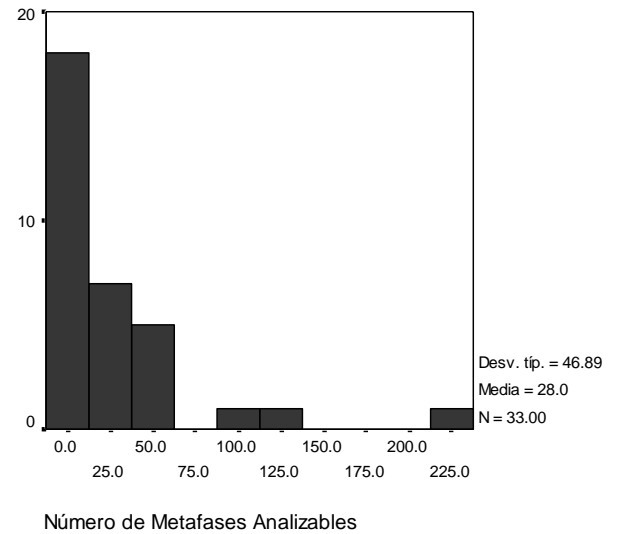


Figura 9: Número de Metafases Analizables

7.4. Alteraciones cromosómicas

Con el propósito de obtener buena calidad de metafases, se realizaron variaciones en el goteo y bandeo, lo que impidió realizar los suficientes cariotipos y llevar a cabo un análisis detallado de alteraciones cromosómicas estructurales como las traslocaciones específicas relacionadas con cada tipo de leucemia. Aún así, se identificaron diferentes tipos de alteraciones en distintos diagnósticos (**Tabla 11**) y a algunos de estos tipos se muestran en diferentes fotografías (**Sección 7.5.1**).

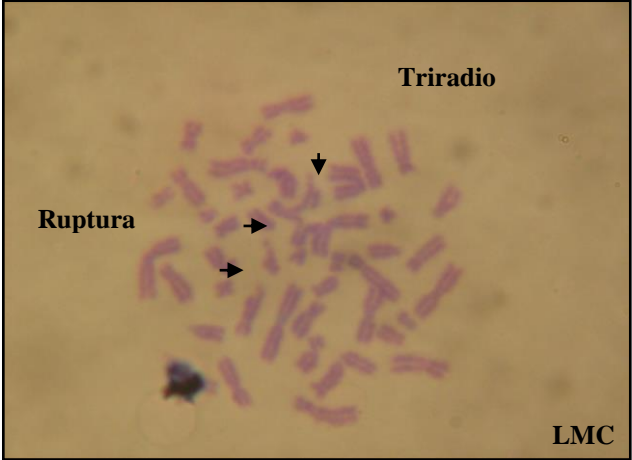
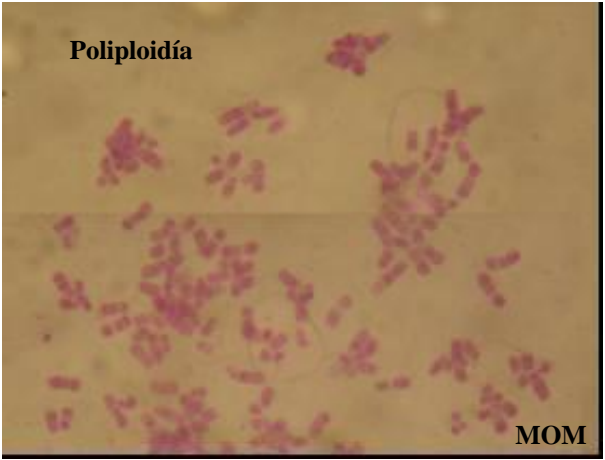
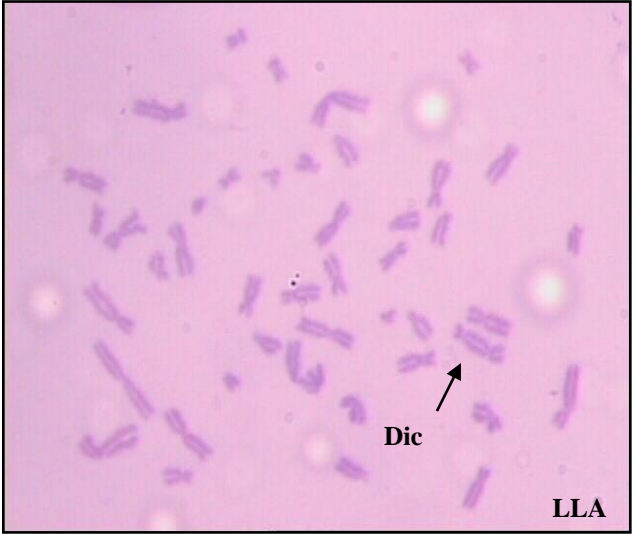
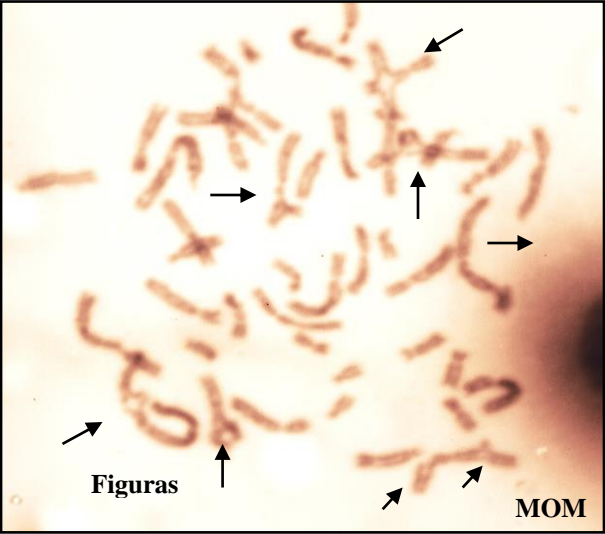
Caso	Diagnóstico	Alteraciones Encontradas
003	Hodgkin	<ul style="list-style-type: none"> • Poliploidía • *SPC • Aneuploidías: Hipodiploide Bajo: 1 de 38 cromosomas, 1 de 37 cromosomas.
004	L.L.C	<ul style="list-style-type: none"> • Aneuploidías: 3 de 41 cromosomas, 1 de 42 cromosomas • 3 Poliploidías: Hipotetraploidía 1 de menos de 92 cromosomas. • *SPC
005	Médula Ósea Megaloblástica	<ul style="list-style-type: none"> • Ruptura Cromatídica • Endoreduplicación • Poliploidía • Cuadriradio • *SPC • Triradio • Pulverización
007	Hiperplasia Eritroide Megacarioblástica	<ul style="list-style-type: none"> • Pulverización • *SPC
010	Mieloma Múltiple	<ul style="list-style-type: none"> • Ruptura Cromatídica
011	M.O. no DX	<ul style="list-style-type: none"> • 9 *SPC • 6 Poliploidías • Endoreduplicación
012	Trombocitopenia	<ul style="list-style-type: none"> • 8 Poliploidías • 5 Aneuploidías • Pulverización • 1 *SPC
014	Mieloma Múltiple	<ul style="list-style-type: none"> • 6 Pulverizaciones • 3 *SPC
016	LMA	<ul style="list-style-type: none"> • 6 Poliploidía: 1 Tetraploidia • Cromosoma Filadelfia • 4 *SPC • Ruptura Cromatídica
017	LLA	<ul style="list-style-type: none"> • *SPC • Cromosoma dicéntrico
018	LMA	<ul style="list-style-type: none"> • 9 *SPC • Pulverización • Cromosoma Filadelfia
019	Mielodisplasia	<ul style="list-style-type: none"> • Endoreduplicación • 2 Pulverización • 2 *SPC
022	LMC	<ul style="list-style-type: none"> • 5 Pulverizaciones • 3 Poliploidías • 4 Cromosoma Filadelfia • 7 *SPC • Endoreduplicación
023	LLC	<ul style="list-style-type: none"> • Poliploidía
024	LLA	<ul style="list-style-type: none"> • Pulverización • *SPC • Poliploidías: • Hiperdiploide: 2 de 47 Cromosomas, 1 de 49 Cromosomas • Hiperdiploide altas: 1 de 54 cromosomas, 3 de 50 Cromosomas, 1 de 57 Cromosomas, 1 de 55 Cromosomas.

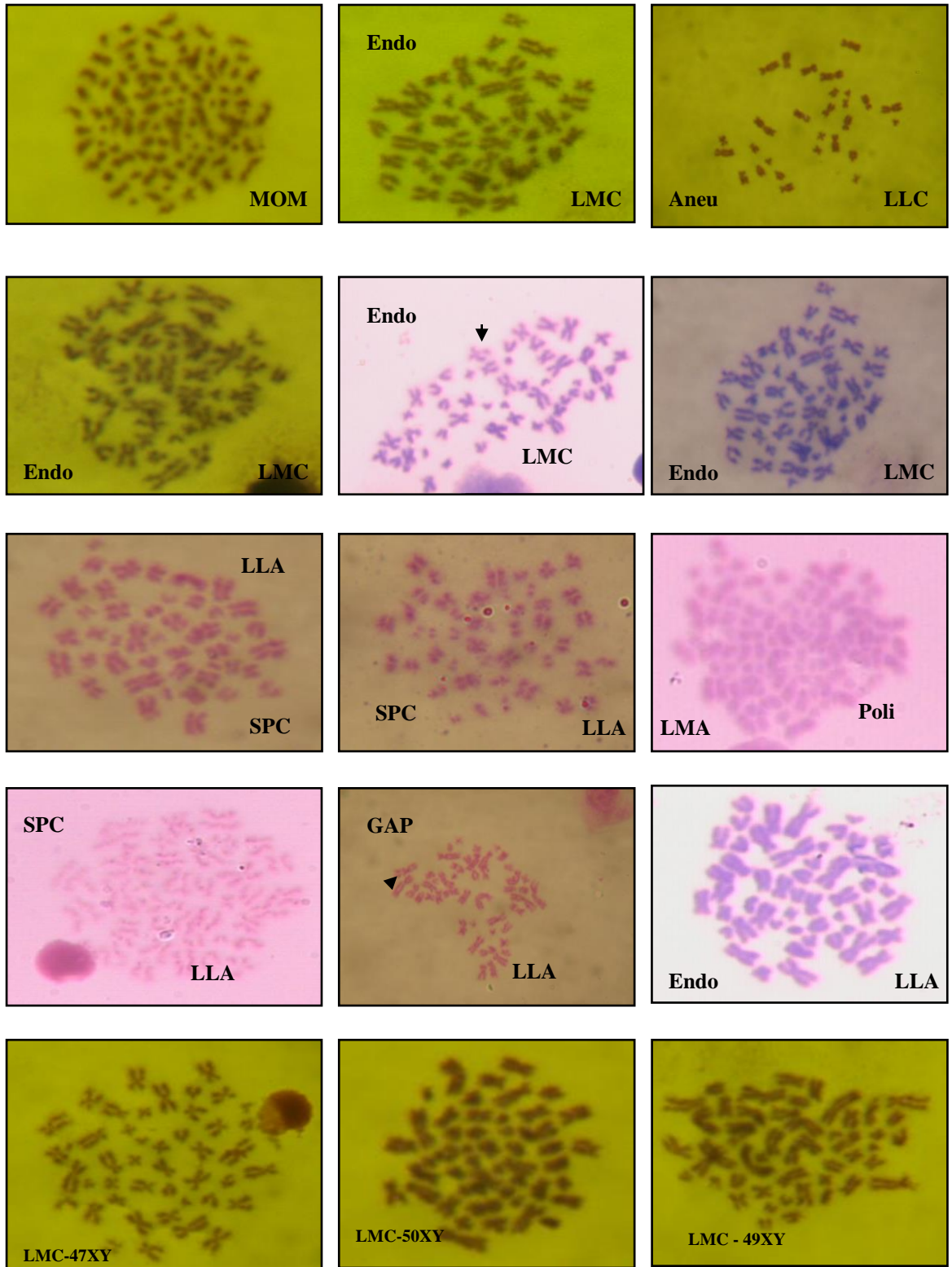
Tabla 11: Alteraciones Cromosómicas Encontradas.

* SPC: Separación Prematura de Centrómeros.

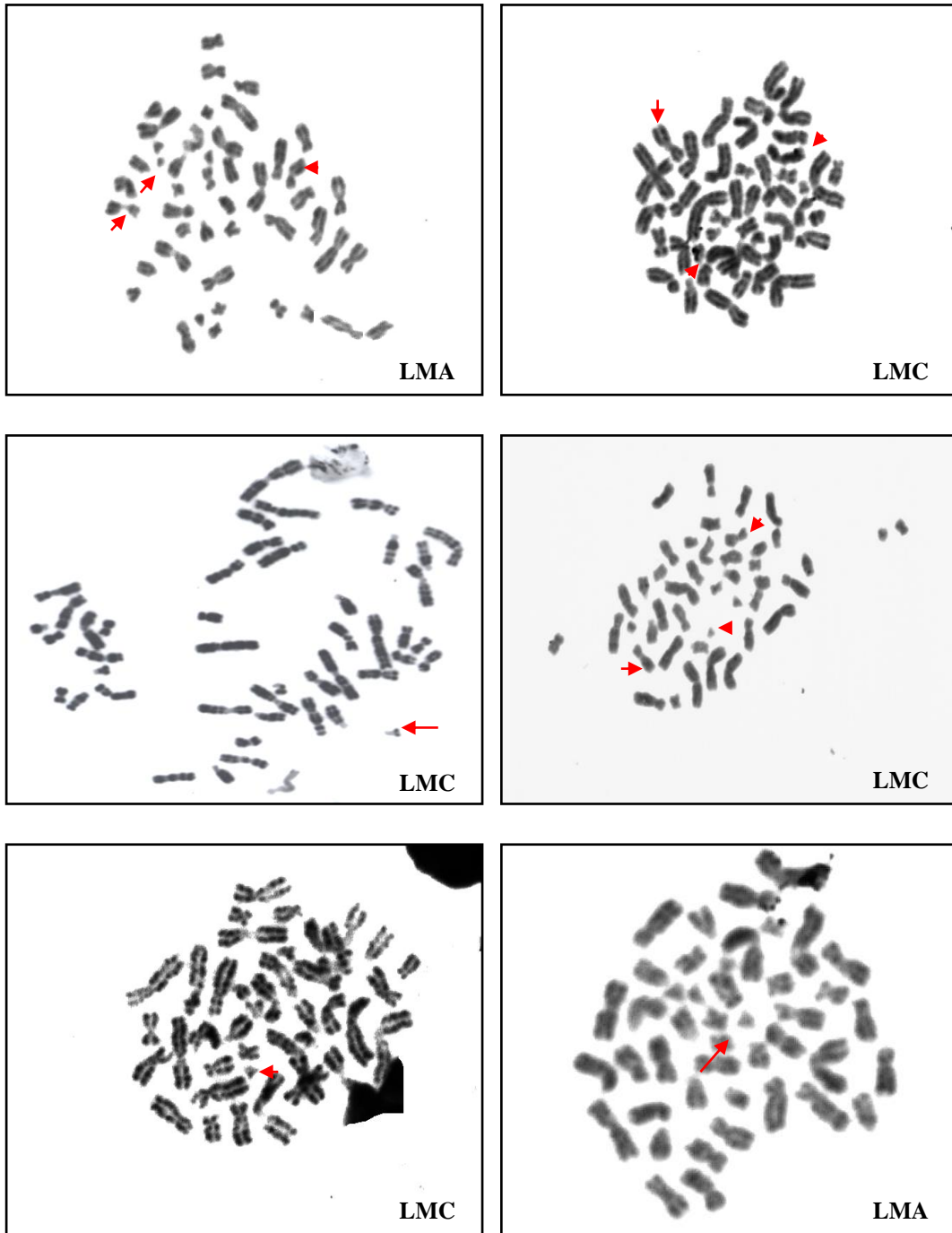
7.5. Fotografías de metafases obtenidas.

7.5.1. Fotografías de Alteraciones cromosómicas Encontradas



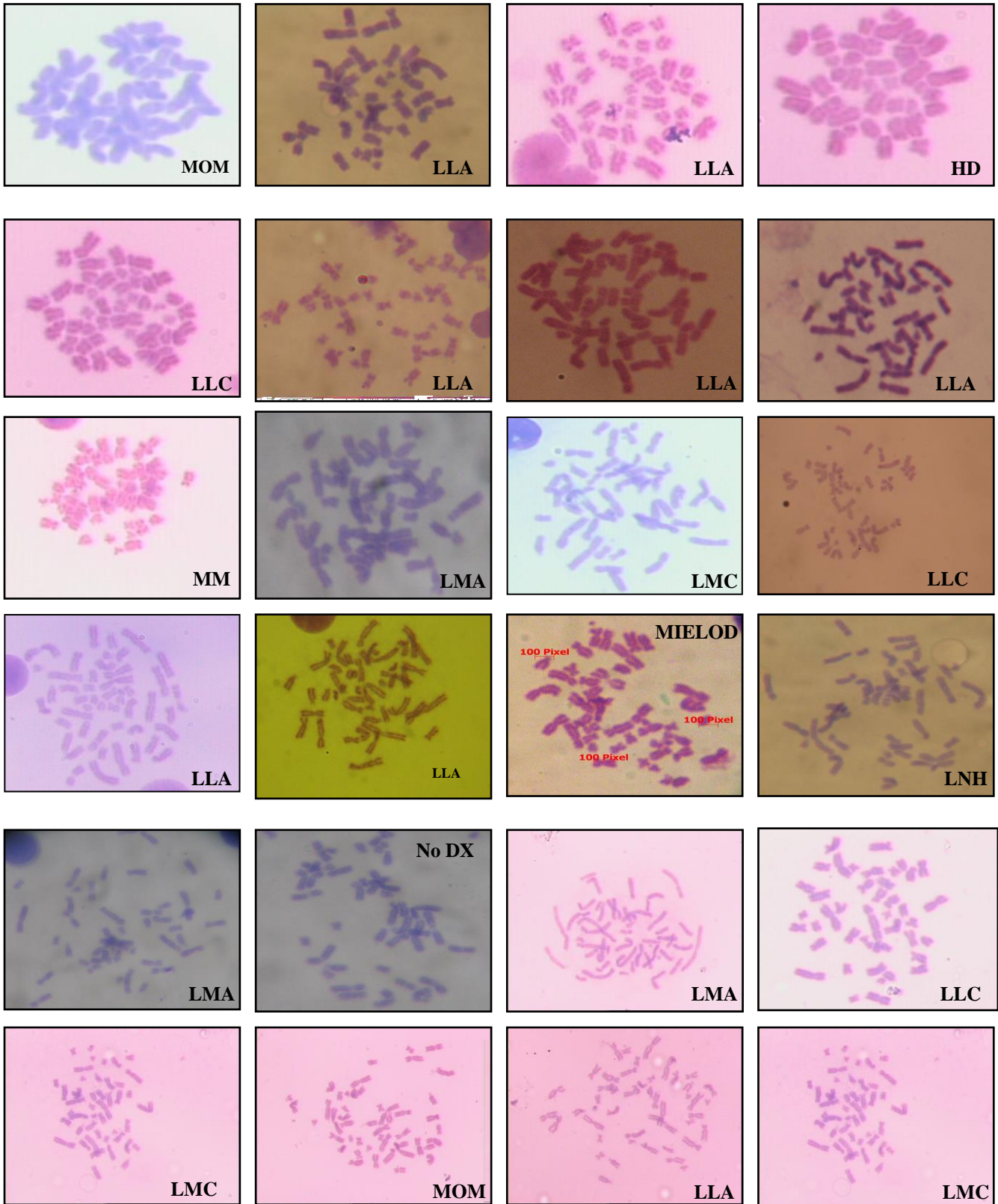


Metafases con cromosoma Filadelfia t(9;22).



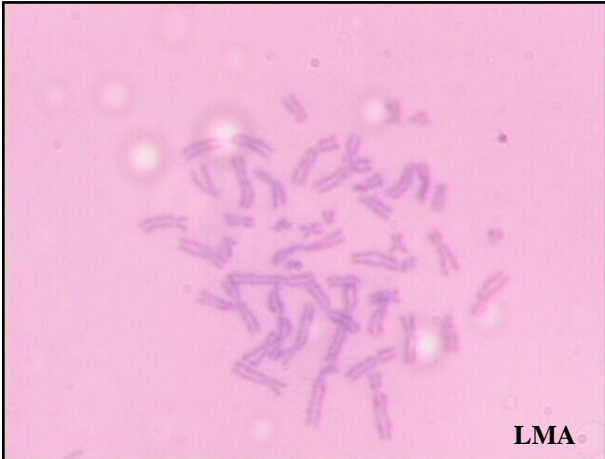
Nota: Ver Cariotipos que muestran las alteraciones (**Anexo 5**).

7.5.2. Metafases obtenidas durante el proceso de estandarización.

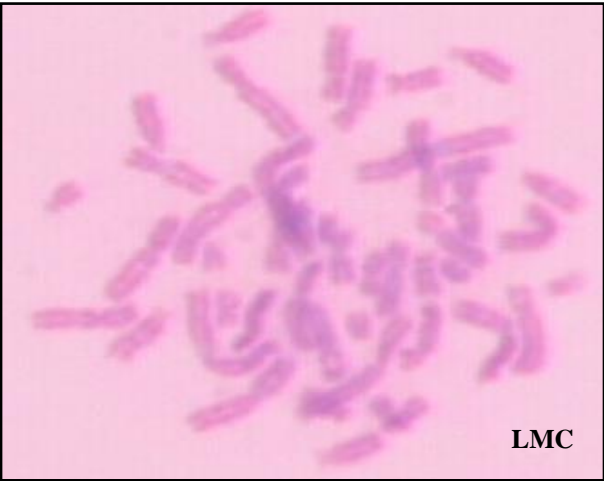




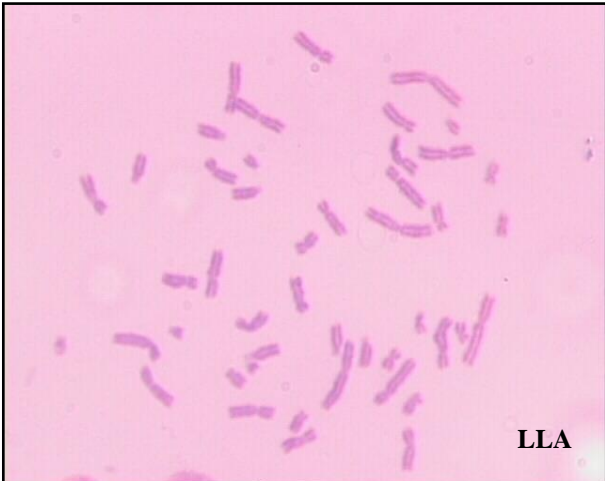
MM



LMA



LMC



LLA

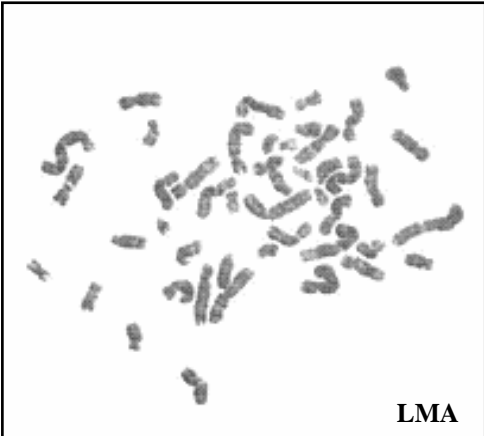
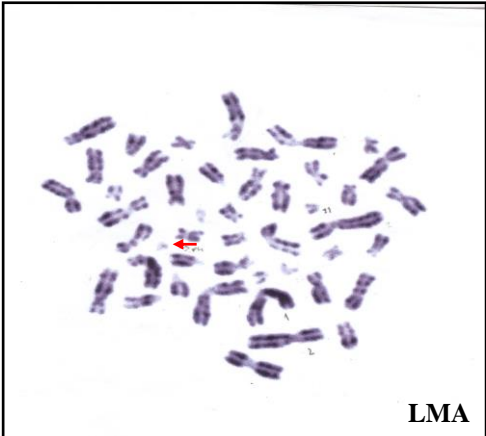
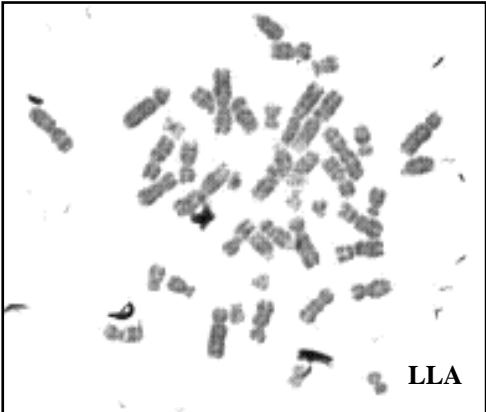
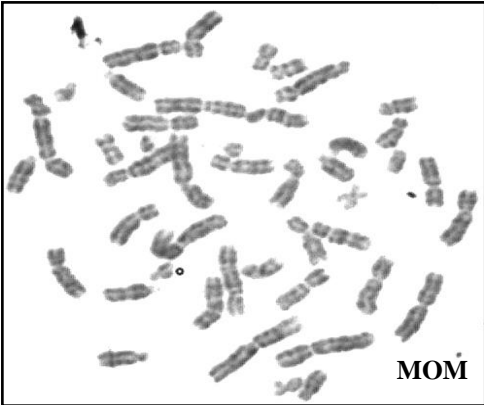


MOM



TROMB

Metafases procesadas para cariotipo.



8. ANALISIS DE RESULTADOS

8.1. Análisis sociodemográfico de la población objeto de estudio

Las variables como sexo, edad, procedencia y ocupación indicaron que las enfermedades hematológicas como las leucemias se presentaron en mayor proporción en hombres (77,8%), a una edad promedio de 44 años, esta información coincide con los reportes de Ferlay *et al*, en el 2005, donde afirma que la incidencia de leucemias es mayor en hombres. Por otro lado la edad promedio del grupo de estudio es relativa, por que varia dependiendo del diagnóstico, esta variación se puede notar en la **Figura 10**.

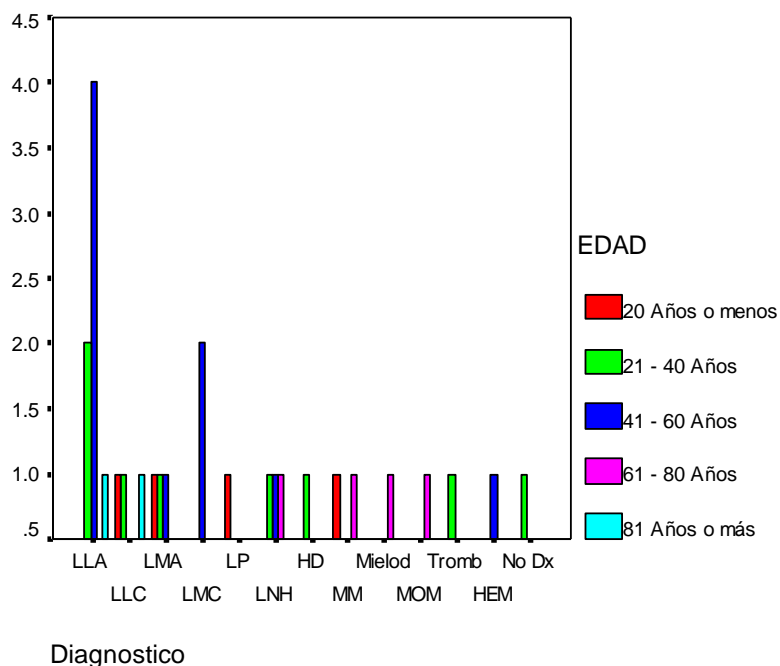


Figura 10: Rangos de edad según diagnósticos

La mayoría los pacientes provienen de la población rural en un 70,4%, predominó la ocupación agrícola con un 51,9%; al tener en cuenta características de riesgo como la exposición a plaguicidas correspondió al 51,9% de los pacientes y un tiempo laboral de $27,10 \pm 21,20$ años. Estos datos indican que la población rural

tuvo en su mayoría una ocupación agrícola, donde se ha tenido un gran riesgo de exposición a plaguicidas durante varios años y se cree que por el tiempo laboral la enfermedad se inició a una edad temprana. Pudo ocurrir que hubo un largo periodo de exposición a algunos de los solventes empleados en los plaguicidas, los cuales presentan efectos carcinogénicos en el hombre y en otros animales (Cullen *et al*, 1990).

Otras características de riesgo presentes en los pacientes que participaron en el estudio son el consumo de cigarrillo en un 40,7% y la exposición al humo de leña en un 85,2% los cuales parecen tener incidencia en la formación del cáncer, como lo afirma Rosell *et al*, (2004). Además de la baja ingestión de frutas y verduras reportada (Nunca 48,1% y rara vez 37,0 %), las cuales se considera que pueden disminuir la toxicidad de una sustancia, ya que reducen la velocidad de absorción, forman enlaces con proteínas, cambian las tasas metabólicas y detoxifican al organismo por medio de la eliminación renal (Vieira V. y Ozonoff, 2003).

El tiempo promedio de estar enfermos los pacientes fue de 17,10 semanas. Los pacientes afirmaron una sintomatología desde hace algún tiempo, pero muchos de los síntomas se manifiestan de forma severa sólo cuando ha alcanzado una etapa avanzada de la enfermedad (Hillman *et al*, 2006) y cuando acuden a un centro médico, muchas veces no alcanza una remisión completa. Además otra de las razones por la cual no asistieron de manera oportuna a un centro médico fue la lejanía y la falta de recursos.

8.2. Técnica de Cultivo

8.2.1. Calidad de Metafases Obtenidas

La no presencia de célula alguna en las placas de algunos de los casos (Proliferación Nula) pudo deberse a que:

1. El tejido de sangre muchas veces no crece debido a que no se estimula con Fitoheماغلوتينina, ya que no es adecuado estimularse, porque solo crecería la línea linfoide.
2. Pudo haber variado la temperatura de las células del cultivo y esto detuvo el crecimiento celular.
3. Un cambio de pH en el medio de cultivo. Pudieron proliferar demasiadas células.
4. Es posible que el colcemid no fuera efectivo.
5. La exposición a la solución hipotónica fue por demasiado tiempo.
6. Las células fueron digeridas por una alta exposición a tripsina o Brdu en el extendido.

Parece ser que la calidad de las metafases es inherente a muchos factores y en este tipo de estudios es intrínseco al hecho de ser una malignidad, y a la dinámica genética intrínseca de cada paciente. Cuando hubo metafases borrosas, cromosomas largos y/o superpuestos pudo deberse a poca exposición a solución Hipotónica, a que está no causará efecto, que la temperatura no fue la adecuada, o a que la técnica de goteo fue mala. Cuando hubo cromosomas cortos pudo ser por una alta exposición a colcemid o al mismo padecimiento de un determinado tipo de enfermedad como en los casos de LLA.

8.2.2. Criterios de evaluación de la Técnica de Cultivo

Teniendo en cuenta los diagnósticos se evaluó la proliferación celular. En la **Figura 11**, se observa que la proliferación celular nula, baja y alta solo se encuentra en leucemias. En este tipo de pacientes los niveles celulares pueden

ser bajos o altos, siendo estos niveles dependientes de la fase de la leucemia y/o estado en que se encuentre su organismo (Swansbury, 2003); también pudo depender de la interacción entre el tiempo de cultivo y el número de ciclos celulares descontrolados que sucedan, donde influye igualmente la cantidad de muestra que se cultivó.

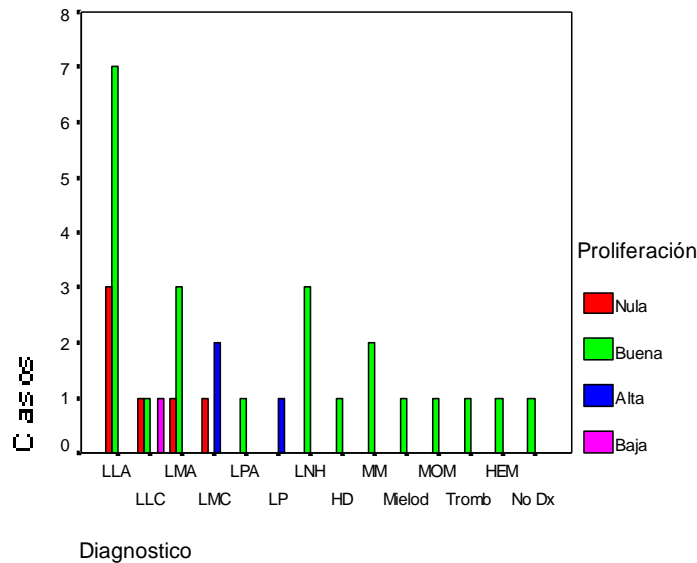


Figura 11: Diagnóstico vs. Proliferación

También se evaluó la presencia de células en metafase con los diagnósticos como se muestra en la **Figura 12**, en la cual destaca que la presencia de células en metafase nula sólo aparece en un caso de LMC, esto pudo deberse a que, como los ciclos celulares de leucemias son descontrolados, pudo suceder que la cantidad de colcemid agregado a la muestra fuera insuficiente o que el tiempo del mismo no fue el adecuado.

La morfología cromosómica también varió de acuerdo al diagnóstico, según se muestra en la **Figura 13**, en donde dos casos de LLA presentaron mala morfología y tres regular, esto coincide con lo que afirman los citogenetistas de la notoria pobre morfología que se presentan en las leucemias linfoides agudas, especialmente con un clon hiperdiploide alto (Swansbury, 2003). Las demás leucemias mostraron morfología cromosómica buena y en algunos casos regular,

esto parece indicar que los desordenes mieloides y otros desordenes hematológicos no presentan tantos retos técnicos como ocurre en la LLA, excluyendo la leucemia promielocítica que también presentó mala morfología.

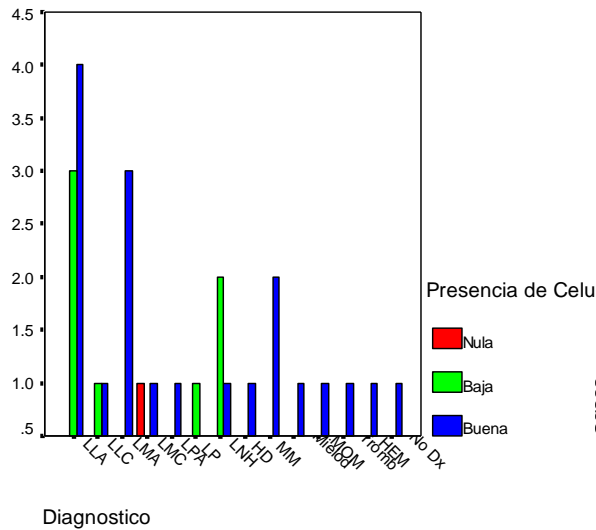


Figura 12: Diagnóstico vs. Presencia de Células en Metafase

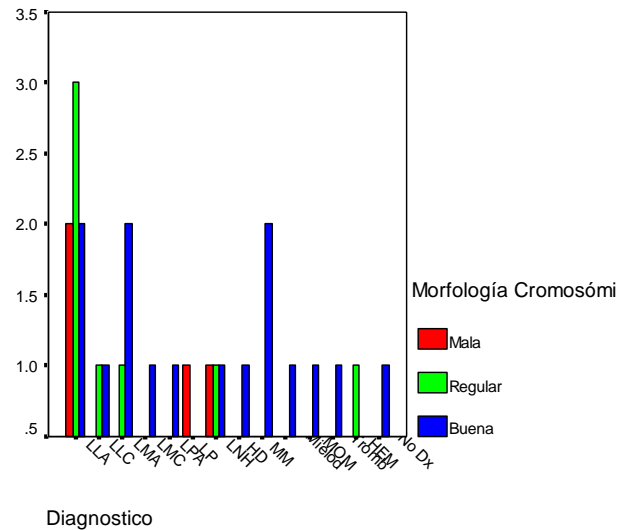


Figura 13: Diagnóstico vs. Morfología Cromosómica

Se observó la proliferación celular en función del tipo de muestra (**Figura 14**), y debido a que el número de datos obtenidos son disímiles (27 muestras de médula ósea y 6 periféricas) no es posible establecer una comparación, sin embargo, se puede destacar que sin importar el tipo de muestra obtenida la proliferación puede ser nula, baja, buena o alta; no obstante la muestra de la médula ósea es mas empleada según las razones dadas anteriormente, además hay que tener en cuenta que los cultivos de sangre no deberían de ser estimulados con fitohemaglutinina (porque solo se estimularía el linaje linfoide), por lo tanto por no ser estimulados los cultivos, es muy probable que no proliferen (Swansbury, 2003).

De igual manera en la **Figura 15** podemos notar que la mala morfología cromosómica se encontró sólo en médula ósea y no en periférica, esta situación puede presentarse debido a la misma presencia de clones malignos en la médula

y a la desnaturalización de proteínas en la condensación del ADN (Shivdasani y Orkin *et al*, 1996), mientras que en sangre las metafases obtenidas con buena morfología pueden no ser propias de un clon sino que pueden provenir de células normales y así, por su buena morfología, generar un falso negativo (Swansbury, 2003).

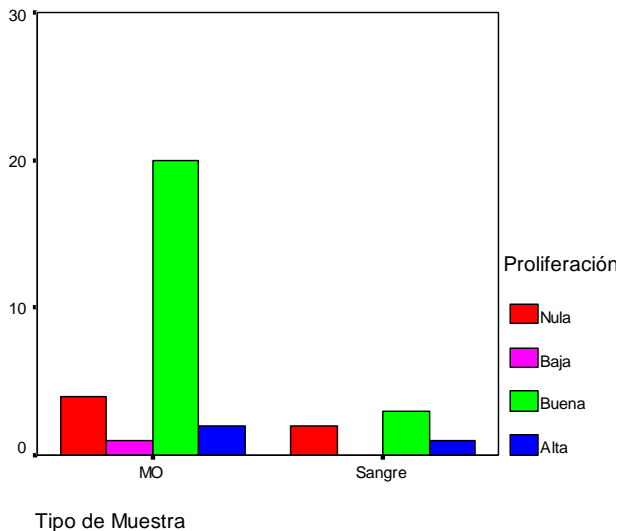


Figura 14: Tipo de Muestra vs. Proliferación

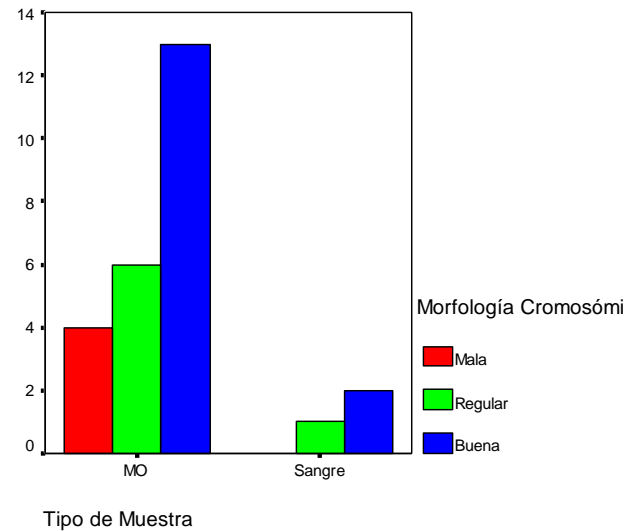


Figura 15: Tipo de Muestra vs. Morfología Cromosómica

Se analizó la proliferación, la presencia de células en metafase y la morfología cromosómica de acuerdo a la calidad de las muestras recibidas (**Figuras 16, 17, 18**); en primera instancia se podría afirmar que la obtención de una muestra de buena calidad, no asegura que la proliferación, la presencia de células en metafase y la morfología cromosómica sean buenas, en segunda instancia de la misma manera una muestra coagulada puede resultar buena según los tres criterios. Aun así se recomienda evitar la coagulación de la muestra porque no asegura que la proliferación sea efectiva, puesto que cuando la muestra esta coagulada ocurre muerte celular y que la mínima cantidad de células vivas no crezcan. Es posible que se haya rescatado la muestra coagulada, al disolverla en el medio de cultivo debido a que el tiempo entre la obtención de la muestra y la siembra fue muy corto.

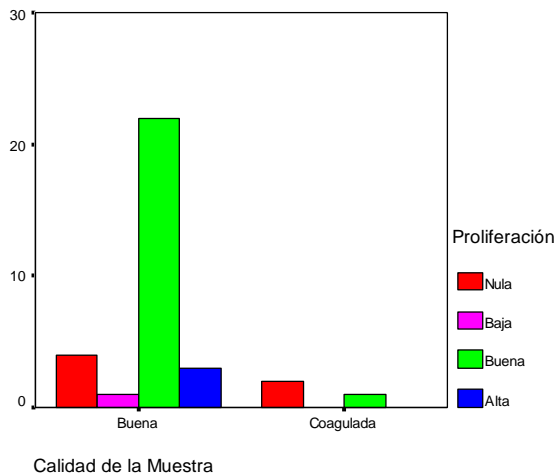


Figura 16: Calidad de la Muestra vs. Proliferación

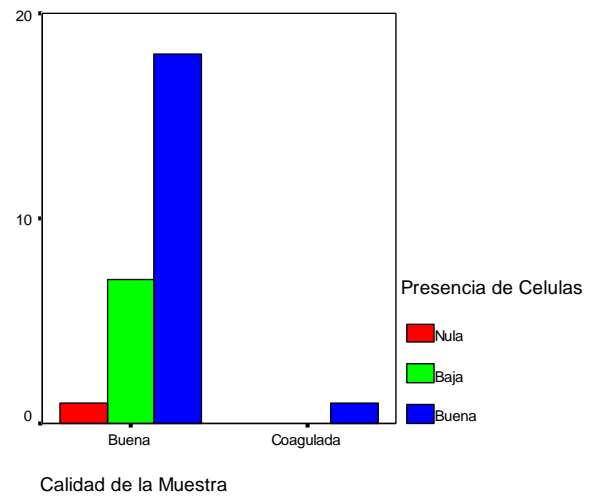


Figura 17: Calidad de la Muestra vs. Presencia de Células en Metafase

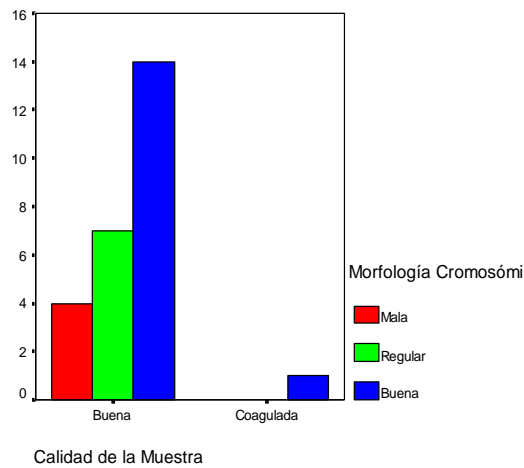


Figura 18: Calidad de la Muestra vs. Morfología Cromosómica

La **Figura 19** describe la relación entre la presencia de células en metafase y la proliferación, se puede ver como en la proliferación baja la presencia de células en metafase es baja, mientras que cuando la proliferación es alta la presencia de células en metafase es nula, baja y buena. No obstante cuando la proliferación fue buena se encontró que la presencia de células en metafase fue buena y pocas veces baja. Esto nos indica que cuando hay buena proliferación, asegura una mayor proporción de metafases, por el contrario cuando hay baja proliferación puede ocurrir que las pocas células no pudieran dividirse, y estas no llegaron a

metafase; o que si hubo divisiones, se perdieron en el procesamiento. Cuando el crecimiento celular fue alto, es posible que ocurra aglomeración celular, y ésta no permitiera que las células se alimentaran, causando una no adecuada división o muerte celular. En el último caso es posible que la cantidad de colcemid no alcanzara a llegar a las células en división. Todo lo anterior se puede prevenir si se calcula la cantidad de muestra a sembrar, tomando en cuenta los niveles celulares que presenten los pacientes en Hemograma (uno a diez millones de células por cultivo).

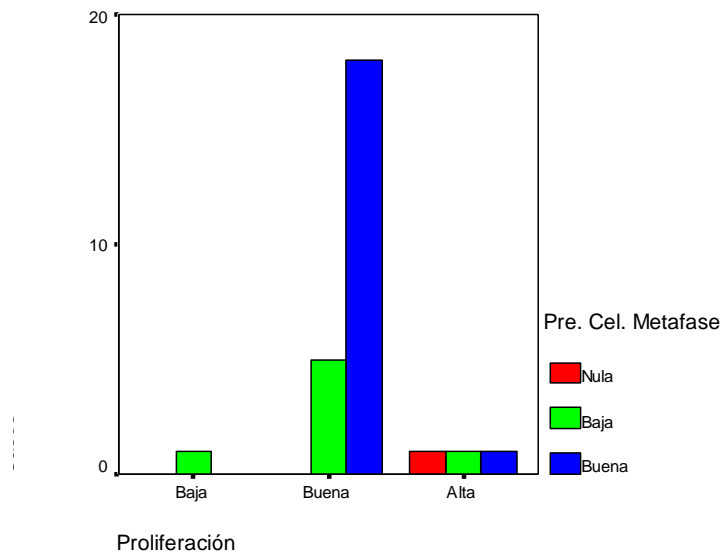


Figura 19 Proliferación vs. Presencia de Células en Metafase

En la **Figura 20**, se muestra que el único caso con baja proliferación presentó una morfología regular y cuando hubo proliferación alta, se presentó un caso con mala morfología y un caso con buena. Si se observa, cuando la proliferación fue buena en la mayoría de los casos la morfología cromosómica también fue buena y en una proporción menor, regular o mala. Esto permite deducir que una proliferación buena no asegura obtener una buena morfología, porque seguramente depende en mayor medida de otros factores como: el procesamiento de la muestra, el tipo de muestra, el diagnóstico entre otros.

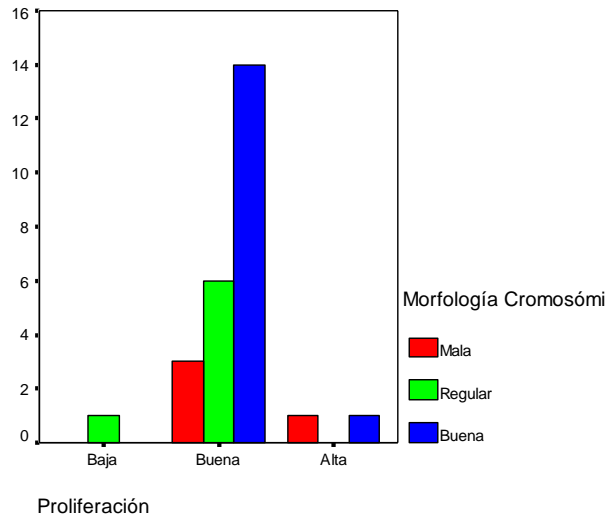


Figura 20: Proliferación vs. Morfología Cromosómica

Al observar el gráfico de la morfología cromosómica en función de la presencia de células en metafase en la **Figura 21**, se puede observar que cuando la presencia fue baja, la morfología fue mala y regular, por otro lado cuando la presencia fue buena la morfología cromosómica fue buena y pocas veces regular o mala, esto puede ser debido a que si se obtiene un mayor número de metafases hay mas probabilidad de encontrar metafases con buena morfología.

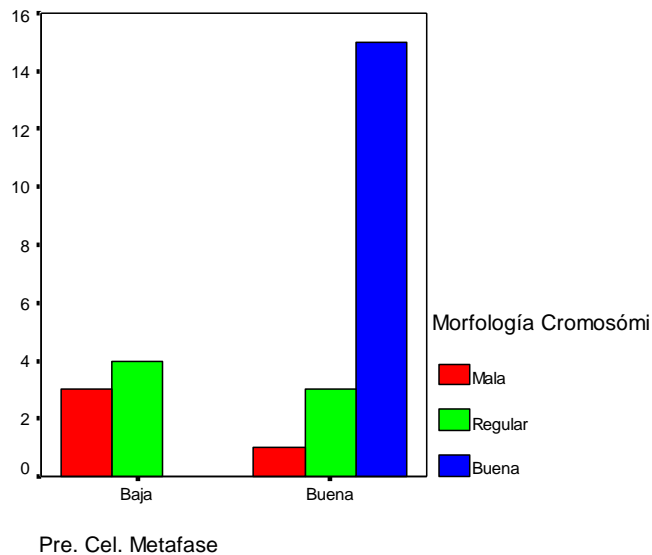


Figura 21: Presencia de Células en Metafase vs. Morfología Cromosómica

Se llevó a cabo un análisis de regresión lineal, con el fin de comparar la relación entre las células en metafase observadas y analizables; la que se obtuvo fue significativamente positiva ($R = 0,881$; $F = 107.339$; $SIG \leq 0,001$), lo cual muestra que el número de metafases analizables dependen en un 77,6% del número de las metafases observadas, como muestra la **Figura 22**, de lo anterior se deduce que la observación de una buena cantidad de metafases permite realizar un mejor análisis al microscopio y así obtener un diagnóstico citogenético.

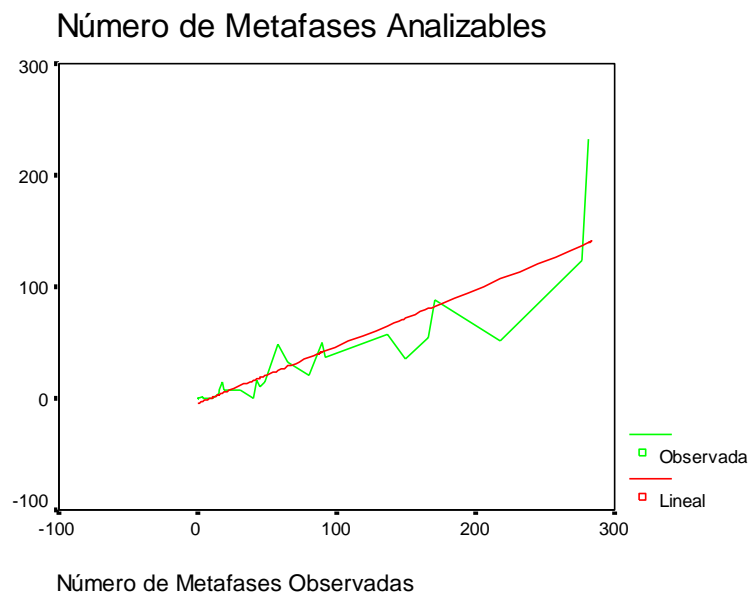


Figura 22: Numero de Metafases Observadas vs. Numero de Metafases Analizables

8.3. Alteraciones Cromosómicas

Se encontraron varias poliploidías en las muestras de pacientes con enfermedad de: Hodgkin, LLA, LLC, LMC y LMA. En uno de los casos de LLA se reportaron un juego de cromosomas hiperdiploide e hiperdiploide alto. Estas son muy importantes para los pronósticos de los pacientes con LLA sobre todo en niños. Cuando se encuentra hiperdiploidías con patrones de ganancias de cromosomas no al azar generalmente se obtiene un buen pronóstico, por el contrario, el pronóstico no es tan bueno cuando el patrón de ganancia es al azar (Heerema, *et*

al 2005). Lo mismo ocurre con un juego cromosómico alto hiperdiploide, pero este se considera un buen pronóstico a pesar de la presencia de otras anomalías menos favorables (Secker-Walker *et al*, 1978). En el linfoma de Hodgkin, las poliploidías son comunes, pero no han sido relacionadas con el padecimiento de la enfermedad (Swansbury 2003). La LMA no muestra muchas evidencias de relación entre las poliploidías con la enfermedad, sin embargo algunos casos hiperdiploides permiten la clasificación de grupos de pacientes con un pronóstico determinado (Luquet *et al* 2008).

El cromosoma Filadelfia pudo ser detectado en dos LMA y en una LMC. Estos pacientes podrían tener un pronóstico favorable gracias al desarrollo del imatinib un fármaco que contrarresta la proteína quimérica del gen mutado BCR-ABL, este es el medicamento más específico y eficaz en acción a esta alteración en relación a leucemia (Talpaz *et al*, 2006).

En 3 de los casos se pudo detectar rupturas cromatídicas y cromosómicas, este tipo de alteraciones han sido relacionados con la exposición a plaguicidas (Zeljezki y Garaj-Vrhovac, 2004; Das *et al*, 2007), por otra parte aunque no ha sido posible demostrar una relación directa entre los plaguicidas, las rupturas cromosómicas y la leucogénesis, se ha encontrado que la exposición a plaguicidas puede desencadenar una leucemia (Lafiura *et al*, 2007), al igual que se ha demostrado que este tipo de alteraciones aparecen en la médula ósea de ratones con una exposición prolongada a plaguicidas (Amer y Fahmy 2004).

9. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las leucemias marcan un problema de salud pública a nivel mundial, son la sexta causa de mortalidad en Colombia y la Quinta en el Cauca. A pesar de esta incidencia, en el país se presenta un mínimo de reportes y estudios realizados. Por lo tanto, se sugiere mayor atención en la influencia de este tipo de cáncer en nuestro departamento, por lo que se recomienda realizar sondeos y registros del padecimiento de esta enfermedad, para así determinar, cuales son más frecuentes y en que zonas del departamento se encuentra el mayor número.

La mayoría de los pacientes que participaron en el estudio fueron personas que trabajaban o han trabajado en la agricultura y están directamente en contacto con plaguicidas, además lo han hecho por mucho tiempo. Sería importante realizar estudios más completos donde se evalué la exposición prolongada a plaguicidas y su relación con las leucemias, demás neoplasias hematológicas, y otros tipos de cáncer en el departamento del Cauca.

Es útil conocer las fortalezas y aplicaciones, así como las debilidades y limitaciones de la citogenética convencional para saber cuando hacer uso de ella, además de que otras herramientas son apropiadas y cuales presentan la información requerida para un estudio específico a la hora de que un médico lo solicite. Es necesario tener en cuenta que existen pruebas que pueden dar falsos negativos o falsos positivos y se deben realizar estrategias para minimizar este tipo de casos.

La estandarización de la técnica de cultivo, es importante, por que permite confiabilidad en la utilización de las técnicas para la obtención de los cromosomas y el análisis Citogenético de las Leucemias, ya que, algunas veces no se obtienen resultados, esto se debe a varios factores como el recuento de glóbulos blancos,

porcentaje de blastos del paciente, también por el estado en que llega la muestra, la cantidad y la calidad de las metafases. Estos factores pueden ser limitantes a la hora de no obtener metafases o de no poder realizar un estudio Citogenético.

Las técnicas citogenéticas poseen algunas limitaciones, por ejemplo, no resultan ser suficientes a la hora de detectar niveles bajos de clones, además algunas traslocaciones muy finas, inserciones y deleciones no perceptibles al microscopio. Sin embargo, no dejan de ser una buena herramienta para elaborar pruebas genéticas, siendo las más disponibles actualmente para la elaboración de cariotipos y las mejores para identificación de nuevas alteraciones cromosómicas. De todas maneras en algunas situaciones es necesario complementarse con el uso de técnicas moleculares como FISH Y PCR RT.

Según la bibliografía encontrada especialmente en la recopilación hecha por Swansbury (2003), y lo observado en el desarrollo de este trabajo. A pesar de todo el esfuerzo que se hace para la estandarización de la técnica, en leucemias es difícil obtener gran cantidad de metafases y buena morfología de los cromosomas en todas las muestras, puesto que cada caso es particular debido a: el diagnóstico, el estado del paciente y el contenido de células sanguíneas. Es importante tener en cuenta estos aspectos, a la hora de realizar cambios sobre la técnica de cultivo, para llegar a un buen resultado citogenético.

La proliferación celular parece cumplir un papel muy importante en el cultivo de médula ósea y sangre de pacientes con leucemia, esta es influenciada por el diagnóstico y el estado del paciente, y al mismo tiempo influye en la cantidad y la calidad de las metafases que se puedan obtener. Por tal razón, es necesario saber con anterioridad el recuento de glóbulos blancos, con tal de determinar el número correcto de gotas de muestra que se van a cultivar para que la proliferación sea óptima. Por cada cultivo es necesario que haya alrededor de diez mil células blancas.

Para la obtención de metafases analizables, es conveniente tener en cuenta el tipo de muestra que se recibe, ya sea médula ósea o sangre, ese factor no solo influye en la posibilidad de éxito en la obtención de resultados, sino que también es importante para informar la veracidad y confiabilidad con la que se entregan los diagnósticos citogenéticos.

El éxito o fracaso es también dependiente de la calidad de los reactivos utilizados, razón por la cual si empiezan a ocurrir varias fallas en el desarrollo de la técnica, debería de ser investigadas pronto. Para este propósito es esencial mantener datos sobre la preparación, almacenamiento, fecha de vencimiento y procedencia de los reactivos que se utilizan.

Para poder descartar que la pobre morfología no sea debido a fallas técnicas, se recomienda repetir el cultivo. Es recomendable para ello guardar parte de la muestra de médula en refrigeración. Por otra parte es conveniente que el hematólogo tome suficiente muestra, si el estado del paciente lo permite, para poder realizar múltiples cultivos.

El estudio citogenético en neoplasias hematológicas es amplio, sin embargo estudios que se enfoquen en el análisis de la técnica de cultivo de médula ósea y sangre de pacientes con leucemia aún es muy escaso. Aun así es conveniente realizar revisiones bibliográficas a menudo, con el fin de encontrar nuevas alternativas de manejo de las técnicas o el descubrimiento de nuevos reactivos que faciliten y den más confianza en la obtención de resultados.

Muchas alteraciones están asociadas con las neoplasias hematológicas pero el valor pronóstico y terapéutico de las mismas es variable según el diagnóstico, por ejemplo en la LLA las poliploidias son importantes para el pronóstico de los pacientes (especialmente en niños) mientras que en el Linfoma de Hodgkin aunque son comunes no han sido relacionadas con la enfermedad.

Las rupturas cromosómicas fueron comunes en los diferentes diagnósticos obtenidos, estos aunque no han sido señalados directamente como causantes de la leucogénesis, parecen estar relacionados con la exposición a plaguicidas, los cuales se han considerado como factores de riesgo para el desarrollo de la leucemia, en especial por los solventes que poseen.

La implementación de la técnica de laboratorio permite establecer un sistema claro y definido para la obtención de resultados para ser correlacionados con el diagnóstico, pronóstico y seguimiento en el tratamiento de pacientes. La información recíproca entre el trabajo citogenético y el hematológico no solo es importante por que se pueden determinar los pasos a seguir en el tratamiento. Sino también para conocer el recuento de glóbulos blancos (alrededor de diez mil células blancas), que permiten determinar el número de gotas que se deben sembrar para el cultivo, además del tiempo de tomada la muestra y la entrega oportuna de ella por los hematólogos; así mismo en determinar el tiempo de reporte de los resultados obtenidos por los citogenetistas. Se debe por lo tanto realizar un trabajo interdisciplinario coordinado para poder dar un tratamiento al paciente que sea correcto, preciso y oportuno. Y de esta manera prestar un mejor servicio a la comunidad.

10. BIBLIOGRAFIA

- Atkin, N. B. Cytogenetics of Hodgkin's disease. 1998. *Cytogenet. Cell Genet.* 80, 23–27.
- Amer S., Fahmy M. Genotoxicity studies on the organophosphorous insecticide "malathion" in mouse bone-marrow. 2004. *Bulletin of the National Research Centre (Cairo)*. Vol. 29 (No. 1) 93-108
- Bennet J., Catovsky D., Daniel M., et al. The FAB Co-operative Group. Proposals for the clasiffication of the mielodisplastic syndromes. 1982. *Br. J. Haematol.* 51, 189-199.
- Berrio M., Correa M., Jimenez M. El hemograma: análisis e interpretación con las tres generaciones. 2003. Escuela de bacteriología Editorial Universidad de Antioquia. Colombia.
- Bloomfield C., Secker-Waker L., Goldman., et al. Six-year follow-up of the significance of karyotype in acute limphoblasstic leukemia. 1987. *The Sixth International Workshop on Chromosomes in Leukemia, London. Cancer Genet. Cytogenet.* 40, 171-185.
- Brunning D., Mckenna W. Tumors of the Bone Marrow. 1994. Editorial Advisory Borrard. Washington D.C. Pag: 19 – 142, 195 – 222.
- Calasanz M., Cigudosa J., Odero M., *et al.* Cytogenetic analisis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breackpoints and clynical correlations. 1997. *Genes Chromosomes Cancer* 18, 84-93.
- Calasanz M. Revisión de técnicas de citogenética convencional y molecular y su implicación en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. 2001. *ANALES Sis San Navarra*, Vol. 24, Suplemento 1.
- Ceballos J., Pinto D., Canto J. Incremento de aberraciones cromosómicas e intercambio de cromatides hermanas en personas sanas con exposición laboral a rayos X. *Revistas Biomédicas*. Vol: 13:76-82, 2000.

- Cervantes, F., Rozman, M., Urbano-Ispizua, A., Monserrat, E., and Rozman, C. A study of prognostic factors in blast crisis of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. 1990. *Br. J. Haematol.* 76, 27–32.
- Cervantes R. Leucemia mieloide crónica. 2000. Ediciones Doyma, S.A.
- Cullen M, Cherniack M, Rosenstock L. Occupational Medicine. 1990. *New Engl J Med*; 322: 675-83; Paul M. Occupational reproductive hazards. *Lancet* 1997; 349: 1385-8.
- Das P, Shaik A, Jamil K. Genotoxicity induced by pesticide mixtures: in-vitro studies on human peripheral blood lymphocytes. 2007 *Toxicol Ind Health.* Sep;23(8):449-58
- Dohner H., Stilgenbauer S., Benner, A., et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. 2000. *N. Engl. J. Med.* 343, 1910–1916.
- Espinet B., Salido M., Solé F. Técnicas de citogenética molecular y sus aplicaciones Hospital de Mar de Barcelona. 2005.
- Ferlay J., Bray F., Pisani P., Parkin D.M. GLOBOCAN 2002: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. 2005. IARC CancerBase No. 5. Lyon: IARC Press.
http://www-depdb.iarc.fr/globocan/ASP/GLOBOCAN/Table2_sel.html
- Forestier E., Gustafsson G., Von Heideman A., Heideman A., Heim S., Hernell O., et al. Prognostic impact of bone marrow karyotype in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Swedish experiences 1986-91. 1997. *Acta Paediatrica*; 86: 819-825.
- Forestier E. Gustafsson G., Von Heideman A., Heideman A., Heim S., Hernell O. Prognostic impact of karyotypic findings in childhood acute lymphoblastic leukaemia: Nordic series comparing two treatment periods. 2000. *Haematology*; 110> 147-153.
- Gibbons B., MaCallum P., Watts E., et al. Near haploide acute limphoblasstic leukemia: seven new cases and a review of the literature. 1991. *Leukemia* 5, 738-743.

- Grimwade D., Walker H., Oliver F., Wheatley K., Harrison C., Harrison G., et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. 1998. *Blood*; 92: 2322-2333.
- Guevara G., Medina V., García L., Cárdenas Y. Alteraciones cromosómicas en leucemias linfoides agudas; un estudio de nueve años en 632 pacientes: implicaciones en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y seguimiento de la enfermedad. 2001. *Acta Biológica Colombiana*, Vol. 6 No. 2.
- Harrison C., Martineau M., Secker-Walker L. The Leukemia Research Fund/United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Karyotype Database in acute lymphoblastic leukaemia: a valuable resource for patient management. 2001. *Br J Haematol*; 113: 3-10.
http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/esp_imagepages/1129ht
- Heerema N., Sather H., Sensel M., et al. Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17 and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (> 50 chromosomes). 2000. *J. Clin. Oncol.* 18, 1876–1887.
- Heerema N, Raimondi S, Anderson J, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. 2005. *Cancer Genet Cytogenet.* 92(1):8-10.
- Heim S., Mitelman F. *Cancer cytogenetics. Chromosomal and molecular genetic aberrations of tumor cells* 2^a Ed. 1995. Wiley - Liss, New York.
- Heim S., Alimena G., Billstrom R., et al. Tetraploide Kariotype (92 xxyy) in two patients with acute lymphoblastic leukemia. 1987. *Cancer Genet. Cytogenet.* 29, 129-133.
- Hillman R., Ault K., Rinder H. *Hematología en la práctica clínica.* 2006. McGraw-Hill Interamericana.
- Hiorns L., Min T., Swansbury G., Zelent A., Dyer M., and Catovsky D. Interstitial insertion of retinoic receptor- α gene in acute promyelocytic leukemia with normal chromosomes 15 and 17. 1994. *Blood* 83, 2946–2951.

- Instituto Nacional de Cancerología. Anuario Estadístico 2005: “Por el control del cáncer”. Volumen 4. 2007. Bogotá, D.C., Colombia. Pag. 17-27.
- Instituto Nacional de Cancerología. Anuario Estadístico 2006: “Por el control del cáncer”. Volumen 4. 2007. Bogotá, D.C., Colombia. Pag. 17-27.
- Juliusson G., Oscier D., Fitchett M., et al. prognostic subgroups in B-cell prolymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. 1990. N. Eng. J. Med. 323, 720-724.
- Lafiura K, Bielawski D, Posecion N *et al.* Association between prenatal pesticide exposures and the generation of leukemia-associated T(8;21). 2007. Pediatric Blood Cancer. Oct 15;49(5):607-8.
- Leiss J., Savitz D. Home pesticide use and childhood cancer: a case-control study. 1995. Am J Public Health. Feb;85(2):249–252
- Lens, D., De Schouwer, P. J. J. C., Hamoudi, R. A., et al. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. 1997. *Blood* 89, 2015–2023.
- Losada P. *et al.*, Trisomy 12 in Chronic Lymphocytic Leukemia: An Interphase Cytogenetic Study. The American Society of Hematology. 1991. *Blood*, VOI 78, NO 3 (August I): pp 775-779.
- Luquet I, Laï JL, Barin C *et al.* Hyperdiploid karyotypes in acute myeloid leukemia define a novel entity: a study of 38 patients from the Groupe Francophone de Cytogenetique Hematologique (GFCH). 2008 Department of Cytogenetic, Hôpital Robert Debré, Reims, France. Francophone de Cytogenetique Hematologique.
- Manascero A. Hematología herramienta para el diagnóstico. 2003. 20a Ed, Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.
- Merck & Co. Dohme de España, S.A Trastornos de la sangre: Leucemias. Manual Merck de Información medica para el hogar. 2005. España Sec: 14 Cap: 157.
http://www.msd.es/publicaciones/mmerck_hogar/leucemias.html
- Mitelman F., Mertens F., Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. 1997. Nat Genet; Spec No: 417-474.

- Moorman A., Clark R., Farrell D., Hawkins J., Martineau M., and Secker-Walker L. Modelling chromosome gain in hiperdiploid LLA: a Leukemia Research Fund United Kingdom Cancer Cytogenetics Group Study. 1995. Blood 86, 771a, Abstr. 3073.
- Panzera F., Pérez R., Panzera Y. Identificación cromosómica cariotipo humano. Sección Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias. Uruguay. 2004.
- Passmore S., Hann I., Stiller C., et al. Pediatric myelodysplasia: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. 1995. Blood 85, 1742-1750.
- Piñeros M., Ferlay J., Murillo R. 2006. Subdirección de Investigaciones, Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, DC, Colombia. Salud pública Méx. v.48 n.6 Cuernavaca.
- Sandberg A. The chromosomes in human cancer and leukemia, 2^a ed. 1996. Nueva York, Elsevier,
- Rosell M., Juan M., Rafecas R. Leucemias. 2004. Servicio de Hematología H. U. Dr Peset. Valencia.
- Rooney D., Czepulkowski B. Human cytogenetics. A practical approach, vol III. Malignancy and acquired abnormalities. 1990. Oxford, IRL Press at Oxford University Press.
- Secker-Walker L., Lawler S., y Hardisty R. Prognostic implications of chromosomal findings in acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. 1978. Br. Med. J. 23, 237-244.
- Shivdasani R. y Orkin S. The transcriptional control of hematopoiesis. 1996. Blood. 87: 4025-4039.
- Slavustsky I. Leucemias agudas. Impacto del diagnóstico citogenético en el resultado. 1999. Avances en medicina. Sociedad Argentina de medicina. Pag 213-221.
- Swansbury J. Cancer cytogenetics: Methods and Protocols. Methods In Molecular Biology. 2003. Humana Press. New Jersey, USA. Pag 1-171.
- Talpaz M., et al. El dasatinib en las leucemias con cromosoma Filadelfia positivo resistentes al imatinib. 2006. Volume 354:2531-2541 June 15,

Number 24 The New England Journal of Medicine. Massachusetts Medical Society.

- Tricot G., Barlogie B., Jagannath S., *et al.* Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosomes 13 or abnormalities involving 11q and not with karyotype abnormalities. 1995. *Blood* 86, 4250-4256.
- Van den Berghe H., Vermaelen K., Mecucci C., Barbieri D., y Tricot G. La anomalía 5q. 1985. *Cancer Genet. Cytogenet.* 17, 189-255.
- Vardiman, J.W., Harris, N.L. and Brunning, R.D.. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. 2002. *Blood* 100: 2292-2302.
- Vásquez G. *et al.* Leucemia linfocítica aguda: estudio citogenético en niños atendidos en el Hospital Universitario San Vicente de Paúl de Medellín en el período 1998-2001. 2002. *IATREIA*, VOL 15: No.4, DICIEMBRE.
- Vieira V., Ozonoff D. Environmental Causes of Blood-related Cancers in Children. 2003. Department of Environmental Health, Boston University School of Public Health. Pag. 1-3.
- Zeljezic D., Garaj-Vrhovac V. Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. 2004. *Toxicology*. Jul 15;200(1):39-47



Universidad
del Cauca

ANEXO 1
CONSENTIMIENTO INFORMADO
ESTUDIO CITOGÉNÉTICO DE PACIENTES CON LEUCEMIA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
UNIDAD DE GENÉTICA HUMANA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Yo _____, mayor de edad, identificado(a) con cedula de ciudadanía número _____ de _____, he sido informado(a) que Mary Bolaños Palacios realizará un “Estudio de Alteraciones Cromosómicas en Médula Ósea y Sangre Periférica de Pacientes con Leucemia en el Departamento del Cauca” en la Unidad de Genética Humana de la universidad del Cauca. Estudio para el cual se me ha solicitado participar voluntariamente.

Objetivo del estudio:

El objetivo general es identificar cuales alteraciones cromosómicas se hallan en pacientes con diagnóstico de Leucemia de una población del Cauca, y contribuir con la búsqueda de herramientas, para obtener un pronóstico más confiable en pacientes que vayan a recibir tratamiento y/o que están recibiendo.

Los resultados se darán a conocer a la comunidad científica, servirán de objeto de estudio para posteriores investigaciones o de registro para estadísticas de la población.

Requerimiento:

Yo en pleno uso de mis facultades mentales, libre y conciente, estoy de acuerdo en participar en este estudio y entiendo que este requiere de mi lo siguiente: contestar una encuesta de 10 minutos aproximadamente, en la que suministro datos como mi edad, estado de salud, ocupación, historia familiar. Al ser seleccionado (a) para el estudio, debo donar una muestra de sangre de Médula Ósea de 2 a 3 ml, mediante un aspirado del hueso sacro, que se tomará antes del tratamiento con quimioterapia y, si es posible, otra muestra luego del tratamiento en el transcurso de un mes o dos meses.

Este aspirado se tomará en el laboratorio de hematología por personal especializado donde la muestra tiene como finalidad un examen hematológico. El estudio Citogenético, se desarrollará en el laboratorio de la Unidad de Genética Humana de la Universidad del Cauca, y se analizará para la identificación de Alteraciones Cromosómicas.

RIESGO DE PARTICIPACIÓN

Los pacientes que participan en el estudio pueden sufrir contaminación en el sitio de la toma de la muestra, los cuales serán controlados por un profesional experto y el empleo de técnicas médicamente aceptadas, utilizando jeringas con agujas nuevas y estériles con heparina. Cada muestra será codificada y los resultados se darán a conocer en forma individual.

APORTE CIENTIFICO

Los resultados del estudio permitirán el apoyo de posteriores estudios, el conocimiento a cerca del pronóstico y de los efectos secundarios causados por la exposición a diferentes medicamentos utilizados en la quimioterapia, para que de esta manera, especialistas de esta área, puedan elegir el tratamiento adecuado.

YO HE SIDO INFORMADA SOBRE LOS OBJETIVOS, PROPÓSITOS, JUSTIFICACIÓN, METODOLOGIA, RIESGOS Y BENEFICIOS CIENTIFICOS DEL ESTUDIO.

La participación en este estudio admite un mínimo riesgo contra mi. En el estudio serán seleccionados, aproximadamente 20 personas con diagnóstico Hematológico. El propósito de esta investigación tiene relevancia social, científica y obedece a una problemática de salud pública. Los resultados se le informaran al paciente, explicándole la importancia que tiene este estudio para furas investigaciones.

YO ENTIENDO QUE

Mi participación es completamente voluntaria y puedo rehusarme a responder cualquier pregunta si así lo deseo, que un familiar conteste por mi o de tomar la decisión de finalizar mi participación en este monitoreo, en cualquier momento, sin que ello me genere o cause discriminaciones raciales, políticas, económicas, sociales, laborales de ninguna índole. La información será tratada de manera confidencial y mis respuestas, serán analizadas exclusivamente para relacionarlas al estudio.

La Universidad del Cauca, se compromete a vigilar que las muestras de sangre serán obtenidas por un profesional experto y autorizado, de forma aséptica, para evitar inconvenientes.

Puedo preguntar cualquier inquietud o duda que tenga, durante o después del estudio a la Magíster Sulma lilian Muñoz Benitez o a la estudiante Mary Bolaños de la Universidad del Cauca, en el Laboratorio de Genética Humana en la Facultad de Medicina, Popayán. En el teléfono 8209872, Ext: 2614.

Los procedimientos alternativos principales, incluyendo procedimientos experimentales del estudio, me ha sido explicado en un lenguaje claro que yo he podido entender. Los riegos y molestias que pueden presentarse, me han sido explicados claramente. Los resultados de este estudio podrán se divulgados y/o publicados en revistas científicas en forma individual o grupal, sin que se den nombres.

He leído este consentimiento, he entendido en que consiste el estudio y también me fueron aclaradas mis dudas al respecto, en consecuencia voluntariamente acepto participar como sujeto de estudio en el monitoreo biológico **“ESTANDARIZACION DE LA TECNICA DE CULTIVO DE MÉDULA ÓSEA PARA LA EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA DE ALTERACIONES CROMOSÒMICAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFOIDE Y MIELOIDE”**

Nombre del participante

Firma del participante

Nombre del Testigo

Firma del Testigo

Director del proyecto

Firma Director del proyecto

Firma en la ciudad de Popayán a los _____ días del mes de _____ del 2006


ANEXO 2
ENCUESTA ESTUDIO CITOGENÉTICO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
UNIDAD DE GENETICA HUMANA
UNIVERSIDAD DEL CAUCA

Fecha: _____ No de muestra: _____

No de Historia: _____		Centro de salud: _____		
Nombre: _____				
Edad: _____	Sexo: _____	Estado civil: Soltero () - Casado ()	No. Hijos: _____	
Lugar de nacimiento: _____		Lugar de residencia: _____		
Dirección: _____		Barrio: _____	Teléfono: _____	
Ocupación: _____	Tiempo Laboral: _____	Teléfono del trabajo: _____		
Grupo Étnico:	Blanco	Mestizo	Negro	
Padre: _____		Madre: _____		
No de hermanos: _____		Hermanos Gemelos (Si) (No)		
EXPOSICIÓN	Humo de leña: (si) – (no)		_____	
	Cigarrillo: (si) – (no)	No de paquetes al día:	Años: _____	
	Consumo Bebidas Alcohólicas: (si) - (No)		Frecuencia: _____	
	Radiaciones:	UV	Rayos X	Otros: _____
	Químicos:	Benceno: _____		
		Plaguicidas u Otros: _____		
	Fungicidas:	Tipo: _____		
	Líneas de alto voltaje: _____			
DIETA	Consumo frutas y vegetales (Si) – (No)		Frecuencia: _____	
HISTORIA	Diagnóstico: _____		Tiempo de estar enfermo: _____	
	Ha recibido tratamientos: (si) - (no)		De que tipo: _____	
	Esta recibiendo tratamiento:(si)–(no)		De que tipo: _____	
	Anemias: (Si) - (No)	Edad de padecimiento: _____	Tiempo: _____	
	Enfermedades infecciosas: (Si) – (No)		De que tipo: _____	
	Consumo algún tipo de medicamento: (Si) – (No)		_____	
ANTECEDENTES	Anemia: (si) – (no)		_____	
	Cáncer: _____			
FAMILIARES	Leucemia: (si) – (no)		Tipo: _____	
	Enfermedades: _____			

ANEXO 3

REGISTRO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

 Universidad del Cauca	<h2 style="margin: 0;">FORMATO DE LECTURA DE PLACAS</h2>
---	--

Caso No: ____ **Fecha (D/M/A):** _____

No. de Metaf.	Placa No.	Coordenadas	No Cromosómico	Grupo D.	Grupo G.	Observaciones
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
34						
35						
36						

Reporte:

Firma de quien leyó: _____ **Fecha:** _____

ANEXO 4

RESULTADOS CRITERIOS DE EVALUACIÓN TÉCNICA DE CULTIVO

Diagnostico	Tipo de Muestra	Calidad de la Muestra	Proliferación	Pre. Cel. Metafase	Metafases Observadas	Morfología	Metafases Analizables
LLA	MO	Buena	Buena	Baja	10	Mala	0
LLA	MO	Buena	Buena	Buena	40	Mala	0
LNH	MO	Buena	Buena	Baja	15	Regular	4
HD	MO	Buena	Buena	Buena	65	Buena	33
LLC	MO	Buena	Buena	Buena	171	Buena	88
MOM	MO	Buena	Buena	Buena	276	Buena	123
LNH	MO	Buena	Buena	Baja	4	Mala	0
HEM	MO	Buena	Buena	Buena	31	Regular	7
LMA	MO	Buena	Buena	Buena	45	Regular	10
LNH	MO	Buena	Buena	Buena	80	Buena	20
MM	MO	Buena	Buena	Buena	136	Buena	58
No Dx	MO	Buena	Buena	Buena	166	Buena	55
Tromb	MO	Coagulada	Buena	Buena	42	Buena	16
LLA	MO	Coagulada	Baja	Nula	0	No Aplica	0
MM	MO	Buena	Buena	Buena	150	Buena	36
LLA	MO	Buena	Buena	Baja	15	Regular	8
LMA	MO	Buena	Buena	Buena	58	Buena	48
LLA	MO	Buena	Buena	Baja	19	Regular	7
LMA	MO	Buena	Buena	Buena	18	Buena	15
Mielod	MO	Buena	Buena	Buena	15	Buena	8
LP	MO	Buena	Alta	Baja	8	Mala	0
LLA	MO	Buena	Baja	Nula	0	No Aplica	0
LMC	MO	Buena	Alta	Buena	281	Buena	233
LLC	MO	Buena	Baja	Baja	3	Regular	1
LLA	MO	Buena	Buena	Buena	89	Buena	50
LMC	MO	Buena	Baja	Nula	0	No Aplica	0
LLA	MO	Coagulada	Baja	Nula	0	No Aplica	0
LLC	Sangre	Buena	Buena	Nula	0	No Aplica	0
LLA	Sangre	Buena	Buena	Buena	218	Buena	51
LPA	Sangre	Buena	Buena	Buena	92	Buena	37
LLA	Sangre	Buena	Buena	Buena	48	Regular	15
LMC	Sangre	Buena	Alta	Nula	0	No Aplica	0
LMA	Sangre	Buena	Baja	Nula	0	No Aplica	0

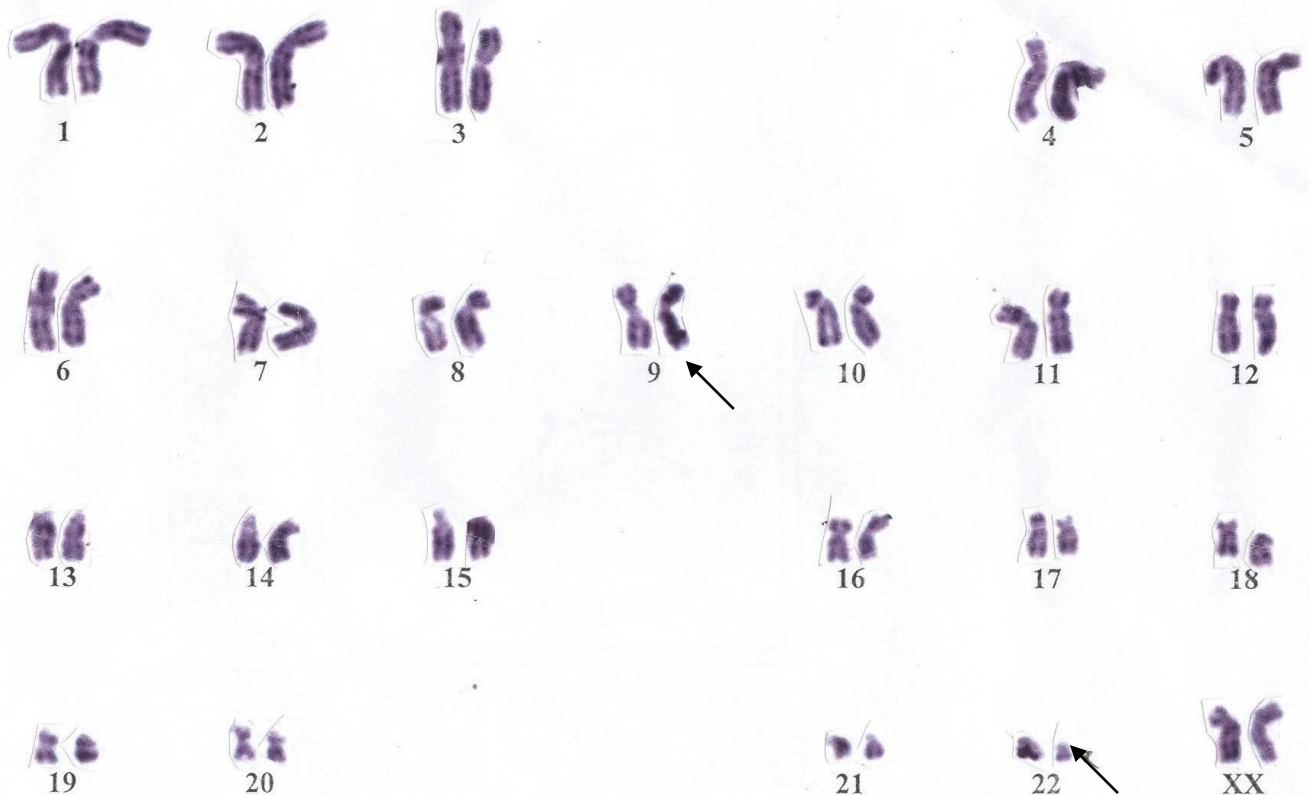


Universidad
del Cauca

ANEXO 5 CARIOTIPOS

CARIOTIPO

Tipo de cultivo: Blastos de medula ósea.
Técnica de bandas: R
Diagnóstico Clínico: LMC
Diagnóstico Citogenético: 46XX, t(9;22).





Universidad
del Cauca

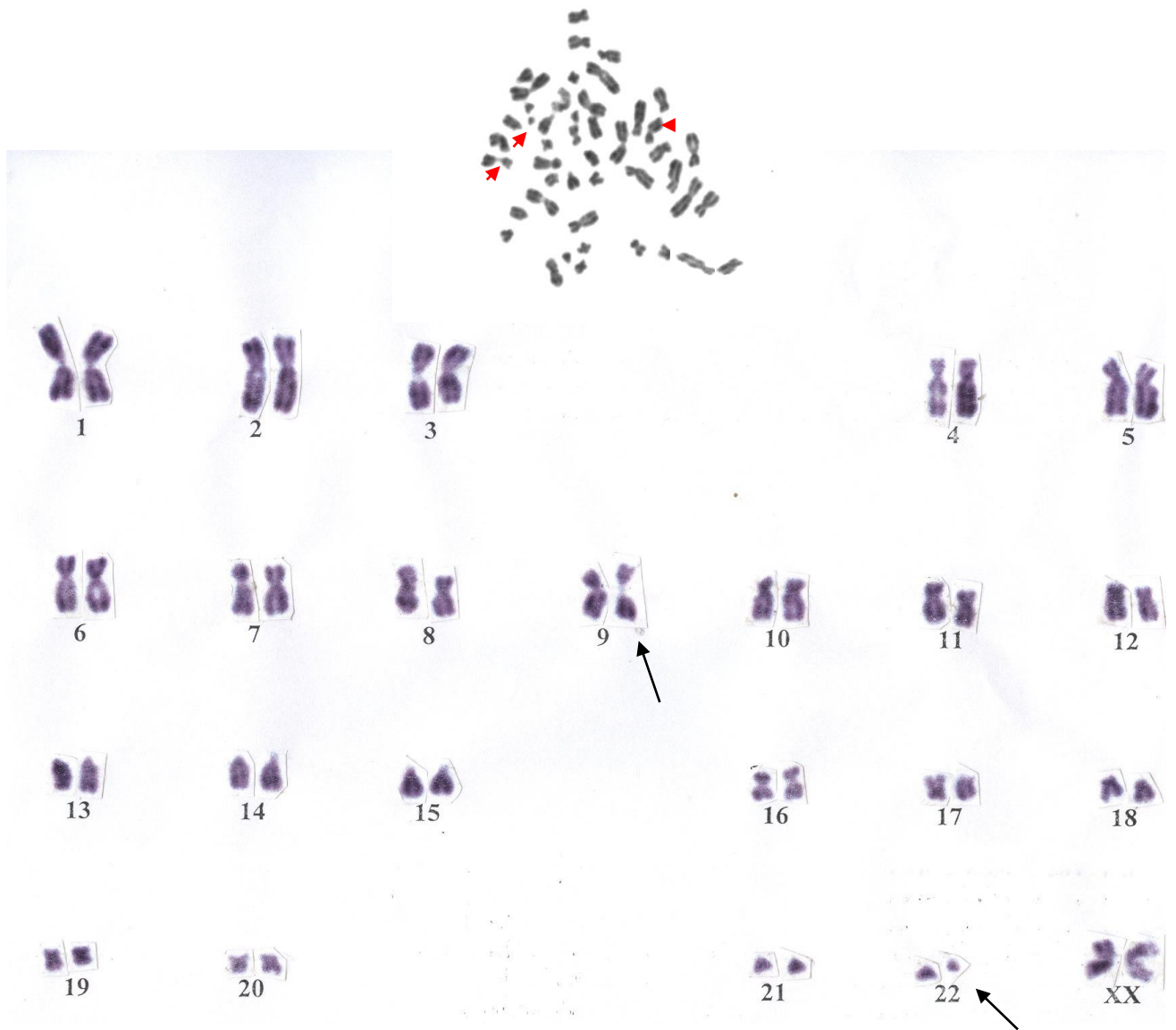
CARIOTIPO

Tipo de cultivo: Blastos de medula ósea.

Técnica de bandas: R

Diagnóstico Clínico: LMA

Diagnóstico Citogenético: 46XX, t(9;22)





Universidad
del Cauca

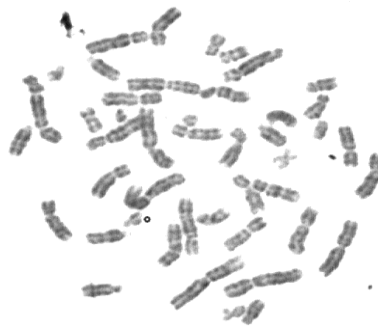
CARIOTIPO

Tipo de cultivo: Blastos de medula ósea.

Técnica de bandas: R

Diagnóstico Clínico: Médula ósea Megaloblástica.

Diagnóstico Citogenético: 46XY





Universidad
del Cauca

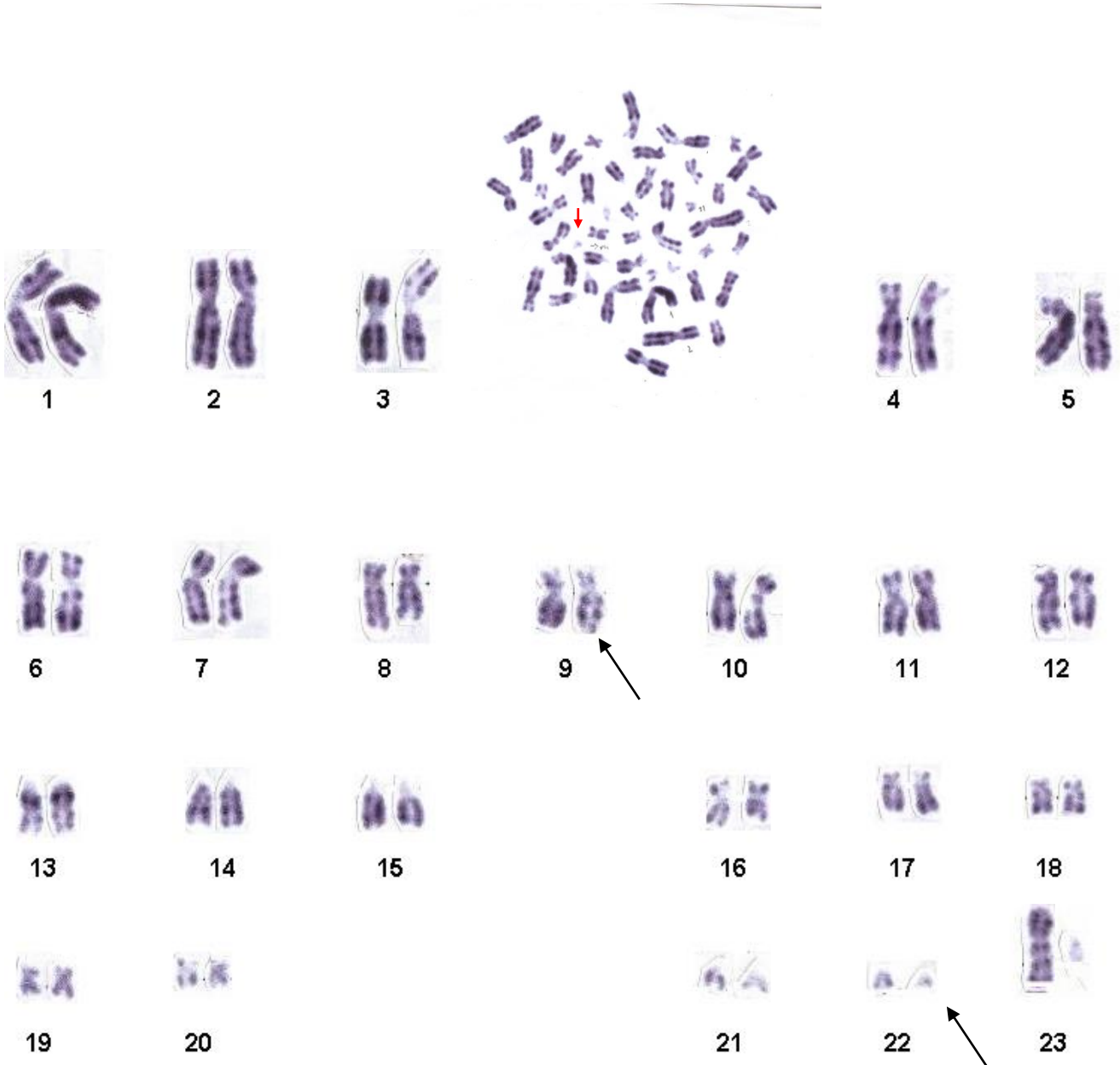
CARIOTIPO

Tipo de cultivo: Blastos de medula ósea.

Técnica de bandas: R

Diagnóstico Clínico: LMA

Diagnóstico Citogenético: 46XY





Universidad
del Cauca

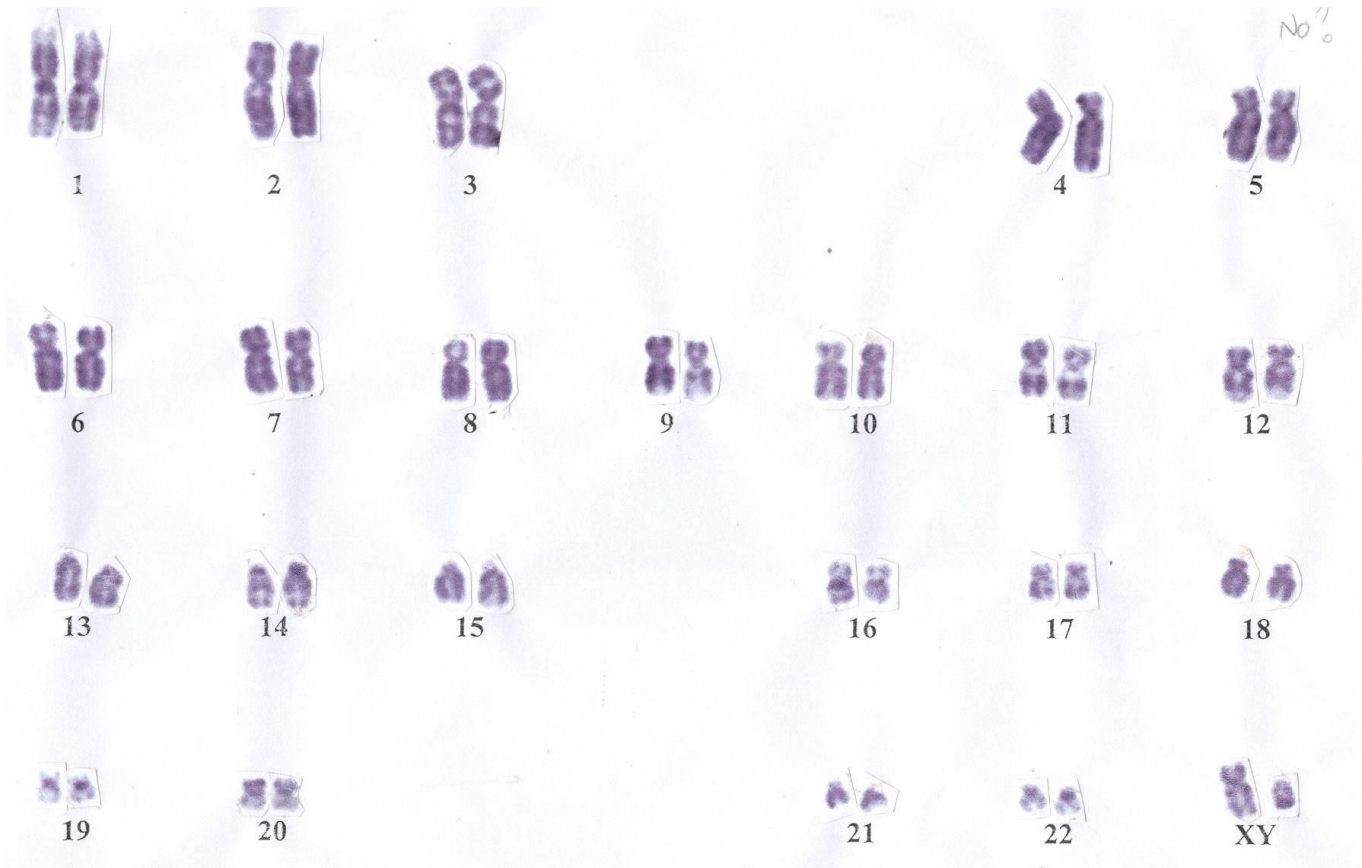
CARIOTIPO

Tipo de cultivo: Blastos de medula ósea.

Técnica de bandas: R

Diagnóstico Clínico: Medula Ósea Megaloblástica

Diagnóstico Citogenético: 46XY





Universidad
del Cauca

CARIOTIPO

Tipo de cultivo: Blastos de medula ósea.

Técnica de bandas: R

Diagnóstico Clínico: LLA

Diagnóstico Citogenético: 46XY

