

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR



"DETECCION DE TRISOMIA 12 EN SINDROMES
LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS Y REORDENAMIENTO BCR-ABL
EN LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA, MEDIANTE LA TECNICA DE
HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE"

María Esther Rendal Vázquez

1995

UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR Y MOLECULAR



**“DETECCION DE TRISOMIA 12 EN SINDROMES
LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS Y REORDENAMIENTO BCR-ABL
EN LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA, MEDIANTE LA TECNICA DE
HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE”**

María Esther Rendal Vázquez

1995

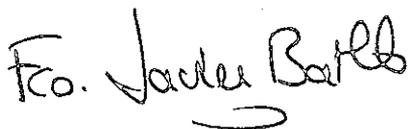
D. FRANCISCO JAVIER BATLLE FONRODONA, DÓCTOR EN MEDICINA

INFORMA:

Que la presente Memoria titulada " **DETECCION DE TRISOMIA 12 EN SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS Y REORDENAMIENTO BCR-ABL EN LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA, MEDIANTE LA TECNICA DE HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE**", que para optar al Grado de Doctor presenta Dña. **María Esther Rendal Vázquez**, ha sido realizada bajo mi dirección y, considerándola finalizada, autorizo su presentación al Tribunal Calificador.

La Coruña, a 23 de Marzo de 1995.

Vº Bº



Fdo. Prof. Dr. D. Javier Batlle Fonrodona.
Director de la Tesis Doctoral.



Esperanza Cerdán Villanueva
Tutora de la Tesis Doctoral.



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

JOSEFINA MENDEZ FELPETO, CATEDRÁTICA DE GENÉTICA Y DIRECTORA
DEL DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA
UNIVERSIDAD DE LA CORUÑA

AUTORIZA la presentación a la Comisión de Doctorado de la
Tesis Doctoral "Detección de trisomía 12 en Síndromes
linfoproliferativos crónicos y reordenamiento bcr-abl en
Leucemia mieloide crónica, mediante la técnica de Hibridación
in situ fluorescente" realizada en el Servicio de Hematología
y Hemoterapia del Hospital Juan Canalejo-Teresa Herrera de La
Coruña por Dña. María Esther Rendal Vázquez y dirigida por el
Dr. Francisco Javier Batlle Fonrodona.

La Coruña, a 23 de Marzo de 1.995.



Josefina Méndez

Fdo. Josefina Méndez Felpeto
Directora del Departamento

A mis padres.

La ciencia es para nosotros en la vejez un cómodo refugio, pero no nos dará entonces sombra si no la hemos planteado de jóvenes.

P. Stanhope Chesterfield

En lo tocante a la ciencia, la autoridad de un millar no es superior al humilde razonamiento de una sólo persona.

Galileo Galilei

AGRADECIMIENTOS

Son bastantes las personas que por una u otra razón relaciono con este trabajo. Gracias a todos, que atendiendo, aconsejando o comprendiendo me han ayudado.

Al Doctor Francisco Javier Batlle Fonrodona y a la Doctora M^a Fernanda López Fernández, por su incondicional apoyo y constante motivación. Sin su ayuda este trabajo hubiera sido imposible.

A todas las personas que trabajan en el Servicio de Hematología del Hospital Juan Canalejo-Teresa Herrera de La Coruña por su ayuda y enseñanzas imprescindibles para la realización de este trabajo.

Al Servicio de Hematología del Hospital Universitario de Salamanca así como a María Pereira-Leahy, por su colaboración desinteresada, facilitándonos la enseñanza de algunas metodologías.

Al Servicio de Citología del Hospital Teresa Herrera de La Coruña y muy especialmente al Doctor Ernesto García Ureta, por su ayuda facilitándonos el uso de parte de la infraestructura necesaria para la elaboración de esta Tesis Doctoral.

A Ignacio, Ricardo y Pedro por su ayuda en la elaboración de las fotos y en el trabajo estadístico.

A mi familia, pero muy especialmente a mis padres, por su apoyo y ánimo constante en todos los momentos, sin cuya ayuda realmente este trabajo no hubiera sido posible.

Por último, a mis amigos y también mención especial a Esther y a Teresa, por su apoyo y sus animadoras charlas.

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al apoyo de la Xunta de Galicia, mediante una Bolsa de Tercer Ciclo los años 1990-91 y 1991-92, y posteriormente, una Beca Predoctoral, años 1992-93 y 1993-94. Asimismo, ha sido realizada en parte merced al Proyecto Fis# 89-91/0780 (Fondo de Investigación Sanitaria, INSALUD).

**GLOSARIO DE
ABREVIATURAS**

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

- abl:** Oncogén Abelson.
- ADN:** Acido desoxirribonucleico.
- AHAI:** Anemia hemolítica autoinmune.
- ALTMO:** TMO alógeno.
- AMCA:** Amino metil cumarina.
- ANAE:** Alfa naftil acetato esterasa.
- ARN:** Acido ribonucleico.
- ATMO:** TMO autólogo.
- bcr:** "Breakpoint cluster region".
- BMO:** Biopsia de médula ósea.
- CHOP:** Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona.
- COP:** Ciclofosfamida, vincristina, prednisona.
- CRD:** Células reticulares dendríticas.
- Cromosoma Filadelfia:** Cromosoma Ph.
- DABCO:** 1,4 diazabicyclo (2,2,2) octano.
- DAPI:** 4,6 diamino-2-fenil indol 2CIH
- DHAP:** Dexametasona, Ara-C a altas dosis, platino.
- DE:** Desviación estandar.
- EH:** Enfermedad de Hodgkin.
- FAG:** Fosfatasa alcalina granulocítica.
- FC:** Fracaso completo.
- FITC:** Isotiocianato de fluoresceína.
- Hb:** Hemoglobina.
- HIS:** Hibridación "in situ".
- ICT:** Irradiación corporal total.
- INF α :** Interferón alfa.
- Ig:** Inmunoglobulina.
- Igs:** Inmunoglobulinas.
- IP:** Ioduro de propidio.
- IWCLL:** "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia".
- LB:** Linfocitos B.
- LDH:** Lactato-deshidrogenasa.
- LH-D:** Linfoma histiocítico, difuso.
- LH-N:** Linfoma histiocítico, nodular.
- LLA:** Leucemia linfoblástica aguda.
- LLBD-D:** Linfoma linfocítico bien diferenciado, difuso.
- LLC:** Leucemia linfática crónica.
- LLCB:** LLC de origen B.
- LLCP:** Linfoma linfocítico de células pequeñas.
- LLCT:** LLC de origen T.

LLMD-D: Linfoma linfocítico mal diferenciado, difuso.
LLMD-N: Linfoma linfocítico mal diferenciado, nodular.
LMC: Leucemia mieloide crónica.
LM-D: Linfoma mixto, difuso.
LM-N: Linfoma mixto, nodular.
LNH: Linfoma no Hodgkin.
LP: Leucemia prolinfocítica.
LPS: Lipopolisacáridos.
LT: Linfocitos T.
Mbcr: "Major breakpoint cluster region".
mbcr: "Minor breakpoint cluster region".
MIME: Metil-GAG, ifosfamida, metotrexato, VP-16.
MO: Médula ósea.
MTT: Masa tumoral total.
NCI: "National Cancer Institute".
PBS: Tampón fosfato salino.
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PHA: Fitohemaglutinina.
RC: Remisión completa.
RP: Remisión parcial.
RFLPs: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica.
rpm: Revoluciones por minuto.
SLP: Síndrome linfoproliferativo.
SLPc: Síndrome linfoproliferativo crónico.
Smlg: Inmunoglobulina de superficie.
SMPc: Síndrome mieloproliferativo crónico.
SNC: Sistema nervioso central.
SP: Sangre periférica.
TA: Temperatura ambiente.
Test de Coombs directo: "Test" directo antiglobulina.
TDL: Tiempo necesario para doblar el conteo de linfocitos en sangre.
TM: Temperatura de fusión.
TMO: Transplante de médula ósea.
TPA: Acetato de tetra decanoil forbol.
TRITC: Tetra metil rodamina.
VCM: Volumen corpuscular medio.
VEB: Virus de Epstein-Barr.
VSG: Velocidad de sedimentación globular.

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCION.....	1
I.- SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS DE EXPRESION LEUCEMICA.....	3
I.1. Clasificación.....	3
I.1.1. SLPc con expresión leucémica de origen B.....	4
I.1.1.1. Leucemia linfática crónica.....	4
1.1.1.1.a. Progreso en LLC: una prespectiva histórica.....	4
1.1.1.1.b. Período de reconocimiento de LLC como una entidad distinta: 1845-1924.....	4
1.1.1.1.c. Período de definición precisa y descripción clínica de LLC: 1924-1973.....	5
1.1.1.1.d. La era moderna: 1973-1994.....	5
1.1.1.1.e. La LLC forma típica.....	6
e.1. Frecuencia.....	6
e.2. Etiopatogenia.....	6
e.3. Fisiopatología.....	6
e.4. Cuadro clínico.....	7
e.5. Datos de laboratorio.....	8
e.6. Diagnóstico.....	8
e.7. Pronóstico.....	9
e.8. Otros sistemas de clasificación.....	11
e.9. Otros parámetros pronósticos.....	12
1.1.1.1.f. LLC latente.....	14
1.1.1.1.g. Tratamiento de la LLC.....	15
1.1.1.1.h. Valoración de la respuesta.....	17
1.1.1.1.i. La LLC forma atípica.....	17
I.1.1.2. Leucemia de células peludas (Tricoleucemia).....	18
1.1.2.a. Cuadro clínico.....	18
1.1.2.b. Datos de laboratorio.....	18
1.1.2.c. Diagnóstico.....	19
1.1.2.d. Pronóstico.....	19
1.1.2.e. Tratamiento.....	19
I.1.1.3. Enfermedades ganglionares: Linfomas malignos.....	20
1.1.1.3.a. Clasificación.....	20
a.1. Linfomas no Hodgkin.....	21
a.1.1. Etiología.....	21
a.1.2. Frecuencia, edad y sexo.....	21
a.1.3. Clasificación.....	21
a.1.4. Anatomía patológica.....	23
a.1.5. Cuadro clínico.....	25

a.1.6. Otras manifestaciones.....	26
a.1.7. Datos de laboratorio.....	26
a.1.8. Diagnóstico.....	27
a.1.9. Estudio de extensión.....	27
a.1.10. Pronóstico.....	28
a.1.11. Tratamiento.....	28
a1.11.1. Linfomas de bajo grado de malignidad.....	28
a.1.11.2. Linfomas de grado intermedio y alto de malignidad.....	30
a.1.11.3. Valoración de la respuesta al tratamiento.....	31
I.1.2. SLPc con expresión leucémica de origen T.....	32
I.1.2.1. Leucemia linfática crónica T.....	32
1.2.1.a. Cuadro clínico.....	32
1.2.1.b. Datos de laboratorio.....	32
1.2.1.c. Diagnóstico.....	33
1.2.1.d. Tratamiento.....	33
I.1.2.2. Linfomas cutáneos de células T con expresión leucémica (Síndrome de Sézary).....	33
1.2.2.a. Cuadro clínico.....	33
1.2.2.b. Diagnóstico.....	34
1.2.2.c. Pronóstico.....	34
1.2.2.d. Tratamiento.....	34
 II.- SINDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRONICOS.....	34
II.1. Leucemia mieloide crónica.....	34
II.1.1. Concepto.....	34
II.1.2. Etiología, patogenia, incidencia y sexo.....	35
II.1.3. Cuadro clínico.....	35
II.1.4. Datos de laboratorio.....	35
II.1.5. Formas clínicas.....	37
II.1.6. Evolución y pronóstico.....	38
II.1.7. Fase de aceleración y crisis blástica.....	38
II.1.8. Tratamiento.....	39
 III.- CITOGENETICA EN LLC Y DESORDENES RELACIONADOS.....	40
III.1. SLPc con expresión leucémica de origen B.....	42
III.1.1. Leucemia linfática crónica B.....	43
1.1.1. Estudios moleculares de anomalías cromosómicas en LLC.....	45
1.1.2. Hallazgos cromosómicos y pronóstico.....	46
1.1.3. Origen y mecanismo de la trisomía 12.....	48
III.1.2. Leucemia de células peludas (Tricoleucemia).....	49
III.1.3. Fases leucémicas de los LNH.....	51
1.3.1. Linfoma linfocítico de células pequeñas.....	51

1.3.2. Linfomas foliculares.....	51
1.3.3. Linfomas difusos.....	51
III.2. SLPc con expresión leucémica de origen T.....	52
III.2.1. Leucemia linfática crónica T.....	52
III.2.2. Linfomas cutáneos de células T con expresión leucémica (Síndrome de Sézary).....	52
IV.- ASPECTOS HISTORICOS Y DESCRIPTIVOS DE LA TECNICA DE HIS FLUORESCENTE.....	53
IV.1. Esquema de marcaje de la sonda.....	55
IV.2. Detección de sondas hibridadas.....	55
IV.3. Sondas para HIS.....	56
IV.3.1. Sondas para estructuras cromosómicas específicas.....	56
IV.3.2. Sondas complejas o librerías.....	57
IV.3.3. Sondas dirigidas frente a genes, locus o subregiones más o menos amplias del genoma.....	57
IV.4. Instrumentación óptica e imagen digital.....	58
IV.5. Aplicaciones de HIS fluorescente.....	58
IV.6. Ventajas y limitaciones de HIS fluorescente.....	59
IV.7. Recientes desarrollos en HIS fluorescente.....	62
II. PROYECTO DE TRABAJO Y OBJETIVOS CONCRETOS.....	63
III. MATERIAL Y METODOS.....	67
I.- MATERIAL.....	69
I.1. Sujetos normales.....	69
I.2. Pacientes.....	71
I.3. Reactivos.....	74
I.4. Preparación de reactivos.....	76
I.5. Tampones.....	78
II.- METODOS.....	79
II.1. Método de HIS fluorescente en células para la detección de la trisomía 12.....	79
II.1.1. La sonda de ADN.....	79
II.1.2. Preparación de las células.....	79
II.1.3. Hibridación.....	79
II.1.4. Detección.....	80
II.2. Método de HIS fluorescente en células: detección de la translocaciónBCR/ABL.....	83
II.2.1. La sonda de ADN.....	83
II.2.2. Preparación de los portas y de las células.....	83

II.2.3. HIS fluorescente.....	83
II.2.3.1. Primer protocolo.....	83
2.3.1.a. Preparación de los portas.....	83
2.3.1.b. Desnaturalización de los portas.....	83
2.3.1.c. Hibridación.....	84
2.3.1.d. Lavados rápidos post-hibridación.....	84
2.3.1.e. Detección.....	84
2.3.1.f. Contratinción fluorescente.....	85
2.3.1.g. Amplificación.....	85
II.2.3.2. Segundo protocolo.....	87
2.3.2.a. Preparación de portas.....	87
2.3.2.b. Desnaturalización/Hibridación.....	87
2.3.2.c. Lavados post-hibridación.....	88
2.3.2.d. Bloqueo.....	88
2.3.2.e. Incubaciones inmunocitoquímicas.....	88
II.3. Métodos estadísticos.....	92
 IV. RESULTADOS.....	 93
I.- Leucemia linfática crónica de origen B.....	95
I.1. Controles.....	95
I.2. Pacientes.....	95
I.2.1. HIS fluorescente al inicio del estudio.....	95
I.2.2. Citogenética.....	95
I.2.3. Relaciones entre distintas características clínicas y de laboratorio y la trisomía 12.....	96
I.2.4. Seguimiento.....	97
I.2.5. Supervivencia.....	99
II.- Leucemia de células peludas (Tricoleucemia).....	112
II.1. Controles.....	112
II.2. Pacientes.....	112
III.- Linfomas leucemizados de origen B.....	118
III.1. Controles.....	118
III.2. Pacientes.....	118
IV.- Síndromes linfoproliferativos crónicos de origen T.....	131
IV.1. Controles.....	131
IV.2. Pacientes.....	131

V.- Leucemia mieloide crónica.....	135
V.1. Controles.....	135
V.2. Pacientes.....	135
V. DISCUSION.....	141
I.- Leucemia linfática crónica de origen B.....	143
II.- Leucemia de células peludas (Tricoleucemia).....	155
III.- Linfomas leucemizados de origen B.....	160
IV.- Síndromes linfoproliferativos crónicos de origen T.....	167
V.- Leucemia mieloide crónica.....	170
VI. Método de HIS fluorescente.....	173
VI.1. Preparación adecuada de la muestra y de los portas.....	174
VI.2. Tratamiento enzimático y fijación celular.....	174
VI.3. Hibridación.....	176
VI.4. Revelado inmunológico de la sonda.....	179
VI.4.1. Método fluorescente.....	179
VI.4.2. Método inmunohistoquímico.....	180
VI.4.3. Amplificación inmunológica.....	180
VI.4.4. Contraintención general del ADN.....	181
VI. CONCLUSIONES.....	183
I. Relacionadas con el método de hibridación "in situ" fluorescente utilizado para la detección de trisomía 12.....	185
II. Generales sobre la detección de la trisomía 12 en Síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPc) de origen B.....	185
III. Relacionadas con la Leucemia linfática crónica de origen B (LLCB).....	185
IV. Relacionadas con la Leucemia de células peludas (Tricoleucemia).....	186
V. Relacionadas con los linfomas leucemizados de origen B.....	186
VI. Relacionadas con los Síndromes linfoproliferativos crónicos de origen T.....	186

VII. Relacionadas con la Leucemia mieloide crónica (LMC).....	187
VII. BIBLIOGRAFIA.....	189

INTRODUCCION

I.- INTRODUCCION.

I.- SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS DE EXPRESION LEUCEMICA.

Bajo el término de síndromes linfoproliferativos (SLP) se incluye un grupo heterogéneo de enfermedades que tienen en común el origen linfoide de las células que en ellos proliferan (Williams et al, 1990; Rozman, 1993). Dentro de los SLP cabe distinguir los agudos y los crónicos. Estos, a su vez, pueden cursar con expresión leucémica (es decir con la presencia en sangre periférica (SP) de elementos linfoides atípicos) o no (entre estos últimos se incluyen los linfomas no hodgkinianos) (LNH).

Las primeras descripciones de la leucemia linfática crónica (LLC) se remontan a 1845 (Virchow), no obstante ha sido en los últimos años cuando el interés por estas enfermedades ha aumentado notablemente. Ello se debió a dos hechos: por una parte, al conocimiento de que el sistema linfoide no podía seguir considerándose de forma única, sino tomando en consideración las distintas poblaciones linfoides (T y B), y por otra, a los estudios de la propia ontogenia de los linfocitos T y B (LT y LB), que han hecho que las enfermedades linfoproliferativas se consideren como la consecuencia de la detención del proceso madurativo normal de los linfocitos en alguna de sus etapas, lo que da lugar, según el punto en que esta detención se opera, a diferentes enfermedades.

I.1. CLASIFICACION.

En la tabla 1 se muestra una clasificación de los SLP crónicos (SLPc) con expresión leucémica basada en su origen T ó B.

Tabla1: Clasificación de los SLPc con expresión leucémica.

<i>Origen B</i>
Leucemia linfática crónica (LLC)
Forma típica
Forma atípica (estimulada)
LLC-leucemia prolinfocítica
Leucemia prolinfocítica
Tricoleucemia
Forma clásica
Forma variante
Linfomas leucemizados
Centrocítico
Centrocítico-centroblástico
Centroblástico
Linfoplasmocitoide (Waldenström)
Esplénico de células vellosas
Leucemia de células plasmáticas
<i>Origen T</i>
Leucemia linfática crónica T
Leucemia prolinfocítica
Tricoleucemia
Leucemia/linfoma T del adulto (HTLV-I+)
Linfomas cutáneos de células T leucemizados (Sézary)
<i>Origen NK</i>
Síndrome de los linfocitos grandes granulados

NK: natural killer.

I.1.1.SLPc. CON EXPRESION LEUCEMICA DE ORIGEN B.

I.1.1.1.LEUCEMIA LINFATICA CRONICA.

1.1.1.a. Progreso en LLC: una prespectiva histórica.

En décadas pasadas, se hicieron importantes avances en relación al entendimiento de los desórdenes linfoproliferativos con expresión leucémica. Los avances en técnicas inmunológicas permitieron una mejor clasificación de estos desórdenes. Recientemente, gracias al desarrollo de metodologías citogenéticas y de biología molecular se tiene una mejor idea de la naturaleza de los diferentes tipos de neoplasias linfoides. El desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos ofrece nuevas ayudas para poder controlar estas enfermedades.

1.1.1.b. Período de reconocimiento de LLC como una entidad distinta: 1845-1924.

John Hughes Bennett (1812-1875) y Rudolph Virchow (1821-1902) descubrieron la patología en 1845 que hoy es reconocida como leucemia.

No fue hasta después de 1877 (o tal vez 1891), cuando Paul Ehrlich desarrolló el método de tinción triácido para estudiar corpúsculos rojos y blancos, y fue posible una distinción morfológica clara entre células mieloides y linfoides (Wintrobe, 1980).

Virchow y Bennett habían observado que la leucemia podría ser subdividida en dos formas diferentes, esplénica (la cual hoy es reconocida como mieloide) y linfática. La primera sugerencia de subdivisión adicional en formas aguda y crónica de leucemia fue hecha por Ebstein en 1889. Los métodos de Ehrlich para tinción de células de la sangre fueron realizados hace aproximadamente 100 años y fue entonces cuando los descubrimientos microscópicos y morfológicos pudieron ser correlacionados con las características clínicas, haciendo posible clasificar las leucemias mieloide y linfoide en sus respectivas formas crónica y aguda (Gunz, 1980).

Kundrat en 1893, seguido por Turk en 1903 y Symmers en 1918 separaron LLC de linfoma. Osler publicó su libro "The Principles and Practice of Medicine" en 1892 e indicó que, la LLC constituía el 22% de todas las leucemias y que la enfermedad estaba asociada con un agrandamiento generalizado de los nódulos linfáticos. Él notó que en los pacientes con LLC se observaban períodos de supervivencia largos, de hasta 3 y 11 años. Los primeros trabajos clínicos extensos en pacientes con LLC fueron publicados por Minot e Isaacs en 1924 quienes indicaron que el tiempo de supervivencia medio era aproximadamente de 40 meses.

Así, aunque los primeros pacientes con leucemias fueron descritos en 1845, el descubrimiento real de LLC como una entidad clínica reconocida y bien descrita debería ser considerado en 1924 con el trabajo de Minot e Isaacs.

1.1.1.c. Período de definición precisa y descripción clínica de LLC: 1924-1973.

Este período tuvo numerosas contribuciones importantes que ayudaron a los médicos al entendimiento de como diagnosticar la LLC, como era su historia natural, y cuales eran las varias opciones de tratamiento. Leavell en 1938 presentó una revisión de la incidencia y de los factores que influyen en el tiempo de supervivencia. En 1939, Wintrobe y Hansenbush describieron datos clínicos en 86 casos enfatizando la fase temprana de la enfermedad. Hayhoe en su libro, "Leukemia", proporcionó una visión en 1960 de todos los aspectos clínicos de LLC.

Una descripción extensa de los criterios de diagnóstico, características clínicas, respuesta a la terapia y datos de supervivencia en una serie grande de pacientes con LLC fue publicado por Boggs et al en 1966. Este trabajo confirmó el amplio rango de los tiempos de supervivencia asociados con esta enfermedad. Boggs et al concluyeron que pacientes que sobrevivían menos de 5 años tenían evidencia de enfermedad más avanzada en el momento de diagnóstico inicial que aquellos que sobrevivían más tiempo. Galton, también en 1966, indicó que el patrón de aumento en el conteo de linfocitos en sangre en LLC era un predictor del curso clínico: pacientes con una tendencia de continuo y progresivo aumento tenían peor pronóstico comparado con aquellos cuyos conteos de linfocitos permanecieron estables durante un largo período de tiempo. Dameshek en 1967 hizo observaciones similares a aquellas observadas por Galton (1966) y Boggs et al (1966) y propusieron un método de estratificar la extensión de la enfermedad por la presencia o ausencia de ciertos criterios clínicos tales como síntomas relacionados con la enfermedad, agrandamiento de los nódulos linfáticos, bazo e hígado, y anomalías en el conteo en sangre. En 1973 Hansen presentó datos clínicos detallados en unas series grandes de pacientes con LLC. El curso de la enfermedad en las series de Hansen pareció confirmar las conclusiones de Dameshek, Galton y Boggs et al que cuanto mayor era la evidencia clínica de LLC el pronóstico en conjunto era peor.

1.1.1.d. La era moderna: 1973-1994.

En la primera de las dos décadas que siguen el trabajo de Hansen en 1973 se realizó la identificación de los criterios pronósticos y el desarrollo de los sistemas de clasificación por estadíos en LLC, y en la segunda década, finalizada en 1994, progresó en la caracterización inmunológica de la célula leucémica en la LLC.

1.1.1.e. La LLC forma típica.

Es una neoplasia hematológica de origen clonal que se caracteriza por la proliferación y acumulación de linfocitos de aspecto relativamente maduro. En la inmensa mayoría de los casos (95%) la LLC es consecuencia de la expansión de una única clona de LB que experimentan una transformación maligna e invaden la médula ósea (MO), los órganos linfoides y la SP (Brouet et al, 1975; Gale et al, 1985; Stansfeld et al, 1988) y en menos de un 5% de los casos las células son de origen T (Juliusson et al, 1990a,b).

e.1. Frecuencia.

La LLC representa el 30% de todas las leucemias, es por ello la forma más común de leucemia humana. Predomina en los varones (2:1) (Henderson y Han, 1986). La edad media de los enfermos en el momento del diagnóstico es de 60 años (Farreras y Rozman, 1993).

e.2. Etiopatogenia.

En su origen no se reconoce influencia alguna de las radiaciones ionizantes ni de sustancias tóxicas.

e.3. Fisiopatología.

Los LB de la LLC presentan inmunoglobulinas de superficie (Smlg) en escasa cantidad (Han et al, 1982), que habitualmente son de tipo IgM ó IgM + IgD. Expresan asimismo cadenas kappa o lambda, pero nunca ambas, lo que junto con el reordenamiento de los genes de las inmunoglobulinas (Igs), demuestra su monoclonalidad (Henderson y Han, 1986; Bennet et al, 1989; International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukaemia, 1989a,b).

Los LB de la LLC expresan un antígeno de membrana (CD5) que es una glucoproteína de 5000 daltons.

La presencia de Smlg en escasa cantidad, rosetas M y positividad para el CD5 son los marcadores típicos de esta proliferación. Otro marcador de superficie de los LB de la LLC útil para el diagnóstico es el CD19 (Lennert et al, 1991). Los linfocitos de la LLC expresan también otros determinantes antigénicos propios de los LB (CD20, CD22, CD24, CD37), FcR y receptores para el complemento, siendo los C3d (CR2) más numerosos que los C3b (CR1). En algunos casos también tienen receptores para la interleucina 2 (TAC, CD25) (Freedman, 1990; Hanson et al, 1990; Wormsley et al, 1990).

Desde el punto de vista de la cinética celular, la LLC es una enfermedad más acumulativa que proliferativa. El número de células en fase de síntesis y de mitosis es muy bajo. Por otra parte, la recirculación de la población de LB entre los distintos compartimentos linfoides es anómala. Los LT están disminuidos, en parte, debido a la dilución que experimentan por la expansión de la población de LB leucémicos. En las fases más avanzadas de la enfermedad el número de LT supresores (CD8) tiende a aumentar. La proporción de LT colaboradores (CD4) y supresores (CD8) se halla descendida en la SP y aumentada en la MO. Es posible que estos hechos guarden relación con la hipogammaglobulinemia que tan a menudo presentan los enfermos con LLC (Dighiero et al, 1991).

Por otro lado, en la LLC se han hallado alteraciones de la función de los granulocitos, complemento, y actividad "natural killer" lo que, unido a hipogammaglobulinemia, explicaría las frecuentes infecciones bacterianas que sufren estos enfermos. La posible existencia de componentes monoclonales, es otra expresión de las complejas alteraciones de la inmunidad que se observan en este proceso.

e.4. Cuadro clínico.

Aproximadamente la mitad de los casos de LLC se descubren al practicar una analítica por cualquier motivo banal. En otras ocasiones, los primeros síntomas consisten en la aparición de adenopatías, astenia o alteración del estado general. Otras veces son las infecciones repetidas, sobre todo de origen broncopulmonar. Es mucho más raro que sea una anemia hemolítica autoinmune (AHA) la primera manifestación de la LLC. Sin embargo, alrededor del 15% de los enfermos presentan AHA en algún momento de su evolución.

La exploración física puede ser anodina, como sucede en los casos poco avanzados de la enfermedad, o bien revelar la presencia de numerosas adenopatías de carácter simétrico, grandes e indoloras, así como hepatomegalia y esplenomegalia, hallazgos propios de las formas más avanzadas del proceso. Las adenopatías mediastínicas o la infiltración del anillo linfático de Waldeyer son sumamente raras. A diferencia de lo que ocurre en los linfomas, no son habituales la fiebre, la sudoración, ni la pérdida de peso.

Por otro lado, el 5-15% de los enfermos con LLC presentan en algún momento de su evolución, a veces de forma simultánea con el diagnóstico, neoplasias asociadas, sobre todo de piel, tubo digestivo y pulmón. De forma excepcional los linfocitos de la LLC pueden infiltrar la piel, el tubo digestivo, el pulmón, la pleura o el sistema nervioso central (SNC).

e.5. Datos de laboratorio.

El dato más característico consiste en leucocitosis con linfocitosis absoluta. En menos de 1/3 de los enfermos hay anemia o trombocitopenia en el momento del diagnóstico. La cifra de lactato-deshidrogenasa (LDH) puede estar ligeramente aumentada. El recuento de leucocitos suele ser superior a $15 \times 10^9/L$, de los cuales más del 90% son linfocitos de aspecto maduro, con núcleo redondo de cromatina densa, sin apenas nucleolos y escaso citoplasma. Hay variabilidad en la morfología de los linfocitos que proliferan. En la mayoría de los pacientes con LLC de origen B (LLCB), los linfocitos son pequeños. En la LLCB, no hay aumento en los linfoblastos como ocurre en la leucemia linfoblástica aguda (LLA). Los LB de la LLC son muy frágiles, por lo que se rompen con facilidad al efectuar las extensiones de SP, dando lugar a las características sombras nucleares o sombras de Gumprecht. A diferencia de lo que ocurre en las proliferaciones linfoides T, la betaglucuronidasa y la fosfatasa ácida linfocitarias están muy disminuidas. La MO se halla infiltrada por linfocitos de aspecto maduro. La biopsia medular (BMO) revela asimismo diversos patrones histológicos: nodular, intersticial, mixto (nodular+intersticial) y difuso, que tienen interés pronóstico (Lipshutz et al, 1980; Rozman et al, 1984). Puede haber variabilidad entre diferentes áreas de una biopsia. Si cualquier área de la biopsia cumple con el criterio para envolvimiento difuso, el proceso debería ser clasificado como difuso. A diferencia de lo que ocurre en los linfomas centrolímbicos, los nódulos linfoides de la MO ocupan una situación central y no paratrabecular. La hipogammaglobulinemia es frecuente (30-40% de los casos). La IgM es la Ig que con mayor frecuencia se halla disminuida, seguida de la IgG y la IgA. La prueba de Coombs puede ser positiva en el 10-15% de los pacientes, sin que necesariamente exista una AHAI evidente.

e.6. Diagnóstico.

El diagnóstico de la LLC en su forma clásica es fácil. El hallazgo de leucocitosis absoluta, con linfocitos de aspecto típico (pequeños, con escaso citoplasma, núcleo redondo y cromatina condensada y sin nucleolos) y de sombras de Gumprecht, con escasas (menos del 10%) células linfoides atípicas (centrocitos, centroblastos) en un individuo adulto, por lo general mayor de 40 años, evoca de inmediato el diagnóstico de LLC. En ocasiones, sin embargo, el cuadro clínico y, sobre todo, el hemoperiférico no son tan concluyentes.

Recientemente, el "International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia" (IWCLL) ha recomendado emplear los siguientes criterios diagnósticos: a) linfocitosis mantenida

en SP $\geq 10 \times 10^9/L$, b) morfología típica y c) fenotipo característico (SmIg de intensidad débil, CD5, rosetas M) o aspirado y/o BMO compatibles. En los casos con un recuento de linfocitos inferior a $10 \times 10^9/L$ es necesario confirmar el diagnóstico tanto por el estudio de los marcadores de membrana como por el de MO.

La biopsia ganglionar, medular, esplénica y, sobre todo, el estudio del fenotipo de las células son de gran ayuda en el diagnóstico de los casos difíciles.

e.7. Pronóstico.

Si bien existen casos benignos con evoluciones que superan los 10-15 años, la supervivencia media de los enfermos con LLC no sobrepasa los 5-6 años. Las causas más frecuentes de muerte son las infecciones, la anemia irreversible por invasión medular y los accidentes hemorrágicos por trombocitopenia.

La introducción en 1975 de un sistema de clasificación por estadios de la LLC (Rai et al, 1975; 1987b) representó un avance considerable en la posibilidad de predecir la evolución de los pacientes con esta enfermedad. El sistema propuesto por Rai et al divide a los pacientes en cinco grupos, con tiempos medios de supervivencia que oscilan desde más de 100 meses para los estadios poco avanzados de la enfermedad a menos de 25 meses para los estadios más avanzados (Tabla 2).

Tabla 2: LLC: clasificación de Rai.

Estadio	Criterios	Mediana de supervivencia (meses)
0	Linfocitosis en sangre periférica ($> 15 \times 10^9/L$) y medula ósea ($> 40\%$)	> 120
I	Linfocitosis + adenopatías	> 120
II	Linfocitosis + hepatomegalia y/o esplenomegalia	50-60
III	Linfocitosis + anemia (hemoglobina < 11 g/dL)	24-36
IV	Linfocitosis + plaquetopenia (plaquetas $< 100 \times 10^9/L$)	24-36

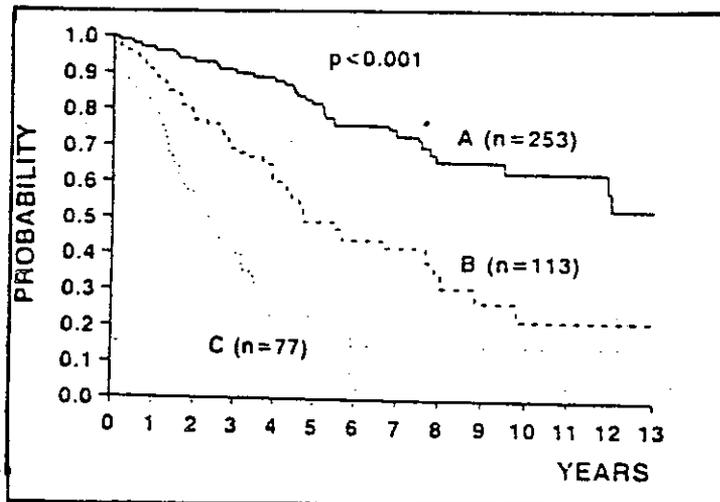
En 1981, Binet et al; propusieron un sistema de clasificación por estadios (Binet et al, 1977; 1981). En este sistema destaca la importancia de las masas de tumores enfatizada, teniendo en cuenta el potencial de agrandamiento de las 5 áreas linfoides diferentes: (1) cervical; (2) axilar; (3) nódulos linfáticos inguinales (uni o bilaterales); (4) bazo; y (5) hígado. En base al número de áreas linfoides envueltas y la presencia o no de anemia y/o trombocitopenia, se distinguen 3 grupos pronóstico. Las supervivencias medias para los pacientes en estadios A, B y C son 12, 5 y 2 años, respectivamente (Tabla 3, Fig. 1).

Tabla 3: LLC: clasificación de Binet.

Estadio	Criterios	Mediana de supervivencia (meses)
A	No anemia ni plaquetopenia Menos de tres áreas "linfoides" aumentadas de tamaño	> 120
B	No anemia ni plaquetopenia Tres o más áreas "linfoides" aumentadas de tamaño	50-60
C	Anemia (hemoglobina < 10 g/dL) y/o plaquetopenia (plaquetas < $100 \times 10^9/L$) con independencia del número de áreas "linfoides" afectas	24

* Áreas "linfoides": adenopatías en regiones laterocervicales, axilares e inguinales (ya sean unilaterales o bilaterales), hígado y bazo.

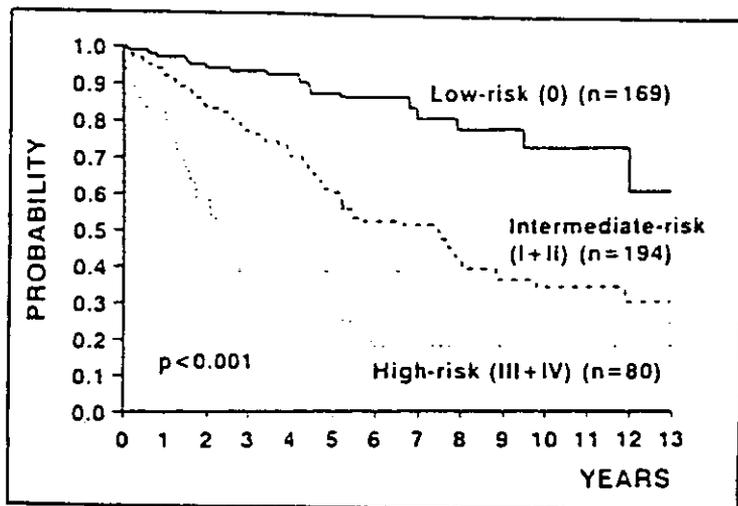
Fig. 1: LLC: supervivencia de 443 pacientes seguidos en la "Postgraduate School of Haematology Farreras Valenti", de acuerdo a la clasificación de Binet ($p=0.001$).



El IWCLL, primero en 1981 y nuevamente en 1989 (International Workshop on CLL, 1981; 1989a,b), recomendaron que los sistemas de Rai y de Binet deberían ser integrados al añadir al estadio de Rai apropiado el estadio de Binet, proporcionando así una descripción completa de cualquier estadio clínico del paciente. Esta recomendación no ha sido ampliamente adoptada, y la mayoría de los clínicos usan uno u otro sistema en la práctica.

En 1987, los 5 estadios en el sistema de Rai original fueron reducidos a 3, en reconocimiento a las 3 curvas de supervivencia (Rai y Montserrat, 1987a) (Fig 2).

Fig. 2: LLC: supervivencia de 443 pacientes seguidos en la "Postgraduate School of Haematology Farreras Valenti", de acuerdo a la clasificación de Rai modificada ($p=0.001$).



e.8. Otros sistemas de clasificación.

Se hicieron varios intentos para mejorar los sistemas de clasificación. En 1981, Jaksic y Vitale propusieron un método para estimar la masa tumoral total (MTT) en LLC y que era útil para predecir la supervivencia. Pacientes con un alto MTT en el diagnóstico (por ejemplo ≥ 9.0) tenían una supervivencia media de 39 meses, comparada con 101 meses cuando la MTT era <9.0 .

Mandelli et al (1987) evaluaron unas series grandes de pacientes e identificaron 4 grupos de riesgo en base a los parámetros siguientes: (1) nivel de hemoglobina (Hb) $<11\text{g/dL}$; (2) linfocitosis en SP $> 60 \times 10^9/l$; (3) número de lugares de nódulos linfáticos (cervical, axilar, inguinal y otros) envueltos (por ejemplo $>2\text{cm}$) y (4) hepatomegalia (por ejemplo $>3\text{cm}$). Pacientes con ninguno de estos factores desfavorables son considerados como en estadio I (linfocitosis benigna), y aquellos con 1, 2 ó 3, ó los 4 factores arriba mencionados de peor pronóstico son considerados como en estadio II (bajo riesgo), III(riesgo intermedio) y IV(alto riesgo), respectivamente. La supervivencia media es mucho menor en pacientes en estadio avanzado.

Aunque todos estos sistemas, y otros (Baccarani et al, 1982; Lee et al, 1987) son válidos para identificar pacientes, ellos no añaden información sustancial a aquella ofrecida por las clasificaciones de Rai, Binet y la integrada en IWCLL, estos últimos sistemas tienen la ventaja de simplicidad y aplicación más fácil.

e.9. Otros parámetros pronósticos.

Para determinar si el curso de la enfermedad puede ser predicho y la exactitud de los sistemas de clasificación, casi todos los parámetros medibles de la enfermedad han sido evaluados para valorar su significado pronóstico. Como resultado, durante los últimos años, se ha acumulado mucha información con respecto a los parámetros pronóstico para la LLC (Montserrat y Rozman, 1988; Foon et al, 1990; Dighiero et al, 1991; Cheson, 1993). La mayoría de estos parámetros, sin embargo, no son útiles para predecir progresión y no añaden información adicional al estadio clínico, sólo los parámetros discutidos abajo son importantes a este respecto.

e.9.1. Contaje de linfocitos en sangre.

En LLC el número absoluto de linfocitos en sangre puede ser considerado como un simple y real reflejo de la masa del tumor y, por lo tanto, un parámetro útil para valorar el pronóstico. Su valor pronóstico ha sido bastante controvertido. Antiguamente, algunos autores habían encontrado que un alto contaje de linfocitos era indicativo de peor pronóstico (Galton et al, 1961; 1966; Dameshek, 1967; Hansen, 1973; Gray et al, 1974) mientras que otros no (Coeur et al, 1970; Binet et al, 1981; Geisler et al, 1986). No obstante, en análisis recientes (Baccarani et al, 1982; Rozman et al, 1982; Mandelli et al, 1987; French Co-operative Group on CLL, 1990; Jarque et al, 1991), el contaje de linfocitos se ha encontrado que es un importante predictor de la supervivencia.

e.9.2. Tiempo de duplicación de la cifra de linfocitos.

El significado pronóstico de los valores de linfocitos en SP fue sugerida primero por Galton (1966). Desde entonces varios estudios han demostrado que el tiempo necesario para duplicarse la cifra de linfocitos en sangre (TDL) es un factor pronóstico independiente (Montserrat et al, 1986). En la práctica, TDL es un excelente parámetro para averiguar la marcha del paciente: pacientes con contajes de linfocitos que progresan rápidamente (por ejemplo TDL<12 meses) tienen un curso agresivo y una corta supervivencia, mientras que aquellos con contajes estables tienden a tener un curso indolente y no progresivo. El significado pronóstico del TDL ha sido confirmado en varios estudios (Molica y Alberti, 1987; Dhodapkar et al, 1992; Jarque et al, 1991).

e.9.3. Morfología de linfocitos.

Los linfocitos en SP en LLC presentan una gran heterogeneidad. Esto ha llevado a subclasificar la LLC en diferentes variantes morfológicas (Melo et al, 1986; Orfao et al, 1988; Bennet et al, 1989) así como a estudios dirigidos a averiguar el valor pronóstico de la variabilidad morfológica en LLC (Dubner et al, 1978; Ghani y Krause, 1986). A pesar de algunas discrepancias

entre estudios, probablemente debidas a la metodología, hay un acuerdo general que un aumento en el número de linfocitos grandes e inmaduros (prolinfocitos) está asociado normalmente con enfermedad avanzada y supervivencia más corta. Recientemente, Melo et al (1987) han mostrado que un aumento en el número de prolinfocitos (por ejemplo >5-10%; >5-15x10⁹/L) es una característica independiente de peor pronóstico.

e.9.4. Histopatología de la MO.

Diferentes clasificaciones de los patrones de histopatología de la MO en LLC han sido propuestos. En 1977, Hernández-Nieto et al reconocieron 4 tipos diferentes de infiltración: (1) nodular; (2) intersticial; (3) mixta (nodular + intersticial); y (4) difusa. Esta clasificación es fácil de reproducir y ha sido ampliamente aceptada. Sin embargo, en términos de pronóstico, se pueden distinguir dos grupos amplios: difuso y no difuso (Lipshutz et al, 1980; Bartl et al, 1982; Rozman et al, 1984; Montserrat y Rozman, 1987). Pacientes con infiltración difusa tienen una supervivencia media <2-4 años, comparada con >8-10 años para aquellos con patrones no difusos.

El patrón de infiltración de la MO normalmente se correlaciona con el estadio clínico. Así, mientras que el patrón difuso predomina en estadios avanzados (Gray et al, 1974; Lipshutz et al, 1980; Rozman et al, 1982; 1984; Han et al, 1984b; Geisler et al, 1986; 1991; Pangalis et al, 1987), patrones no difusos se encuentran con mayor frecuencia en estadios tempranos (Hernández-Nieto et al, 1977; Lipshutz et al, 1980; Bartl et al, 1982; Rozman et al, 1982; 1984; Han et al, 1984a; Geisler et al, 1986; 1991; Pangalis et al, 1987). Sin embargo, esta correlación no es absoluta. Así, pacientes en estadio clínico temprano pueden ser subclasificados en 2 subgrupos pronóstico diferentes en base a la histología de la MO: bajo riesgo, cuando la infiltración es no difusa; alto riesgo, cuando el patrón de MO es difuso (Bartl et al, 1982; Geisler et al, 1986; 1991; Montserrat y Rozman, 1987). Los pacientes en estadios tempranos y con histología difusa tienden a progresar rápidamente y a tener una supervivencia más corta (Bartl et al, 1982; Montserrat y Rozman, 1987; Pangalis et al, 1987).

Aún cuando el valor pronóstico de los patrones de MO en LLC ha sido claramente demostrado (Rozman et al, 1984; Geisler et al, 1986; 1991), en algunos estudios, la histología de la MO, se ha encontrado que está correlacionada con el estadio clínico o con la progresión de la enfermedad pero no con la supervivencia (Lipshutz et al, 1980; Geisler et al, 1986; 1991). Esto puede ser debido a variaciones en el número de pacientes incluidos en cada estudio, en la longitud del seguimiento o en el criterio usado para evaluar las BMO.

La BMO es útil no sólo en el diagnóstico, sino también en evaluar la respuesta a la terapia (Cheson et al, 1987; International Workshop en LLC, 1981; 1989a).

e.9.5. Citogenética.

El impacto de las anomalías cromosómicas en el pronóstico no ha sido completamente establecido debido a las dificultades del análisis citogenético convencional en la LLC. El análisis mediante citogenética convencional después del cultivo de las células con mitógenos de células B, ha mostrado anomalías cromosómicas en el 50% de los pacientes con LLC. Se ha visto que la trisomía 12 es la anomalía cromosómica más frecuente en los pacientes con LLCB (1/3 de los casos) (Gahrton et al, 1980a,b; Gahrton et al, 1982; Pittman y Catovsky, 1983; Han et al, 1984a,b; Autio et al, 1987; Juliusson et al, 1990a,b; Datta et al, 1991) y en algunos casos ha sido asociado con disminución de la supervivencia y necesidad para un tratamiento más temprano (Han et al, 1984b; Juliusson et al, 1990a,b). Su presencia fue detectada inicialmente mediante técnicas citogenéticas convencionales después del cultivo con mitógenos de células B (Robèrt et al, 1978), pero este tipo de estudio es difícil debido al bajo índice mitótico espontáneo de las células leucémicas B y su pobre respuesta a la estimulación con mitógenos (Juliusson et al, 1990a,b; Delhomme-Bachy et al, 1992). Así en muchos casos no se producen metafases analizables o cuando estas están presentes ellas muestran un cariotipo normal. Por ello la verdadera incidencia de anomalías cromosómicas, tales como la trisomía 12, es desconocida.

Otras anomalías incluyen los cromosomas 6, 11, 13 y 14 (Robèrt et al, 1982; Pittman y Catovsky, 1984; Gahrton et al, 1987; Geisler et al, 1989; Juliusson et al, 1990a,b). Pacientes en estadios tempranos tienden a tener menos anomalías citogenéticas (20%) que aquellos en estadio avanzado (70%) (Han et al, 1987). Los pacientes con anomalías cromosómicas se asocian con un peor pronóstico comparado con pacientes con cariotipos diploides (Pittman y Catovsky, 1984; Han et al, 1988; Juliusson et al, 1990a,b; Oscier et al, 1990).

1.1.1.f. LLC latente.

Se distinguen dos formas de LLC útiles para decidir si se trata o no al enfermo: las LLC activas (o agresivas) y las LLC inactivas (o quiescentes). Las LLC activas presentan un TDL corto (inferior a 12 meses), grandes adenopatías que aumentan de tamaño, visceromegalias que ocasionan problemas, fiebre, sudoración, pérdida de peso o cualquier otro hecho que interfiera en la vida normal del enfermo. Por el contrario, los pacientes en estadio inicial (A), histopatología medular no difusa,

Hb \geq 13g/L, linfocitos $<$ 30 x 10⁹/dL y TDL prolongado (superior a 12 meses) presentan una forma sumamente quiescente de la enfermedad, con escasas probabilidades de progresión y una esperanza de vida igual a la de la población control (Montserrat et al, 1991b; 1993).

1.1.1.g. Tratamiento de la LLC.

El curso variable de la enfermedad, la edad avanzada de la mayoría de los pacientes y la ausencia de un criterio uniforme para evaluar el tratamiento han constituido importantes reveses en la terapia en la LLC. La llegada de los sistemas de clasificación clínicos por estadíos, los cuales permiten la identificación de pacientes con diferentes riesgos y el planteamiento de una terapia apropiada, constituye una importante ventaja. Resultados de los ensayos basados en estos sistemas de clasificación por estadíos, han demostrado que el tratamiento de pacientes con LLC en estadio inicial no presenta ningún beneficio y puede ser incluso perjudicial (Rozman and Montserrat, 1989). Por el contrario, hay acuerdo general de que los pacientes en estadio avanzado deberían ser tratados.

El clorambucil, administrado diariamente o intermitente, y dado sólo o con corticosteroides, es la droga usada comúnmente (Galton et al; 1961; Montserrat y Rozman, 1984; Gale y Foon, 1985; Travade et al, 1987; Foon et al, 1990). Otros agentes únicos usados en LLC incluyen prednisona, busulfán y ciclofosfamida (Montserrat y Rozman, 1984; Gale y Foon, 1985; Travade et al, 1987). Los resultados son a menudo comparables con aquellos observados con clorambucil sólo, aunque algunas veces con más toxicidad. El beneficio en términos de supervivencia de todas estas drogas aún no está demostrado. Nuevos agentes, tales como fludarabina (Keating et al, 1989,90; Robertson et al, 1992), 2-desoxicoformicina (O'Dwyer et al, 1988; Dillman, 1989) y 2-clorodesoxiadenosina (Piro et al, 1988; Keating, 1993), presentan unas perspectivas prometedoras. Sin embargo, la superioridad de estas drogas sobre el clorambucil no está todavía demostrada. La mayoría de los regímenes de terapia combinada no han mostrado ninguna ventaja sobre el clorambucil con o sin prednisona cuando se compararon diferentes ensayos clínicos. En un ensayo, el "French Co-operative Group on CLL", mostró el papel beneficioso para la adriamicina dada a bajas dosis con ciclofosfamida, vincristina y prednisona (mini-CHOP) en pacientes con estadio C de la enfermedad. Sin embargo, estos resultados fueron obtenidos en unas series pequeñas de pacientes y necesitan ser confirmados.

La esplenectomía puede ser válida en pacientes con AHA1 o trombocitopenia, con destrucción esplénica (Ferrant et al, 1986; Stein et al, 1987; Delpero et al, 1990). La radioterapia es efectiva en unos pocos pacientes, pero una secuela frecuente suele ser la mielosupresión (Lawrence

et al, 1949; Chanana et al, 1976). La irradiación esplénica ha sido usada en el caso de esplenomegalia masiva o inmunocitopenia cuando la esplenectomía era difícil. Nuevas estrategias, incluyendo el uso de modificadores de la respuesta biológica [interferones (Montserrat et al, 1991a,b,c) , interleucinas 2 y 4 (Kay et al, 1988; Luo et al, 1990), eritropoyetina, ciclosporina (Tura et al, 1988) y anticuerpos monoclonales solos o conjugados con inmunotoxinas], están bajo estudio.

Aunque una remisión completa (RC) en términos clásicos, es observada frecuentemente con estas terapias, la remisión clonal es un hecho muy raro y la curación no se puede lograr. La cuestión de si regímenes de quimioterapia más intensiva, incluyendo el uso de factores de crecimiento recombinantes hematopoyéticos y trasplante de médula ósea autólogo (ATMO) (Rabinowe et al, 1992) y alógeno (ALTMO) (Michallet et al, 1991), pueden mejorar la supervivencia en LLC están siendo investigados. Sin embargo, la morbilidad y la mortalidad asociadas con estos procedimientos hace necesario considerar su indicación cuidadosamente y reservarlos para pacientes más jóvenes que sufren de enfermedad más avanzada o LLC resistente a quimioterapia.

En contraste a los avances en el entendimiento de la biología y de la historia de la LLC, el progreso en el tratamiento ha sido lento. Numerosos datos indican que la respuesta a la terapia está asociada con un aumento en la supervivencia (Cheson et al, 1988; International Workshop on CLL, 1989a,b; French Co-operative Group on CLL, 1991; Hansen et al, 1991; Keating, 1993). También, una terapia más intensiva está asociada con una respuesta aumentada (Jaksic y Brugiatelli, 1988; Conlan y Mosher, 1989; French Co-operative Group on CLL, 1989,1991; Keating et al, 1989; Hansen et al, 1991; Caballero et al, 1992; Rai, 1993). Sin embargo, pocos datos sugieren que esto se traduzca en cura, incluso en pacientes aparentemente libres de células de LLC usando técnicas de detección sensibles. Resultados preliminares con ALTMO y ATMO son prometedores (Bandini et al, 1991; Michallet et al, 1991; Bastion et al, 1992; Khouri et al, 1992; Montserrat et al, 1992; Rabinowe et al, 1992; Jarque et al, 1993;) pero ensayos controlados son necesarios para determinar la supervivencia y/o la cura. Varias consideraciones sugieren que la terapia intensiva debería ser reservada para personas jóvenes con características pronóstico adversas que no responden al tratamiento convencional (Pangalis et al, 1991; Dhodapkar et al, 1992; Montserrat et al, 1992; Rai, 1993).

1.1.1.h. Valoración de la respuesta

No existen criterios aceptados de forma general para valorar la respuesta al tratamiento. De acuerdo con el IWCLL se distinguen los siguientes tipos de respuesta (Cheson et al, 1988; International Workshop on CLL, 1989a,b):

1. Respuesta completa clínica. Se define por los siguientes criterios; a) ausencia de síntomas y signos atribuibles a la enfermedad, b) linfocitos en SP $< 4 \times 10^9/L$, c) granulocitos $> 1.5 \times 10^9/L$, d) plaquetas $> 100 \times 10^9/L$ y e) aspirado y BMO normales aunque la presencia de focos o nódulos linfoides en esta última no es incompatible con la respuesta completa.

2. Respuesta completa clonal. Además de los criterios anteriores, es preciso demostrar la desaparición de la clona leucémica por estudio de marcadores celulares.

3. Respuesta parcial. Cuando, tras el tratamiento, la enfermedad pasa a un estadio menos avanzado.

4. Enfermedad estable. Cuando no se produce modificación alguna en el estadio de la enfermedad tras el tratamiento.

5. Progresión. Cuando la enfermedad progresa de estadio bajo tratamiento.

1.1.1.i. La LLC forma atípica.

Incluye dos subtipos morfológicos. En el primero, hay linfocitos pequeños y grandes entremezclados. Los linfocitos más grandes tienen un citoplasma moderadamente abundante y poco o ligeramente basófilo. La cromatina nuclear está agrupada; los nucleolos si están presentes, no son prominentes. El número de prolinfocitos es menos de 11%. El segundo tipo de células mezcladas es la leucemia linfática crónica-leucemia prolinfocítica (LLC-LP). Es definida por la presencia de 11-54% de prolinfocitos en la sangre. Pacientes con LLC-LP tienen características clínicas intermedias entre LLC y LP (Melo et al, 1986) y generalmente presentan linfadenopatía y esplenomegalia. El grado de esplenomegalia es desproporcionado al de linfadenopatía. Las secciones de MO pueden contener focos de transformación o una mezcla de pequeños linfocitos y prolinfocitos.

I.1.1.2. LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS (TRICOLEUCEMIA).

Esta enfermedad fue descrita por Bouroncle en 1958 con el nombre de reticuloendoteliosis leucémica. La denominación tricoleucemia hace referencia a la presencia en el bazo, la MO y la SP de células linfoides provistas de prolongaciones citoplasmáticas a modo de pelos (Bouroncle et al, 1958, 1979).

Es una enfermedad rara que representa el 1-2% de todas las leucemias y linfomas. Afecta con mayor frecuencia a los varones que a las mujeres (4/1) y la edad media en el momento del diagnóstico es de 40 años (Golomb et al, 1978a,b).

1.1.2.a. Cuadro clínico.

El inicio de la enfermedad es difícil de precisar. Pueden pasar más de 12 meses entre los primeros síntomas y el diagnóstico. Las manifestaciones más frecuentes son astenia, palidez, púrpura, gingivorragias e infecciones. La invasión de la MO y el bazo por los tricoleucocitos puede originar una pancitopenia muy acusada. Las infecciones son frecuentes. El dato más llamativo de la exploración física es la esplenomegalia, aunque puede faltar hasta en una tercera parte de los casos. Las adenopatías son muy poco frecuentes (Jansen et al, 1982).

1.1.2.b. Datos de laboratorio.

Casi siempre hay pancitopenia ($Hb < 10g/dL$, leucocitos $< 4.5 \times 10^9/L$ y plaquetas $< 100 \times 10^9/L$). El volumen corpuscular medio (VCM) está incrementado. Se comprueba neutropenia y, de forma característica, monocitopenia. El índice de fosfatasa alcalina granulocítica (FAG) suele ser alto. En la extensión de SP se observa un número variable de tricoleucocitos. Se trata de células de aspecto linfóide con prolongaciones citoplasmáticas, citoplasma azulado sin granulación y núcleos de aspecto redondo o arriñonado, sin nucleolos. Estas células toman la tinción de la fosfata ácida (isoenzima 5), la cual resiste la incubación con ácido L-tartárico. Poseen Smlg en cantidad abundante (a diferencia de lo que ocurre en la LLC), forman rosetas M (aunque en menor cantidad que en la LLC), tienen receptores para la fracción Fc de la IgG y expresan antígenos de membrana característicos (FMC7, CD25 ó anti-Tac, CD11c). Puede haber elementos ultraestructurales típicos denominados complejos ribosómicos lamelares. En muy raras ocasiones la tricoleucemia puede tener fenotipo T (Bennet et al, 1989). El aspirado de MO es difícil de obtener debido a la fibrosis. La BMO revela un aspecto típico de infiltración laxa por tricoleucocitos y fibrosis reticulínica (Jandl, 1987; Doane et al, 1990).

1.1.2.c. Diagnóstico.

La posibilidad de una tricoleucemia debe tenerse en cuenta en el estudio de toda pancitopenia. El examen de la SP es importante para llegar al diagnóstico, pero en muchos casos el número de tricoleucocitos es muy bajo o éstos se hallan ausentes. La BMO es esencial para el diagnóstico. El estudio de los marcadores celulares es útil para establecer el diagnóstico definitivo.

Recientemente, ha sido descrita una forma variante de la tricoleucemia (Sainati et al, 1990), que tiene varias características que difieren de la forma clásica de la enfermedad (Cawley et al, 1980). Estos incluyen la tendencia a afectar a individuos más viejos y a hembras, presentación en la fase leucémica, ausencia de monocitopenia y, más importantemente, peor respuesta al tratamiento con interferón o 2-desoxicoformicina (Sainati et al, 1990; Catovsky, 1993).

1.1.2.d. Pronóstico.

En la mayoría de las series la media de supervivencia es de 4-5 años, aunque alrededor del 10% de los enfermos presentan un curso indolente y pueden vivir casi sin problemas 10 años o más. Los factores que se han asociado a un peor pronóstico son el tamaño del bazo, la intensidad de la granulocitopenia, la anemia y la falta de respuesta a la esplenectomía. La causa de muerte más frecuente son las infecciones.

1.1.2.e. Tratamiento.

En la tricoleucemia hay una serie de posibilidades terapéuticas que no se excluyen entre sí. La esplenectomía (Golomb et al, 1978) consigue corregir la pancitopenia, al menos temporalmente, en alrededor del 75% de los casos, sobre todo cuando la infiltración de la MO no es masiva. Es el tratamiento indicado en los pacientes jóvenes con significativa esplenomegalia y sólo mínimo envolvimiento de la MO. El interferón alfa (INF α) (Platanias y Golomb, 1992) es el tratamiento de elección en los casos en los que la esplenectomía no ha resultado eficaz o se producen recaídas tras ella. El INF α es útil incluso en los casos en los que no se ha extirpado el bazo. Aunque se consiguen excelentes respuestas, éstas rara vez son completas. Las recaídas de la enfermedad tras el tratamiento con INF α son frecuentes. El INF α induce remisión en aproximadamente 90% de los pacientes con tricoleucemia, pero RC es obtenida sólo en 5-10%. El desarrollo de anticuerpos contra el INF α fue inicialmente considerado un problema muy importante, pero mayores seguimientos de pacientes que desarrollaron anticuerpos ha mostrado que es transitorio y no tiene un impacto significativo en la respuesta en conjunto al tratamiento. Recientemente se ha comprobado que la 2-desoxicoformicina (pentostatina) (Cassileth et al, 1991) es muy eficaz en este proceso, incluso en

casos resistentes al INF α , el pentostatin induce RC en 60-70% de los pacientes y remisión parcial (RP) en 20-40%. La 2-clorodesoxiadenosina también se ha visto que es muy eficaz (Juliussón y Liliemark, 1992). Es una droga muy prometedora, incluyendo RC en aproximadamente 80% de los pacientes. Asimismo, se han descrito algunos casos de pacientes curados mediante TMO o que han respondido bien a quimioterapias intensivas. Por último, los factores de crecimiento hematopoyético se han mostrado útiles para corregir la granulocitopenia de estos enfermos. Mientras que el INF α no cura la enfermedad, es posible que un grupo de pacientes tratados con pentostatin ó 2-clorodesoxiadenosina sean curados.

I.1.1.3. ENFERMEDADES GANGLIONARES: LINFOMAS MALIGNOS.

Reciben el nombre de linfomas malignos las neoplasias del sistema linforreticular que asientan preferentemente en los gánglios linfáticos (Berard et al, 1987; Habeshaw y Lauder, 1988). Debido a la heterogeneidad funcional de los linfocitos y porque los linfocitos por su naturaleza tienen acceso a casi cualquier sitio anatómico, estas enfermedades pueden envolver cualquier órgano y son muy heterogéneas. Las diferencias entre leucemia y linfoma resultan bastante arbitrarias. Es leucemia la neoplasia linforreticular que afecta a la MO y que se acompaña del paso a la SP de células atípicas, y es linfoma la que queda localizada en los gánglios linfáticos u otros tejidos linfoides y carece, al menos inicialmente, del comportamiento leucémico, (McElwain y Lister, 1987; Montserrat, 1989).

1.1.3.a. CLASIFICACION.

La clasificación de los linfomas malignos ha tropezado desde antiguo con grandes dificultades de tipo conceptual y semántico. Thomas Hodgkin, en 1832, descubrió la enfermedad que después llevaría su nombre. Virchow, en 1863, identificó el linfosarcoma. Brill et al, en 1925, y Symmers, en 1927, describieron el linfoma folicular gigante, y, por último, Roulet, en 1930, introdujo el reticulosarcoma. Estos términos acabaron por resultar confusos. En 1942, Gall y Mallory propusieron una clasificación en la que se modificaban esos términos y sólo se conservaba el de linfoma folicular gigante como entidad independiente. Jackson y Parker, en 1947, subclasificaron la enfermedad de Hodgkin en tres tipos: paragranuloma, granuloma y sarcoma. En 1965, Lukes y Butler publicaron una clasificación.

En la práctica, los linfomas malignos se dividen en dos grandes grupos: enfermedad de Hodgkin (EH) y LNH, los cuales, a su vez, están constituidos por un grupo muy heterogéneo de linfomas.

a.1. LINFOMAS NO HODGKIN.

Los LNH son un grupo heterogéneo de desórdenes caracterizados por la proliferación maligna de LB y LT. Se incluyen bajo esta denominación los antiguamente llamados linfosarcoma, reticulosarcoma y linfosarcoma folicular gigante. Estos términos han perdido en gran parte su sentido y por ello es mejor atenerse a una descripción global de los LNH según la clasificación de Rappaport (1966) y otras clasificaciones más recientes.

a.1.1. Etiología.

Su etiología es desconocida. En la leucemia/linfoma T del adulto, la participación de un virus específico en la etiología está plenamente demostrada. En el linfoma de Burkitt, el virus de Epstein-Barr (VEB) es el agente responsable.

Además del oncogén c-myc, ligado al linfoma de Burkitt, otros oncogenes están relacionados con diversos tipos de linfoma. Así, el bcl-1, característico del linfoma linfocítico de células pequeñas y difuso de células grandes, y el bcl-2, que se asocia de forma bastante específica a los linfomas foliculares B.

Diversos trastornos de la inmunidad favorecen la aparición de linfomas.

a.1.2. Frecuencia, edad y sexo.

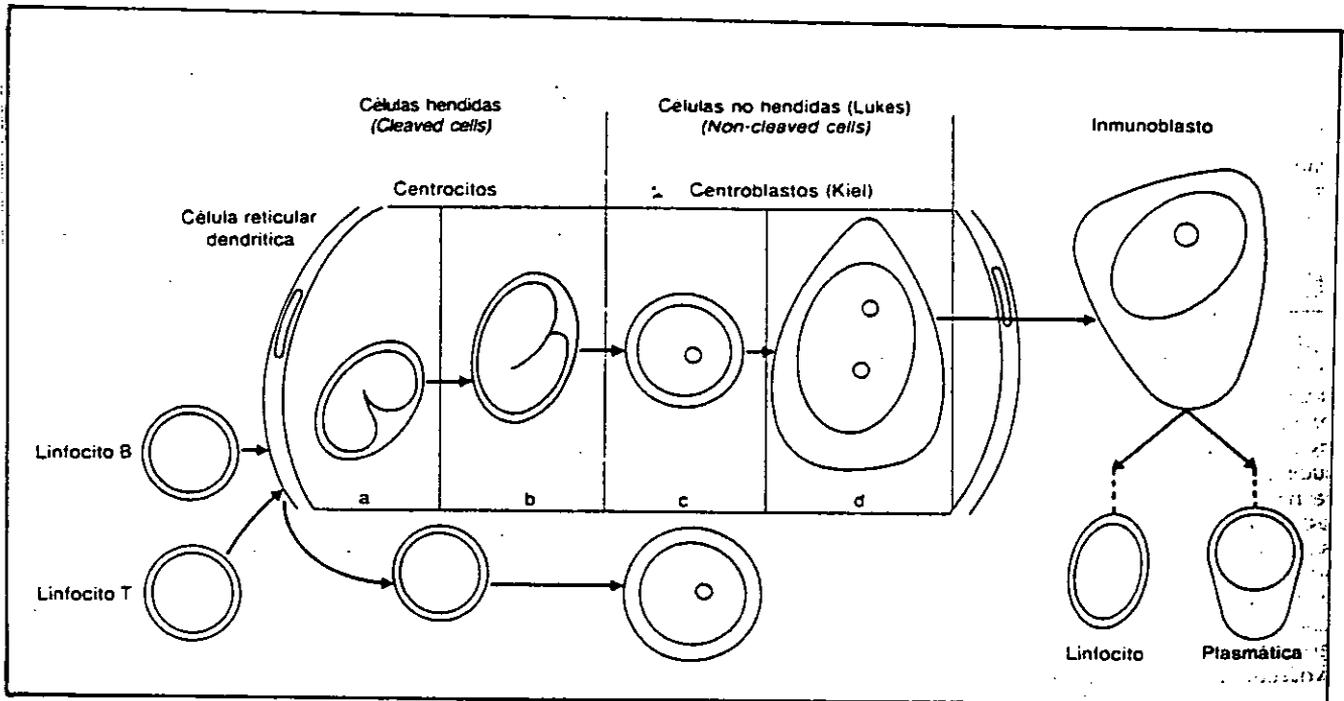
Los LNH son 2-3 veces menos frecuentes que la EH. La edad media de presentación son los 50 años, aunque pueden observarse a cualquier edad. Los linfomas difusos predominan en los varones (2:1), mientras que en los foliculares no prevalece ningún sexo.

a.1.3. Clasificación.

En 1966, Rappaport publicaba una clasificación de los LNH en la que distinguía dos tipos básicos de afección linfomatosa: la nodular (folicular) y la difusa; además según el tipo celular implicado y su grado de diferenciación, se admitían diversos tipos de linfoma.

La existencia de dos poblaciones linfocitarias distintas identificables con marcadores celulares (LB y LT) hace evidente la necesidad de clasificar los linfomas malignos según que su origen radique en los LT ó LB, y no considerando, como hacía Rappaport, una sola línea linfoide. En los centros foliculares existen cuatro tipos fundamentales de células: reticulares dendríticas, macrófagos, células hendidas (centrocitos, según Lennert) y células no hendidas (centroblastos, según Lennert). En el interior de los centros foliculares se operaría una auténtica transformación "in vivo" de los linfocitos (fig 3).

Fig. 3: Transformación centrolímbica de las células linfoides.



Basándose en estudios de carácter inmunológico y funcional se han propuesto diversas clasificaciones de los linfomas malignos. Las más aceptadas han sido las propugnadas por Lukes y Collins y por el grupo de Kiel (Lennert et al, 1991). Ambas clasificaciones difieren fundamentalmente en la terminología.

En 1982, un comité de expertos diseñó una clasificación de los LNH con interés pronóstico basada en el grado de malignidad de dichos tumores ("Working formulation"). La tabla 4 muestra sus equivalencias con las clasificaciones más utilizadas.

Tabla 4: LNH: equivalencias entre las clasificaciones más utilizadas.

Rappaport	"Working Formulation"	Kiel
Bajo grado de malignidad		
Linfocítico bien diferenciado (con o sin rasgos plasmocitoides) (LLBD)	<i>Linfocítico de células pequeñas</i> Compatible con leucemia linfática crónica Plasmocitoide	<i>Linfocítico (B y T)</i> <i>Linfoplasmocítico o linfoplasmocitoide</i>
Linfocítico mal diferenciado nodular (o folicular) (LLMD-N)	<i>Folicular con predominio de células hendidas pequeñas</i> Con o sin áreas difusas Con o sin esclerosis	<i>Centroblástico-centrocítico (células pequeñas) Folicular</i> Con o sin áreas difusas
Mixto (linfohistiocítico) nodular (LMI-N)	<i>Folicular mixto. Células hendidas pequeñas y células grandes</i>	
Malignidad intermedia		
Histiocítico nodular (folicular) (LH-N)	<i>Folicular con predominio de células grandes</i> Con o sin áreas difusas Con o sin esclerosis	<i>Centroblástico folicular</i> Con o sin áreas difusas
Linfocítico mal diferenciado difuso (LLMD-D)	<i>Difuso de células pequeñas hendidas</i> Con o sin esclerosis	<i>Centrocítico (células pequeñas)</i>
Mixto (linfohistiocítico) difuso (LMI-D)	<i>Difuso mixto de células pequeñas y grandes</i> Con o sin esclerosis Con o sin componente epitelioides	<i>Centroblástico-centrocítico difuso</i> Linfoplasmocitoide
Histiocítico difuso (LH-D) Con o sin esclerosis	<i>Difuso de células grandes</i> Células hendidas Células no hendidas Con o sin esclerosis	<i>Centrocítico (células grandes)-centroblástico</i>
Alto grado de malignidad		
Histiocítico difuso (LH-D) Con o sin esclerosis	<i>Células grandes. Inmunoblástico</i> Plasmocitoide Células claras Polimorfio Con componente epitelioides	<i>Centrocítico (células grandes)-centroblástico</i>
Linfoblástico convoluto no convoluto	<i>Linfoblástico</i> Convoluto No convoluto	<i>Linfoblástico convoluto no clasificable</i>
	<i>Células pequeñas no hendidas</i> Burkitt Con o sin áreas foliculares	<i>Linfoblástico</i> Burkitt Otros
	<i>Miscelánea</i> Linfoma "compuesto" Micosis fungoide Histiocítico verdadero Plasmocitoma extramedular Inclasificables Otros	<i>Micosis fungoide</i> <i>Plasmocítico</i>

Como puede observarse (Ersboll y Schultz, 1989), los linfomas se separan en tres grupos distintos atendiendo a su grado de malignidad: los linfomas de baja malignidad, los de malignidad intermedia y los de alta malignidad. El 20-40% de los linfomas de baja malignidad ("buen pronóstico") acaban por transformarse en linfomas de alta malignidad ("mal pronóstico").

a.1.4. Anatomía patológica.

A continuación se exponen las principales características de los LNH. La nomenclatura que se emplea es la de la "Working Formulation" (entre paréntesis figuran los términos equivalentes en la clasificación de Rappaport).

a.1.4.1. Linfoma linfocítico de células pequeñas (LLCP) (linfoma linfocítico bien diferenciado difuso, LLBD-D).

Comprende el 5-10% de todos los linfomas. La arquitectura ganglionar se halla totalmente borrada. En ocasiones el citoplasma es basófilo (linfoma linfoplasmocitoide, macroglobulinemia de Waldeström) (Waldeström, 1944; Juliusson et al; 1985b). Hay nula o escasa actividad mitótica. Esta histopatología es indistinguible de la que se observa en la LLC, aunque en ésta puede haber un patrón pseudofolicular en vez de difuso. El fenotipo es, prácticamente, siempre B con Smlg (IgM ó IgM + D) de débil intensidad, receptores para el complemento (CD21), HLA-DR (Ia) y positividad para los determinantes antigénicos CD5, CD19, CD20, CD23 y CD24. El CD9 y el CD10, en cambio, son negativos y sólo una tercera parte expresan el CD25 (Heinz et al, 1981; Engelhard et al, 1991).

a.1.4.2. Linfomas foliculares.

Los linfomas foliculares constituyen el 40-50% de todos los linfomas. Su rasgo principal reside en la estructura folicular (o nodular) que presentan. Basta la existencia de algunos nódulos, con independencia de su número, para que el linfoma se considere folicular. En ocasiones hay zonas de infiltración difusa.

No lo hay que confundir con el denominado linfoma "compuesto" en el que, de forma excepcional, se hallan distintas histopatologías en el mismo ganglio.

Los linfomas foliculares (Melo et al, 1988) tienen su origen en las células centrofoliculares y, según la célula neoplásica predominante, se distinguen las siguientes variedades: a) de células pequeñas hendidas (linfocítico mal diferenciado nodular, LLMD-N) (20% de todos los linfomas); (Foucar et al, 1979; Mc Kenna et al, 1975; 1985) b) de células pequeñas hendidas y de células grandes (mixto nodular, LM-N) (20%) y c) de células grandes (histiocítico nodular, LH-N) (10%). El diagnóstico diferencial entre estas formas no siempre es fácil.

El fenotipo de las células es invariablemente B. Expresan Smlg (IgM ó IgM + D) de fuerte intensidad y los siguientes determinantes antigénicos: CD9, CD10, CD19, CD20, CD22, CD24, CD37 y HLA-DR. El CD5, característico de los LLCP, es negativo. En el interior de los folículos linfoides se identifican células reticulares dendríticas (CRD+) muy prominentes y también células T (CD4+), a veces en gran cantidad.

a.1.4.3. Linfomas difusos.

Representan el 50-60% de los linfomas. En este grupo de linfomas la arquitectura ganglionar está totalmente borrada por la proliferación neoplásica. Con excepción del LLCP, todos los linfomas difusos son de malignidad intermedia o alta.

Entre los linfomas de malignidad intermedia se distinguen: a) de células pequeñas hendidas (linfocítico mal diferenciado difuso, LLMD-D) (10-15% de todos los linfomas); b) de células pequeñas hendidas y de células grandes (mixto difuso, LM-D) (5%), y c) de células grandes ("histiocítico" difuso, LH-D) (20%). En el 80 % de los casos el fenotipo es B.

Entre los linfomas de malignidad alta se distinguen: a) inmunoblástico (histiocítico difuso, LH-D) (10% de los linfomas); b) linfoblástico (5%), y c) células pequeñas no hendidas (Burkitt) (5%). El linfoma inmunoblástico puede ser B (90% de los casos) ó T (5-10%) y afecta primordialmente a individuos de edad avanzada con trastornos de la inmunidad.

La presencia de esclerosis puede tener significado pronóstico favorable, sobre todo en el denominado linfoma de células grandes con esclerosis.

a.1.5. Cuadro clínico.

a.1.5.1. Inicio extranodal.

En el 15-25% de los casos los LNH (Come et al; 1980) se manifiestan en órganos extraganglionares. Las localizaciones extraganglionares más frecuentes son: anillo linfático de Waldeyer, tubo digestivo, piel, esqueleto, pulmón, tiroides y gónadas. En la mayoría de los casos la histología es de tipo difuso.

a.1.5.2. Inicio nodal.

Las adenopatías son la forma de presentación más común de los LNH. En el caso de los linfomas de baja malignidad es típica adenopatías en diversos territorios con fluctuaciones espontáneas del tamaño de los ganglios e incluso su desaparición. Las adenopatías suelen ser simétricas, indoloras y fácilmente movilizables. A diferencia de lo que ocurre en la EH, pueden observarse adenopatías epitrocleares. Los ganglios retroperitoneales se hallan afectados en alrededor del 90% de los casos. La invasión de los ganglios mesentéricos es muy común. A veces, el tamaño de las adenopatías es tal que pueden llegar a formar mazacotes palpables en el abdomen. El estado general suele ser conservado.

En los linfomas de alta malignidad la historia clínica suele ser breve, de semanas o, a lo sumo, meses de duración. El inicio puede ser brusco. A veces, las adenopatías no tienen carácter simétrico

sino que se hallan localizadas en un territorio ganglionar. La afección del estado general suele ser importante.

a.1.6. Otras manifestaciones.

En el 15-25% de los casos puede haber fiebre, sudación y pérdida de peso. El 20-30% de los enfermos, sobre todo aquellos con histologías de bajo grado de malignidad, presentan esplenomegalia. Alrededor del 20% presentan adenopatías mediastínicas. Las adenopatías mediastínicas son menos frecuentes en los LNH (20% de los casos) que en la EH (40-60%) y, a diferencia de lo que ocurre en ésta, en los LNH puede haber afección a un lado y otro del diafragma sin adenopatías mediastínicas (salto mediastínico). La afección del parénquima pulmonar es rara al inicio de la enfermedad pero puede producirse en los casos avanzados, en recaídas o en los enfermos resistentes al tratamiento.

El hallazgo de hepatomegalia no es demasiado frecuente. Aunque la infiltración de la piel es propia de los linfomas cutáneos de células T, también los linfomas B pueden acompañarse de lesiones cutáneas infiltrativas.

En el momento del diagnóstico, sólo el 1% de los enfermos presentan infiltración del SNC, pero, a lo largo de la evolución, el 10% puede llegar a presentar esta complicación. Los enfermos con linfoma linfoblástico, linfoma de Burkitt o linfoma de células grandes, jóvenes y con invasión de la MO se hallan especialmente predispuestos a presentar esta complicación.

a.1.7. Datos de laboratorio.

La velocidad de sedimentación granulocítica (VSG), la Hb, los leucocitos y las plaquetas pueden ser normales. El incremento de la VSG es un parámetro de actividad de la enfermedad o de presencia de disproteinemia (gammapatía monoclonal, etc.). En algunos casos hay anemia moderada. También es posible la existencia de trombocitopenia, en algunos casos de origen inmune. Puede haber linfopenia (menos de $1 \times 10^9/L$).

La BMO muestra infiltración por linfoma en alrededor del 50% de los casos. La infiltración es básicamente de carácter nodular, intersticial o difuso. A diferencia de lo que ocurre en la LLC, los nódulos son de situación paratrabecular. La infiltración es más frecuente en los linfomas de bajo grado de malignidad (5-15%). De forma similar a lo que ocurre en la MO, la expresión hemoperiférica de los LNH es frecuente. La cifra de leucocitos suele ser normal o moderadamente alta ($15-30 \times 10^9/L$). El porcentaje de células linfoides atípicas no suele superar el 50%. Con gran frecuencia se observa la

presencia de LB monoclonales en SP, como expresión de enfermedad generalizada. El significado clínico de tal hallazgo se desconoce.

La cifra de LDH puede aumentar, especialmente en los linfomas de alto grado de malignidad, con mucha masa tumoral y mal pronóstico. En el 5-10% de los enfermos, sobre todo con linfomas de bajo grado de malignidad, puede haber componentes monoclonales IgG ó IgM. En ocasiones hay hipercalcemia, dato que es muy constante en la leucemia/linfoma T del adulto. Asimismo, los valores séricos del receptor para la interleucina 2 (IL-2) (CD25) pueden ser altos, lo cual se ha relacionado con la extensión y la actividad de la enfermedad.

a.1.8. Diagnóstico.

El diagnóstico es histológico. La elección del ganglio a biopsiar es importante, y deben escogerse, siempre que sea posible, los situados en las regiones supraclaviculares o laterocervicales en vez de los axilares o inguinales, donde las lesiones reactivas inespecíficas son más comunes.

a.1.9. Estudio de extensión.

Sirve para conocer el estadio de la enfermedad. La histología del linfoma, su estadio y los factores pronósticos son esenciales para elegir la estrategia terapéutica más adecuada para cada caso.

Los linfomas foliculares tienden a afectar particularmente los órganos donde el tejido linfoide es más abundante: ganglios linfáticos, MO, bazo, respetando los tejidos extralinfáticos. Los linfomas difusos de alto grado de malignidad pueden afectar órganos extralinfáticos.

La MO se afecta en el 60-80% de los enfermos con linfomas de bajo grado de malignidad. En cambio, en los linfomas de alto grado de malignidad esta circunstancia es más rara (5-15% de los casos). La biopsia hepática revela infiltración por linfoma en el 20-40% de los casos, sobre todo en aquellos con histología de bajo grado de malignidad. A diferencia de lo que ocurre en la EH, en los LNH la afeción del anillo linfático de Waldeyer es frecuente (10-20%).

La mayoría de los enfermos (85-95%) con linfomas de bajo grado de malignidad se hallan en estadios III ó IV en el momento del diagnóstico, y sólo el 5-15% se encuentran aparentemente en estadios I ó II. En el caso de los linfomas de malignidad intermedia y alta, el 20-30% de los casos se hallan en estadios I ó II y el resto (70-80%) en estadios III ó IV.

a.1.10. Pronóstico.

El factor pronóstico de mayor importancia es la histología del linfoma. Los pacientes con linfomas de bajo grado de malignidad tienen una media de supervivencia de 5-10 años. A su vez, aquellos con linfomas de grado intermedio y alto de malignidad tienen una media de supervivencia de 1.5-3 años.

En el pronóstico de los LNH intervienen factores relacionados con el paciente, el linfoma y el tratamiento muchos de los cuales también se relacionan entre sí. Los factores pronóstico más importantes en el momento del diagnóstico son la histología y la masa tumoral, de la que la cifra de LDH es un fiel reflejo. Posteriormente, una rápida respuesta al tratamiento sirve para predecir remisiones y supervivencias prolongadas.

Tabla 5: Factores pronóstico desfavorables en los LNH.

Relacionados con el enfermo
Edad avanzada
Enfermedades asociadas (p. ej., SIDA)
Síntomas generales B
Mal estado general
Relacionados con el linfoma .
Histología
Masa tumoral
Múltiples territorios ganglionares afectados
Masas > 10 cm
Afección extranodal (p. ej., SNC)
Datos analíticos
VSG aumentada
Anemia
LDH alta
β_2 -microglobulina elevada
VIIH+
Fenotipo T (sólo para estadios IV)
Presencia de glucoproteína p+
Índice mitótico alto
Número de células Ki-67+ elevado
Alteraciones de los cromosomas 7 o 17.
Relacionados con el tratamiento
Respuesta lenta (> 3 ciclos para alcanzar la remisión)
Disminución de la dosis de citostáticos previstas
Fracaso terapéutico

a.1.11. Tratamiento.

a.1.11.1. Linfomas de bajo grado de malignidad.

1.a. Estadios I y II.

Sólo un 5-15% de los enfermos presentan formas localizadas de la enfermedad (Ersboll y Schultz, 1989; Montserrat, 1989). La radioterapia localizada se considera el tratamiento de elección para estas formas. La radioterapia sola no parece suficiente. Por ello, suelen emplearse quimioterapia y radioterapia de forma conjunta.

1.b. Estadios III y IV.

Comprende el 85-95% de los pacientes con estos linfomas. El tratamiento óptimo para estos estadios se desconoce. En el momento actual ningún tratamiento es capaz de curar a los enfermos con linfomas de bajo grado de malignidad en estadio avanzado. Con la aplicación de radioterapia total nodal en los pacientes en estadio III se consigue una tasa elevada de RC. La irradiación corporal total (ICT) constituye un arma terapéutica útil en los linfomas linfocíticos en estadio avanzado, con

alrededor de un 80% de RC. La ICT suele producir intensa depresión medular que compromete la posterior administración de quimioterapia. Con agentes alquilantes se consigue un 13-65% de RC. El empleo de quimioterapias más intensivas produce una tasa de RC superior, pero la supervivencia no difiere de la que se observa en pacientes tratados con regímenes menos intensivos.

Los estudios en los que se comparan tratamientos poliquimioterápicos frente a tratamientos con agentes monoalquilantes, no han demostrado diferencias sustanciales en el número de RC, en su duración ni en la supervivencia. Sin embargo, el tiempo necesario para alcanzar la remisión es sensiblemente superior con los alquilantes que con los regímenes poliquimioterápicos. Este hecho debe tenerse en cuenta cuando es preciso alcanzar rápidamente una remisión.

Un estudio emprendido por el "National Cancer Institute" en el que se comparan actitudes opuestas en el tratamiento de estos linfomas. Se observa que la duración de la RC es más larga en los enfermos tratados inicialmente con poliquimioterapia intensiva que en los tratados tras un intervalo de abstención terapéutica.

1.c. Tratamiento de las recaídas.

Las recaídas, a razón del 10-15% anual, son constantes en este tipo de linfomas. Las recaídas en forma de linfoma de alta malignidad suelen responder mal al tratamiento y tienen un pronóstico desfavorable. Cuando las recaídas conservan la histología de baja malignidad, suele ser fácil conseguir nuevas remisiones con el mismo régimen terapéutico con el que se alcanzó la anterior, aunque las remisiones sucesivas que van obteniendo son cada vez de más corta duración.

1.d. Nuevas tendencias.

En el tratamiento de los linfomas de buen pronóstico se están investigando nuevas modalidades terapéuticas: anticuerpos monoclonales, INF, linfoquinas y TMO.

Los anticuerpos monoclonales no han mostrado una gran eficacia debido a una serie de limitaciones bien conocidas (falta de especificidad, presencia de antígenos tumorales libres en el suero, etc). Los anticuerpos monoclonales unidos a toxinas, citostáticos o sustancias radioactivas ofrecen perspectivas prometedoras.

El INF α ha sido ampliamente ensayado en los linfomas de buen pronóstico. En las recaídas los resultados son malos. Sin embargo, como tratamiento de primera línea da lugar a un 50% de respuestas con un 10-15% de RC, aunque por lo general de corta duración. Administrado de forma aislada, el INF α no ofrece ventajas con respecto a los citostáticos. Sin embargo, algunos estudios sugieren que puede mejorar los resultados de la quimioterapia prolongando las RC.

El empleo combinado de diversos modificadores de la respuesta biológica es otro de los aspectos que está en estudio. Asimismo, se están investigando los factores de crecimiento hematopoyético que permiten administrar tratamientos intensivos disminuyendo la toxicidad hematológica.

La experiencia con TMO en este tipo de linfomas es limitada. Los tratamientos pretransplante son muy variados. El estado general del enfermo, el grado de respuesta alcanzado antes del transplante, la quimioterapia recibida previamente y la sensibilidad del linfoma al tratamiento son los factores pronóstico más importantes.

a.1.11.2. Linfomas de grado intermedio y alto de malignidad.

2.a. Estadíos I y II.

Alrededor del 20-30% de los enfermos con estos tipos histológicos presentan formas localizadas de la enfermedad (Ersboll y Schultz, 1989; Montserrat, 1989). El tratamiento de elección es la quimioterapia. Es recomendable utilizar radioterapia de forma complementaria cuando se trata de estadíos II o cuando en el momento del diagnóstico existen grandes masas adenopáticas. La persistencia de adenopatías tras la quimioterapia es otra indicación de la radioterapia complementaria.

En los linfomas localizados del tubo digestivo la cirugía erradicativa es fundamental para poder alcanzar la curación. Tras la cirugía debe efectuarse un tratamiento complementario basado en la quimioterapia.

2.b. Estadíos III y IV.

Mediante el empleo de CHOP se consiguen un 40-60% de RC. Alrededor del 30% de los pacientes recaen.

Mediante el empleo de regímenes con múltiples citostáticos o quimioterapias intensivas en series muy seleccionadas se han conseguido tasas de RC de 70-80%.

La eficacia del tratamiento depende de la forma de administración de la quimioterapia y de los factores pronósticos.

En los estadíos avanzados la radioterapia desempeña un papel complementario.

2.c. Tratamiento de las resistencias y de las recaídas.

Los casos resistentes tienen mal pronóstico, ya que no suelen responder a ningún tratamiento. La esperanza de vida de estos enfermos es muy corta. En los pacientes en recaída, las quimioterapias de "rescate" como el metil-GAG, ifosfamida, metotrexato, VP-16 (MIME) o dexametasona, ARA-C a altas dosis, platino (DHAP) proporciona alrededor de un 30% de nuevas RC,

pero incluso en las mejores series sólo el 10-20% de los enfermos alcanzan una RC continuada. Los factores pronóstico más importantes son el grado de respuesta alcanzado previamente y su duración.

El TMO ofrece resultados algo superiores a los logrados sólo con quimioterapia. Las RC son del 40-60%, y el 20-30% de los enfermos continúan vivos y libres de enfermedad. La mortalidad directamente ligada al trasplante es alta. Los resultados no parecen diferir considerablemente según el tipo de trasplante utilizado. Por ello, el tipo de trasplante más utilizado es el ATMO, excepto que la MO esté infiltrada por el linfoma o sea muy hipocelular. El número de pacientes con linfoma en recaída que pueden beneficiarse del trasplante es escaso, ya que sólo en los menores de 55-60 años, con muy buen estado general, linfoma que todavía responda al tratamiento, sin evidencia de transformación histológica y con una buena respuesta al tratamiento de "rescate", los resultados justifican el procedimiento.

2.d. Nuevas tendencias.

Las quimioterapias más recientes ofrecen perspectivas en el tratamiento de los linfomas con histología desfavorable. Dados los resultados alcanzados con regímenes que incluyen platino en el tratamiento de "rescate", este fármaco se está ensayando, junto con otros de eficacia ya comprobada, en el tratamiento de primera línea de estos linfomas. También se ensaya la administración de citostáticos en forma de infusión continua.

El estudio de factores pronóstico ha permitido identificar un grupo de pacientes en los que los resultados con la quimioterapia convencional son insatisfactorios. En tales pacientes se está investigando el ATMO como parte del tratamiento inicial, utilizándolo como consolidación una vez lograda la RC. Respecto al trasplante, la SP se empieza a utilizar como alternativa a la MO para obtener células madre ("stem-cells") también en estos pacientes. Por otra parte se están investigando diferentes regímenes pre-TMO para erradicar el linfoma y el papel de la radioterapia en los mismos. Por último, los factores de crecimiento hematopoyético, que permiten administrar con mayor seguridad altas dosis de quimioterapia, se están ensayando.

a.1.11.3. Valoración de la respuesta al tratamiento.

La respuesta al tratamiento se valora por datos clínicos y exploraciones complementarias.

Se distinguen los siguientes tipos de respuesta: RC: desaparición de todos los signos y síntomas de la enfermedad, durante un período de tiempo no inferior a un mes; RP: disminución en más del 50% de todos los parámetros mensurables de la enfermedad, y fracaso (FC): respuestas que no alcanzan el grado de RP y enfermedad estable o en progresión. Al lado de la tasa de RC, la

duración de la RC y la supervivencia han venido siendo los parámetros clásicos para valorar la eficacia de un determinado tratamiento.

I.1.2. SLPc CON EXPRESION LEUCEMICA DE ORIGEN T.

En 1975, Brouet et al describieron un cuadro clínico que afectaba a individuos adultos, caracterizado por la proliferación de LT, con escasa leucocitosis, frecuente infiltración cutánea, moderada infiltración linfoide de la MO, pocas o ninguna adenopatía y ocasional hepatoesplenomegalia.

I.1.2.1. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA T.

Alrededor del 2% de las LLC forman rosetas espontáneas con hematíes de carnero. La LLCT es una enfermedad heterogénea tanto desde el punto de vista citológico como clínico.

1.2.1.a. Cuadro clínico.

Es una enfermedad que predomina en varones (2/1) adultos (40-50 años). El diagnóstico puede hacerse de forma totalmente fortuita, al investigar episodios infecciosos de repetición o como parte del estudio de una neutropenia crónica. En algunos casos las manifestaciones clínicas son evidentes, en forma de adenopatías generalizadas e infiltración cutánea.

1.2.1.b. Datos de laboratorio.

La leucocitosis es moderada, normalmente inferior a $20 \times 10^9/L$. Los LT de la LLCT suelen tener características morfológicas típicas: son grandes, de aspecto maduro, citoplasma abundante y con gránulos azurófilos que ultraestructuralmente corresponden a los denominados elementos tubulares paralelos. Asimismo, no suelen observarse sombras de Gumprecht en las extensiones de SP. La fosfatasa ácida y la betaglucuronidasa de los linfocitos son intensamente positivas. En cambio, la alfa naftil acetato esterasa (ANAE) es negativa o muy poco positiva. El fenotipo más característico es CD3+, CD8+, CD4-, CD57, el cual suele asociarse a un curso clínico relativamente crónico. Los casos CD4+ son poco frecuentes y suelen tener un curso más agresivo. En otras ocasiones el fenotipo es diferente. El reordenamiento de las cadenas beta o gamma del receptor T ó la demostración de alteraciones citogenéticas sirven para evidenciar la naturaleza clonal del proceso. No suele haber anemia ni plaquetopenia intensas. En cambio, la granulocitopenia puede ser extrema. Las gammaglobulinas pueden estar aumentadas de forma heterogénea. En la MO, el hígado y el bazo

puede demostrarse una infiltración por las células antes descritas. En la MO la infiltración rara vez es masiva; la estructura medular está conservada.

1.2.1.c. Diagnóstico.

Debe basarse en el cuadro clínico, la existencia de leucocitosis moderada persistente y la linfocitosis T de características morfológicas y fenotípicas típicas. Aunque no hay criterios diagnósticos bien definidos, suele exigirse la existencia en SP de unos recuentos de linfocitos grandes granulados superiores a $1-2 \times 10^9/L$ durante 3-6 meses para que este diagnóstico pueda plantearse (Brouet et al, 1975; Bennet et al, 1989).

1.2.1.d. Tratamiento.

El pronóstico es sumamente variable. En las formas CD4+ el curso clínico suele ser malo. La quimioterapia puede lograr remisiones transitorias. Se han comunicado excelentes resultados con la desoxicoformicina. Algunos pueden responder a los glucocorticoides. Los agentes citostáticos son poco útiles y la esplenectomía tampoco se ha mostrado eficaz.

1.1.2.2. LINFOMAS CUTANEOS DE CELULAS T CON EXPRESION LEUCEMICA (SINDROME DE SEZARY).

En el año 1938 Sézary et al describieron el síndrome de Sézary que constituye una enfermedad que puede afectar a muchos órganos, posee características citológicas e histológicas peculiares y que tiene su origen en la proliferación de las células T con fenotipo colaborador.

1.2.2.a. Cuadro clínico.

Afecta prácticamente por igual a ambos sexos y suele diagnosticarse en individuos de alrededor de 50 años (Broder y Buun, 1980; Montserrat, 1989; Catovsky y Foa, 1990). Es típico que las lesiones cutáneas iniciales sean relativamente inespecíficas. En una etapa posterior aparecen placas que infiltran la piel. El prurito es muy frecuente. Puede haber adenopatías y hepatoesplenomegalia. En las fases más avanzadas de la enfermedad hay invasión de la MO y aparición en SP de las células características de esta enfermedad, de carácter linfoide y núcleos cerebriformes. La cifra de leucocitos en estos casos es muy variable. La leucocitosis puede ser moderada ($12-15 \times 10^9/L$) o extrema (superior a $200 \times 10^9/L$) (Flandrin y Brouet, 1974; Winkelmann, 1974). El porcentaje de células de Sézary también puede variar mucho de un caso a otro (Flandrin y Brouet, 1974). Tales células forman rosetas E. La LDH sérica puede aumentar.

1.2.2.b. Diagnóstico.

Cuando no existe expresión leucémica, el diagnóstico debe efectuarse por medio de la biopsia cutánea, en la que se encuentran las células atípicas infiltrando la piel. El dato más característico es la presencia de células de Sézary (Sausville et al, 1988).

1.2.2.c. Pronóstico.

La media de supervivencia es de unos 5 años.

1.2.2.d. Tratamiento.

En las formas localizadas se emplean distintos esquemas de quimioterapia local y/o radioterapia y/o tratamiento con psoralen y luz ultravioleta. Cuando la enfermedad está en fases avanzadas es obligado el tratamiento con poliquimioterapias del tipo de las utilizadas en los linfomas malignos. Con ello pueden observarse algunas remisiones prolongadas.

II.- SINDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRONICOS.

Bajo el término de síndromes mieloproliferativos crónicos (SMPc) se incluyen un conjunto de hemopatías que tienen su origen en una célula madre pluripotencial de la hematopoyesis y que comparten una serie de características hematológicas, clínicas y evolutivas. Comprenden la leucemia mieloide crónica (LMC), la policitemia vera, la mielofibrosis idiopática y la trombocitopenia esencial (Farreras y Rozman, 1992).

II.1. LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA.

II.1.1. Concepto.

La leucemia mieloide crónica es un SMPc de naturaleza clonal, con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas, si bien el cuadro clínico, biológico e histológico de la enfermedad se halla dominado por la existencia de una intensa proliferación de la serie granulocítica en la MO, SP y otros órganos hematopoyéticos. En casi todos los casos existe una anomalía cromosómica en la MO (el cromosoma Filadelfia o Ph), hecho que confiere a la LMC una gran personalidad. La enfermedad suele presentar un cuadro evolutivo bifásico, con un período inicial o fase crónica, fácil de controlar con diferentes terapéuticas, y otro final o crisis blástica, muy similar desde desde el punto de vista clínico y hematológico a una leucemia aguda, aunque de pronóstico mucho peor. En algunos pacientes se intercala entre ambos un tercer período, la denominada fase de aceleración de la LMC (Ciscar y Farreras, 1972; Williams et al, 1990).

II.1.2. Etiología, patogenia, incidencia y sexo.

La LMC es una enfermedad neoplásica de etiología desconocida. La presencia del cromosoma Ph no sólo en los precursores granulocíticos sino también en los eritrocíticos, megacariocíticos y linfocitos B (y posiblemente en los T) indica que el trastorno que origina la LMC radica probablemente en una célula madre ("stem cell") común a todas las células hematopoyéticas.

La LMC representa el 15-20% del total de las leucemias y su incidencia en los países occidentales se estima en un caso nuevo por 100000 habitantes y año. Puede aparecer a cualquier edad, pero es más frecuente en las edades media y avanzada de la vida y rara, en cambio, en la infancia. La edad media se sitúa alrededor de los 45 años y el pico de incidencia máxima entre los 30 y los 40. Predomina ligeramente en los varones.

II.1.3. Cuadro clínico.

El diagnóstico de la LMC suele ir precedido de un período de unos meses durante los cuales los pacientes presentan síntomas inespecíficos (astenia, anorexia, pérdida de peso, febrícula, sudación nocturna). Otras manifestaciones clínicas son bastante menos frecuentes. En el 15% de los casos el diagnóstico de LMC se establece de forma casual, al descubrirse leucocitosis o una masa abdominal en una exploración de revisión o por otro motivo.

Una forma de presentación poco habitual de la LMC consiste en la crisis blástica inicial, en pacientes en quienes la fase crónica de la enfermedad ha pasado inadvertida. En algunos enfermos el cuadro recuerda una leucemia aguda, y en otros, con localización extramedular de la crisis blástica (especialmente en ganglios), puede confundirse con un linfoma. En tales casos la presencia de datos sugestivos de LMC, como esplenomegalia, basofilia, mieleemia o trombocitosis, permite sospechar el auténtico diagnóstico, que se confirmará al demostrar el cromosoma Ph.

El hallazgo más constante de la exploración física es la esplenomegalia, presente en el 80% de los pacientes. Su tamaño es muy variable y suele guardar relación con la cifra de leucocitos, siendo frecuente que alcance o incluso sobrepase la línea umbilical. En la mitad de los casos se detecta hepatomegalia, por lo general moderada.

II.1.4. Datos de laboratorio.

El dato más característico es la leucocitosis, por lo general entre 50 y $300 \times 10^9/L$, a base de granulocitos en todos los estadios madurativos. Si bien las formas maduras son más numerosas que las inmaduras, es típico que los mielocitos predominen sobre los metamielocitos. En general, la proporción de blastos en SP es pequeña (0-8%). La basofilia es prácticamente constante y la

eosinofilia es más rara. En la mitad de los casos se observan eritroblastos circulantes. Suele existir anemia moderada. En cuanto a las plaquetas, casi siempre son normales o elevadas y presentan alteraciones en su funcionalismo, lo que explica la tendencia de estos enfermos a sufrir hemorragias.

Un parámetro de gran valor diagnóstico es la disminución de la actividad de la FAG, que muy a menudo llega a ser de 0, hallazgo que ayuda en el diagnóstico diferencial con otras entidades.

El aumento constante en los niveles séricos de vitamina B₁₂ y transcobalaminas y casi constante de la LDH y del ácido úrico séricos reflejan el aumento del recambio granulocitario que se produce en la enfermedad. Suele existir un aumento moderado de la muramidasa sérica y es igualmente frecuente la hipocolesterolemia, que desaparece con el tratamiento.

El examen del aspirado medular revela un intenso aumento de la celularidad hematopóyética, en especial de la serie granulocítica, por lo que la relación mieloeritroide se halla notablemente aumentada. Los mielocitos y metamielocitos son los elementos predominantes y la proporción inicial de blastos pocas veces supera el 5%. Con frecuencia se evidencia una notable hiperplasia de los magacariocitos. Aunque la disminución del hierro medular y de los sideroblastos es habitual, dicho hallazgo no traduce la existencia de un auténtico estado de ferropenia, ya que la ferritinemia suele ser normal (Cervantes et al, 1983).

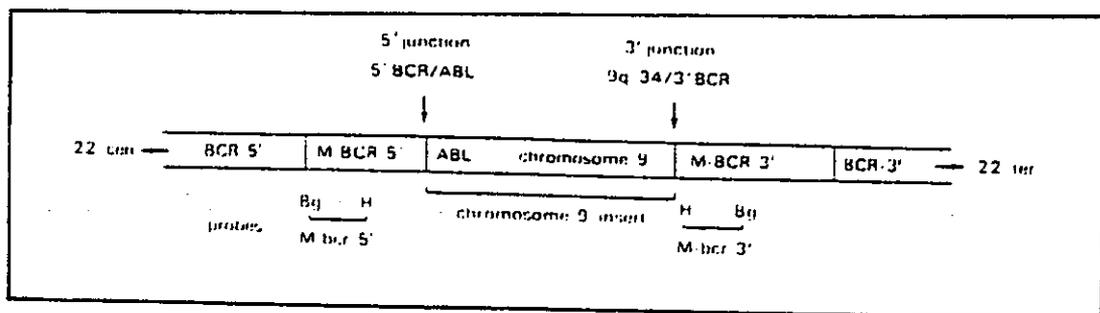
El estudio citogenético de la MO demuestra la existencia del cromosoma Ph en más del 90% de los casos. Nowell y Hungerford en 1960 descubrieron en la LMC el cromosoma Filadelfia o cromosoma Ph¹ (Ph como las iniciales del nombre inglés de esta ciudad, "Philadelphia", en la cual radicaba el laboratorio donde el cromosoma anómalo en cuestión fue descubierto, y el exponente 1 para indicar que era el primer cromosoma anormal encontrado en la misma, ya que había la posibilidad de que descubrieran más y entonces serían denominados Ph², Ph³, etc.). Consiste en la pérdida del material de los brazos largos de uno de los cromosomas del par 22, por translocación al cromosoma 9. Por tanto el cromosoma Ph es en realidad un cromosoma 22 de menor tamaño que su homólogo. El reciente desarrollo de las técnicas de análisis molecular ha permitido reconocer que la translocación entre los cromosomas 22 y 9 es recíproca, ya que el cromosoma 9 transfiere a su vez una pequeña porción de sus brazos largos al 22. Dicho material constituye el oncogén abl que, al unirse a la región bcr ("breakpoint cluster region") del cromosoma 22 da origen al oncogén bcr-abl. En los pacientes con LMC, el punto de ruptura en el gen bcr ocurre dentro de una región de 5-8 kilobases denominada región bcr "major" (Mbcr). En el 50% de los pacientes con LLA que tienen t(9;22)(q34;q11.2), el

punto de ruptura es en Mbcrr; en el otro 50% el punto de ruptura es en otra región del bcr llamada "minor bcr" (mbcr). Sea cual sea el punto de ruptura en bcr, la unión de bcr y abl parece tener potencial maligno. El significado clínico del sitio "minor" y "major" no se conoce. El oncogén bcr-abl sintetiza un ácido ribonucleico mensajero (ARNm) quimérico, que codifica la síntesis de una proteína con actividad tirosinocinasa anómala. Dicha proteína (que regula el crecimiento celular) parece la responsable de la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas. El cromosoma Ph persiste en la crisis blástica, fase en la que en el 60-80% de los casos existen otras anomalías citogenéticas, siendo las más frecuentes la trisomía 8, la aparición de un segundo cromosoma Ph y el isocromosoma 17 (Cervantes et al, 1986).

La investigación de este cromosoma tiene gran importancia cuando existen dudas diagnósticas, y puede hacerse en SP o en MO. Este cromosoma se encuentra en todas las fases de la enfermedad.

Fig. 1: Diagrama que muestra parte del cromosoma 22 y el gen bcr (no a escala).

Un segmento del cromosoma 9 que incluye abl está entre la zona 5'y 3'de un M-bcr que está dividido. Se indican las posiciones de los lugares de unión 5'y 3'y los lugares de las sondas M-bcr.



II.1.5. Formas clínicas.

Tradicionalmente se distinguían dos formas de LMC, según presentasen o no el cromosoma Ph: LMC convencional (Ph-positiva) y LMC Ph-negativa. La aplicación en los últimos años de criterios más precisos para el diagnóstico de síndromes mielodisplásicos, así como la introducción de las modernas técnicas de análisis molecular, han hecho que tienda a cuestionarse la existencia de la LMC Ph-negativa. Se ha comprobado que muchos de estos pacientes se hallan afectados en realidad de una

mielodisplasia, mientras que en otros se detecta la alteración molecular característica de la LMC (el reordenamiento bcr-abl). De esta forma quedarían pocos pacientes con LMC auténticamente Ph-negativa.

En la infancia se reconocen dos formas de LMC: la forma adulta y la llamada forma juvenil. La primera afecta a niños mayores de 5 años, es Ph-positiva y resulta en todo indistinguible de la LMC del adulto. En cuanto a la forma juvenil, se trata en realidad de una forma mielomonocítica subaguda o crónica de la infancia, que muestra ciertos rasgos característicos, como la edad de los pacientes inferior a 5 años, la frecuente presencia de erupciones cutáneas, adenopatías u otras localizaciones leucémicas extramedulares, el menor grado de leucocitosis, la presencia de monocitosis, la frecuente plaquetopenia, la existencia de alteraciones en los antígenos eritrocitarios y aumento de la hemoglobina fetal, la resistencia al tratamiento con busulfán y la corta supervivencia.

La crisis blástica inicial de la LMC presenta dos variantes: pseudoleucemia aguda y pseudolinfoma.

También se pueden distinguir dos entidades extremadamente diferentes de la LMC: la leucemia neutrofílica crónica y la leucemia eosinofílica.

II.1.6. Evolución y pronóstico.

La supervivencia media de los pacientes con LMC es de 3-4 años.

Los factores iniciales que determinan un pronóstico más desfavorable son la edad avanzada, el mayor tamaño del bazo, la trombocitosis intensa y un mayor porcentaje de blastos circulantes.

III.7. Fase de aceleración y crisis blástica.

Durante la fase crónica la LMC es una enfermedad poco agresiva y fácil de controlar, que permite a los pacientes una vida prácticamente normal. Al cabo de un período variable, cuyo promedio es de unos 3 años, la enfermedad entra en una fase terminal muy agresiva y resistente al tratamiento. Este período final de la LMC sigue dos grandes patrones clinicohematológicos: la fase de aceleración y la crisis blástica.

La fase de aceleración se observa en alrededor de un tercio de los pacientes. En ellos cambian las características de la enfermedad, sin que el porcentaje de blastos en SP o en MO sea de momento suficiente para establecer el diagnóstico de crisis blástica. Si bien no existen unos criterios diagnósticos de aceptación generalizada, la aparición a lo largo de la fase crónica de la LMC de dos o más de las características siguientes permite diagnosticar la fase de aceleración: fiebre y/o sudoración nocturna inexplicables, esplenomegalia progresiva y resistencia al tratamiento, anemia o

plaquetopenia no atribuibles a la quimioterapia, leucocitosis resistente al tratamiento, trombocitosis superior a $1000 \times 10^9/L$ en ausencia de esplenectomía, blastosis del 10-20% en SP o en MO y aparición de anomalías citogenéticas adicionales al cromosoma Ph. Algunos pacientes fallecen en esta fase por infección o hemorragia, pero la mayoría acaban por presentar en pocos meses criterios de crisis blástica.

La crisis blástica "auténtica" consiste en el paso sin solución de continuidad de la fase crónica a un cuadro superponible al de la leucemia aguda, con la invasión más o menos absoluta de la Mo, la SP y a veces otros órganos por blastos. Este patrón evolutivo es el más frecuente, ya que se da en el 60% de los pacientes. Para el diagnóstico de crisis blástica se exige la presencia de uno de los siguientes criterios: a) blastos $\geq 20\%$ en SP o MO; b) blastos+promielocitos $\geq 30\%$ en SP ó $\geq 50\%$ en MO, y c) infiltración blástica extramedular (crisis blástica extramedular) en ganglios, periostio, SNC, piel o partes blandas. Desde el punto de vista clínico se observa un rápido deterioro de los enfermos, que presentan anorexia, astenia, pérdida de peso, fiebre, sudoración profusa, dolores óseos, molestias por el crecimiento masivo del bazo, síndrome anémico, infecciones, hemorragias. Estas dos últimas complicaciones constituyen las causas habituales de muerte. Aparte de la blastosis periférica, aparecen anemia y plaquetopenia. Los blastos son de estirpe mieloide en el 60% de los pacientes, linfoide en el 25% y megacarioblástica o eritroide en el resto, mientras que en el 60%-80% de los casos se observan nuevas anomalías citogenéticas (trisomía 8, duplicación del cromosoma Ph, isocromosoma 17). La supervivencia media es de sólo 4-5 meses desde el diagnóstico de la crisis blástica.

II.1.8. Tratamiento.

Cuando la LMC se deja a su libre evolución, la supervivencia media es de unos 19 meses. El tratamiento la alarga hasta 3-4 años.

Fase crónica: El busulfán es el fármaco de elección. La hidroxiurea es tan eficaz como el busulfán. Su efecto es mucho más rápido. Otro fármaco de interés es la 6-mercaptopurina, que, por su menor efecto sobre la proliferación megacariocítica, suele reservarse en los casos en los que aparece plaquetopenia.

Otras modalidades terapéuticas de escasa aplicación actual son la radioterapia esplénica, el ^{32}P y la esplenectomía.

Fase de aceleración: La aparición de esta fase obliga a cambiar el tratamiento, para lo cual se aprovecha la falta de resistencia cruzada entre el busulfán y la hidroxiurea. Por tanto deberá cambiarse a hidroxiurea si se emplea el busulfán, y viceversa. De este modo es posible restablecer, a veces, el control de la enfermedad durante unos meses, hasta que finalmente aparece la crisis blástica.

Crisis blástica: El tratamiento en este caso es poco efectivo. Cuando la crisis blástica es de fenotipo linfoide existen elevadas posibilidades de obtener una remisión temporal con la asociación de vincristina, prednisona y adriamicina.

Nuevas tendencias: En los últimos años se está empleando el interferón alfa en la fase crónica de la LMC. Con este tratamiento se consiguen remisiones clinicohematológicas en el 70% de los casos, pero rara vez se logra eliminar el cromosoma Ph, desconociéndose por el momento su efecto sobre la supervivencia.

La única medida terapéutica que ha logrado la curación aparente en algunos pacientes con LMC es el TMO (Goldman et al, 1988). Debe realizarse en individuos menores de 45 años y en la fase crónica de la enfermedad.

III.- CITOGENETICA EN LLC Y EN DESORDENES RELACIONADOS.

Las anomalías cromosómicas en células de tumores permiten la identificación de los genes que están envueltos en la transformación maligna, y pueden también ser de ayuda en la determinación del pronóstico y en el manejo clínico de los pacientes con tumores (Mitelman y Levan, 1981).

Hace 80 años, en 1914, Boveri describió cambios cromosómicos en células del tumor. La transformación de las células normales a células tumorales requiere múltiples sucesos, de los cuales al menos algunos son reflejados por cambios estructurales en el genoma.

La primera anomalía cromosómica específica de tumor identificada fue el cromosoma Ph, un cromosoma pequeño en LMC, descrito por Nowell y Hungerford en 1960. 10 años después, debido al desarrollo de las técnicas de bandeado cromosómico por Caspersson et al en 1971, fue posible identificar el cromosoma Ph que es un cromosoma 22 alterado (Caspersson et al, 1970) que resulta de una $t(9;22)(q34;q11.2)$ (Rowley, 1973). En el año 1980 se estudiaron los puntos de ruptura específicos dentro del gen bcr y el oncogen abl, el gen híbrido específico del tumor identificado, el producto del gen caracterizado (Kurzrock et al, 1988) y la amplificación génica con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizada para detección simplificada y altamente sensible de células con el cromosoma Ph.

El segundo ejemplo de descubrimientos cromosómicos son los linfomas foliculares. Este subtipo de linfomas es caracterizado por una translocación t(14;18) (q32;q21) (Yunis et al, 1982). Posteriormente se produjo la identificación del gen bcl-2 (Tsujiimoto et al, 1984a) y su producto génico (Chen Levy et al, 1989)

Se ha demostrado que las anomalías cromosómicas llevan información pronóstico. Así, los descubrimientos cromosómicos en individuos con leucemia mieloide aguda (Yunis et al, 1984) y LLA (Bloomfield et al, 1986) son importantes en la selección de pacientes para tratamientos específicos. Además, esfuerzos para identificar y caracterizar anomalías cromosómicas en otros tipos de tumor con técnicas citogenéticas y moleculares, mejoran el conocimiento de la patofisiología del tumor, diagnóstico y tratamiento para varias clases de tumor.

Las técnicas citogenéticas requieren células en metafase de buena calidad. Los tumores que proliferan rápidamente, tales como en leucemias agudas, normalmente presentan mitosis espontáneas. Sin embargo, células de enfermedades perezosas, tales como LLC, tienen un índice mitótico muy bajo y la activación "in vitro" con mitógenos es requerida para inducir mitosis en células del tumor de tales enfermedades. Para evaluar anomalías cromosómicas la técnica consistía en cultivar células de SP con fitohemaglutinina (PHA), que es un potente activador de células T, produciendo metafases de LT. Así, cuando o cultivos de MO no estimulados o células de SP estimulados con PHA de pacientes con LLC eran analizadas, como ocurrió en los años 1970, sólo las células normales eran evaluables para el análisis cromosómico. La conclusión entonces era que no había anomalías cromosómicas en LLC (Crossen, 1975).

En 1978 fue documentada la primera activación con éxito en las células de LLC (Robèrt et al, 1978) y fueron detectadas las anomalías cromosómicas (Gahrton et al, 1980a,b). Los mitógenos con más éxito han sido lipopolisacáridos (LPS), sobrenadante de VEB y acetato de tetra decanoil forbol (TPA). Células de LLC muestran una heterogeneidad en la respuesta a los mitógenos (Robèrt et al, 1978).

Desafortunadamente, la calidad de las metafases de las células del tumor son peores que las de células normales que contaminan. Es por lo tanto importante intentar el análisis de las metafases de peor calidad para permitir la identificación de las anomalías de las células del tumor, ya que la mayoría de los cultivos de células contienen células normales mezcladas con una proporción variable de células de tumor.

III.1.SLPc CON EXPRESION LEUCEMICA DE ORIGEN B.

III.1.1.LEUCEMIA LINFATICA CRONICA B.

La LLC es la leucemia más común en la europa del oeste y en USA, pero es rara en Asia. Las células leucémicas de pacientes con LLC son obtenidas fácilmente, ya que son abundantes en SP. los pacientes frecuentemente no tienen necesidad para el tratamiento y tienen larga vida, y la terapia tradicional no ha sido efectiva en la erradicación de la leucemia. A pesar de esto, la incapacidad para inducir mitosis de células leucémicas "in vitro" impidió el análisis cromosómico con éxito hasta 1979 (Gahrton et al, 1979). La trisomía 12 fue identificada como la anomalía más frecuente (Gahrton et al, 1980a,b), encontrada en 15% de todos los pacientes estudiados, y en aproximadamente 1/3 de aquellos con anomalías cromosómicas.

Las anomalías estructurales envuelven frecuentemente el brazo largo del cromosoma 13 (Peterson et al, 1992), con diferentes puntos de ruptura (Tabla 6). La mayoría de estas anomalías envuelven una delección de la banda 13q14, el lugar del gen supresor del retinoblastoma.

Tabla 6: Anomalías estructurales del cromosoma 13.

Band	Simple	Complex
p11		+(13;7)(p11;7)
q11	del(13)(q11q22)	(2;13)(q32;q11) (7;13)(7;q11)
q12	del(13)(q12q14)	(3;13)(p25;q11) del(13)(q12q14) del(13)(q12q21) del(13)(q12q22)
	ins(4;13)(p15;q12q14)	(3;13)(q12;q12) (9;13)(q32;q12) (1;13)(q12;p11) (1;13)(q12;q14)
q13	del(13)(q13q14)	(3;13)(q13q14)
	del(13)(q13q21)	del(13)(q13q11)
	del(13)(q13q22)	(3;13)(q29;q13)
q14	del(13)(q14q21)	del(13)(q14q21)
	del(13)(q14q22)	del(13)(q14q22)
q14	del(13)(q14q31)	del(13)(q14q32) del(13)(q14)
	(2;13)(q14;q14)	(2;13)(q17;q14)
	(3;13)(q13;q14)	(3;13)(q29;q14)
	(6;13)(p21;q14)	(6;13)(q15;q14)
	(6;13)(p23;q14)	(6;13)(q25;q14)
	(9;13)(q22;q14)	(7;13)(q11;q14)
	(11;13)(p13;q14)	(7;13)(q21;q14)
	(11;13)(p15;q14)	
	(11;13)(q21;q14)	(11;13)(q23;q14)
	(12;13)(q14;q14)	(12;13)(q27;q14)
	(13;14)(q14;q32)	(13;14)(q14;q24)
	(13;15)(q14;p11)	ins(13;14)(q14;q24q32)
	(13;18)(q14;p11)	(13;18)(q14;q22)
(13;19)(q14;p13)	(13;19)(q14;p13) (13;19)(q14;p13)	
q21	(4;13;17)(q34;q14;q23)	(Y;13;19)(q11;q14;q13)
	del(13)(q21q22)	del(13)(q21)
q22	(X;13)(p22;q22)	(13;21)(q21;q22)
	(1;13;9)(q21;q22;q26)	del(13)(q22)
q31	(13;13)(q31;q34)	(13;17)(q22;q22)
q32	(6;13)(q31;q32)	
q34	(6;13)(q21;q34)	(14;13)(q31;q32)

Data from the IWC/CLL database, with the addition of published karyotypes. n indicates number of patients with identical abnormalities.

Sin embargo, el otro alelo normalmente tiene un gen de retinoblastoma normal (Liu et al, 1992), y el producto del gen del retinoblastoma es expresado normalmente en pacientes con deleciones del gen del retinoblastoma (Kay et al, 1991; Brown et al, 1993; Liu et al, 1993).

Otros cromosomas frecuentemente afectados en la LLCB incluyen n° 11, 6 y 14. El cromosoma 14 esconde los genes para las cadenas pesadas de las Ig en la banda q32 en el extremo distal del brazo largo. Estas anomalías se deben normalmente a la presencia de material cromosómico extra en el brazo q, que origina un cromosoma marcador 14q+. El material adicional translocado a 14q puede originarse de cualquier cromosoma. Sin embargo, hay ciertos cromosomas donadores no al azar. El más frecuente es el cromosoma 11, con una ruptura en 11q13 (Tabla 3), originando una translocación t(11;14) (q13;q32) que une el gen bcl-1 (Tsujiimoto et al, 1984b; Meeker et al, 1989) y el gen para la cadena pesada de la Ig. Aunque común en la LLC, esta translocación es especialmente característica para LP y ciertos linfomas, tales como linfomas intermedios y linfomas esplénicos con linfocitos vellosos (Pambo de Oliveira et al, 1989; Brito-Babapulle et al, 1991). Otras anomalías que envuelven el cromosoma 14 son deleciones terminales del brazo largo, más comunmente con puntos de ruptura en q21-q24 (Tabla 7).

Tabla 7: Anomalías estructurales del cromosoma 14.

Band	Single		Complex	
p11			t(8;14)(q12;p11) t(14;17)(p11;q11) t(14;18)(p11;q11)	
q11			inv(14)(q11q32) t(10;14)(q24;q11) del(14)(q11q13)	n = 2
q12			t(11;14;17)(q13;q12:?)	
q13			t(1;3;14)(q23q42;q14;q13) inv(14)(q13;q32)	
q21			del(14)(q21)	
q22	t(14;18)(q22;q21)		del(14)(q22)	
q23	del(14)(q23)	n = 2		
q24			del(14)(q24) ins(13;14)(q14;q24q32) t(13;14)(q14;q24) del(14)(q31)	n = 3
q31			t(7;14)(q11;q27q31) t(11;14)(q13;q32) t(11;14)(q15;q32) t(14;18)(q32;q21) t(1;14)(p22;q32) t(2;14)(p12;p32) t(2;14)(p16;q32) t(2;14)(p22;q32) t(5;14)(?;q32) t(8;14)(q24;q32) t(12;14)(q15;q32) t(14;17)(q32;q11) t(14;19)(q32;q13) t(14;?) (q32;?)	n = 7 n = 12 n = 2
q32	t(11;14)(q13;q32)	n = 7		
	t(14;18)(q32;q21)			n = 2
	t(14;18)(q32;q13)			
	t(2;14)(p14;q32)			
	t(9;14)(p12;q32)			
	t(14;19)(q32;q13)			
	t(14;?) (q32;?)	n = 3		n = 12

Un quinto cromosoma, frecuentemente envuelto en anomalías de la LLC, es el n°6, principalmente como deleciones del brazo largo, o translocaciones con puntos de ruptura muy variables en ambos brazos (Juliusson y Gahrton, 1990a,b; 1993a,b; Philip et al, 1991).

En la LLC, análisis cromosómicos realizados adecuadamente que siguen a la estimulación adecuada con mitógenos de las células B (Robèrt et al, 1978; Callen y Ford, 1983) revela cambios clonales en la mitad de los casos. Más de la mitad de estos cariotipos anormales están constituidos por anomalías únicas, mientras que cariotipos complejos son encontrados en 10-15% de los pacientes. Anomalías cromosómicas únicas encontradas en LLC son listadas en la tabla 8. La trisomía 12 es la única anomalía en el 55% de los casos, y anomalías 13q aparecen individualmente en 45%, mientras que sólo 1/3 de las anomalías 11q y 6q son únicas. Anomalías 14q son acompañadas por otras anomalías en más de 3/4 de los pacientes.

Tabla 8: Anomalías cromosómicas únicas en LLC.

Abnormality	No. of patients
+12	96
13q	45
involving 13q14	36
6q-	17
11q- (excl. t(11;14))	17
14q+	11
t(11;14)(q13;q32)	5
t(14;18)(q32;q21)	2
t(14;19)	1
+3	4
+18	4
iso(17)q	3
+21	3
+X	3
+8	2
+16	2
8q+	2
2q-	2
7p-	2
inv(9)	2

Genes de importancia patofisiológica específica pueden ser detectados a través de anomalías cromosómicas estructurales específicas. Al contrario de LMC y algunas leucemias agudas, en las que hay evidencias del papel de los oncogenes, los oncogenes definidos hasta ahora localizados en el cromosoma 12 no se ha visto que estean activados en la LLC (Butturini y Gale, 1988; Juliusson y Gahrton, 1990a,b; Tsujimoto, 1993). Una pista de los genes que están envueltos puede venir de las anomalías estructurales del cromosoma 12 que son vistas en la tabla 9. Los puntos de ruptura más comunes parecen ser p11, q13 y q22. Varias de las anomalías estructurales producen trisomías parciales, principalmente de partes del brazo largo del cromosoma 12 (Gahrton et al, 1982; Crossen y Horn, 1987; Mecucci et al, 1988; Bird et al, 1989; Xiao et al, 1990).

Paréce haber alguna correlación entre cariotipo y estadio clínico. Las anomalías son menos frecuentes en el estadio A de Binet (Binet et al, 1981), y más comunes en el estadio C. La mayoría

de los pacientes muestran progresión del tumor sin un cambio en los descubrimientos cromosómicos (Juliusson et al, 1988a,b; Nowell et al, 1988; Oscier et al, 1991). Cuando anomalías 14q aparecen individualmente, ellas son casi exclusivamente encontradas en el estadio A, mientras que cariotipos complejos 14q son una característica común de la enfermedad en estadio C.

Tabla 9: Anomalías estructurales del cromosoma 12.

Band	Single	Complex
p11	t(12;19)(p11;q13) t(9;12)(q34;p11)	t(4;12)(q21;p11) t(12;?)(p11;?) dup(12)(p11;p13)
p12		+t(12;7)(p12;?) +t(10;12)(q22;p12)
p13		t(12;19)(p13;p12) t(6;12)(q15;p13) dup(12)(p13q11)
q11		+t(4;12)(q35;q11)
q13	t(5;12)(q21;q13)	t(6;12)(p22;q13) t(12;17)(q13;p11) t(12;17)(q13;p13) +t(12;17)(q13;p13) dup(12)(q13q22)
q14	t(12;13)(q14;q14)	
q15		t(12;14)(q15;q32)
q22		+del(12)(q22)
q24	t(2;12)(p11;q24) t(7;12)(q11;q24)	
q2?		t(12;13)(q2?;q14)

1.1.1. Estudios moleculares de anomalías cromosómicas en LLC.

Las técnicas moleculares, recientemente desarrolladas, permiten la identificación de anomalías cromosómicas (Rechavi et al, 1989; Adachi et al, 1990; Einhorn et al, 1990; Raghoebier et al, 1991b; Delhomme-Bachy et al, 1992).

Sólo desde hace unos pocos años, están disponibles sondas de ADN marcadas con biotina específicas para las secuencias repetidas α -satélite en la región centromérica del cromosoma 12. HIS fluorescente de esta sonda puede por lo tanto detectar 3 copias del cromosoma 12, no sólo en células en metafase, sino también en células en interfase. Varios estudios han mostrado que individuos con trisomía 12 pueden ser identificados por HIS fluorescente, incluso cuando la anomalía cromosómica no es detectada en las preparaciones para citogenética convencional (Tabla 10).

Debido a la activación no correcta, utilizando mitógenos activos de células T, la incidencia de la trisomía 12 detectada por HIS fluorescente es mayor que la que ha sido publicada en los pacientes estudiados mediante técnicas citogenéticas. HIS fluorescente podría ser un método más simple para

la detección de trisomía 12, aunque anomalías estructurales con regiones centroméricas supranuméricas, frecuentes pérdidas al azar y células hiperdiploides serán mal interpretados. También, los estudios citogenéticos tienen la gran ventaja de permitir la identificación de múltiples anomalías cromosómicas a la vez. Así, estas técnicas preferiblemente deberían ser usadas juntas. Si no es posible, es necesario un mínimo panel de sondas de ADN que hibridan a varios cromosomas, como es ya empleado por algunas instituciones (Lewis et al, 1972,93).

Tabla 10: Análisis molecular de trisomía 12 en LLC.

Reference	Cytogenetics		FISH
	With +12/total	With +12/total	Range of cells with +12 (%)
Cunéo et al (1992)	0/20 (0)*	4/20 (20)	15-25
Perez Losada et al (1991)	0/13 (0)	2/13 (15)	5, 56
Anastasi et al (1992)	7/40 (18)	12/40 (30)	24-68
	Not performed	6/20 (30)	48-72
Escudier et al (1991)	18/294 (8)	26/80 (33)	median 42 (6/26 < 10)
Döhner et al (1991a)	2/20 (10)	4/20 (20)	
Chen et al (1992a,b)	0/10 (0)	3/10 (30)	
Oumsiyeh & Tharapel (1992)	1/7 (14)	4/7 (57)	
Raghoebier et al (1991a)	Not performed	7/61 (11)	30-91
Einhorn et al (1990)	0/13	0/13†	

Values are numbers of patients with percentages in parentheses.
 * One patient subsequently had +12 in 7/12 cells.
 † Analysed by RFLP; in most studies, cells were selected for FISH or RFLP due to previous cytogenetic results.

1.1.2. Hallazgos cromosómicos y pronóstico.

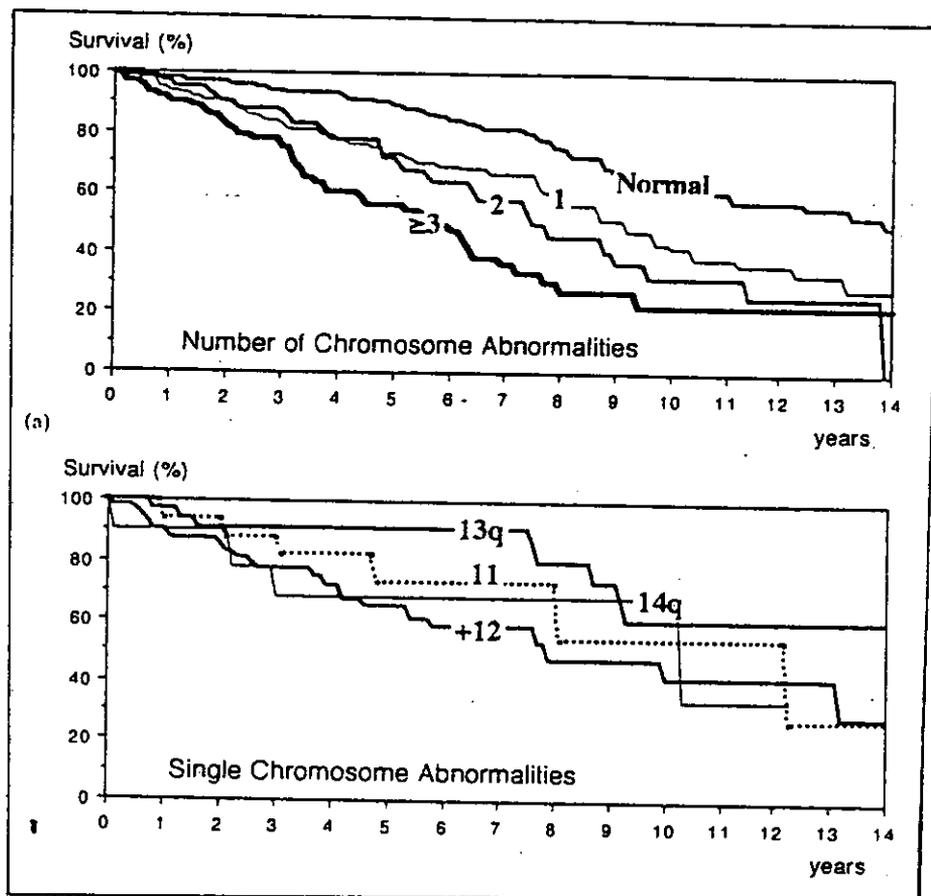
Robèrt et al observaron en 1982 que la trisomía 12 era un signo de pronóstico adverso (Robèrt et al, 1982). Este descubrimiento fue altamente significativo en análisis siguientes (Juliussón et al, 1985b), pero fue cambiado por los investigadores que no encontraron diferencias en el índice de supervivencia en conjunto para los pacientes con y sin trisomía 12 (Han et al, 1984a,b; Pittman y Catovsky, 1984). En efecto, hasta que el IWCCLL recopiló los datos de cariotipos y de supervivencia de 400 pacientes no fue posible confirmar el efecto adverso de la trisomía 12 en la supervivencia

(Juliussen et al, 1990a,b), aunque las curvas de supervivencia de la mayoría de los estudios tienen una apariencia similar. El efecto adverso de la trisomía 12 puede ser escondido si pacientes con cariotipos complejos son incluidos. En la Fig 3 Juliussen y Gahrton muestran la supervivencia de pacientes con trisomía 12 como la única anomalía en comparación con otras anomalías únicas específicas. Pacientes con anomalías estructurales en el cromosoma 13 parecen tener tan buen pronóstico como aquellos con un cariotipo normal (Juliussen et al, 1990a,b).

Cualquier anomalía cromosómica indica un peor pronóstico comparado a un cariotipo normal (Han et al, 1984a,b). Sin embargo, la complejidad del cariotipo es un parámetro pronóstico más significativo (Juliussen et al, 1985b; 1990a,b; Juliussen, 1986). Anomalías cromosómicas únicas en LLC indican una supervivencia más grande que múltiples anomalías (Juliussen et al, 1985b; 1990a,b; 1991), y resultados similares fueron vistos en LNH (Kristoffersson et al, 1987). El impacto adverso en la supervivencia de los cromosomas 14q+ (Juliussen et al, 1990a,b), primero mostrado por Pittman y Catovsky (1984), parece ser debido a la fuerte asociación entre marcadores 14q+ y cariotipos complejos: anomalías 14q solas funcionan tan bien como otras anomalías solas, excluyendo la trisomía 12 (Fig 3). Es ampliamente reconocido que hay una correlación inversa entre supervivencia y la extensión de las anomalías cromosómicas en esta enfermedad (Juliussen et al, 1990a,b; Juliussen y Gahrton, 1993b).

Una alta proporción de metafases anormales sería un signo de activación preferencial de células de leucemia comparado con células normales, y así compatible con peor pronóstico (Juliussen et al, 1985b, 1990; Juliussen, 1986). Se requieren grandes estudios, y la citogenética convencional es además necesaria para la detección de cariotipos complejos.

Figura 3: Curvas de supervivencia de acuerdo a los descubrimientos cromosómicos en 649 pacientes con LLC (Juliussen et al, 1991). (a) Cariotipo normal (n=293); 1, 2, 3 ó más anomalías clonales, n=176, 64 y 71, respectivamente. (b) Anomalías únicas sólo: +12 (n=61), anomalías estructurales que afectan a los cromosomas 13 (n=33), 11 (n=18) y 14 (n=17).



1.1.3. Origen y Mecanismo de la trisomía 12.

Wang et al en 1985 y Crossen et al en 1987, usando sondas moleculares que detectan polimorfismos en el cromosoma 12, indican que la presencia de un cromosoma 12 adicional en la LLC no se produce por triplicación de un homólogo. Sugieren que la LLC se puede alcanzar a través de un mecanismo dosis-gen. La duplicación de un cromosoma que contiene un gen alterado o un oncogén activado daría dos copias del gen y podría llevar a neoplasia. La posterior pérdida del cromosoma normal y su reemplazamiento por el homólogo anormal llevaría tres copias del gen alterado.

Mecucci et al en 1988 señalan un efecto dosis gen para explicar las consecuencias de la trisomía cromosómica en la enfermedad. Dicen que el origen de la trisomía 12 en la LLC es la duplicación de un homólogo por una no disyunción y no la triplicación de un cromosoma asociada con pérdida del homólogo. Señalan que la duplicación del brazo largo del cromosoma 12 es el paso crítico en la LLC. Aunque normalmente una trisomía 12 completa se encuentra en LLC, aparentemente una trisomía del brazo largo es suficiente para tener el efecto de trisomía 12 en LLC. Esto confirma la evidencia, previamente obtenida, que un segmento en el cromosoma 12, la banda q13-q22, es crítica en la LLC. Esta zona es la zona del gen que es importante para la transformación maligna. El aislamiento del gen relevante permitiría determinar si la transformación maligna es realmente debida a un efecto dosis-gen o a una activación mutacional del gen.

Einhorn et al en 1989 investigaron a nivel molecular el origen citogenético del cromosoma 12 extra y mostraron que resulta de una simple duplicación de uno de los alelos, lo que está de acuerdo con los estudios anteriores (Wang, Crossen y Mecucci). Las células en metafase de pacientes con trisomía 12 que tienen un cariotipo normal derivan de una pequeña fracción de células normales y fácilmente estimuladas y no de una segunda gran población de células malignas con un cariotipo normal.

Los resultados de Xiao et al en 1990 son consistentes con la idea que la LLC se puede alcanzar a través de un mecanismo dosis gen. Los genes localizados en el brazo largo del cromosoma 12 posiblemente juegan un papel importante en el desarrollo de la LLCB junto con un mecanismo dosis-gen, confirmando los estudios anteriores.

III.1.2. LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS (TRICOLEUCEMIA).

Esta leucemia presenta cambios cromosómicos algunos comunes y otros no con otras leucemias de células B. Mediante análisis citogenético, en la tricoleucemia se ha descrito la presencia de trisomía 12 en el 9% de los pacientes utilizando SP y 40% en cultivo de líneas celulares. Hay que resaltar que el estudio citogenético no se logra con éxito en todas las muestras analizadas ya que en muchos casos no se producen metafases analizables o cuando estas están presentes, muestran un cariotipo normal.

Han et al en 1988 mostraron que otras anomalías encontradas en pacientes con tricoleucemia eran -10, -17, 6q-, etc.

De 153 casos publicados con tricoleucemia (tabla 11), 38 (25%) tenían anomalías clonales. El cromosoma 14 estaba envuelto en anomalías clonales, como un marcador 14q+ en 9 pacientes, y con una delección o inserción en 7. Un cromosoma 12 extra fue encontrado en 4 pacientes, delecciones 12p en 3 pacientes y delecciones 12q en 1. Anomalías estructurales de 6q y 11q fueron encontradas en 10 y 6 pacientes respectivamente. Monosomía del cromosoma 10 y 12 fueron encontradas, pero su significado no está claro debido a la frecuente pérdida de cromosomas en células de tricoleucemia.

Tabla 11: Tricoleucemia: Estudios cromosómicos publicados.

Location of study	Total no. studied	No. evaluable	No. with clonal abnormalities	References
Huddinge, Sweden	36	30	20	Juliussen et al, 1993
Buffalo, USA	28	24	15	Sadamori & Sandberg (1983), Sadamori et al (1985), Ohyashiki et al (1987) Han et al (1988)
London, UK	19	15	12	Brito-Babapulle et al (1986)
Kyoto, Japan	3	3	3	Nishida et al (1989)
Paris, France	17	2	2	Berger et al (1985)
Chicago, USA	58	44	2	Golomb et al (1978a,b), Ueshima et al (1983)
Modena, Italy	16	12	2	Emilia et al (1985)
Cambridge, UK	7	5	1	Khalid et al (1981)
Toulouse, France	1	1	1	Duchayne et al (1991)
Cambridge, UK	1	1	1	Nacheva et al (1992)
New York, USA	4	4	0	Leic et al (1981)
Total	190	141	59	

III.1.3. FASES LEUCEMICAS DE LOS LNH.

Los estados leucémicos de los linfomas malignos (Rowley, 1973; Spiro et al, 1975; Melo et al. 1988) probablemente tienen las mismas anomalías cromosómicas como las formas correspondientes no leucémicas (Levine et al, 1985; Cabanillas et al, 1986; Yunis et al, 1987).

1.3.1. En el **Linfoma linfocítico de células pequeñas**, Sandberg en 1981, describió la presencia de un marcador 14q+. Yunis et al en 1982, describieron la presencia de t(14;18) (q32;q21) en 16 de 19 pacientes y la presencia de trisomía 12 en 4 de 11 pacientes analizados mediante análisis citogenético (36%). Levine et al en 1985, describieron también la presencia de trisomía 12 en 4 de 19 pacientes analizados mediante análisis citogenético.

1.3.2. Los **linfomas foliculares**. La mayoría de los linfomas foliculares humanos de células B y sobre el 30% de los linfomas difusos de células B grandes llevan la t(14;18) (q32;q21) (Yunis et al, 1982), la cual yuxtapone el locus para el gen de la cadena pesada de la Ig en el cromosoma 14 al gen bcl-2 localizado en el cromosoma 18 (Tsujimoto et al, 1984a; Lipford et al, 1987; Adachi et al, 1990). En el linfoma folicular de células pequeñas, Sandberg et al en 1981 describieron la presencia de un marcador 14q+. Yunis et al, en 1982, describieron la presencia de t(14;18) (q32;q21) en 16 de 19 pacientes evaluables mediante análisis citogenético. No describieron la presencia de trisomía 12, pero sí de deleciones del cromosoma 12 en un caso. En 1987 Yunis et al (1 de 7 pacientes estudiados; 14%) describieron la presencia de +12, mediante análisis citogenético.

En el linfoma folicular de células grandes Yunis et al, en 1982, describieron la presencia de t(14;18) (q32;q21) en 16 de 19 pacientes evaluables mediante análisis citogenético. De 3 pacientes analizados citogenéticamente, 1 presentaba +12 (33%) y otras anomalías estructurales del cromosoma 12. En 1987 Yunis et al, mostraron en estos pacientes que la presencia de una deleción 6q junto con +7 y/o +12 significaba un curso más agresivo en la enfermedad. Encontraron que de 17 pacientes analizados citogenéticamente 8 presentaban +12 (47%). Otras alteraciones que encontraron en estos pacientes fueron +3, +18 y +21.

1.3.3. En los **linfomas difusos**, la anomalía más frecuente es la t(11;14) (q23;q32) (en relación con el oncogén bcl-1); con menor frecuencia se observan t(8;14) (q24;q32), t(14;18) (q32;p21) y t(3;22) (q27;q11). Las anomalías y la trisomía del cromosoma 7 se han asociado con un mal pronóstico. En el linfoma inmunoblástico Yunis et al, en 1982, describieron la presencia de t(14;18) (q32;q21) en 5 de 6 pacientes evaluables mediante análisis citogenético y no describen la presencia de trisomía 12. Las anomalías que afectan al cromosoma 12 son anomalías estructurales.

Juliusson et al en 1985 sugirieron que +12 era un marcador también para los linfomas linfocíticos y que está también presente en tricoleucemia y en LP. La trisomía 12 estaba asociada con un peor pronóstico, necesidad para un tratamiento más temprano, pero esto no estaba claro. Quizás estas anomalías proporcionaban una ventaja funcional al proceso neoplásico (Mitelman y Levan, 1981).

III.2. SLP CON EXPRESION LEUCEMICA DE ORIGEN T.

III.2.1. LEUCEMIA LINFATICA CRONICA T.

En la LLCT se han descrito una serie de anomalías citogenéticas pero ninguna asociación consistente ha sido reconocida. Las anomalías cromosómicas más frecuentes son la inversión del cromosoma 14 (q11;q32) y t(11;14) (p13;q11), detectados mediante estudios citogenéticos (Nowell et al, 1986). Nowell et al en 1980 describieron la presencia de trisomía 12 mediante análisis citogenético, en 1 paciente con LLCT, pero no está muy claro si realmente era una LLCB o una LLCT.

III.2.2. LINFOMAS CUTANEOS DE CELULAS T CON EXPRESION LEUCEMICA (SINDROME DE SEZARY).

En el síndrome de Sézary se han descrito una gran variedad de anomalías citogenéticas sin que ninguna asociación consistente sea aparente. Los cariotipos son a menudo muy complejos y no se ha descrito la presencia de trisomía 12. Citogenéticamente, las hiperdiploidías son frecuentes. En la mayoría de los linfomas cutáneos, la aneuploidía es frecuente, las anomalías numéricas y estructurales también son frecuentes, la formación del clon, llega a ser evidente sólo en la fase última o terminal de la enfermedad (Buun et al, 1980). Los cambios estructurales afectan frecuentemente al cromosoma 1, seguido por los cromosomas 7, 14, 16, 6 y 9 en orden de frecuencia. Los cambios numéricos más a menudo envuelven a los cromosomas 8, 15, 11, 17, 22 y 10. Presentan los siguientes cambios cariotípicos: t(4;14) conduciendo a 4q+ y 14q-, t(2;9), t(2;13), 17p+, 19p+ y otras, así como una serie de cambios numéricos (Edelson et al, 1979).

IV.- ASPECTOS HISTORICOS Y DESCRIPTIVOS DE LA TECNICA DE HIS FLUORESCENTE.

Las anomalías cromosómicas se descubren con cierta frecuencia en el seno de los tumores humanos. En las enfermedades hematológicas malignas, las anomalías numéricas y estructurales específicas se asocian con distintos subtipos de leucemia o linfoma que tienen características morfológicas, inmunofenotípicas y clínicas únicas, tales como son la respuesta a la terapia (Mitelman y Heim, 1989; Le Beau y Rowley, 1990; Mitelman et al, 1991). Actualmente, el análisis citogenético de células malignas individuales juega un papel principal en el diagnóstico y subclasificación de una neoplasia hematológica, en la selección de la terapia apropiada, y en el control de los efectos de la terapia.

Importantes avances en la detección de anomalías cromosómicas en los tumores humanos han ocurrido con el desarrollo de nuevas técnicas que permiten identificar cromosomas, mejores métodos para cultivar células, y técnicas más sensibles para detectar células cromosómicamente anormales. Por ejemplo, el desarrollo de las técnicas de bandeo cromosómico permitió a los investigadores distinguir cromosomas humanos e identificar exactamente cromosomas reordenados. Mejoras en la metodología del cultivo de células, particularmente el uso de nuevos sustratos de crecimiento (tales como matrices extracelulares) y factores de crecimiento, han facilitado el cultivo "in vitro" y el análisis citogenético de tumores sólidos.

La interpretación de patrones cromosómicos de bandeo requiere personal altamente experto. Además, el análisis de tumores humanos es a menudo difícil debido a la presencia de múltiples líneas celulares anormales y a la complejidad del patrón cromosómico presente. El análisis citogenético de tumores sólidos humanos es complicado además por la dificultad para obtener células en metafase en número adecuado y de suficiente calidad. Estos factores han llevado a los investigadores a buscar métodos alternativos para identificar anomalías cromosómicas; estos métodos que son aplicables a células en interfase y en metafase son una ayuda a los métodos corrientes de análisis citogenético. La identificación de los genes que están envueltos en las translocaciones cromosómicas en los tumores humanos ha permitido el uso de las técnicas basadas en el ADN, tales como análisis "Southern Blot" del ADN de células del tumor.

Recientemente, ha sido desarrollada otra técnica que tiene aplicaciones en la detección de anomalías cromosómicas, denominada, HIS fluorescente (Langer et al, 1981; Landegent et al, 1984; Pinkel et al, 1986). El desarrollo de esta técnica fue posible gracias a avances en técnicas de

hibridación molecular, particularmente el uso de HIS de sondas no radiactivas que son detectadas por fluorescencia, la mayor disponibilidad de sondas de ADN que son útiles para tales hibridaciones, y el desarrollo de la instrumentación, tal como son los sistemas de análisis de imagen, que permiten a uno captar y manipular imágenes microscópicas.

Con las técnicas de HIS, secuencias específicas de ácidos nucleicos pueden ser detectadas en cromosomas conservados morfológicamente en buen estado, células y cortes de tejidos. Por consiguiente, la HIS y su combinación con la inmunocitoquímica, es capaz de establecer una conexión entre la información topológica microscópica con la localización génica y la actividad génica. La técnica puede, por lo tanto, hacer importantes contribuciones a la genética y biología celular (Lichter y Ward, 1990; Trask, 1991).

La técnica de HIS fue desarrollada por Pardue y Gall (1969) y John et al (1969) hace más de 20 años. Hasta este momento, los radioisotopos eran las únicas técnicas de marcaje disponibles para los ácidos nucleicos, y la autoradiografía ha sido el único medio para detectar secuencias hibridadas "in situ" durante mucho tiempo. Además, como el clonaje no era posible en aquellos días, la HIS estaba restringida a aquellas secuencias que podían ser purificados y aislados por medios bioquímicos convencionales (por ejemplo ADN satélite de ratón, ADN viral). Con el clonaje molecular de los ácidos nucleicos, síntesis enzimática "in vitro" de ADN y ARN por medio respectivamente de, reacción PCR y sistemas de transcripción "in vitro" así como el perfeccionamiento de las técnicas de marcaje radioactivo han cambiado este cuadro enormemente. En los años 1980, la HIS radioactiva ha alcanzado una sensibilidad muy alta: por ejemplo, secuencias de ADN de unos pocos cientos de pares de bases en longitud pueden ser detectadas en cromosomas en metafase con cortos tiempos de exposición autoradiográfica (Harper et al, 1981; Jhanwag et al, 1984; Rabin et al, 1984; Schroeder et al, 1984). A pesar de la sensibilidad, la aplicación de las técnicas radioactivas han estado restringida a los laboratorios de investigación, principalmente debido a los inconvenientes impuestos por el uso de radioactividad tales como medidas de seguridad, vida media limitada de los radioisotopos y tiempos relativamente largos de exposición autoradiográfica. Además, la HIS radioactiva tiene la desventaja de la resolución espacial limitada. Finalmente, la multiplicidad de HIS, por ejemplo el número de diferentes blancos que pueden ser distinguidos simultáneamente, es sólo uno usando autoradiografía.

El análisis del patrón citogenético de células no divididas por HIS fluorescente fue primero introducido por Cremer et al en 1986, y es generalmente denominado como citogenética en

interfase. La reciente descripción de técnicas de HIS para la identificación de secuencias específicas de ADN por métodos no radioactivos (Rudkin y Stollar, 1977; Bauman et al, 1980; Bauman et al, 1981; Langer et al, 1981; Leary et al, 1983) ha abierto nuevas prespectivas en el campo de la genética tumoral. La producción en la última década de un gran número de sondas dirigidas frente a secuencias específicas del ADN humano ha contribuído de forma notable a que su utilización se halla extendido en el campo de la biomedicina (Anastasi et al, 1990; Poddinche et al, 1991).

IV.1. ESQUEMA DE MARCAJE DE LAS SONDAS.

Una variedad de esquemas han sido descritos para el marcaje de sondas con compuestos no radioactivos; estos incluyen incorporación enzimática de nucleótidos modificados y técnicas de marcaje químicas. Incorporación enzimática de nucleótidos modificados con biotina, digoxigenina, dinitrofenol, o nucleótidos halogenados (BrdU, FrdU) por "nick-translation" o técnicas de marcaje con oligos resultan en una alta eficacia de marcaje y son normalmente preferidas sobre las técnicas de marcaje químicas que emplean componentes fotoreactivos (por ejemplo, fotobiotina). Sin embargo, otros esquemas de modificación química que usan acetilaminofluoreno (Landegent et al, 1984), mercuración (Hopman et al, 1987), o sulfonación han sido usados con éxito para detección no radioactiva sensible de sondas de ácidos nucleicos hibridados.

IV.2. DETECCION DE SONDAS HIBRIDADAS.

En caso de utilizar métodos de marcaje no radiactivos, los híbridos formados "in situ" pueden ser detectados mediante la aplicación de diversas técnicas inmunocitoquímicas. La fluorescencia fue uno de los primeros sistemas no autorradiográficos utilizados en ensayos de HIS. Sin embargo, también se han aplicado métodos de detección enzimática y, especialmente a nivel de microscopía electrónica, la utilización de oro coloidal ha proporcionado excelentes resultados. La detección inmunocitoquímica es mucho más rápida que la autorradiografía, proporciona en general menos ruido de fondo y ofrece mayor resolución espacial.

Cada uno de los métodos descritos arriba típicamente usa procedimientos de detección indirectos. Para los métodos indirectos, es crucial que la sonda contenga un elemento, que lo vuelva detectable por afinidad citoquímica, de aquí el término indirecto. Su presencia no debería, o sólo en una manera limitada, interferir con la reacción de hibridación y la estabilidad del híbrido resultante, y además, debería ser accesible a los anticuerpos (Rudkin y Stollar, 1977; Langer et al, 1981; Leary et al, 1983, Landegent et al, 1984; Hopman et al, 1986; Lichter et al, 1991).

Recientemente, han sido desarrolladas técnicas de marcaje directas en las cuales son marcadas las sondas directamente con fluorocromos (Wiegant et al, 1991). Esto permite el examen microscópico inmediatamente después de la hibridación y no requiere los pasos de detección. Para tales métodos es esencial que el complejo sonda-fluorocromo sobreviva las condiciones de hibridación y de lavado. Este complejo no debería, o sólo a un nivel aceptable, interferir con la reacción de hibridación y también los métodos directos son susceptibles de amplificación inmunocitoquímica.

IV.3. SONDAS PARA HIS.

Actualmente, una de las principales limitaciones de HIS fluorescente es la disponibilidad de sondas de ADN; anomalías cromosómicas u otras mutaciones genéticas sólo pueden ser detectadas si están disponibles las sondas adecuadas. Como resultado de varios factores, el número y la naturaleza de las sondas que pueden ser usadas para HIS fluorescente han aumentado enormemente durante los últimos años.

Varios tipos de sonda pueden ser usados para detectar anomalías cromosómicas por HIS fluorescente. En general, estas sondas pueden ser divididas en tres grupos (Willard y Wage, 1987; Cremer et al, 1988a,b; Pinkel et al, 1988; Lichter y Ward, 1990) dependiendo del tamaño y de la localización de las secuencias que identifican:

1. Sondas para estructuras cromosómicas específicas.
2. Sondas complejas o librerías.
3. Sondas dirigidas frente a genes, locus o subregiones más o menos amplias del genoma.

IV.3.1. Las sondas para estructuras cromosómicas específicas.

Incluyen las sondas ADN satélite y las sondas para telómeros. Las sondas ADN satélite hibridan al ADN satélite alfa o beta u otras secuencias repetitivas presentes en los centrómeros de los cromosomas humanos (Willard y Wage, 1987; Anastasi et al, 1990). La organización básica de este ADN α satélite se caracteriza por la presencia de monómeros de alrededor de 170 pares de bases repetidos en "tándem". Aunque hay excepciones, estas sondas pueden ser específicas de un sólo cromosoma o par de cromosomas, existiendo en la actualidad sondas que permiten identificar la casi totalidad de los cromosomas humanos (Willard y Wage, 1987). Dado que la secuencia de nucleótidos y la distribución y organización de los monómeros difiere de un cromosoma a otro, han podido

elaborarse sondas que en condiciones de astringencia elevada reconocen a un sólo cromosoma o par de cromosomas (Vogt, 1990). El ADN alfa satélite es el más abundante ADN satélite centromérico en el cromosoma humano.

Este tipo de sondas se viene utilizando con fines muy diversos, sin embargo su principal aplicación se centra en la detección de alteraciones cromosómicas de tipo numérico tanto en los tumores sólidos (Moyzis et al, 1987; Cremer et al, 1988a,b; Nederlof et al, 1989; Hopman et al, 1991; Jenkins et al, 1992;) como en las hemopatías malignas (Tkachuk et al, 1990; Anastasi et al, 1991a,b; Pérez Losada et al, 1991; Poddínghe et al,1991; Ried et al, 1992) al permitir detectar un número anómalo de señales de hibridación, hipoploidías e hiperdiploidías, tanto en núcleos interfásicos como en cromosomas en metafase (Cremer et al, 1988a,b; Anastasi et al, 1990; Lichter et al, 1991). Sondas DNA satélite hibridan a múltiples copias de la unidad que se repite presente en los centrómeros, lo cual resulta en una señal fluorescente muy brillante en células en metafase o en interfase. Con ellas podemos identificar los diferentes cromosomas humanos no sólo en células en metafase sino también en núcleos interfásicos (Nederlof et al, 1989). Las sondas beta satélite se distinguen de las alfa satélite, en que el DNA beta satélite consiste en secuencias monoméricas de 68 pares de bases repetidas en "tándem". Las sondas teloméricas hibridan a las unidades de DNA repetitivo presentes en los telómeros de los cromosomas humanos.

IV.3.2. Sondas complejas o librerías.

Contienen secuencias derivadas de todas las partes del cromosoma (Cremer et al, 1988a,b; Lichter et al, 1988; Pinkel et al, 1988). Estas sondas pintan el cromosoma entero, y son especialmente útiles en identificar reordenamientos estructurales en células en metafase, tales como translocaciones (Cremer et al, 1988a,b; Lichter et al, 1988; Pinkel et al, 1988). No son útiles para el análisis de células en interfase, porque los dominios de la señal son muy grandes y difusos. Actualmente, están disponibles comercialmente las sondas librería para cromosomas 1-4, 6-14, 16-18 y 22 y cromosoma X; las sondas para los otros cromosomas se espera que estén disponibles pronto.

IV.3.3. Sondas dirigidas frente a genes, locus o subregiones más o menos amplias del genoma.

Son normalmente clones genómicos que varían de tamaño dependiendo de la naturaleza del vector de clonaje; estas incluyen clones de plásmidos (~ 500 pb - ~5 Kb), clones de bacteriofagos λ (~8 - ~15 Kb), clones de cósmidos (~20 - 50 Kb), y clones de cromosomas artificiales de levaduras

(YAC) (50-1000 Kb). Son también útiles en detectar reordenamientos estructurales (Rowley et al, 1990) sin embargo, ellas son derivadas de una porción más pequeña del cromosoma.

IV.4. INSTRUMENTACION OPTICA E IMAGEN DIGITAL.

Los métodos HIS fluorescente han llegado a ser aplicados generalmente en investigaciones y aplicados a la investigación clínica (Jovin y Arndt-Jovin, 1989). Para utilizar plenamente estas técnicas son inevitables altas demandas con respecto al microscopio. Primero, el microscopio no puede limitar la sensibilidad de la técnica de HIS; la fuente de luz de excitación y los filtros por lo tanto tienen que ser elegidos para que se obtenga una óptima **(1) sensibilidad** del microscopio. Además, se usa un iluminador fluorescente multilongitud de onda ya que los métodos de HIS son a menudo usados para demostrar **(2) múltiples blancos o dianas** en el mismo espécimen. Especialmente en los últimos años hay una mayor necesidad de proporcionar **(3) información cuantitativa** sobre las moléculas blanco que son demostradas por HIS. Evidentemente, esto requiere sensores (cámaras o tubos fotomultiplicadores) por los cuales la intensidad de la fluorescencia pueda ser cuantificada.

IV.5. APLICACIONES DE HIS FLUORESCENTE.

El desarrollo de técnicas de hibridación molecular, tales como HIS fluorescente, han tenido un impacto principal para detectar y caracterizar los cambios genéticos que dan lugar a los tumores humanos (Trask, 1991). Estas técnicas ya han alterado los procedimientos usados por los laboratorios de citogenética clínica. HIS fluorescente es más poderoso cuando el análisis está dirigido hacia aquellas anomalías que se sabe que están asociadas con una enfermedad particular o tumor. Un ejemplo de como HIS fluorescente podría ser usado en un seguimiento clínico es como sigue: El análisis citogenético podría ser realizado en el momento del diagnóstico para identificar las anomalías cromosómicas en células individuales malignas de un paciente. Por lo tanto, HIS fluorescente podría ser usado para detectar enfermedad residual o recaída temprana y ensayar la eficacia de regímenes terapéuticos.

Algunas de las aplicaciones más importantes de la HIS fluorescente son las siguientes:

- a) Examinar el patrón cariotípico de células en metafase o en interfase. (Anastasi et al; 1992).
- b) Identificar anomalías cromosómicas numéricas y estructurales. (Moyzis et al, 1987; Cremer et al, 1988a,b; Tkachuk et al, 1990; Hopman et al, 1991; Poddinche et al, 1991; Le Beau et al, 1993).

- c) Controlar los efectos de la terapia y detectar enfermedad mínima residual o recaída temprana. (Anastasi et al, 1991a,b).
- d) Determinar el linaje de las células neoplásicas (Anastasi et al, 1991a,b).
- e) Identificar el origen de las células de MO que siguen al TMO. (Van Dekken et al, 1989).
- f) Mapeo cromosómico.

IV.6. VENTAJAS Y LIMITACIONES DE HIS FLUORESCENTE.

El conocimiento actual de las alteraciones cromosómicas presentes en muchos tumores sigue siendo relativamente escaso. Esto es debido entre otras razones, a las limitaciones que presentan las técnicas citogenéticas convencionales como son la necesidad de obtener metafases y la posible selección de determinadas subpoblaciones celulares por el cultivo. El análisis citogenético por métodos convencionales, el medio tradicional de detectar anomalías cromosómicas, es una labor muy intensiva. Esta técnica tiene la ventaja que esencialmente todas las anomalías citogenéticas pueden ser detectadas por un "test" único; sin embargo, la naturaleza de la labor intensa del análisis citogenético impide obtener resultados en menos de 2 a 4 semanas salvo casos excepcionales. El desarrollo de la técnica de HIS empleando métodos no radiactivos, elimina en gran medida algunos de los inconvenientes de la citogenética convencional. Hay varias ventajas en la citogenética en interfase:

1- No depende de la población de células que se dividen, necesaria para el análisis citogenético clásico. El análisis simultáneo de metafases y de núcleos en interfase y por otra parte la identificación de forma específica de cromosomas, genes u otras secuencias de ADN (Moyzis et al, 1987; Willard y Wage, 1987; Cremer et al, 1988a,b; Pinkel et al, 1988; Nederlof et al, 1989; Lichter y Ward, 1990).

2- Es posible un rápido análisis de la muestra ya que no se requieren ningunas técnicas de cultivo y puede ser analizado un gran número de células y los resultados pueden ser sometidos a análisis estadístico. El material para HIS fluorescente puede ser procesado en 4 a 24 horas, y el análisis de 1000 a 2000 células puede ser efectuado en 15 a 45 minutos. Así HIS fluorescente es una técnica rápida que permite a uno obtener información sobre el patrón citogenético de las células del tumor en un breve espacio de tiempo permitiendo así ser considerados estos datos para tomar decisiones sobre el tratamiento.

3- Aumenta el grado de detección de anomalías cromosómicas clonales, por ejemplo, en estudios retrospectivos de trisomía 12 en LLC, HIS fluorescente reveló una más alta proporción de pacientes con trisomía comparada con la encontrada con análisis citogenéticos normales.

La citogenética en interfase ha sido usada también en el diagnóstico prenatal para el análisis rápido de aneuploidías cromosómicas.

4- La eficacia de la hibridación y la detección es muy elevada y la sensibilidad y especificidad son muy altas.

5- Datos citogenéticos pueden ser obtenidos de muestras malas, que contienen demasiadas pocas células, para estudios de citogenética de rutina (por ejemplo, muestras obtenidas de pacientes después de quimioterapia o un TMO o de pacientes con LMC que tienen fibrosis de médula o médulas hipocelulares que siguen a la terapia de INF durante un largo período de tiempo).

6- La técnica permite la correlación directa de características citogenéticas y citología (morfología, la cual permite a los patólogos diferenciar condiciones malignas de condiciones benignas en casos equívocos).

7- La técnica puede ser adaptada para sistemas automatizados.

No todas son ventajas ya que esta técnica presenta también una serie de limitaciones. La más notable de éstas es que la detección de anomalías está limitada a aquellas que pueden ser detectadas con las sondas que son disponibles. Actualmente sondas centrómero específicas son disponibles para todos los 24 cromosomas humanos, y sondas libreras, disponibles para 18 cromosomas.

Otras limitaciones de HIS fluorescente son relativas a factores técnicos.

En primer lugar, la técnica ha demostrado ser altamente sensible para la detección de trisomía, pero HIS fluorescente es menos sensible en detectar pérdida de cromosomas (Moyzis et al, 1987; Pinkel et al, 1988; Poddinche et al, 1991; Jenkins et al, 1992). La falsa proporción de monosomía (presencia de 1 señal en una célula diploide) puede variar de 2 a 10% de todas las células nucleadas en preparación de MO o de SP, por lo tanto, la disponibilidad de HIS fluorescente para detectar monosomía en un pequeño porcentaje de la población celular (por ejemplo enfermedad mínima residual en leucemia) es limitada.

En segundo lugar, el procesado de células de MO y de SP de pacientes con enfermedades hematológicas malignas es relativamente simple; sin embargo, el procesado de otros tejidos, tales como tejidos embebidos en parafina o secciones congeladas de tumores sólidos o de biopsias de

ganglio linfático es más difícil. Artefactos creados por el aplastamiento y seccionado del tejido y factores técnicos relativos a la penetración de la sonda dentro de los núcleos de la célula pueden llevar a resultados desencaminados. En estos tejidos, el porcentaje de células que muestran falsa monosomía puede ser muy alta (>50%). El empleo de material incluido en parafina presenta una serie de inconvenientes, ya que, la utilización de cortes tisulares de 2-10µm en vez de suspensiones celulares ocasiona la pérdida de parte del ADN de muchos de los núcleos presentes en el área de análisis (Arnoldus et al, 1991). En el caso de utilizar material incluido en parafina, hay que tener en consideración que la ausencia de una metodología perfectamente controlada, en lo que hace referencia a la fijación de la muestra y a su inclusión en parafina, puede afectar la calidad de los resultados obtenidos. Además, el tamaño variable de las piezas incluidas en parafina influye también de forma importante en la hibridación. Un inconveniente en el estudio del material incluido en parafina es la autofluorescencia que limita el análisis de los resultados al empleo de métodos inmunohistoquímicos y microscopía óptica, reduciendo por un lado la sensibilidad de detección de la técnica y por otra parte la posibilidad de realizar marcajes múltiples. Para el análisis de alteraciones cromosómicas de tipo numérico mediante técnica de HIS se aconseja la utilización de suspensiones celulares de material obtenido en fresco (Arnoldus et al, 1991). Muchos de estos problemas han sido eliminados parcialmente por mejoras en las técnicas de hibridación .

Una tercera limitación importante de HIS fluorescente, es el hecho que los datos citogenéticos pueden ser obtenidos sólo de los cromosomas blanco. En contraste, el análisis citogenético convencional puede detectar la presencia de cualquier anomalía cromosómica, incluyendo múltiples anomalías, por un "test" único. Este problema ha sido resuelto en parte por el reciente desarrollo de métodos de hibridación multicolor, que permiten la visualización simultánea de 2 o más regiones de ADN (Nederlof et al, 1989; Ried et al, 1992). Estas últimas técnicas requieren equipos más sofisticados, tal como sistemas de análisis de imágenes; sin embargo la fluorescencia doble color es factible con un microscopio de fluorescencia simple equipado con un filtro doble.

Una de las desventajas del análisis citogenético ya sea por cariotipo o HIS es que no da información del tipo de célula en la cual la anomalía ha ocurrido. Varias técnicas han sido desarrolladas para determinar la morfología, marcadores de superficie celular y cariotipo de células intactas (técnica MAC).

IV.7. RECIENTES DESARROLLOS EN HIS fluorescente.

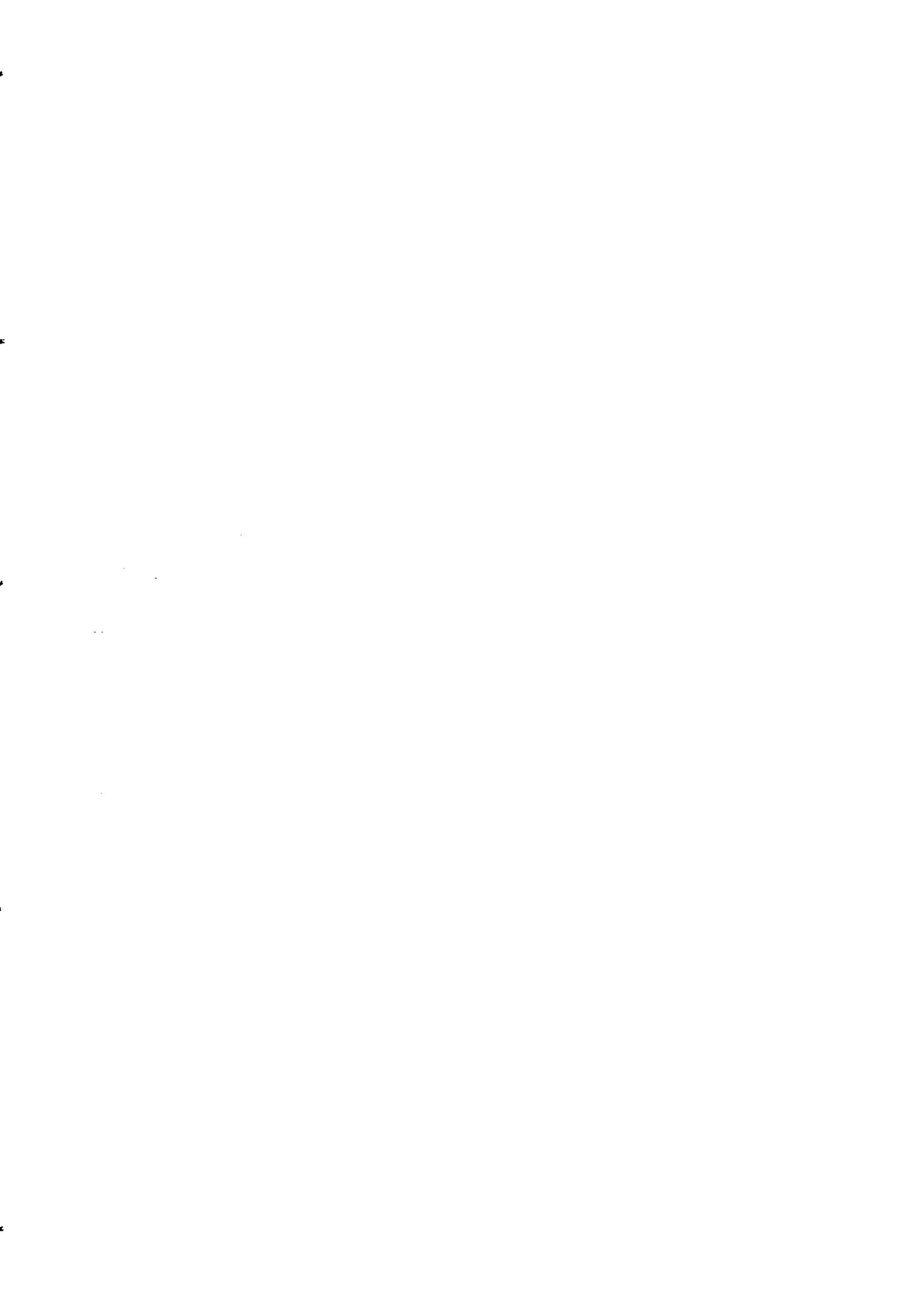
II.7.1. Sondas marcadas directamente.

Recientes desarrollos que han llevado a mejorar la tecnología de HIS fluorescente incluyen el desarrollo de sondas directamente marcadas con fluorocromos, las cuales emiten bastante luz para ser detectadas fácilmente por microscopía de fluorescencia, simplificando la técnica por eliminación de los pasos de detección (Wiegant et al, 1991). Estas sondas producen señales muy fuertes y son disponibles para aplicaciones clínicas.

II.3.8.2. Técnicas de marcaje combinado.

Otra técnica que es importante en las aplicaciones clínicas de HIS fluorescente es el método de marcaje combinado (Nederlof et al, 1989; Ried et al, 1992), en el cual las sondas son marcadas con más de una molécula. Esta técnica aumenta el número de secuencias blanco que pueden ser detectadas simultáneamente. La detección de las sondas hibridadas es realizada usando un sistema de análisis de imagen digital.

**PROYECTO
DE TRABAJO Y OBJETIVOS
CONCRETOS**



II.- PROYECTO DE TRABAJO Y OBJETIVOS CONCRETOS.

El proyecto de trabajo que constituye el punto de partida de esta tesis viene fundamentado por los siguientes aspectos:

1. La descripción de la presencia de trisomía 12 en algunos procesos oncohematológicos.
2. La importancia de la trisomía 12, que mediante estudios citogenéticos fundamentalmente, ha venido siendo apuntada en algunos de estos procesos, así como también, la correcta detección de esta anomalía cromosómica traía consigo importantes implicaciones diagnósticas y terapéuticas.
3. Debido a las limitaciones que presentaba la citogenética convencional, actualmente se comenzó a utilizar una nueva técnica denominada hibridación "in situ" (HIS) fluorescente que ofrece ventajas frente a la citogenética convencional. HIS es una técnica rápida para detectar anomalías cromosómicas en células en interfase o durante la metafase. Se puede analizar un mayor número de células, y se puede hacer una valoración exacta de la proporción de células anormales.
4. Por último, la disponibilidad en nuestro Servicio de estudiar pacientes afectados de diferentes procesos oncohematológicos que proporcionan una oportunidad ideal para el planteamiento y posterior desarrollo de un proyecto de investigación.

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, nos hemos propuesto los siguientes

OBJETIVOS CONCRETOS:

1. La aplicación de HIS fluorescente a los pacientes afectos de diferentes síndromes linfoproliferativos crónicos (SLPc) de origen B ó T, para el diagnóstico de la trisomía 12, comparando su sensibilidad con los métodos de citogenética convencionales en el caso de la leucemia linfática crónica de origen B (LLCB).

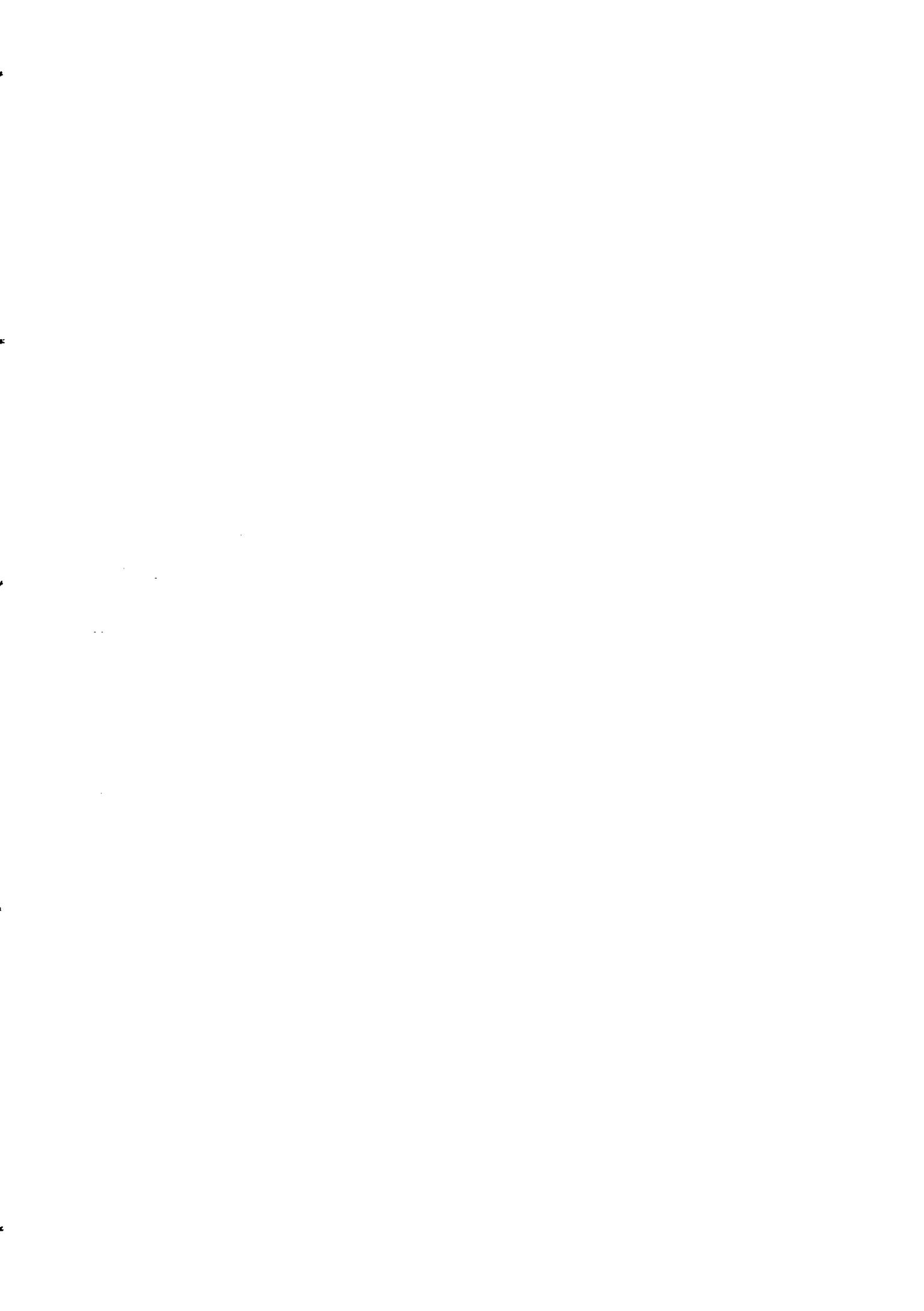
2. Determinación de trisomía 12 en una serie de pacientes atendidos en nuestro Servicio, que mostraban diferentes patologías: pacientes diagnosticados de LLCB en diferentes estadios, pacientes afectos de diferentes tipos de SLPc de origen T y de diferentes tipos de linfomas leucemizados, fundamentalmente, linfoma linfocítico de células pequeñas y por último, pacientes diagnosticados de tricoleucemia.

3. Seguimiento de estos pacientes durante un período de dos años, para controlar la frecuencia de trisomía 12 en núcleos en interfase en el curso de la enfermedad y valorar el significado pronóstico de esta anomalía cromosómica en las diferentes enfermedades oncohematológicas.

3. Asimismo, nos propusimos valorar la relación entre la presencia de trisomía 12 en los pacientes afectos de LLCB con diferentes características clínicas y de laboratorio.

4. Finalmente, nos parecía de sumo interés determinar mediante HIS fluorescente y mediante citogenética convencional, la presencia del cromosoma Filadelfia (Ph) en pacientes afectos de leucemia mieloide crónica (LMC), comparando la sensibilidad de estas dos técnicas.

**MATERIAL Y
METODOS**



III. MATERIAL Y METODOS.

I.- MATERIAL

I.1. SUJETOS NORMALES

Se escogieron para la realización de este estudio 38 sujetos sanos, que se ofrecieron amablemente a tal fin, de diferente edad y sexo, que no habían recibido ninguna medicación durante al menos un mes antes del estudio. Las muestras de sangre obtenidas fueron utilizadas para la siguiente valoración:

a).- Cálculo del rango de normalidad para pacientes con SLPc (n=28).

En el presente estudio se ha empleado sangre con heparina litiada de cada uno de los donantes, centrifugada a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 15 minutos, a 4°C. Se separó el "buffy-coat". Se añadieron 10 gotas en un tubo falcon estéril de 15 ml. Se le añadió 10 gotas de tampón fosfato salino (PBS) (pH=7.2) y mientras se está agitando la muestra en el "vórtex", se le añade, gota a gota, 10 gotas de solución de fijación (metanol-ácido acético glacial 3:1) el cual, debe ser preparado fresco, diariamente. Seguidamente, mientras se está agitando la muestra en el "vórtex", se le va añadiendo gota a gota, más solución de fijación hasta un volumen de 10 ml. Se deja reposar la muestra 20 minutos a temperatura ambiente (TA) y se centrifuga nuevamente a 1500 rpm durante 8 minutos, a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se lava nuevamente el "pellet" con solución de fijación, como se ha descrito anteriormente. Así se realizan al menos tres lavados, hasta que el "pellet" queda blanco. Se guarda así la muestra en solución de fijación a -20°C hasta el momento de realizar la hibridación en estos sujetos sanos. De esta forma, se pudo calcular posteriormente el rango de normalidad de este parámetro.

b).- Cálculo del rango de normalidad para pacientes con SMPc (n=10).

Se emplearon dos métodos para la preparación de las células:

1- Directo.

2- Separación de células.

1- Directo. Se parte de tubos de extracción sin ningún aditivo a los que se le ha introducido aproximadamente 1cc de heparina Rovi al 1% y que están guardados en nevera a 4°C hasta el momento de la extracción. Es muy importante que no lleve ningún aditivo la heparina. Se parte de 8 ml de medio RPMI o HANS o suero fisiológico, 1ml de sangre total extraída en heparina sin aditivos y

0.1ml de colchicina (0.5mgr/ml). Se pone en la estufa a 37°C y durante 50 minutos. Se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante. Se añade 10 ml de cloruro potásico 0.075M , que está a 37°C, y se deja 30 minutos a 37°C. Se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos. Se elimina el sobrenadante. Se fija con metanol:ácido acético glacial (3:1) aproximadamente unas 2 veces y se guarda a -20°C.

2- Separación de células. Una vez realizada la extracción en tubos sin ningún aditivo a los que se les ha añadido aproximadamente 1cc de heparina Rovi al 1% y que están guardados en nevera a 4°C hasta el momento de la extracción, se procede a desplaquetizar la muestra. Para ello se centrifuga 5 minutos a 1200rpm y a TA. Se desecha el plasma. Se añade unos 2ml de medio RPMI, HANS o suero fisiológico y se mezcla. Luego se añaden 3ml de Ficol o "Lymphoprep" por cada 2ml de sangre y se centrifugan 30 minutos a 1600rpm y a TA. Se separa la interfase y se pone en otro tubo. Se añaden hasta unos 10 ml de medio RPMI o HANS o suero fisiológico y se centrifuga 10 minutos a 2000rpm. Se quita el sobrenadante, se deja el "pellet", y se le añade medio RPMI o HANS o suero fisiológico hasta 8 ó 10 ml y se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm. Se quita el sobrenadante, se deja el "pellet", y se añade medio RPMI hasta 5ml y 0.1 ml de colchicina (0.5mgr/ml). Se deja una hora a 37°C. Se centrifuga 5 ó 10 minutos a 1200 rpm. Se elimina el sobrenadante. Se añade hasta 10 ml de Cloruro potásico 0.075M (que está a 37°C), y se deja 30 minutos a 37°C. Se centrifuga 5 minutos a 1200rpm. Se elimina el sobrenadante. Se añade metanol:ácido acético glacial (3:1). Se deja a 4°C cerrados los tubos durante 10 minutos. Se centrifuga a 1200 rpm durante 10 minutos y se elimina el sobrenadante. Se añade un nuevo fijador metanol:ácido acético glacial (3:1) y se guarda a -20°C hasta el momento de realizar la hibridación en estos sujetos sanos.

Siguiendo estos dos métodos, se pudo calcular posteriormente el rango de normalidad de este parámetro en estos sujetos.

1.2. PACIENTES

En este trabajo se han estudiado un total de 74 pacientes diagnosticados de SLPc de expresión leucémica y 3 pacientes con SMPc tipo LMC.

PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE SLPc DE EXPRESION LEUCEMICA.

1. De origen B:

1.1. Pacientes pertenecientes al grupo de LLC.

Los 45 pacientes diagnosticados de LLC se distribuyen de la siguiente manera según la clasificación de BINET:

- 24 pacientes pertenecientes al estadio A.
- 12 pacientes pertenecientes al estadio B.
- 9 pacientes pertenecientes al estadio C.

1.2. Pacientes pertenecientes al grupo de Tricoleucemia.

Se han estudiado 5 pacientes diagnosticados de tricoleucemia, 4 pertenecientes a la forma clásica y 1 perteneciente a la forma variante.

1.3. Pacientes pertenecientes al grupo de Linfomas leucemizados.

Los 19 pacientes diagnosticados de linfomas leucemizados se distribuyen de la siguiente manera según la clasificación "Working formulation" :

1.3.1. Bajo grado de malignidad.

- 11 pacientes pertenecientes al grupo denominado LLCP.
- 1 paciente perteneciente al grupo folicular con predominio de células hendidas

pequeñas.

1.3.2. Malignidad intermedia.

- 3 pacientes pertenecientes al grupo folicular con predominio de células grandes.

1.3.3. Alto grado de malignidad.

- 4 pacientes pertenecientes al grupo inmunoblástico, células grandes.

2. De origen T:

2.1. Pacientes pertenecientes al grupo de LLC.

- 3 pacientes diagnosticados de LLC.

2.2. Pacientes pertenecientes al grupo de linfomas cutáneos de células T leucemizados (Sézary).

- 2 pacientes diagnosticados de Sézary.

PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE SMPc.

Se han estudiado 3 pacientes diagnosticados de LMC.

I.2.1. Descripción de los pacientes.

En el presente estudio las muestras de SP de los 45 **pacientes** con LLCB fueron obtenidas desde octubre de 1991 a octubre de 1993: 24 hombres y 21 mujeres con una edad comprendida entre 40 y 88 años, media 65 años. El diagnóstico de LLCB típica estaba basado en características clínicas, morfología celular y marcadores inmunológicos. En el momento de iniciar este estudio 17 pacientes estaban sometidos a tratamiento quimioterapéutico. 12 pacientes fueron diagnosticados coincidiendo con su estudio mediante HIS, mientras que 33 pacientes ya habían sido diagnosticados anteriormente (1-15 años antes de su admisión en este estudio).

Las muestras de SP de los 5 **pacientes** con tricoleucemia fueron también obtenidas desde octubre de 1991 a agosto de 1993: 3 hombres y 2 mujeres, con una edad comprendida entre 54 y 60 años, media 56 años. El diagnóstico de tricoleucemia fue confirmado por la demostración de células fosfatasa ácida positivas, ácido tartárico resistentes en los 5 casos, y la presencia de marcadores FMC7, CD11c y CD25 positivos. Las BMO obtenidas en cada caso también confirmaron el diagnóstico de tricoleucemia. Tres pacientes (P1, P2 y P4) fueron esplenectomizados después de su admisión en el hospital. En el momento de iniciar el presente estudio, 2 pacientes (P1 y P4) estaban sometidos a tratamiento con INF α . Un paciente fue diagnosticado coincidiendo con su estudio mediante HIS fluorescente, mientras que los otros 4 pacientes ya habían sido diagnosticados anteriormente (1-10 años antes de su estudio mediante HIS).

Las muestras de SP de los 19 **pacientes** diagnosticados de diferentes tipos de linfomas leucemizados de origen B, que fueron también estudiadas desde octubre de 1991 hasta octubre de 1993 (11 hombres y 8 mujeres) presentaban una edad media de 60 años (rango 48-70 años). El diagnóstico de linfomas leucemizados en estos pacientes fue confirmado en todos los casos histológicamente. Estos 19 pacientes fueron clasificados en diferentes subtipos según la "Working formulation" como LLCP (11 casos, 8 no sometidos a tratamiento al comienzo de este estudio), folicular de células hendidas pequeñas (1 caso, no tratado), folicular de células grandes (3 casos, 3 no tratados al comienzo de este estudio) e inmunoblástico de células grandes (4 casos, 3 no sometidos a tratamiento al comienzo de este estudio). 7 pacientes fueron diagnosticados coincidiendo con su estudio mediante HIS, mientras que 12 pacientes ya habían sido diagnosticados anteriormente (1-5 años antes de su admisión en este estudio). Los 19 casos eran de fenotipo B.

Las muestras de SP de los 5 **pacientes** diagnosticados de diferentes tipos de SLP de origen T, que fueron estudiados desde octubre de 1991 hasta octubre de 1993, tenían una edad media de 54 años (rango 48-65 años) (3 hombres y 2 mujeres). El diagnóstico de LLCT en estos pacientes fue confirmado por la presencia de linfocitosis, moderada o nula, con granulocitopenia, anemia aplásica o pancitopénica. Presencia de linfocitos atípicos en SP de gran tamaño, cromatina laxa y granulación azurófila en el citoplasma y la presencia de marcadores CD3, CD8, CD57, HLA-DR y CD38 positivos. CD5 tiene muy baja o ausente expresión. El diagnóstico de Sézary fue confirmado por la presencia de células linfomatosas en SP (células de pequeño o gran tamaño, con núcleos de aspecto cerebriforme). Presencia de infiltración cutánea por células linfomatosas y presencia de marcadores CD2, CD3, CD4 y CD5 positivos y CD8 negativo. Estos 5 pacientes fueron clasificados en dos grupos diferentes: LLCT (3 casos, 2 no tratados al comienzo de este estudio) y linfoma cutáneo de células T leucemizado (2 casos, no tratados al comienzo de este estudio). Un paciente fue diagnosticado coincidiendo con su estudio mediante HIS, mientras que 4 pacientes ya habían sido diagnosticados anteriormente (1-5 años antes de su admisión en este estudio).

Por último, el estudio en los 3 **pacientes** con LMC (2 hombres y una mujer con una edad media de 46 años) fue hecho en muestras de SP y cuando estos pacientes se encontraban en diferentes momentos de su evolución, concretamente cuando la enfermedad no estaba en fase de actividad, sino bastante controlada, gracias al tratamiento al que estaban sometidos los 3 pacientes. El diagnóstico de la LMC fue confirmado por la presencia de leucocitosis mielocitarias, neoplasia del sistema granulopoyético de la MO y en ocasiones esplenomegalias gigantes.

I.3. REACTIVOS

- " Kit" para hibridación en cromosomas en metafase o en núcleos en interfase (ONCOR; Gaithersburg, MD).

- " Kit" para detección Digoxigenina-Rodamina (ONCOR; Gaithersburg, MD).

- " Kit" para detección Biotina-Fluoresceína (ONCOR; Gaithersburg, MD).

REACTIVOS EMPLEADOS EN LA PREPARACION DE CELULAS Y DE PORTAS

- Acido acético glacial (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Cloruro sódico 1M (Baker; Deventer, Holland).

- Cloruro potásico 0.075M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Colchicina 0.5mgr/ml (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).

- Etanol 100 % (Panreac; Madrid, Spain).

- Eter 100 % (Panreac; Madrid, Spain).

- Fosfato disódico 1M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Fosfato monosódico 1M (Baker; Deventer, Holland).

- "Lymphoprep" (Nycomed Pharma AS; Oslo, Norway).

- Medio TC HANKS Solution (Difco Laboratories; USA).

- Metanol (Panreac; Madrid, Spain).

REACTIVOS EMPLEADOS EN LA HIBRIDACION

- Acido clorhídrico 0.1M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Acido clorhídrico 1 M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Acido clorhídrico 2 M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Acido desoxirribonucleico de esperma de arenque "sodium salt type XIV" (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).

- Cloruro magnésico 1M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).

- Citrato sódico 0.3 M (Baker; Deventer, Holland).

- Cloruro sódico 1M (Baker; Deventer, Holland).

- Cloruro sódico 3 M (Baker; Deventer, Holland).

- Dextrán sulfato (Pharmacia; Uppasala, Sweeden).
- Etanol 70 %, 80%, 85 %, 90%, 95%,100 % (Panreac; Madrid, Spain).
- Formaldehído 1 %(Baker; Deventer, Holland).
- Formamida 50% desionizada (y sin desionizar) pH=7.00 (USB; Cleveland, Ohio).
- Formamida 70 % desionizada (y sin desionizar) pH=7.00 (USB; Cleveland, Ohio).
- Fosfato disódico 1M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).
- Fosfato monosódico 0.5M pH=7.0 (Baker; Deventer, Holland).
- Fosfato monosódico 1M (Baker; Deventer, Holland).
- "Glass coverslip sealant" (ONCOR; Gaithersburg, MD).
- "Ion exchanger" (Serva; Heidelberg, Federal Republic of Germany).
- Pepsina al 10% (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- RNAsa 10mgr/ml (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Sonda abl (ONCOR; Gaithersburg, MD).
- Sonda bcr (ONCOR; Gaithersburg, MD).
- Sonda bcr/abl (ONCOR; Gaithersburg, MD).
- Sonda para el cromosoma 12 α satélite D12Z3 (ONCOR; Gaithersburg, MD).
- Tritón X-100 0.05 % (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).
- Tween 20 (Aldrich; Steinheim, West Germany).

REACTIVOS EMPLEADOS EN LA DETECCION Y EN LA AMPLIFICACION.

- Acido clorhídrico 5M (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).
- Antiavidina conjugada con biotina (Vector Laboratories; Burlingame, CA).
- Anticuerpo antiavidín de cabra biotilado (Vector Laboratories; Burlingame, CA).
- Anticuerpo antidigoxigenina de ratón (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Anticuerpo antiratón de conejo marcado con rodamina (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Avidín conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Avidín-FITC) (Vector Laboratories; Burlingame, CA).
- Azida sódica 0.02%(Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Azida sódica al 20% (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Citrato sódico 0.3 M (Baker; Deventer, Holland).
- Cloruro sódico 0.15 M (Baker; Deventer, Holland).

- Cloruro sódico 1M (Baker; Deventer, Holland).
- Cloruro sódico 1.5M pH=7.5 (Baker; Deventer, Holland).
- Cloruro sódico 3 M (Baker; Deventer, Holland).
- 4,6 diamino-2-fenilindol 2ClH (DAPI) (Serva; Heidelberg, Federal Republic of Germany).
- 1,4 diazabicyclo (2,2,2) octano (DABCO) (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Formamida 50% desionizada (USB; Cleveland, Ohio).
- Fosfato disódico (Merck; Darmstadt, Federal Republic of Germany).
- Fosfato monosódico (Baker; Deventer, Holland).
- Glicerol (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Hidróxido sódico 1 M (Baker; Deventer, Holland).
- Ioduro de propidio 10ng/ml (IP) (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Leche en polvo al 0.5%.
- Leche en polvo 5% .
- Nonidet P-40 0.1 % (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- "Phenylendiamine dihydrochloride" (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Tris 1M pH=7.5 (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Tris ClH 0.1M (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Tris ClH 1M pH=7.5 (Sigma Chemical Co; St Louis, MO).
- Tween 20 al 10% (Aldrich; Steinheim, West Germany).

I.4. PREPARACION DE REACTIVOS.

- Para eliminar el "background":

Acido clorhídrico 0.1N y Tritón X-100 0.05 %.

- Para fijar las células:

Formaldehído 1 % en PBS, pH=7.2.

- Para desnaturalizar:

Formamida 70 % en tampón 2 x SSC, pH=7.00 y a 70°C.

- Preparación del ADN de esperma de arenque:

250 mg en 50 ml de agua bidestilada. Mezclar durante 24 horas a TA. Sonicar durante 3 minutos. Guardar a -20°C.

- "Master mix":

20xSSC: 1 ml; Formamida 50%: 5 ml; Dextrán sulfato: 1 g; Tween- 20: 10µl; Completar con agua hasta 8 ml. Disolver esta mezcla a 70°C. Ajustar a pH=7.0 con ClH 2N. Guardar a -20°C.

- Solución de hibridación:

"Master Mix": Sonda de ADN: ADN de esperma de arenque: 8µl : 1µl : 1µl

- Para eliminar las uniones inespecíficas:

Formamida 50 % en tampón 2 x SSC, pH=7.00 y a 45°C.

- Solución "stock" para avidín y antiavidín:

0.02% de solución "stock" para azida sódica (= 10µl de 2.0 g de azida sódica en 100 ml de agua) + Leche en polvo 5% (500mg/10 ml en tampón 4 x SSC, pH=7.5). Disolver esta mezcla a 37°C. Dejarla en oscuridad y en reposo al menos 24 horas. Centrifugar a 1000 rpm durante 5 min. Quitar el sobrenadante y ajustarlo a pH=7.00. Guardar a 4°C en oscuridad.

- Preparación de avidín y antiavidín.

Avidín: 995µl solución "stock" para avidín y antiavidín y 5µl avidín. Guardar a 4°C.

Antiavidín: 990µl solución "stock" para avidín y antiavidín y 10µl antiavidín. Guardar a 4°C.

- "Antifade":

100mg de "phenylendiamine dihydrochloride" en 10 ml de PBS. Ajustar a pH=8.00 con hidróxido sódico. Añadir hasta 90 ml de glicerol. Filtrar a través de filtros de 0.22µ para quitar las partículas sin disolver. Almacenar a -20°C en oscuridad.

- "Antifade" + Ioduro de propidio (1ng/1ml):

1000µl "Antifade" + 3 µl Ioduro de propidio. Almacenar a 4°C en oscuridad.

- Soluciones para el pretratamiento de portas.

1. RNAsa 10mgr/ml. Se cogen 10 mgr de RNAsa en 1 ml de agua. De este stock se cogen 10µl y 990 µl de 2xSSC pH=7.0.

2. Pepsina al 10% en agua. Se prepara este stock de pepsina al 10% y se cogen de este stock 50 µl y se diluyen en 1ml de ClH 1N y 99 ml de agua.

3. Formaldehído al 1% en PBS diluido en ClMg₂ 1M. Se cogen 92.4 ml de PBS, 5 ml de ClMg₂ 1M y 2.6 ml de formaldehído libre de ácidos.

- Mezcla de hibridación para resuspender la sonda bcr/abl.

70% formamida desionizada/2xSSC/ fosfato monosódico 50mM pH=7.0.

Se cogen 700 µl de 100% formamida desionizada + 100 µl de 0.5M fosfato monosódico pH=7.0 + 100 µl de 20xSSC + 100 µl de agua.

- Desionizar la formamida.

Se añaden 5 gramos de "ion exchanger" a 100 ml de formamida comercial, se centrifuga durante 2 horas. Se filtra 2 veces a través de papel de filtro "Whatman". Se hacen alícuotas alícuotas de 1 ml. Se almacena a -20°C.

- Preparación de DABCO/DABCO-DAPI/DABCO-IP.

Se disuelve 2 gr de DABCO en 90 ml de glicerol durante 15-30 minutos a 60°C. Se añaden 10 ml de 1.0M Tris ClH pH=7.5. Se ajusta el pH a 8.0 con ClH 5M. Se enfria a TA. Se añade 100 µl de 20% de timerosal o azida sódica en agua. Se añade ó 50 µl de IP (solución stock 1mgr/ml en agua) ó 15 µl de DAPI (solución stock 1mgr/ml en agua) y se guarda a 4°C.

- Avidín-Isotiocianato de fluoresceína (Avidín-FITC) (1:1000).

1000µl de 4M y 1µl de Avidin-FITC.

- Anticuerpo antiavidín de cabra biotilado (1:100).

100µl de TNB y 1µl de anticuerpo antiavidín de cabra biotilado .

- Anticuerpo antidigoxigenina de ratón (1:500).

500µl de TNB y 1µl de anticuerpo antidigoxigenina de ratón.

1.5. TAMPONES

- PBS (pH=7.2):

Fosfato monosódico 0.221g + Fosfato disódico 1.193g + Cloruro sódico 8.773g, en 1 litro de agua bidestilada. Ajustar a pH=7.2.

- Tampón 20 x SSC (pH=7):

Citrato sódico 0.3 M 44.116g + Cloruro sódico 3 M 87.678g, en 500ml de agua bidestilada. Ajustar a pH=7.00.

- Tampón 4 x SSC (pH=7.5).

1200 ml de agua bidestilada+ 300 ml de tampón 20xSSC (pH=7.00) + 1.5ml 0.1% Nonidet P40%. Ajustar a pH=7.5.

- Tampón 4T (4xSSC/ 0.05% Tween 20).

200ml de 20xSSC pH=7.0 + 800ml de agua + 5ml de Tween 20 al 10% en agua.

- Tampón 4M (4xSSC/ 5% leche en polvo).

5 gr de leche en polvo al 5% + 100ml de 4xSSC + 100 μ l de timerosal o azida sódica al 20% en agua.

- Tampón TNT (0,1M Tris ClH/ 0.15M ClNa/ 0.05% Tween 20).

100ml de 1M Tris-1.5M ClNa pH=7.5 + 900 ml de agua + 5ml de Tween 20 al 10% en agua.

- Tampón TNB (0.1M Tris ClH/ 0.15M Cl Na/ 0.5% leche en polvo).

0.5 gr de leche en polvo + 100 ml de 0.1M Tris ClH/ 0.15M Cl Na + 100 μ l de timerosal o azida sódica al 20% en agua. Calentar durante 1 hora a 60°C.

II.- METODOS.

II.1. METODO DE HIS FLUORESCENTE EN CELULAS PARA LA DETECCION DE LA TRISOMIA 12.

II.1.1. La sonda de ADN.

La sonda de hibridación es una sonda α satélite (D12Z3-ONCOR, Gaithersburg MD), conjugada con biotina, específica para el cromosoma 12, que hibrida con el ADN α altamente repetitivo localizado en el centrómero del cromosoma 12. Esta sonda es rica en A-T. Está conjugada con biotina que es una pequeña vitamina soluble en agua y su principal ventaja es su punto casi isoeléctrico el cual, reduce la unión de ADN no específico.

II.1.2. Preparación de las células.

El "buffy coat" fue fijado en metanol:ácido acético glacial (3:1 vol:vol). Las células fijadas fueron almacenadas a -20°C hasta el momento de la hibridación. Las suspensiones de células fueron extendidas sobre portas y secadas al aire. Los portas habían estado, al menos, un día en metanol a 4°C y no más de dos días en agua estéril destilada a 4°C.

II.1.3. Hibridación.

Se seleccionó una zona adecuada para la hibridación mediante el microscopio de contraste de fases porque la ausencia de citoplasma es crucial para la sensibilidad de la HIS. Los portas han de ser preparados, a ser posible, el día que se va a realizar la hibridación, ya que se obtienen mejores resultados. Las hibridaciones se hicieron usando el procedimiento modificado, descrito por Pinkel et al (1986) (Fig.1). Los portas, que contienen las células, se sumergen en 0.1N HCL + 0.05% Tritón X 100 a TA durante 15 minutos, lavadas en 2 x SSC y en PBS durante dos minutos cada lavado y

fijadas en 1% Formaldehído en PBS durante 5 minutos a TA. Después de dos lavados en PBS y en 2 x SSC cada uno de 2 minutos y a TA, el ADN de las células se desnaturalizó en Formamida, 2 x SSC a 70 °C durante 4 minutos. Los portas se deshidrataron en etanol a diferentes concentraciones (70%, 85% y 100%) y a TA. Los pasos de deshidratación fueron realizados durante 1 minuto cada uno, empezando con el etanol al 70% y luego se secaron al aire. 1 μ l de la sonda de ADN conjugada con biotina (ONCOR, Chromosoma 12 α satellite, D12Z3), fue diluido en 9 μ l de la mezcla de hibridación (8 μ l de master mix #50%Formamida, Dextrán Sulfato, 20 x SSC, Tween-20, agua bidestilada#, 1 μ l de ADN "carrier" obtenido de ADN de esperma de arenque (Sigma)). Esta mezcla de hibridación se desnaturalizó a 70°C, durante 5 minutos y luego fue colocada en hielo. Se aplicó a los portas 10 μ l de esta mezcla, posteriormente se taparon con cubres 24x32mm y se sellaron con una solución pegamento. Los portas fueron incubados durante toda la noche a 37 °C en una cámara húmeda.

II.1.4. Detección.

Los cubres se eliminaron mediante un lavado en 2 x SSC durante 2 minutos. La sonda que no hibridó se eliminó con tres lavados en 50% Formamida, en 2 x SSC, a 45°C durante 2 minutos, los dos primeros lavados, y 5 minutos el último lavado, continuando con un lavado en 4 x SSC, Nonidet P - 40 a TA durante 5 minutos. Para detectar la sonda que hibridó, los portas se incubaron con 20 μ l de avidín-FITC (Vector Laboratories) en 4 x SSC + 0.02% azida sódica + 5% leche en polvo durante 20 minutos a 37°C. A continuación los portas se lavaron tres veces en 4xSSC a TA durante dos minutos cada lavado. Si la señal de hibridación no era detectable en este punto, se amplificó con antiavidina de cabra marcada con biotina (Vector Laboratories) en 4 x SSC + 0.02% azida sódica + 5% leche en polvo y se incubó durante 20 minutos a 37°C, seguido por otra incubación con avidín-FITC (FITC). Hasta dos amplificaciones fueron realizadas. Las células fueron contrastadas con IP (1ng/1ml Antifade) (Sigma).

Los portas fueron evaluados usando un microscopio de fluorescencia Olympus equipado con un filtro para FITC y otro para IP. El análisis fue realizado por enumeración de señales de hibridación en 200 células por paciente/control. El conteo de puntos en células en interfase fue realizada teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

- 1- Un punto fue contado sólo como positivo cuando había o una distancia clara de los puntos adyacentes o los diferentes puntos estaban en diferentes planos de enfoque.
- 2- Las áreas del porta que muestran en conjunto débil hibridación no fueron contadas.

3- Se consideraron aquellas células que o no tenían ninguna señal o una señal ambigua como no analizables.

4- Todos los análisis de células en interfase fueron realizados usando portas con una morfología buena y completa de las células así como células que no están solapadas.

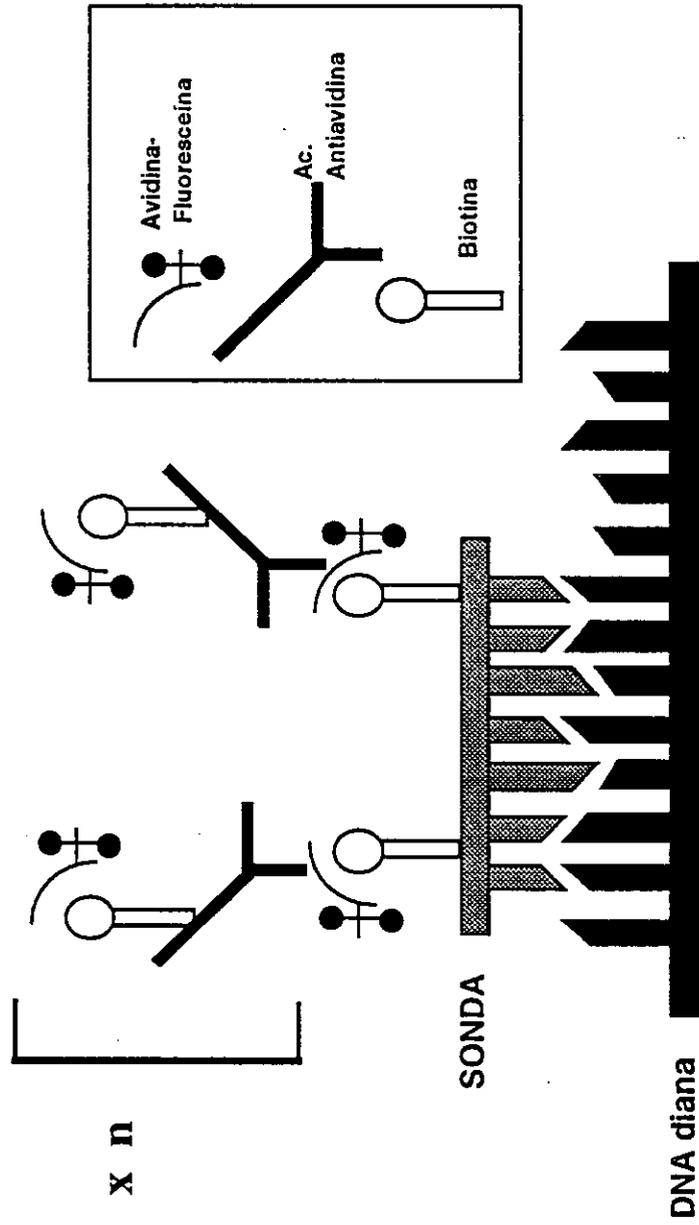
5- Las muestras fueron consideradas evaluables si la hibridación estaba presente en $\geq 90\%$ de las células o menos del 20% de las células tenían o cero o una señal.

6- El porcentaje de células con tres señales fue calculado del número total de células analizables.

Dos puntos fluorescentes representaban las dos copias normales del cromosoma 12 mientras que 3 puntos indicaban una célula trisómica. Se contaron también células con 4 ó más puntos fluorescentes.

Los núcleos en interfase son tridimensionales y por ello requieren la observación cuidadosa en el microscopio para revelar puntos fuera de foco. Los portas con bajos porcentajes de trisomía 12 fueron confirmados en todos los casos.

Fig. 1: METODO DE HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE (HIS)



II.2. METODO DE HIBRIDACION EN CELULAS: DETECCION TRANSLOCACION BCR/ABL.

II.2.1. La sonda de ADN.

La sonda de ADN para la translocación Mbc_r/abl es una mezcla de cósmidos de ADN marcados con digoxigenina específicos para la región "mayor" del gen bcr, y un único cósmido marcado con biotina para el gen abl.

II.2.2. Preparación de los portas y de las células.

Se lavan en etanol:éter (1:1) preparado a TA. Se introducen los portas durante 1 minuto en un vaso de precipitados con etanol y éter (1:1) y luego se sacan, se secan y se dejan de pie en una gradilla secándose. Los portas se preparan en el momento en que se va a realizar la hibridación. Se coge el porta, se echa una gota de muestra, se extiende y se mira al microscopio para seleccionar la zona óptima y se dejan guardados en oscuridad, secándose durante 24 horas, hasta que se proceda a su hibridación.

II.2.3. HIS Fluorescente.

Se han comparado dos protocolos de HIS fluorescente para la detección de la translocación bcr/abl en pacientes afectados de LMC.

II.2.3.1. PRIMER PROTOCOLO (Fig 2A)

2.3.1.a. Preparación de los portas.

Se preparan los núcleos en interfase en portas de cristal de acuerdo a lo indicado anteriormente. Se precalienta 40 ml de 2xSSC pH=7.0 en una jarra de "kopli" a 37°C en un baño de agua. Se colocan los portas en la jarra de "kopli" y se incuban durante 30 minutos. Se deshidratan los portas en etanol al 70%, 80% y 95% a TA durante 2 minutos cada paso. Se secan los portas al aire. Estos pasos pueden ser realizados hasta 2 semanas antes de la hibridación. Estos portas pretratados son almacenados a TA, si a continuación, no se va a realizar su hibridación.

2.3.1.b. Desnaturalización de los portas.

Se precalienta 40 ml de solución de desnaturalización pH=7.0 (70% de formamida/2xSSC ajustada a pH=7.0 con ClH) en una jarra de "kopli" a 70°C en un baño de agua. Se sumergen los portas en la solución de desnaturalización precalentada durante 2 minutos. No agitar. Se deshidratan los portas en etanol frío (-20°C) al 70%, 80% y 95% durante 2 minutos cada paso. Se reevalúan los portas

usando un microscopio de contraste de fases. Si las células parecen muy pálidas, comparadas a su apariencia antes de la desnaturalización, no hibridan bien. Se deben usar los portas el mismo día que son desnaturalizados.

2.3.1.c. Hibridación.

Se ha empleado una sonda de secuencia única para la translocación Mbcrr/abl en pacientes afectados de LMC. Se precalienta la sonda a 37°C durante 5 minutos. Se colocan 10 µl de la sonda en cada porta y se cubre con un cubre de cristal, tratado, de 25x25mm. Se sella el perímetro del cubre de cristal al porta con una capa delgada de sellador. Se incuban los portas a 37°C, en una cámara húmeda (realizada, empapando toallitas de papel en 50% de formamida a pH=7.0). Se ponen los portas en esta cámara húmeda, a 37°C toda la noche.

Para tratar los cubres se hierven durante 10 minutos en CIH 0.1M. Se dejan enfriar un poco y se pasan por agua del grifo, agua desmineralizada, agua destilada, etanol y luego se secan con papel de filtro y se meten en la estufa en otro vaso de precipitado tapado con papel albal a 180°C y durante 2 horas y luego se guardan a TA y tapados para que no cojan polvo.

2.3.1.d. Lavados rápidos de post-hibridación.

Se quita cuidadosamente el sellador. Se quitan los cubres. Se hace 1 lavado en formamida al 50% a 43°C durante 45 minutos y con agitación. Se precalienta 40 ml de 2xSSC en una jarra de "kopli" a 72°C en un baño de agua. Se sumergen los portas en 2xSSC durante 5 minutos. No agitar. Se transfieren los portas a una jarra de "kopli" que contiene 40 ml de 1xPBD durante 2 minutos, luego se procede a la detección. El tiempo en esta solución no es crítico. Los portas pueden ser mantenidos durante varias horas a TA o almacenados hasta 2 semanas a 4°C en 1xPBD.

2.3.1.e. Detección.

Se quitan los portas del 1xPBD y se seca el exceso de líquido del borde. No se puede dejar secar la superficie del porta. Se aplican 60 µl del reactivo de detección a cada porta (se mezclan 30µl de antidigoxigenina marcada con rodamina y 30 µl de avidín-FITC) y se coloca un cubre de plástico sobre la solución. Se incuban los portas a 37°C durante 5 minutos en una cámara húmeda (hecha en agua). Se quitan cuidadosamente los cubres y se lavan los portas, para quitar el exceso de componentes de detección, 3 veces durante 2 minutos cada lavado en 40 ml de 1xPBD a TA. Se puede proceder a la amplificación, si es necesaria, o a la contraincubación.

2.3.1.f. Contratación fluorescente.

Se quitan los portas del 1xPBD y se seca el exceso de líquido del borde. No se debe permitir que se seque la superficie del porta. Se aplican 10 μ l de la contratación apropiada, que es en este caso DAPI/Antifade. Se cubre con un cubre de cristal 22x50 mm. Se cubre el porta con una toallita de papel y se presiona suavemente para quitar cualquier exceso de líquido teniendo cuidado de no mover el cubre.

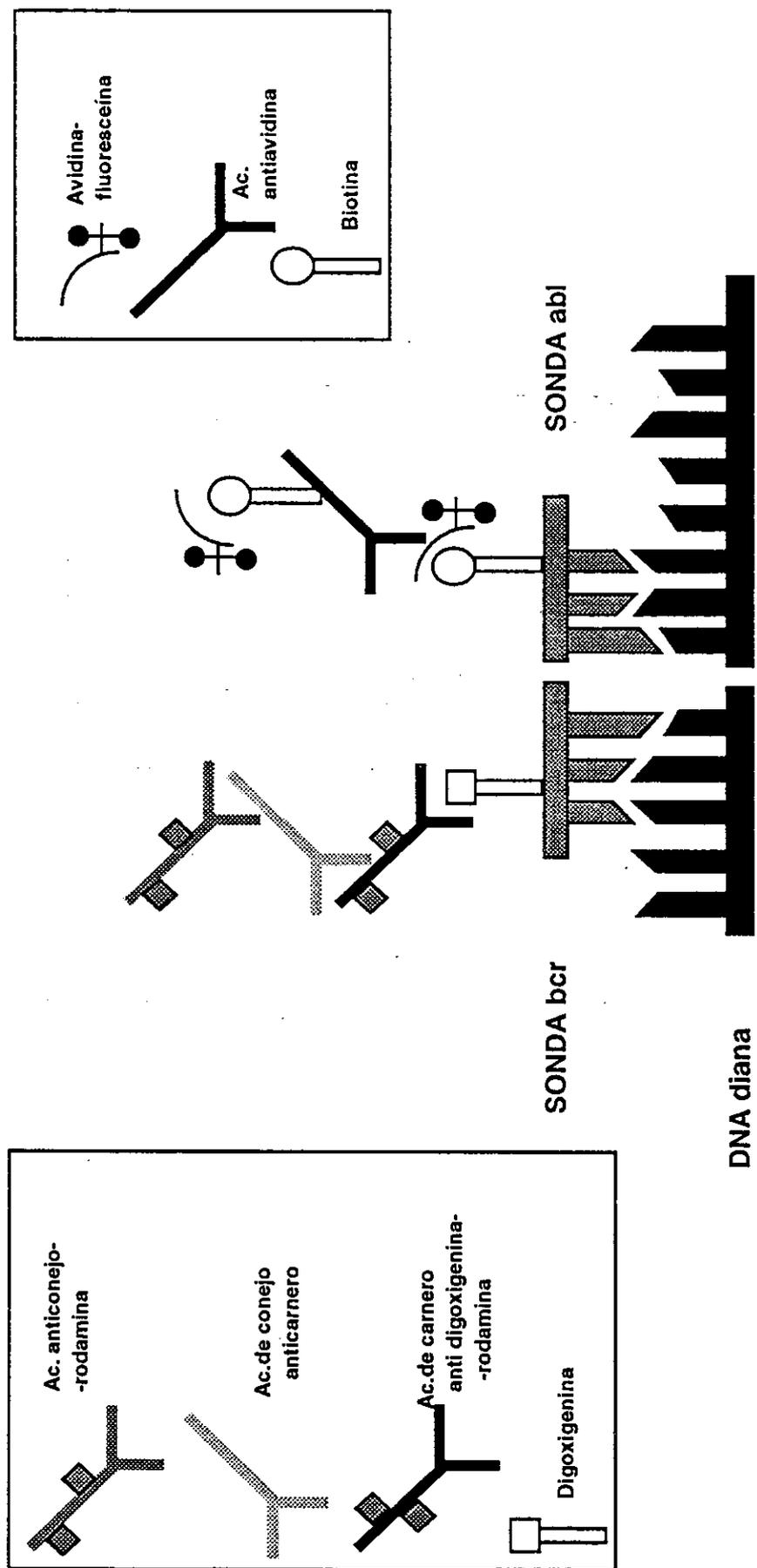
Las células fueron vistas a través de un microscopio de fluorescencia con filtros para rodamina, FITC, DAPI.

Cada una de las 3 muestras fueron estudiadas independientemente por dos personas. Cada uno contó 200 núcleos en interfase de buena calidad de diferentes áreas de la misma preparación.

2.3.1.g. Amplificación.

Si los portas fueron contratañidos antes de la amplificación, se sumergen los portas en 40 ml de 1xPBD a TA hasta que los cubres floten, luego se transfieren los portas a una jarra de "kopli" con 40 ml de 1xPBD fresco a TA y se dejan 5 minutos para desteñirlos. Se quitan los portas del 1xPBD y se seca el exceso de líquido del borde. No se debe dejar secar la superficie del porta. Se aplica 60 μ l de anticuerpo de conejo anti oveja a cada porta. Se coloca un cubre de plástico sobre la solución. Se incuba durante 15 minutos a 37°C (en cámara húmeda, hecha en agua). Cuidadosamente se quitan los cubres de plástico y se lavan los portas 3 veces durante 2 minutos cada lavado en 40 ml de 1xPBD a TA. Se aplican 60 μ l de anticuerpo anti conejo conjugado con rodamina a cada porta. Se coloca un cubre de plástico sobre la solución. Se incuba durante 15 minutos a 37°C. Cuidadosamente se quitan los cubres de plástico y se lavan los portas 3 veces durante 2 minutos cada lavado en 40 ml de 1xPBD a TA. Se aplica 60 μ l de anticuerpo antiavidin a cada porta. Se coloca un cubre de plástico sobre la solución. Se incuba durante 5 minutos a 37°C. Cuidadosamente se quitan los cubres de plástico y se lavan los portas 3 veces durante 2 minutos cada lavado en 40 ml de 1xPBD a TA. Se aplica 60 μ l de avidín-FITC a cada porta y se cubre con un cubre de plástico. Se incuba 5 minutos a 37°C. Cuidadosamente se quitan los cubres de plástico y se lavan los portas 3 veces durante 2 minutos cada lavado en 40 ml de 1xPBD a TA. Se procede a la contratación.

Fig. 2A: METODO DE HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE (HIS) (bcr/abl).



II.2.3.2. SEGUNDO PROTOCOLO (Fig. 2B)

2.3.2.a. Preparación de portas.

Se preparan las cámaras húmedas, una con agua y otra con 50% de formamida pH=7.0. Se tapan con papel albal y se meten a 37°C, para que estén a esta temperatura cuando se vayan a utilizar. Los portas se han estado secando durante 24 horas a TA y en oscuridad. No se deben dejar más de 24 horas. Se prepara un "stock" de RNAsa (10mgr/ml): 10 mgr de RNAsa en 1ml de agua y este "stock" se guarda a -20°C. De éste "stock" se cogen 10 µl y se le añaden 990 µl de 2xSSC a pH=7.0. Se pone en cada cubre 100µl de esta solución (10 µl de stock RNAsa+990 µl de 2xSSC a pH=7.0). Se coloca el porta encima y se incuban boca abajo en una jarra de "kopli" que se pone en la cámara húmeda (hecha con agua) a 37°C y durante 1 hora, tapada la cámara con papel albal. Los cubres que se utilizan para poner la sonda se tratan siempre, los otros cubres se pueden tratar o no. Una vez incubados en RNAsa, se saca la jarra de "kopli" y se hacen tres lavados en 2xSSC con agitación durante 5 minutos cada lavado y a TA. El cuarto lavado es a 37°C, con agitación y también en 2xSSC. Se introducen con el cubre en el primer lavado en 2xSSC para que se caigan los cubres.

Se prepara solución "stock" de pepsina al 10% en agua. De este "stock" se cojen 50 µl y se diluyen en 1ml de CIH1N+99ml de agua. Una vez terminados los lavados en 2xSSC, se incuban los portas durante 10 minutos a 37°C en la solución de pepsina que se ha preparado. A continuación se realizan dos lavados de 5 minutos cada uno en PBS a TA y en agitación.

Se prepara, a continuación la solución de formaldehído. Se cogen de CIMg1M, 5ml y se le añaden 92.4ml de PBS y 2.6ml de formaldehído, libre de ácidos. Se incuban los portas durante 10 minutos en la solución de formaldehído a 37°C. Se lavan los portas 2 veces durante 5 minutos en PBS a TA y con agitación. Se deshidratan en etanol al 70%, 90% y 100% durante 5 minutos cada paso a TA y con agitación. Se secan los portas al aire y en oscuridad y a TA.

2.3.2.b. Desnaturalización/Hibridación.

Se prepara la mezcla de hibridación. Para resuspender la sonda y para desnaturalizar se usa formamida desionizada al 100%. Se cogen 700µl de 100% formamida desionizada, 100µl de 0.5M fosfato monosódico pH=7.0, 100µl de 20xSSC y 100 µl de agua. Se cogen 10µl de sonda bcr y 10 µl de sonda abl, se ponen en un eppendorf y en el baño a 37°C durante 5 minutos, para desnaturalizar la sonda. En cada cubre de 24x50mm no tratado necesariamente se colocan 120 µl de la mezcla de hibridación (700µl de 100% formamida desionizada, 100µl de 0.5M fosfato monosódico pH=7.0, 100µl de 20xSSC y 100 µl de agua). Se pone el porta encima y se ponen a incubar a 80°C en estufa.

Se ponen sobre la placa de la estufa los portas directamente, durante 2 minutos y medio, para desnaturalizar los portas. Luego se sacan y se sacuden para dejar caer los cubres y se meten en etanol al 70% y a -20°C directamente durante 5 minutos y en agitación. Se meten a continuación en etanol al 90% y a TA, durante 5 minutos y en agitación. Luego en etanol al 100% a TA en agitación y durante 5 minutos. Se sacan del etanol y se secan en una placa de calor que está a 37°C horizontalmente los portas y boca arriba. Se añaden a cada porta 10 µl de la sonda. Se pone un cubre tratado de 18x18mm. Se sellan. Se deja secar el sellador y se ponen a incubar en la cámara húmeda (hecha con 50% de formamida pH=7.0). Se ponen a incubar a 37°C toda la noche.

2.3.2.c. Lavados posthibridación.

Se quita el sellador con pinzas y sin mover los cubres. Se sumergen los portas en formamida al 50% pH=7.0 en 2xSSC y a 45°C durante 5 minutos, en agitación, para que se caigan los cubres. Se transfieren los portas sin cubres a una nueva jarra y se lavan 3 veces durante 5 minutos con 50% formamida, 2xSSC, pH=7.0 a 45°C y en agitación. A continuación se lavan los portas en 0.1xSSC, 3 veces durante 5 minutos en agitación y a 60°C. Se lavan 1 vez durante 5 minutos con 4T en agitación y a TA. A partir de ahora es importante que no se sequen los portas sólo escurrirlos.

2.3.2.d. Bloqueo.

Durante 30 minutos a 37°C se procede al bloqueo con 4M y en cámara húmeda. Se pone para ello 100µl de 4M en cada cubre y encima el porta y se ponen a incubar los portas en cámara húmeda (hecha con agua). A continuación se hace un lavado de 5 minutos con 4T y en agitación y a TA.

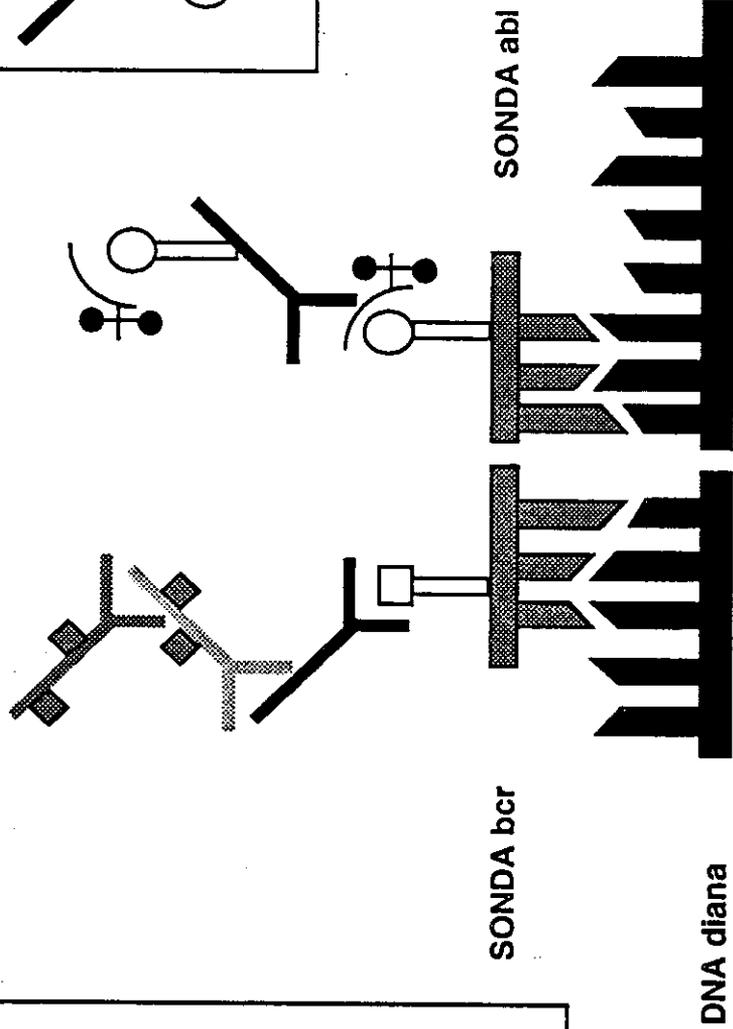
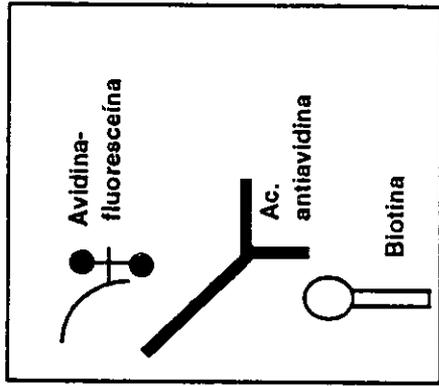
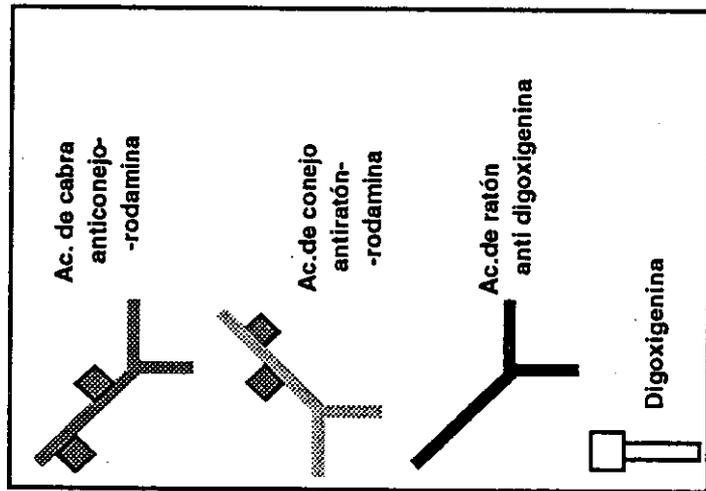
2.3.2.e. Incubaciones inmunocitoquímicas.

Se sacan los portas de la cubeta y se ponen en vertical para escurrir pero no se dejan secar. Se preparan 1000µl de 4M y 1µl de avidín-FITC. Se pone de esta mezcla 100µl en cada cubre no tratado. Se pone el porta y se ponen a incubar, en cámara húmeda (hecha con agua), a 37°C durante 30 minutos. Dos lavados de 5 minutos cada uno con 4T a TA con agitación y en oscuridad. Un lavado de 5 minutos con TNT en oscuridad a TA y en agitación. Se prepara 10µl de anticuerpo antiavidín de cabra biotinilado (proporción 1:100), 2µl de anticuerpo antidigoxigenina de ratón (proporción 1:500) y 1000µl de TNB. Se ponen 100µl de esta mezcla en cada cubre no tto y se pone a incubar una vez puesto el porta encima, en cámara húmeda (hecha con agua), a 37°C. Se hacen 3 lavados con TNT durante 5 minutos con agitación y a TA. Se coge 1µl de avidín-FITC (1:1000 en TNB), 1µl de anticuerpo antiratón de conejo marcado con rodamina (1:1000 en TNB) y 1000µl de TNB. De esta

mezcla se ponen en cada cubre no tto, 100 μ l y se pone a incubar una vez puesto el porta encima en cámara húmeda (hecha con agua), a 37°C . Se hacen 3 lavados con TNT durante 5 minutos con agitación y a TA. Se prepara anticuerpo anticonejo de cabra marcado con rodamina (1:1000 en TNB) con 1 μ l de anticuerpo anticonejo de cabra y 1000 μ l de TNB. De esta mezcla se ponen 100 μ l en cada cubre no tto, y se incuba una vez puesto el porta encima boca abajo, en cámara húmeda (con agua), a 37°C. Se hacen 3 lavados con TNT durante 5 minutos con agitación y a TA. Luego 1 lavado de 5 minutos con PBS a TA. Un lavado con etanol al 70% a TA en agitación durante 5 minutos. Un lavado con etanol al 90% a TA ,en agitación, durante 5 minutos. Un lavado con etanol al 100% a TA, en agitación, durante 5 minutos. Se secan en oscuridad. Se montan las preparaciones con 35 μ l de DABCO/DAPI por porta.

Con estos dos métodos la sonda abl tiene una señal verde, la sonda Mbcrr tiene una señal roja, y la cromatina de fondo es azul. Cualquier translocación que comprende la fusión de las regiones abl y Mbcrr da como resultado dos señales roja y verde juntas o una señal fusionada roja y verde, que algunas veces aparece amarilla (Fig. 3).

Fig. 2B: METODO DE HIBRIDACION IN SITU FLUORESCENTE (HIS) (bcr/abl). (Protocolo II)



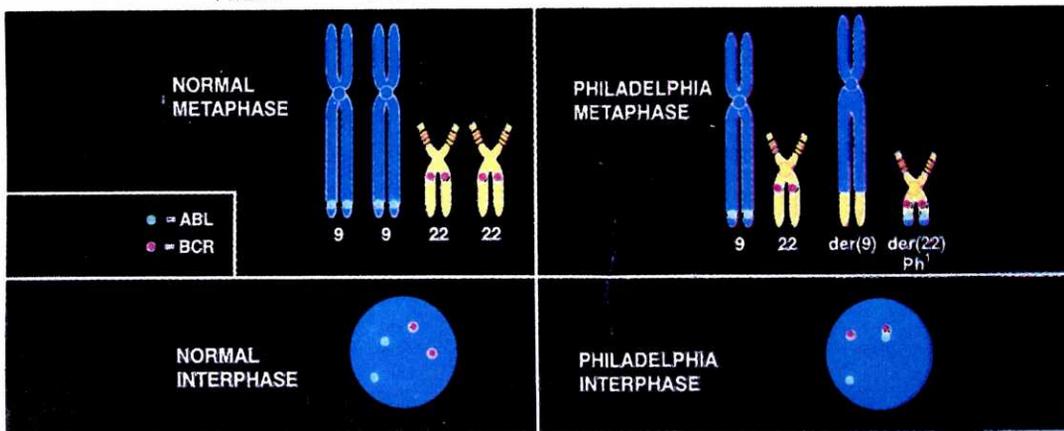
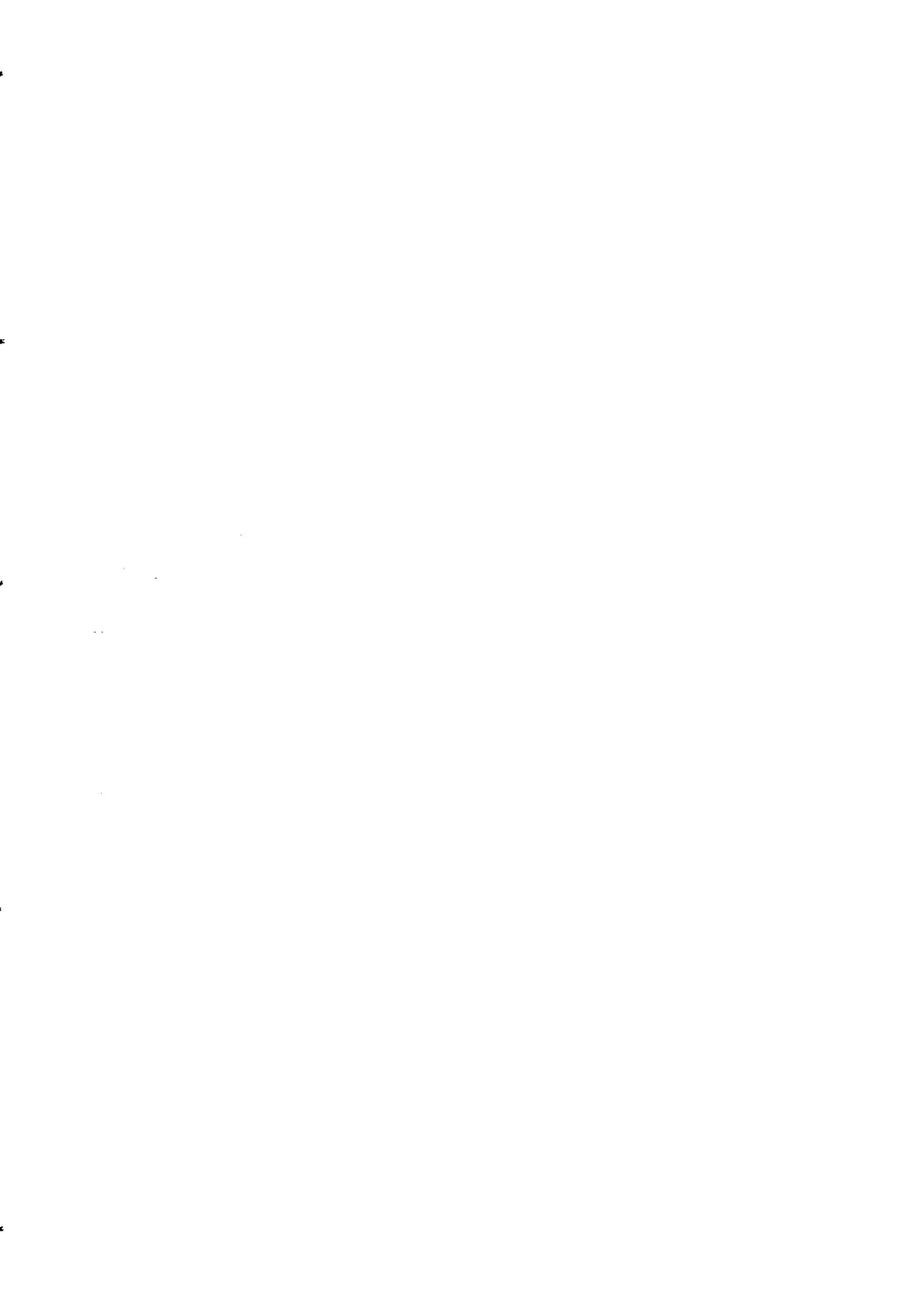


Figura 3: Representación esquemática de la t(9;22) en la LMC, mostrando los genes *abl* y *bcr* en cromosomas en metafase normales (arriba, izquierda), cromosomas en metafase de paciente con LMC (arriba, derecha), núcleos en interfase normales (abajo, izquierda), y núcleos en interfase de paciente con LMC (abajo, derecha).

II.3. METODOS ESTADISTICOS.

Los **métodos estadísticos** empleados para el análisis de datos fueron el estimador de Kolmogorov, para testar si los datos se ajustan a una normal. A continuación, se emplearon los test ANOVA, Regresión y tablas de contingencia para investigar las correlaciones entre varias características clínicas y datos de laboratorio y la presencia de trisomía 12. Por último las curvas de supervivencia que comparan los pacientes con y sin trisomía 12 fueron hechas para los datos del estudio en interfase por HIS, usando el estimador de Kaplan y Meier. La supervivencia fue medida desde la fecha de diagnóstico a la fecha de muerte o a la fecha del último seguimiento. Se empleó el test de Mantel-Cox (Logrank) para ver si las diferencias entre las curvas de supervivencia de los pacientes con y sin trisomía 12 eran significativas.

RESULTADOS



IV. RESULTADOS

I.- LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA DE ORIGEN B.

I.1. CONTROLES.

La frecuencia de células control normales (n=28) con una señal de hibridación era: 0.93% (rango 0%-2%; intervalo de confianza, 0.53% a 1.33%; desviación estándar DE 0.76%); 97.86% (rango 96% a 99%; intervalos de confianza, 97.33 a 98.38; DE 1.01) tenían dos señales. Las tres señales de hibridación indicando "falsa trisomía" fueron vistas en 1.21% de las células (rango 0% a 3%; intervalos de confianza, 0.78 a 1.65; DE 0.83%). Así, se considera que un paciente presentaba trisomía 12 cuando estas tres señales se detectan en $\geq 4\%$ de las células (media \pm 3DE de los controles).

I.2. PACIENTES.

I.2.1. HIS fluorescente al inicio del estudio.

La hibridación en células en interfase fue posible en los 45 casos. La sonda de ADN centrómero-específica en la mayoría de los casos dió señales de hibridación fuertes con buena resolución espacial, que permitieron la rápida enumeración de las señales. La trisomía 12 fue detectada en 20 pacientes con LLCB (44.4%). El número medio de células trisómicas era en estos casos de 19.1 (rango 4% a 38%). La tabla 1 muestra las proporciones de células con ninguna, una, dos, tres o cuatro señales. Dos señales de hibridación, en núcleos en interfase, fueron detectadas en el 60%-99% de los casos. Ninguna señal o sólo una señal fue observada en 0%-3% de las células y cuatro señales de hibridación fueron observadas en 0%-2% de las células.

I.2.2. Citogenética.

El estudio citogenético había sido realizado en 14 pacientes con LLCB. Los resultados citogenéticos en estos fueron los siguientes: no se obtuvieron metafases aptas para el estudio en 4 casos y se obtuvo un cariotipo normal en 10 pacientes. Entre los 4 pacientes en los que no se obtuvieron metafases analizables, 2 pacientes tenían trisomía 12 en el 5%-18% de las células (P6, P15), mientras que entre los 10 casos con cariotipo normal la trisomía 12 estaba presente en 5 en 4% a 26% de las células (P10, P16, P19, P32, P44).

I.2.3. Relaciones entre distintas características clínicas y de laboratorio y la trisomía 12.

La relación entre las características clínicas y de laboratorio y la presencia de trisomía 12 son examinadas en la tabla 2. Desde el punto de vista clínico-biológico, las LLCB con trisomía 12 tenían una mayor incidencia de esplenomegalia (70% vs 36%, $p=0.0234$) y patrón difuso de infiltración medular (85% vs 36%, $p=0.0027$) así como niveles de leucocitosis periférico más elevados (64.5 vs 26.3, $p=0.0021$). Había una tendencia, en los pacientes con trisomía 12, a tener una mayor incidencia de adenopatías que los pacientes sin trisomía 12 (65% vs 32%, $p=0.0275$) y también a tener unos más bajos niveles de Hb pero no estadísticamente significativos (12.1 vs 13.6, $p=0.059$). Tenían estadio de Binet avanzado [A: 25% (5/20) vs 76% (19/25); B: 40% (8/20) vs 16% (4/25); C: 35% (7/20) vs 8% (2/25), $p=0.0229$] comparados con aquellos sin trisomía 12. No se detectó por el contrario ninguna correlación con la presencia de trisomía 12 y otras características clínicas y biológicas de la enfermedad como son el sexo, edad, hepatomegalia, VCM, VSG, plaquetas y recuento granulocítico o linfocitario.

En relación con los niveles séricos de Igs los pacientes con trisomía 12 mostraban niveles medios de IgG más bajos (638 vs 910.5, $p=0.0402$). No se observaron diferencias significativas con respecto a los niveles séricos de las otras Igs (IgA y IgM) al comparar pacientes con trisomía 12 y sin trisomía 12, únicamente había una tendencia en los pacientes con trisomía 12 a tener más bajos niveles de IgA que los pacientes sin trisomía 12 pero no estadísticamente significativo ($p=0.0745$). No se encontraron tampoco relaciones entre ambos grupos de pacientes, con respecto a otras características clínicas, como son niveles de alfa 1 antitripsina y de haptoglobina, así como tampoco con respecto a los niveles de LDH y de albúmina, ni tampoco con respecto al test directo antiglobulina.

Fenotípicamente, la existencia de trisomía 12 no se relacionó con una mayor expresión de los marcadores típicos de la LLCB (FMC7, CD19, CD5). Tampoco se apreciaron diferencias entre los dos grupos entre otros marcadores útiles también para el diagnóstico de la LLCB, como son CD20 y CD22 y los receptores para el complemento (C3d). Tampoco se encontró correlación con la expresión de los CD8 y CD4 entre los dos grupos.

Los pacientes con trisomía 12 era más frecuentemente estar tratados previamente (55% vs 24%, $p=0.0331$).

1.2.4. Seguimiento.

A fin de confirmar estos resultados y controlar la frecuencia de trisomía 12 durante el curso de la enfermedad, la HIS fluorescente fue repetida en estos 45 pacientes, aproximadamente cada 6 meses, en muestras de SP recogidas a lo largo de 2 años. De los 45 pacientes, 24 (53.3%) mostraron trisomía 12 en diferentes momentos de su evolución.

De los 20 pacientes que eran inicialmente positivos se observó:

- 9 pacientes (P8, P10, P15, P16, P21, P22, P30, P31, P45) se mantenían sin cambios significativos en su porcentaje de células trisómicas (5%-28%: media=19.4; 6%-27%: media=19.4; 6%-28%: media=19.3; 6%-28%: media=19.3) ($p=0.99$). En estos pacientes tampoco se apreció un cambio de estadio [4 pacientes en estadio A (1 paciente sometido a tto), 2 en estadio B (sometidos a tratamiento) y 3 en estadio C (sometidos a tratamiento)].

- En 7 pacientes (P1, P6, P24, P32, P33, P43, P44) (4 en estadio C y 3 en estadio B) se encontró un aumento significativo en el porcentaje de células en interfase con tres señales, con un rango entre 12%-40% (media=23.43); 12%-48% (media=27.86); 18%-52% (media=31.86); 26%-55% (media=40.57) ($p=0.0486$), respectivamente, en cada una de las 4 revisiones mediante HIS a las que fueron sometidos. Además, en 2 de estos pacientes (P6, P33) se produjo también un cambio de estadio de B a C. P24, P43 y P44 estaban ya sometidos a tratamiento al inicio de este estudio y P1, P6, P32 y P33 son sometidos a tratamiento en la segunda revisión.

- En los pacientes (P19, P27, P41) no se pudo apreciar la presencia de trisomía 12, 12 meses después de tratamiento, pero en uno de estos 3 pacientes (P41) esta trisomía 12 se volvió a detectar a los 12 meses de haber conseguido su remisión, con un 6% de células trisómicas. Por último, en el paciente P4 (que estaba a tratamiento), el porcentaje de células trisómicas fue disminuyendo hasta 6%, pero no llegó a desaparecer a pesar del tratamiento. Al comienzo del seguimiento de estos pacientes P19 y P41 son sometidos a tratamiento.

En los 25 pacientes que no presentaban trisomía 12 al inicio de este estudio, tampoco se observó su presencia durante los dos años de seguimiento, así como tampoco un cambio de estadio, a excepción de 4 pacientes (P3, P7, P14, P39). En los pacientes P3, P14 y P39 se mostró la presencia de trisomía 12, pero sin cambio de estadio y se apreció un incremento en el porcentaje de células con tres señales en las sucesivas revisiones (3%-12%, media=7.7; 8%-19%, media=12; 17%-28%, media=21.7; 25%-32%, media=28.7) ($p=0.0037$). P3 y P39 estaban a tratamiento desde el inicio del estudio y P14 es sometido a tratamiento en la segunda revisión. P7 evolucionó de estadio A

a estadio B, apreciándose la presencia de trisomía 12 y un incremento en el porcentaje de células en interfase con tres señales de hibridación en cada una de las revisiones sucesivas (3%,estadioA; 15%,estadioB; 18%,estadioB; 25%,estadioB) y no fue sometido a tratamiento.

En las cuatro revisiones a las que fueron sometidos estos pacientes durante 2 años, se sigue observando la asociación entre la presencia de la trisomía 12 y un estadio de Binet avanzado, y ésta relación se va estrechando en las sucesivas revisiones:

- Segunda revisión: (A: 22.7 vs 82.6; B: 40.9 vs 13.04; C: 36.4 vs 4.3; p=0.0026).
- Tercera revisión: (A: 19.04 vs 79.16; B: 38.09 vs 16.6; C: 42.8 vs 4.2; p=0.0001).
- Cuarta revisión: (A: 15 vs 82.6; B: 35 vs 13.04; C: 50 vs 4.3; p=0.0001).
- Quinta revisión: (A: 14.3 vs 86.4; B: 38.1 vs 9.1; C: 47.6 vs 4.5; p=0.0001).

En las cuatro revisiones también se aprecia una mayor tendencia en los pacientes con trisomía 12 a estar sometidos a tratamiento:

- Segunda revisión: [81.8 (18/22) vs 21.7 (5/23), p=0.0028].
- Tercera revisión: [85 (17/20) vs 24 (6/25), p=0.006].
- Cuarta revisión: [85 (17/20) vs 26 (6/23), p=0.0011].
- Quinta revisión: [86 (18/21) vs 23 (5/22), p=0.001].

Si se tiene en cuenta las 4 revisiones, en conjunto, se puede apreciar una tendencia global al incremento del porcentaje de células trisómicas en las sucesivas revisiones (18.6%, 22.08%, 23.9%, 26.7%) (p=0.0968).

El porcentaje de células trisómicas en cada una de las sucesivas revisiones, así como las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 1.

P6 y P33 se mantuvieron positivos durante los dos años de seguimiento, pero se observó una evolución de estadio B a estadio C, apreciándose al mismo tiempo un aumento en el porcentaje de células trisómicas en las sucesivas revisiones. En estos pacientes, que fueron sometidos a tratamiento, se detectó la aparición de una anemia hemolítica, Coombs positiva, así como sucesivas infecciones que deterioraron su estado general. En P33 se vió además un adenocarcinoma de origen, probablemente digestivo.

P1, P24, P32, P43 y P44 se mantuvieron positivos durante el período que se siguió su evolución y aunque no se observó un cambio de estadio, sí se apreció una progresión en su enfermedad, manifestándose un progresivo deterioro del estado general, refractariedad a la quimioterapia que ya recibían (P24, P43, P44) o a la que fueron sometidos (P1, P32) e

hipogammaglobulinemia; así como un aumento en el porcentaje de células trisómicas en las sucesivas revisiones y aumento en su masa tumoral.

P3, P7, P14 y P39 no presentaban trisomía 12 al inicio de este estudio pero ésta se manifestó posteriormente, al mismo tiempo que se apreció un aumento en su recuento plaquetar y linfocitario, así como un progresivo deterioro de su estado general, que en P7 coincidió con un cambio de estadio A a B. P3 y P39 ya estaban sometidos a tratamiento quimioterápico, mientras que P14 es sometido a dicho tratamiento al observarse una progresión en su enfermedad con anemia persistente.

En P4, P19, P27, P41 se observa una mejoría en su estado general, manifestándose una reducción en su linfocitosis y en su masa tumoral, así como una buena respuesta a la quimioterapia a la que estaban (P4, P41) o que fueron sometidos (P19), consiguiéndose reducir el porcentaje de células trisómicas hasta negativizarse incluso la presencia de trisomía 12 en los pacientes P19, P27, P41. Pero un aumento del recuento linfocitario nuevamente, y un aumento del tamaño de la esplenomegalia y de las adenopatías, así como un deterioro de su aspecto, coincidió en el paciente P41 con nuevamente un aumento en su porcentaje de células trisómicas.

P8, P10, P15, P16, P21, P45 (que estaban sometidos a tratamiento quimioterápico) y P22, P30, P31 (que no estaban sometidos a tratamiento quimioterápico) mostraron la presencia de trisomía 12 durante todo su seguimiento, así como una elevada linfocitosis, hipogammaglobulinemia y la presencia de esplenomegalia y adenopatías que se mantuvieron aparentemente homogéneas durante su seguimiento.

P2, P5, P9, P11, P12, P13, P17, P18, P20, P25, P26, P28, P29, P34, P35, P40, P42 (que no estaban sometidos a tratamiento quimioterápico) y P23, P36, P37, P38 (que estaban sometidos a tratamiento quimioterápico) no mostraron la presencia de trisomía 12 durante los dos años en los que se siguió su evolución, así como presentaron una buena evolución clínica y analítica.

1.2.5. Supervivencia.

Las curvas de supervivencia, para el análisis en interfase, en pacientes con y sin trisomía 12 muestran diferencias, apreciándose una tendencia hacia una peor supervivencia para los pacientes con trisomía 12 (Fig. 2).

Tabla 1: Datos del seguimiento mediante HIS fluorescente y citogenética en muestras de SP de 45 pacientes diagnosticados de LLCB (200 células analizadas/muestra)

Paciente N°	Sexo/ Edad del estudio	Fecha	Estadio	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente N° de señales					% de trisomía 12
						0	1	2	3	4	
P1	V/65	Oct-91	C	No	No	4	6	134	56	0	28
	V/65	Abr-92	C	Cl.+P	No	2	2	140	56	0	28
	V/66	Oct-92	C	Cl.+P	No	2	2	140	56	0	28
	V/66	Abr-93	C	CHOP	No	2	0	118	80	0	40
	V/66	Jun-93	C	CHOP	No	2	2	106	90	0	45
P2	V/66	Ene-92	A	No	Normal	4	4	190	2	0	1
	V/67	Abr-92	A	No	No	2	4	192	2	0	1
	V/67	Oct-92	A	No	No	2	4	190	4	0	2
	V/68	Abr-93	A	No	No	2	4	190	4	0	2
	V/68	Sep-93	A	No	No	2	2	192	4	0	2
P3	H/64	Oct-91	B	Cl.+P	NE	0	0	196	4	0	2
	H/65	Abr-92	B	Cl.+P	No	2	2	190	6	0	3
	H/65	Oct-92	B	Cl.+P	No	2	2	176	18	2	9
	H/66	Abr-93	B	Cl.+P	No	2	0	158	40	0	20
	H/66	Oct-93	B	CHOP	No	2	6	142	50	0	25
P4	H/75	Oct-91	B	Rad.	No	2	0	164	34	0	17
	H/75	Abr-92	B	CHOP	No	4	4	168	24	0	12
	H/76	Oct-92	B	CHOP	No	4	4	174	18	0	9
	H/76	Abr-93	B	CHOP	No	2	4	182	12	0	6
	H/77	Oct-93	B	CHOP	No	2	4	182	12	0	6
P5	H/57	Oct-91	A	No	No	2	0	194	4	0	2
	H/57	Abr-92	A	No	No	2	0	194	4	0	2
	H/58	Oct-92	A	No	No	2	2	190	6	0	3
	H/58	Abr-93	A	No	No	2	0	192	6	0	3
	H/59	Oct-93	A	No	No	0	0	196	4	0	2

Paciente N°	Sexo/ Edad del estudio	Fecha del estudio	Estadio	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente N° de señales				% de trisomía 12	
						0	1	2	3		4
P6	V/55	Oct-91	B	No	NE	0	4	156	36	4	18
	V/55	Abr-92	B	Cl.+P		4	4	154	36	2	18
	V/56	Oct-92	B	Cl.+P		4	0	146	50	0	25
	V/56	Abr-93	C	Cl.+P		2	2	132	64	0	32
	V/57	Oct-93	C	Cl.+P		2	2	116	80	0	40
P7	V/40	Oct-91	A	No	No	0	0	194	6	0	3
	V/41	Abr-92	A	No		0	0	194	6	0	3
	V/41	Oct-92	B	No		2	0	168	30	0	15
	V/42	Abr-93	B	No		0	0	164	36	0	18
	V/42	Oct-93	B	No		0	0	150	50	0	25
P8	H/43	Oct-91	A	COP	No	2	2	162	34	0	17
	H/44	Abr-92	A	COP		2	2	160	36	0	18
	H/44	Oct-92	A	COP		4	2	158	36	0	18
	H/45	Abr-93	A	COP		4	2	158	36	0	18
	H/45	Sep-93	A	COP		2	2	160	36	0	18
P9	H/63	Oct-91	A	No	NE	0	0	198	2	0	1
	H/63	Abr-92	A	No		0	0	198	2	0	1
	H/64	Oct-92	A	No		2	0	194	4	0	2
	H/64	Abr-93	A	No		2	0	194	4	0	2
	H/65	Oct-93	A	No		2	0	194	4	0	2
P10	V/71	Feb-92	B	CHOP	Normal	4	4	176	16	0	8
	V/71	Abr-92	B	Rad.		4	4	176	16	0	8
	V/71	Oct-92	B	CHOP		0	2	182	16	0	8
	V/72	Abr-93	B	CHOP		2	2	182	14	0	7
	V/72	Jul-93	B	CHOP		2	2	180	16	0	8
P11	V/63	Oct-91	A	No	No	2	2	192	4	0	2
	V/63	Abr-92	A	No		2	2	192	4	0	2
	V/64	Oct-92	A	No		2	0	194	4	0	2
	V/64	Abr-93	A	No		0	0	196	4	0	2
	V/65	Oct-93	A	No		0	0	198	2	0	1

Paciente Nº	Sexo/ Edad del estudio	Fecha del estudio	Estadio	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente Nº de señales				% de trisomía 12
						0	1	2	3	
P12	V/67	Oct-91	A	No	No	2	2	196	0	0
	V/68	Abr-92	A	No	No	2	2	196	0	0
	V/68	Oct-92	A	No	No	2	0	198	0	0
	V/69	Abr-93	A	No	No	2	0	196	2	0
	V/69	Oct-93	A	No	No	2	0	196	2	0
P13	H/81	Oct-91	A	No	Normal	4	2	190	4	0
	H/82	Abr-92	A	No	No	4	2	190	4	0
	H/82	Oct-92	A	No	No	4	2	190	4	0
	H/83	Abr-93	A	No	No	2	2	194	2	0
	H/83	Oct-93	A	No	No	2	2	194	2	0
P14	V/77	Oct-91	C	No	No	0	0	198	2	0
	V/77	Abr-92	C	Cl.+P	No	2	2	178	16	2
	V/78	Oct-92	C	Cl.+P	No	2	2	180	16	0
	V/78	Abr-93	C	Cl.+P	No	0	6	160	34	0
	V/79	Oct-93	C	CHOP	No	0	6	136	58	0
P15	V/57	Oct-91	B	CHOP	NE	2	0	188	10	0
	V/58	Abr-92	B	CHOP	No	2	0	188	10	0
	V/58	Oct-92	B	CHOP	No	2	0	186	12	0
	V/59	Abr-93	B	CHOP	No	0	0	188	12	0
	V/59	May-93	B	CHOP	No	0	0	188	12	0
P16	H/72	Oct-91	C	Cl.+P	Normal	6	6	136	48	4
	H/72	Abr-92	C	Cl.+P	No	6	4	136	50	4
	H/73	Oct-92	C	Cl.+P	No	6	4	136	50	4
	H/73	Abr-93	C	Cl.+P	No	0	2	146	50	2
	H/74	Jul-93	C	Cl.+P	No	0	2	146	50	2
P17	H/65	Oct-91	A	No	No	0	0	198	2	0
	H/65	Abr-92	A	No	No	0	0	198	2	0
	H/66	Oct-92	A	No	No	2	2	192	4	0
	H/67	Abr-92	A	No	No	2	2	192	4	0
H/68	Oct-93	A	No	No	0	2	194	4	0	

Paciente Nº	Sexo/ Edad del estudio	Fecha del estudio	Estado	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente Nº de señales					% de trisomía 12
						0	1	2	3	4	
P18	V/62	Oct-91	A	No	No	0	2	192	6	0	3
	V/62	Abr-92	A	No	No	0	2	192	6	0	3
	V/63	Oct-92	A	No	No	4	2	188	6	0	3
	V/63	Abr-93	A	No	No	4	2	188	6	0	3
	V/64	Oct-93	A	No	No	4	2	188	6	0	3
P19	V/68	Oct-91	B	No	Normal	0	0	148	52	0	26
	V/69	Abr-92	B	Rad.		0	0	164	36	0	18
	V/70	Oct-92	B	Cl.+P		2	2	190	6	0	3
	V/70	Abr-93	B	Cl.+P		2	0	192	6	0	3
	V/71	Oct-93	B	Cl.+P		2	0	186	12	0	6
P20	H/75	Oct-91	A	No	No	0	2	194	4	0	2
	H/75	Abr-92	A	No	No	2	2	192	4	0	2
	H/76	Oct-92	A	No	No	2	2	192	4	0	2
	H/76	Abr-93	A	No	No	2	2	190	6	0	3
	H/77	Oct-93	A	No	No	0	0	194	6	0	3
P21	V/56	Oct-91	C	CHOP	No	4	4	150	42	0	21
	V/56	Abr-92	C	CHOP		6	2	150	42	0	21
	V/57	Oct-92	C	CHOP		2	2	154	42	0	21
	V/57	Abr-93	C	CHOP		2	2	154	42	0	21
	V/58	Sep-93	C	CHOP		0	2	156	42	0	21
P22	V/66	Oct-91	A	No	No	2	0	142	56	0	28
	V/67	Abr-92	A	No	No	2	0	142	56	0	28
	V/67	Oct-92	A	No	No	0	0	146	54	0	27
	V/68	Abr-93	A	No	No	0	0	144	56	0	28
	V/68	Oct-93	A	No	No	0	0	144	56	0	28
P23	V/63	Oct-91	C	Cl.+P	No	4	0	190	6	0	3
	V/63	Abr-92	C	CHOP		2	2	190	6	0	3
	V/64	Oct-92	C	CHOP		2	2	190	6	0	3
	V/64	Abr-93	C	CHOP		2	2	190	6	0	3
	V/65	Sep-93	C	CHOP		4	2	188	6	0	3

Paciente N°	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Estado	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente N° de señales				% de trisomía 12	
						0	1	2	3		4
P24	H/78	Oct-91	C	Cl.+P	No	0	0	162	38	0	19
	H/78	Abr-92	C	CHOP		0	0	148	52	0	26
	H/79	Oct-92	C	CHOP		0	0	142	58	0	29
	H/79	Abr-93	C	CHOP		2	0	122	76	0	38
	H/80	Ago-93	C	COP		2	0	108	92	0	46
P25	H/71	Oct-91	A	No	No	4	2	192	2	0	1
	H/72	Abr-92	A	No		4	2	192	2	0	1
	H/72	Oct-92	A	No		4	4	190	2	0	1
	H/73	Abr-93	A	No		4	4	190	2	0	1
	H/74	Oct-93	A	No		2	0	194	4	0	2
P26	H/88	Oct-91	A	No	No	0	0	196	4	0	2
	H/88	Abr-92	A	No		0	2	194	4	0	2
	H/89	Oct-92	A	No		0	2	196	2	0	1
	H/89	Abr-93	A	No		0	0	198	2	0	1
	H/90	Oct-93	A	No		0	0	198	2	0	1
P27	H/56	Oct-91	A	No	No	6	2	156	36	0	18
	H/57	Abr-92	A	No		0	0	178	22	0	11
	H/57	Oct-92	A	No		0	0	194	6	0	3
	H/58	Abr-93	A	No		0	0	194	6	0	3
	H/58	Oct-93	A	No		0	2	192	6	0	3
P28	V/78	Dic-91	A	No	No	0	0	198	2	0	1
	V/79	Abr-92	A	No		0	0	198	2	0	1
	V/79	Oct-92	A	No		0	0	198	2	0	1
	V/80	Abr-93	A	No		2	2	192	4	0	2
	V/80	Jun-93	A	No		2	2	192	4	0	2
P29	H/65	Oct-91	A	No	Normal	0	2	194	4	0	2
	H/66	Abr-92	A	No		0	2	194	4	0	2
	H/66	Oct-92	A	No		0	0	196	4	0	2
	H/67	Abr-93	A	No		0	0	196	4	0	2
	H/67	Oct-93	A	No		4	0	190	6	0	3

Paciente N°	Sexo/ Edad del estudio	Fecha	Estadio	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente N° de señales					% de trisomía 12
						0	1	2	3	4	
P30	V/59	Oct-91	A	No	No	2	2	152	42	2	21
	V/60	Abr-92	A	No	No	2	2	150	44	2	22
	V/60	May-92	A	No	No	4	2	150	44	0	22
P31	H/63	Oct-91	A	No	No	0	2	152	46	0	23
	H/63	Abr-92	A	No	No	0	2	148	50	0	25
	H/64	Oct-92	A	No	No	4	4	142	50	0	25
	H/64	Abr-93	A	No	No	2	2	146	50	0	25
	H/65	Oct-93	A	No	No	2	2	148	48	0	24
P32	H/76	Oct-91	B	No	Normal	6	0	176	18	0	9
	H/77	Abr-92	B	Cl.+P		2	2	172	24	0	12
	H/77	Oct-92	B	Cl.+P		2	2	172	24	0	12
	H/78	Abr-93	B	Cl.+P		4	2	156	38	0	19
	H/78	Oct-93	B	CHOP		0	0	140	60	0	30
P33	V/68	Oct-91	B	No	No	0	2	120	76	2	38
	V/69	Abr-92	B	Cl.+P		0	0	120	80	0	40
	V/69	Oct-92	C	Cl.+P		2	2	100	96	0	48
	V/70	Abr-93	C	Cl.+P		2	2	92	104	0	52
	V/70	Oct-93	C	COP		0	2	88	110	0	55
P34	V/74	Oct-91	A	No	No	0	4	196	0	0	0
	V/75	Abr-92	A	No		0	0	198	2	0	1
	V/75	Oct-92	A	No		0	0	198	2	0	1
	V/76	Abr-93	A	No		0	0	198	2	0	1
	V/76	Oct-93	A	No		0	0	198	2	0	1
P35	V/47	Oct-91	A	No	No	2	4	188	6	0	3
	V/47	Abr-92	A	No		2	2	190	6	0	3
	V/48	Oct-92	A	No		2	2	190	6	0	3
	V/48	Abr-93	A	No		2	0	192	6	0	3
	V/49	Oct-93	A	No		0	0	196	4	0	2

Paciente N°	Sexo/ Fecha Edad del estudio	Estadio	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente N° de señales					% de trisomía 12	
					0	1	2	3	4		
P36	V/53	Oct-91	A	Cl.+P	No	0	0	198	2	0	1
	V/53	Abr-92	A	Cl.+P		0	0	198	2	0	1
	V/54	Oct-92	A	Cl.+P		0	0	198	2	0	1
	V/54	Abr-93	A	Cl.+P		4	2	192	2	0	1
	V/55	Oct-93	A	Cl.+P		4	0	194	2	0	1
P37	V/56	Oct-91	A	Cl.+P	No	2	6	188	4	0	2
	V/56	Abr-92	A	Cl.+P		2	2	192	4	0	2
	V/57	Oct-92	A	Cl.+P		2	2	192	4	0	2
	V/57	Abr-93	A	Cl.+P		0	2	194	4	0	2
	V/58	Jul-93	A	Cl.+P		0	2	196	2	0	1
P38	V/49	Oct-91	A	Cl.+P	Normal	2	4	192	2	0	1
	V/50	Abr-92	A	CHOP		2	2	194	2	0	1
	V/50	Oct-92	A	CHOP		2	2	194	2	0	1
	V/51	Abr-93	A	CHOP		0	0	198	2	0	1
	V/51	Jun-93	A	CHOP		0	0	198	2	0	1
P39	H/58	Oct-91	B	COP	Normal	0	0	196	4	0	2
	H/59	Abr-92	B	COP		0	2	174	24	0	12
	H/59	Oct-92	B	COP		0	2	160	38	0	19
	H/60	Abr-93	B	COP		0	0	144	56	0	28
	H/60	Oct-93	B	COP		0	0	136	64	0	32
P40	H/69	Oct-91	B	No	No	4	4	186	6	0	3
	H/69	Abr-92	B	No		4	4	186	6	0	3
	H/70	Oct-92	B	No		4	0	190	6	0	3
	H/70	Abr-93	B	No		0	0	198	2	0	1
	H/71	Ago-93	B	No		0	0	198	2	0	1
P41	V/75	Oct-91	B	Rad.	No	2	0	166	32	0	16
	V/76	Abr-92	B	Cl.+P		2	0	178	20	0	10
	V/76	Oct-92	B	Cl.+P		0	0	196	4	0	2
	V/77	Abr-93	B	Cl.+P		0	0	196	4	0	2
	V/77	Oct-93	B	Cl.+P		0	0	196	4	0	2

Paciente Nº	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Estadio	Tratamiento	Cariotipo	HIS fluorescente Nº de señales				% de trisomía 12	
						0	1	2	3		4
P42	H/63	Oct-91	B	No	No	0	0	198	2	0	1
	H/63	Abr-92	B	No	No	0	0	198	2	0	1
	H/64	Ago-92	B	No	No	4	2	192	2	0	1
P43	V/75	Oct-91	C	Cl.+P	No	0	6	152	40	2	20
	V/75	Abr-92	C	Cl.+P	No	0	0	142	56	2	28
	V/76	Oct-92	C	COP		0	0	130	70	0	35
	V/76	Abr-93	C	COP		0	0	130	70	0	35
	V/77	Oct-93	C	COP		2	0	114	84	0	42
P44	H/65	Oct-91	C	Cl.+P	Normal	2	2	188	8	0	4
	H/66	Abr-92	C	Rad.		4	2	170	24	0	12
	H/66	Oct-92	C	L+P		4	2	158	36	0	18
	H/67	Abr-93	C	CHOP		2	0	162	36	0	18
	H/67	Oct-93	C	CHOP		2	0	146	52	0	26
P45	H/69	Oct-91	C	COP	No	4	2	148	46	0	23
	H/69	Abr-92	C	COP		4	2	148	46	0	23
	H/70	Oct-92	C	COP		0	0	154	46	0	23
	H/70	Abr-93	C	COP		0	0	152	48	0	24
	H/71	Ago-93	C	COP		2	2	148	48	0	24

CHOP: Cyclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona.

Cl.+P= Clorambucil y prednisona.

COP: Cyclofosfamida, vincristina, prednisona.

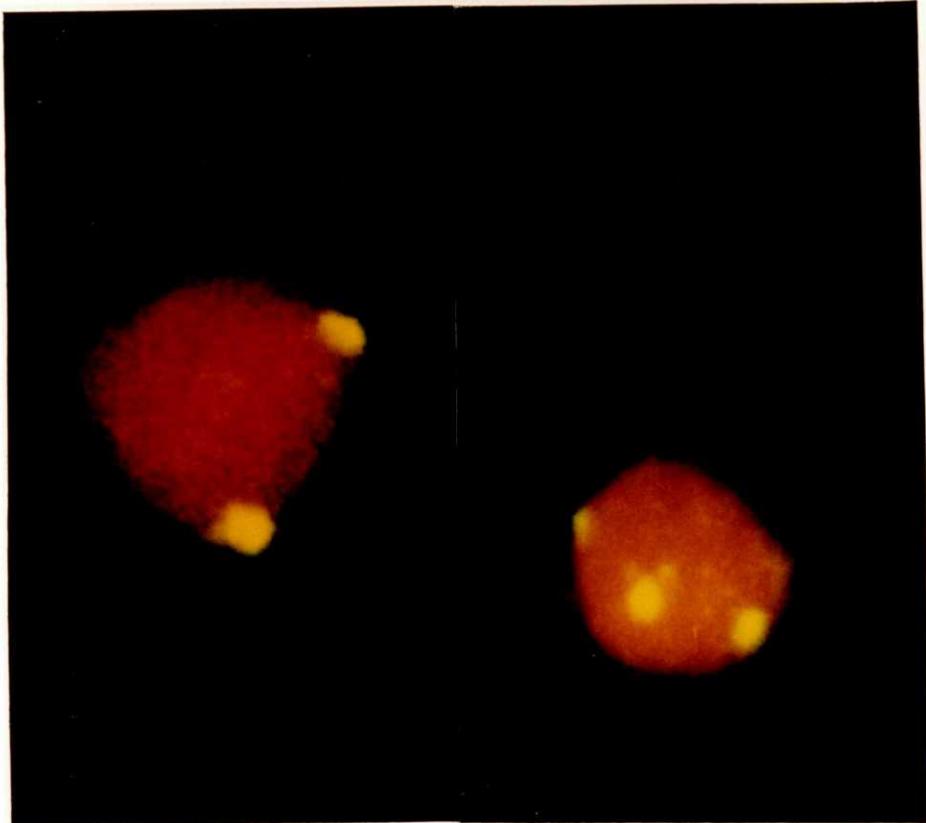
NE: No se obtuvieron metafases evaluables para el estudio.

Rad.: Radioterapia.

Tabla 2: Características clínicas de pacientes con LLCB con y sin trisomía 12 al inicio del presente estudio mediante HIS fluorescente.

	Trisomía 12 <u>presente</u>	Trisomía 12 <u>ausente</u>	Nivel de <u>significación</u>
Edad (años)	65.6	64.6	p=0.8935
Sexo			p=0.8411
Varón	55	52	
Hembra	45	48	
Parámetros hematológicos			
<u>Leucocitos</u> (x10 ³ /μL)	64.5	26.3	p=0.0021
Linfocitos absolutos (x10 ³ /μL)	62.4	72.3	p=0.167
Granulocitos (x10 ³ /μL)	30.5	21.2	p=0.1985
Hb (g/dL)	12.2	13.5	p=0.0571
VCM (fL)	90.5	91.9	p=0.377
Plaquetas (x10 ³ /μL)	165.4	161.4	p=0.57
VSG	16.5	10.1	p=0.4734
<u>Estadio de Binet</u> (%)			p=0.0229
A	25	76	
B	40	16	
C	35	8	
Organomegalias (%)			
Hepatomegalia	50	28	p=0.1304
<u>Esplenomegalia</u>	70	36	p=0.0234
<u>Adenopatías</u>	65	32	p=0.0275
Inmunofenotipo (mlgrs %)			
<u>IgG</u>	638.8	910.5	p=0.0402
IgA	114.3	199	p=0.0745
IgM	76.8	78.5	p=0.9716
α ₁ antitripsina	156.7	150.7	p=0.5238
Haptoglobina	90.6	71.3	p=0.3957
Parámetros bioquímicos			
LDH (U/L)	188.2	182.1	p=0.7291
albúmina (G/dL)	4.4	4.2	p=0.4323
Test directo antiglobulina negativo (%)	95	100	p=0.3671

<u>Médula ósea (%)</u>			p=0.00277
Patrón difuso	85	36	
Patrón nodular	15	40	
Patrón intersticial	0	24	
<u>Marcadores (%)</u>			
FMC7	13.5	13	p=0.3147
CD19	67.3	72.8	p=0.7293
CD5	28	24.3	p=0.7972
CD20	51.7	57.9	p=0.8407
CD22	34.8	29.4	p=0.5103
CD8	11	7.7	p=0.3197
CD4	11.3	6	p=0.0613
C3d	23.9	16.2	p=0.2886
<u>Tratamiento (%)</u>			p=0.0331
No tratamiento anterior	45	76	
Sí tratamiento anterior	55	24	



A

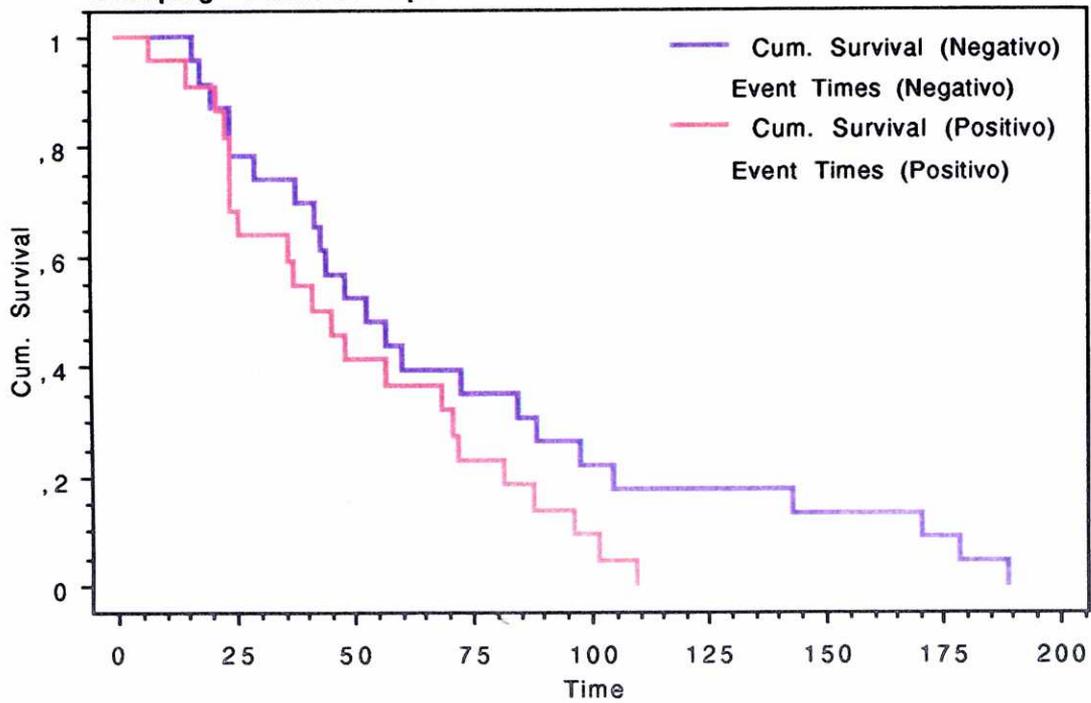
B

Figura 1: Estudio de trisomía 12 mediante FIS fluorescente. (A) Célula en interfase, con dos señales de un control normal, después de hibridación con una sonda centromérica D12Z3 (detectada por medio de avidín-FITC). (B) Célula en interfase del paciente 1 (P1), después de la hibridación con una sonda de ADN centromérica (como en A): se aprecian tres señales en el núcleo.

Kaplan-Meier Cum. Survival Plot for Tiempo

Censor Variable: <None>

Grouping Variable: Tipo



Logrank (Mantel-Cox) Test for Tiempo

Censor Variable: <None>

Grouping Variable: Tipo

Chi-Square DF P-Value

2,600	1	,1068
-------	---	-------

Figura 2: Curvas de supervivencia para los pacientes con LLCB con y sin trisomía 12, mediante la técnica de HIS fluorescente.

II.- LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS.

II.1. CONTROLES.

La frecuencia de células control normales (n=28) con una señal de hibridación era: 0.93% (rango 0%-2%; intervalo de confianza, 0.53% a 1.33%; DE 0.76%); 97.86% (rango 96% a 99%; intervalos de confianza, 97.33 a 98.38; DE 1.01) tenían dos señales, y 1.21% de las células (rango 0% a 3%; intervalos de confianza, 0.78 a 1.65; DE 0.83%) tenían tres señales. Las muestras fueron consideradas positivas para trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación (media \pm 3 DE de los controles).

II.2. PACIENTES.

La HIS fluorescente fue posible en los 5 casos. Tres de los cinco pacientes (60%) mostraron trisomía 12 en diferentes momentos de su evolución. El porcentaje de células trisómicas estaba entre 4%-15%. La tabla 1 muestra las proporciones de células con ninguna, una, dos, tres o cuatro señales. Dos señales de hibridación, en núcleos en interfase, fueron detectadas en el 83% al 98% de los casos. Ninguna señal o sólo una señal fue observada en 0%-3% de las células. Las características clínicas de los pacientes y su evolución se muestran en la Tabla 2 y 3.

P1 que había sido esplenectomizado y que no había estado a tratamiento con INF, mostró evolución clínica y satisfactoria hasta 7 años después de su operación. Tras recaída de su tricoleucemia, se reinicia el tratamiento con INF, apreciándose también la presencia de trisomía 12 (Fig 1). En el último año se diagnosticó anemia progresiva y meningitis pneumocócica y se observó la presencia de tricoleucocitos en SP y de linfocitosis, presentándose también un mayor porcentaje de células trisómicas (12%).

P2 que había sido esplenectomizado seis años antes de que se realizara el primer estudio mediante HIS fluorescente, estaba clínicamente y analíticamente estable. Tras recaída de su tricoleucemia, se observó un deterioro de su estado general junto con anemia progresiva, macrocitosis, linfocitosis, la presencia de tricoleucocitos en SP, IgG aumentada, un bajo nivel de haptoglobina y un test directo antiglobulina positivo, apreciándose la presencia de trisomía 12. Cuando se inició el tratamiento con INF y esteroides, se consiguió una remisión clínica y analítica y la trisomía 12 desapareció.

P4 tenía esplenomegalia y fue inicialmente tratado con INF. Una vez que la esplenectomía fue realizada, la terapia con INF fue reiniciada debido a un aumento de linfocitos y a la presencia de tricoleucocitos en SP, observándose un aumento en el porcentaje de células trisómicas (8% y 12% respectivamente en la 2ª y 3ª revisión). Se alcanzó la remisión de la enfermedad después de un período de 18 meses, desapareciendo la trisomía 12.

P5 había estado sometido a tratamiento con INF hasta 5 meses antes de su estudio alcanzándose la remisión de la enfermedad.

El estudio en P3 comenzó cuando la tricoleucemia fue diagnosticada. Este paciente mostró buen progreso clínico y analítico.

En estos dos últimos pacientes P5 y P3 no se apreció la presencia de trisomía 12.

Tabla 1: Datos de HIS fluorescente en muestras de SP (200 células analizadas/muestra)

Paciente Nº	Fecha del estudio	HIS fluorescente					% de trisomía 12
		Nº Señales					
		0	1	2	3	4	
P1	4-92	2	4	184	10	0	5
	4-93	0	4	172	24	0	12
P2	10-91	4	0	192	4	0	2
	4-92	0	2	168	30	0	15
	10-92	0	2	196	2	0	1
	4-93	0	2	194	4	0	2
P3	10-93	0	4	190	6	0	3
P4	10-91	2	4	186	8	0	4
	4-92	0	0	184	16	0	8
	10-92	4	6	166	24	0	12
	4-93	0	2	194	4	0	2
P5	5-93	0	4	190	6	0	3
	10-93	2	4	190	4	0	2

Tabla 2: Características clínicas e inmunológicas en los pacientes con tricoleucemia

Paciente No	Sexo/Edad	Fecha del estudio	Hb (g/dl)	Leuco. ($\times 10^9/L$)	Linfos. (%)	Plaq. ($\times 10^9/L$)	Tricos. en SP(%)	Esplenomegalia	Tratamiento	
									Esplenectomía	INF
P1	V/60	4-81	14,2	5,81	60,1	258	38	+	-	-
	V/71	4-92	10,7	15,60	3,5	96		-	+	+
	V/72	4-93	10,5	7,10	54,0	283		-	+	+
P2	H/55	10-85	9,2	2,06	54,8	130	12	+	-	-
	F/55	10-91	11,5	4,13	74,4	345		-	+	-
	H/55	4-92	11,3	4,33	71,7	365	**	-	+	+
	H/56	10-92	13,2	4,86	36,7	378	**	-	+	+
	H/56	4-93	13,6	5,18	51,5	333		-	+	+
	H/58	3-93	14	3,81	26,3	73		+	-	-
P3	H/58	10-93	13,2	3,02	32,8	61		+	-	-
	V/54	10-90	10,5	4,41	63,5	100	1-2	+	-	-
	V/55	10-91	13,6	6,06	54,4	234	9	-	+	+
P4	V/56	4-92	13,8	8,31	44,8	274		-	+	+
	V/56	10-92	14,6	6,58	40,5	240	2	-	+	+
	V/57	4-93	13,4	6,26	22,4	226		-	+	+
P5	H/55	11-89	7,9	2,60	82,2	42		+	-	-
	H/58	4-93	15,7	4,22	24,7	112		-	-	-
	H/58	10-93	14,4	4,27	25,9	106		-	-	-

SP: sangre periférica

** ocasionalmente

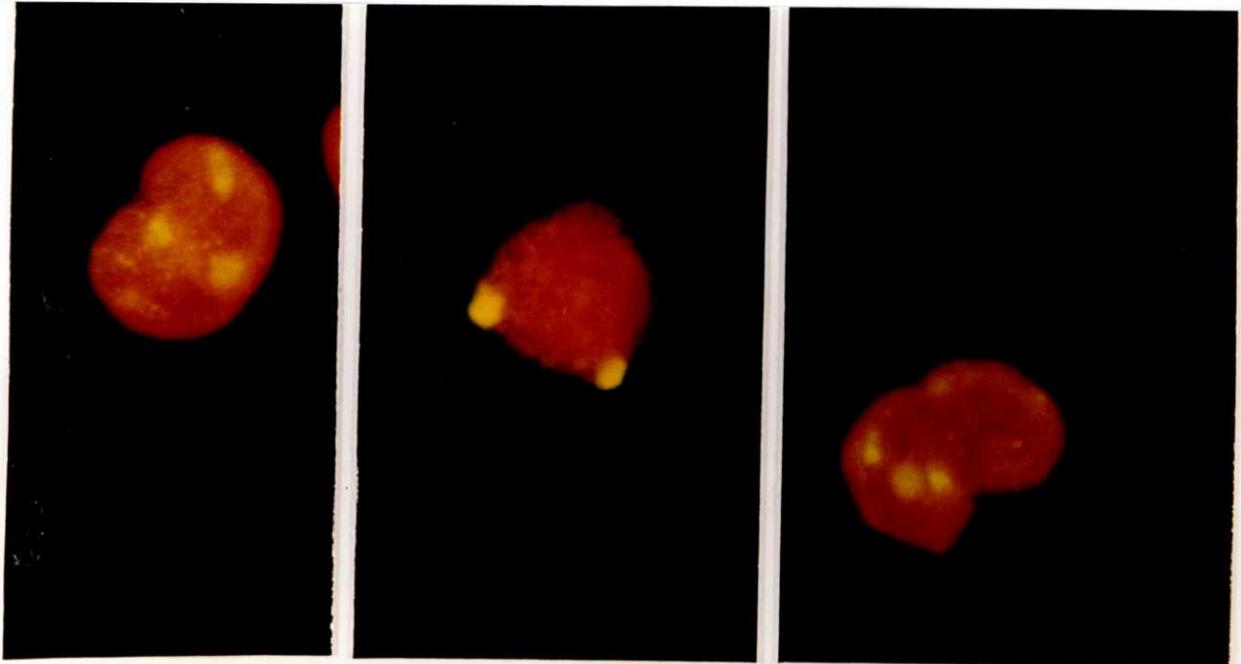
Tabla 3: Características clínicas de los pacientes y su evolución.

Paciente	Tratamiento antes del estudio	Evolución HIS fluorescente			
		1°	2°	3°	4°
		Estado/Tto /HIS clínico	Estado/Tto /HIS clínico	Estado/ Tto /HIS clínico	Estado/ Tto /HIS clínico
P1	Esplenectomía	RP /Si / +	RP /Si / +		
P2	Esplenectomía	RM /No /-	RP /Si /+	RM /Si /-	RM /Si /-
P3	Ninguno	RM /No /-			
P4	Esplenectomía e INF	RP /Si /+	RP /Si /+	RP /Si /+	RM /Si /-
P5	INF	RM /No /-	RM /No /-		

RM: Remisión.

RP: Recaída.

Tto: Tratamiento.



A

B

C

Figura 1: (A, C) Células en interfase de P1 y P4, respectivamente, después de HIS fluorescente, con una sonda α satélite específica para el cromosoma 12, mostrando tres señales de hibridación que evidencian la presencia de trisomía 12. (B) Célula en interfase de un control normal, mostrando dos señales de hibridación en el núcleo.

La detección ha sido realizada por medio del sistema biotina-avidín-FITC.

III.- LINFOMAS LEUCEMIZADOS DE ORIGEN B.

III.1. CONTROLES.

La frecuencia de células control normales (n=28) con una señal de hibridación era: 0.93% (rango 0-2%; intervalo de confianza, 0.53% a 1.33%; DE 0.76%); dos señales en el 97.86% (rango 96% to 99%; intervalos de confianza, 97.33 a 98.38; DE 1.01) , y tres señales en el 1.21% de las células (rango 0% a 3%; intervalos de confianza, 0.78 a 1.65; DE 0.83%). Las muestras fueron consideradas positivas para trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación (media \pm 3 DE de los controles).

III.2. PACIENTES.

La HIS fluorescente fue posible en los 19 casos estudiados. En estos pacientes diagnosticados de linfomas leucemizados de origen B, el porcentaje de células trisómicas, oscilaba entre 9%-19%. La tabla 1 muestra las proporciones de células con ninguna, una, dos, tres o cuatro señales. Dos señales de hibridación en núcleos en interfase fueron detectadas en el 79% al 98% de los casos. Ninguna señal o sólo una señal fue observada en 0%-2% de las células y cuatro señales de hibridación fueron vistas en el 0%-2% de las células. Se aprecian diferencias durante el seguimiento, respecto a la presencia de la trisomía 12 en los diferentes subtipos de linfomas leucemizados de origen B, observándose la presencia de trisomía 12 en los grupos LLCP y linfoma folicular de células grandes. En los otros subtipos estudiados no se apreció la presencia de trisomía 12.

En los pacientes diagnosticados de LLCP se aprecia la presencia de trisomía 12 en 5 de los 11 pacientes (45.5%) en diferentes momentos de su evolución. El porcentaje de células trisómicas en este grupo, también oscilaba entre 9%-19%. Dos señales de hibridación en núcleos en interfase fueron detectadas en el 79% al 98% de los casos. Ninguna señal o sólo una señal fue observada en 0%-2% de las células y cuatro señales de hibridación fueron vistas en el 0%-2% de las células. El paciente diagnosticado de linfoma folicular con predominio de células hendidas pequeñas no mostró trisomía 12 a lo largo de su evolución. En los 3 pacientes diagnosticados de linfoma folicular con predominio de células grandes, sólo uno mostró trisomía 12 a lo largo de la evolución, con un 10% de células trisómicas, y ninguno de los pacientes diagnosticados de linfoma inmunoblástico de células grandes presentaron trisomía 12 a lo largo de la evolución.

Las características clínicas de los pacientes con LLCP y linfoma folicular de células grandes, así como su evolución se muestran en la Tabla 2.

Pacientes diagnosticados de LLCP:

P1 fue diagnosticado en 1989 y, desde entonces y esporádicamente, ha estado sometido a tratamiento con clorambucil. Desde enero de 1992 al observarse citopenización progresiva en SP se le dió clorambucil diario, no apreciándose mejoría, pero sí se apreció un aumento de la Ig M y la presencia de trisomía 12, con un 16% de células trisómicas. Se le retiró este tratamiento y se le dió CHOP, pero se vió un aumento de la VSG, descenso de leucocitos y aumento de la IgM por lo que se veía que la enfermedad estaba progresando. Se apreciaron asimismo infecciones repetidas, así como un aumento en el porcentaje de células trisómicas (19%). Después de 6 ciclos, ingresa por fiebre, distensión abdominal, marcada palidez cutánea y mal estado general, falleciendo posteriormente.

P2 fue diagnosticado en 1991, presentando gran esplenomegalia, MO infiltrada por linfoma, pérdida de peso, adenopatías y hepatomegalia así como anemia y plaquetopenias progresivas y presencia de células trisómicas, cuyo porcentaje va aumentando progresivamente (8%, en 1ª revisión y 10% en 2ª revisión). Se inició tratamiento con clorambucil obteniéndose una buena respuesta, con reducción de la hepatoesplenomegalia y consiguiendo remitir la enfermedad con el tratamiento con clorambucil y desaparece la trisomía 12.

P3 fue diagnosticado en 1990. Ingresó por lesiones perifaríngeas y por medio de biopsia se le objetivó la presencia de un LNH de bajo grado a nivel perifaríngeo. Recibió radioterapia y posteriormente tratamiento con CHOP, con buena respuesta, consiguiendo una RC. Ingresó en enero de 1992 por bultoma inguinal izquierdo, adenopatías y hepatomegalias, diagnosticándose de linfoma folicular con predominio de células grandes y se aprecia la presencia de trisomía 12 (14%). Se le instaura tratamiento con MIME, pero a pesar de ello se aprecia α_1 y α_2 muy aumentadas, así como la haptoglobina. También se le aprecian poliadenomegalias. Todo ello sugiere una actividad intensa de su enfermedad, ya que el linfoma evolucionó de bajo grado a linfoma de grado intermedio de malignidad, apreciándose un aumento en el porcentaje de células trisómicas (14%, en 1ª revisión y 18% en 2ª revisión) (Fig 1).

P5 fue diagnosticado en 1988 y tratado inicialmente con COP, lográndose la RP. Posteriormente se trata con clorambucil-prednisona y se consigue que su visceromegalia se estabilice, suspendiéndose posteriormente el tratamiento. Pero en 1992 se le aprecia anemización progresiva y citopenización progresiva, con grandes organomegalias dispersas. Se le instaura

tratamiento con CHOP y responde mal al tratamiento, observándose como progresa lentamente debido a la presencia de leucopenia, trombopenia y anemia, apreciándose asimismo la presencia de trisomía 12, cuyo porcentaje va en aumento en las sucesivas revisiones (9%, en 3ª revisión y 12% en 4ª revisión).

P6 fue diagnosticado en 1989, recibió tratamiento con clorambucil y prednisona, con buena respuesta y se le suspendió el tratamiento. Acude en 1991 por aumento de su disnea, mal estado general, gran visceromegalia. Se le da de nuevo tratamiento con clorambucil y prednisona pero responde mal, apreciándose anemia, leucopenia, trombopenia, descenso de la IgG, aumento de VSG, adenopatías, hepatomegalia, persistencia del mal estado general y presencia de trisomía 12 (12%).

P4 y P7 habían estado sometidos a tratamiento con clorambucil y con CHOP respectivamente, alcanzándose la remisión de la enfermedad con recuperación de la serie roja, plaquetas e incluso el recuento leucocitario. La Ig M también se encontraba muy estabilizada y también con escasa visceromegalia. En estos pacientes no se apreció la presencia de trisomía 12.

P8, P9, P10 y P11 no habían estado sometidos a tratamiento y, dado el curso indolente y la naturaleza del bajo grado de su linfoma, se está en una actitud expectante, dejando además al paciente sin tratamiento. En estos pacientes tampoco se apreció la presencia de la trisomía 12.

Pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células pequeñas y pacientes diagnosticados de linfoma inmunoblástico de células grandes:

No se pudo detectar la presencia de trisomía 12, ni en el paciente con linfoma folicular de células pequeñas, así como tampoco se pudo detectar su presencia en los cuatro pacientes diagnosticados de linfoma inmunoblástico de células grandes.

Pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células grandes:

En 1 de los 3 pacientes con linfoma folicular de células grandes se pudo detectar la presencia de trisomía 12 en algún momento de su evolución. Este paciente (P3), que fue diagnosticado en 1991 de linfoma de alto grado, se le apreció la presencia de hepatomegalia, adenopatías y gran esplenomegalia y por ello se le sometió a tratamiento con CHOP con buena respuesta, tolerancia y disminución de la masa tumoral. Pero en 1992 recae, apreciándose gran visceromegalia así como anemia y presencia de trisomía 12 (10%).

Los otros dos pacientes, P1 y P2, fueron diagnosticados en 1991 encontrándose asintomáticos, analíticamente estacionarios. Unicamente cabe destacar la presencia de hepatomegalía y no se detectó la presencia de trisomía 12.

Tabla 1: Datos de HIS en muestras de SP de pacientes diagnosticados de LLCp (200 células analizadas/muestra)

Paciente Nº	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente Nº de señales				% de trisomía 12	
				0	1	2	3		4
P1	V/64	Oct-91	No	4	2	162	32	0	16
	V/65	Abr-92	Cl.	0	0	162	38	0	19
	V/65	Oct-92	CHOP	2	2	156	38	2	19
P2	V/62	Oct-91	No	2	4	178	16	0	8
	V/63	Abr-92	Cl.	2	0	178	20	0	10
	V/63	Oct-92	Cl.	2	2	190	6	0	3
	V/64	Abr-93	Cl.	0	2	192	6	0	3
	V/64	Oct-93	Cl.	0	2	192	6	0	3
P3	H/60	Oct-91	CHOP	4	2	166	28	0	14
	H/61	Abr-92	MIME	4	4	156	36	0	18
	H/61	Oct-92	MIME	0	2	162	36	0	18
	H/62	Abr-93	MIME	0	0	164	36	0	18
	H/62	Oct-93	MIME	0	0	164	36	0	18
P4	H/58	Oct-91	Cl.	0	2	194	4	0	2
	H/59	Abr-92	No	4	2	190	4	0	2
	H/59	Oct-92	No	2	2	192	4	0	2
	H/60	Abr-93	No	2	2	192	4	0	2
	H/60	Oct-93	No	2	2	192	4	0	2
P5	H/56	Oct-91	No	2	2	192	4	0	2
	H/57	Abr-92	CHOP	4	4	188	4	0	2
	H/57	Oct-92	CHOP	2	4	176	18	0	9
	H/58	Abr-93	CHOP	0	4	172	24	0	12
	H/58	Oct-93	CHOP	0	0	176	24	0	12

Paciente Nº	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente Nº de señales					% de trisomía 12
				0	1	2	3	4	
P6	V/63	Oct-91	No	0	2	174	24	0	12
	V/63	Abr-92	Cl.+P	4	2	174	20	0	10
	V/64	Oct-92	Cl.+P	2	2	172	24	0	12
	V/64	Abr-93	Cl.+P	0	0	176	24	0	12
	V/65	Oct-93	Cl.+P	0	0	176	24	0	12
P7	V/65	Oct-91	CHOP	2	2	192	4	0	2
	V/66	Abr-92	No	0	0	196	4	0	2
	V/66	Oct-92	No	2	2	190	6	0	3
	V/67	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/67	Oct-93	No	0	0	194	6	0	3
P8	H/55	Oct-91	No	2	2	192	4	0	2
	H/56	Abr-92	No	4	4	190	2	0	1
	H/56	Oct-92	No	0	2	196	2	0	1
	H/57	Abr-93	No	0	2	196	2	0	1
	H/57	Oct-93	No	0	2	196	2	0	1
P9	H/59	Oct-91	No	0	0	196	4	0	2
	H/59	Abr-92	No	2	2	194	2	0	1
	H/60	Oct-92	No	4	4	190	2	0	1
	H/60	Abr-93	No	2	0	196	2	0	1
	H/61	Oct-93	No	2	0	196	2	0	1
P10	V/62	Oct-91	No	2	0	192	6	0	3
	V/63	Abr-92	No	4	2	190	4	0	2
	V/63	Oct-92	No	0	0	196	4	0	2
	V/64	Abr-93	No	0	0	196	4	0	2
	V/64	Oct-93	No	0	0	196	4	0	2

Paciente N°	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente					
				N° de señales					% de trisomía 12
				0	1	2	3	4	
P11	V/61	Oct-91	No	2	4	190	4	0	2
	V/62	Abr-92	No	2	0	194	4	0	2
	V/62	Oct-92	No	2	0	192	6	0	3
	V/63	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/63	Oct-93	No	0	0	194	6	0	3

CHOP: Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona.

Cl.: Clorambucil.

Cl.+P: Clorambucil y prednisona.

MIME: Metil-GAG, ifosfamida, metotrexato, VP-16.

Tabla 1 (continuación): Datos de HIS en muestras de SP de pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células pequeñas (200 células analizadas/muestra)

Paciente N°	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente N° de señales					% de trisomía 12
				0	1	2	3	4	
P1	V/60	Oct-91	No	0	2	194	4	0	2
	V/61	Abr-92	No	2	2	192	4	0	2
	V/61	Oct-92	No	2	2	190	6	0	3
	V/62	Abr-93	Cl.+P	0	0	194	6	0	3
	V/62	Oct-93	Cl.+P	0	0	194	6	0	3

Cl.+P: Clorambucil y prednisona.

Tabla 1 (continuación): Datos de HIS en muestras de SP de pacientes diagnosticados de linfoma foliular de células grandes (200 células analizadas/muestra)

Paciente N°	Sexo/Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente					% de trisomía 12
				N° de señales					
				0	1	2	3	4	
P1	V/59	Oct-91	No	4	2	188	6	0	3
	V/60	Abr-92	No	0	2	192	6	0	3
	V/60	Oct-92	No	2	2	192	4	0	2
	V/61	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/61	Oct-93	No	0	0	194	6	0	3
P2	H/55	Oct-91	No	2	4	192	2	0	1
	H/56	Abr-92	No	2	0	196	2	0	1
	H/56	Oct-92	No	0	0	194	6	0	3
	H/57	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	H/57	Oct-93	No	0	0	194	6	0	3
P3	H/60	Oct-91	No	4	2	188	6	0	3
	H/61	Abr-92	No	0	2	192	6	0	3
	H/61	Oct-92	CHOP	0	2	178	20	0	10
	H/62	Abr-93	CHOP	0	0	180	20	0	10
	H/62	Oct-93	CHOP	0	0	180	20	0	10

CHOP: Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona.

Tabla 1 (continuación): Datos de HIS en muestras de SP de pacientes diagnosticados de linfoma inmunoblástico de células grandes (200 células analizadas/muestra)

Paciente N°	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente				% de trisomía 12	
				N° de señales					
				0	1	2	3	4	
P1	V/48	Nov-91	Cl.+P	4	2	188	6	0	3
	V/49	Abr-92	Cl.+P	0	0	194	6	0	3
	V/49	Oct-92	No	2	2	192	4	0	2
	V/50	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/50	Oct-93	No	2	0	194	4	0	2
P2	H/63	Oct-91	No	2	4	192	2	0	1
	H/64	Abr-92	No	0	0	196	4	0	2
	H/64	Oct-92	No	0	0	196	4	0	2
	H/65	Abr-93	No	0	0	196	4	0	2
	H/65	Oct-93	No	0	0	196	4	0	2
P3	V/61	Dic-91	No	0	2	194	4	0	2
	V/62	Abr-92	No	0	2	194	4	0	2
	V/62	Oct-92	No	0	0	194	6	0	3
	V/63	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/63	Oct-93	No	2	0	192	6	0	3
P4	V/70	Oct-91	No	2	2	192	4	0	2
	V/70	Abr-92	No	4	0	192	4	0	2
	V/71	Oct-92	No	2	0	194	4	0	2
	V/71	Abr-93	No	2	0	192	6	0	3
	V/72	Oct-93	No	0	0	194	6	0	3

Cl.+P: Clorambucil y prednisona.

Tabla 2 : Características clínicas de los pacientes con LLCP y su evolución.

Paciente	Tratamiento antes del estudio	Evolución HIS fluorescente			
		1°	2°	3°	4° y 5°
		Estado/Tto /HIS clínico	Estado/Tto /HIS clínico	Estado/ Tto /HIS clínico	Estado/ Tto /HIS clínico
P1	Cl.	RP /No / +	RP /Si / +	RP /Si / +	
P2	No	RP /No / +	RP /Si / +	RM /Si / -	RM /Si / -
P3	Rad. y CHOP	RP /Si / +	RP /Si / +	RP /Si / +	RP /Si / +
P4	Cl.	RM /Si / -	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -
P5	COP y Cl.+P	RM /No / -	RP /Si / -	RP /Si / +	RP /Si / +
P6	Cl.+P	RP /No / +	RP /Si / +	RP /Si / +	RP /Si / +
P7	CHOP	RM /Si / -	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -
P8	No	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -
P9	No	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -
P10	No	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -
P11	No	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -	RM /No / -

Cl.: Clorambucil.

Cl.+P: Clorambucil y prednisona.

CHOP: Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona.

COP: Ciclofosfamida, vincristina, prednisona.

Rad.: Radioterapia.

RM.: Remisión.

RP: Recaída.

Tto: Tratamiento.

Tabla 2 (continuación): Características clínicas de los pacientes con linfoma folicular de células grandes y su evolución.

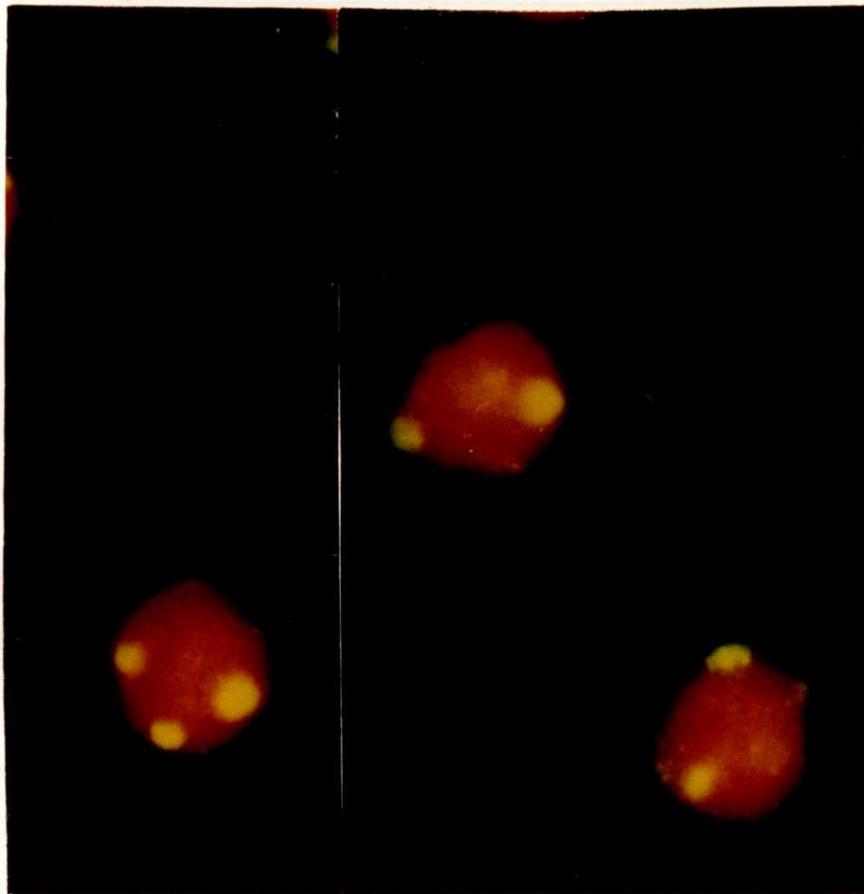
Paciente	Tratamiento antes del estudio	Evolución HIS fluorescente			
		1°	2°	3°	4° y 5°
		Estado/Tto /HIS clínico	Estado/Tto /HIS clínico	Estado/ Tto /HIS clínico	Estado/ Tto /HIS clínico
P1	No	RM / No / -	RM / No / -	RM / No / -	RM / No / -
P2	No	RM / No / -	RM / No / -	RM / No / -	RM / No / -
P3	CHOP	RM / No / -	RM / No / -	RP / Si / +	RP / Si / +

CHOP: Ciclofosfamida, adriamicina, vincristina, prednisona.

RM: Remisión.

RP: Recaída.

Tto: Tratamiento.



C

D

Figura 1: (C) Células en interfase de P3 y de un control normal (D), después de HIS fluorescente con una sonda α satélite específica para el cromosoma 12, mostrando tres señales de hibridación que evidencian la presencia de trisomía 12 (C) o dos señales de hibridación, en el control normal.

La detección ha sido realizada por medio del sistema biotina-avidín-FITC.

IV.- SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS DE ORIGEN T.

IV.1. CONTROLES.

La frecuencia de células control normales (n=28) con una señal de hibridación era: 0.93% (rango 0%-2%; intervalo de confianza, 0.53% a 1.33%; DE 0.76%); 97.86% (rango 96% to 99%; intervalos de confianza, 97.33 a 98.38; DE 1.01) tenían dos señales, y 1.21% de las células (rango 0% a 3%; intervalos de confianza, 0.78 a 1.65; DE 0.83%) tenían tres señales. Las muestras fueron consideradas positivas para trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación (media +/- 3 DE de los controles).

IV.2. PACIENTES.

Ninguno de los 5 pacientes mostró trisomía 12 a lo largo de su evolución. El porcentaje de células con tres señales oscilaba entre 1%-3%. La tabla 1 muestra las proporciones de células con ninguna, una, dos o tres señales. Dos señales de hibridación, en núcleos en interfase, fueron detectadas en el 95% al 98% de los casos. Ninguna señal o sólo una señal fue observada en 0%-2% de las células.

Características clínicas de los pacientes con LLCT:

P1 fue diagnosticado en 1989 con la presencia de moderada linfocitosis en SP, presencia de linfocitos atípicos en SP de gran tamaño, cromatina laxa y granulación azurófila en el citoplasma. Posteriormente se ve granulocitopenia importante, mayor linfocitosis y anemia, así como una mayor organomegalia.

P2 fue diagnosticado en 1991, presentando también linfocitos atípicos en SP, escasa linfadenopatía, esplenomegalia y hepatomegalia. Posteriormente desarrolló neutropenia, anemia y trombocitopenia, aumentando también la masa tumoral.

P3 presentaba también en el momento de su diagnóstico linfocitosis en SP, con linfocitos atípicos de gran tamaño, cromatina laxa y granulación azurófila en el citoplasma. Posteriormente desarrolló granulocitopenia junto con la presencia de anemia y una mayor infiltración en la MO.

Características clínicas de los pacientes con síndrome de Sézary:

P1 y P2 fueron diagnosticados en 1990. Presentaban células linfomatosas en SP de pequeño tamaño, con núcleos de aspecto cerebriforme. Asimismo, presentaban infiltración cutánea por células linfomatosas. En P2 se mostró, posteriormente, una infiltración de la MO con un patrón difuso, presencia de adenopatías y esplenomegalia.

Tabla 1: Datos de HIS en muestras de SP de pacientes diagnosticados de LLCT (200 células analizadas/muestra)

Paciente Nº	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente Nº de señales				% de trisomía 12	
				0	1	2	3		4
P1	V/48	Dic-91	No	0	2	194	4	0	2
	V/49	Abr-92	No	0	2	194	4	0	2
	V/49	Oct-92	No	0	0	196	4	0	2
	V/50	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/50	Oct-93	No	2	2	190	6	0	3
P2	H/56	Oct-91	No	0	4	194	2	0	1
	H/57	Abr-92	No	2	0	196	2	0	1
	H/57	Oct-92	Cl.+P	2	2	190	6	0	3
	H/58	Abr-93	Cl.+P	0	0	196	4	0	3
	H/58	Oct-93	Cl.+P	0	0	196	4	0	3
P3	V/65	Oct-91	Cl.+P	0	0	194	6	0	3
	V/66	Abr-92	Cl.+P	0	2	192	6	0	3
	V/66	Oct-92	Cl.+P	2	2	192	4	0	2
	V/67	Abr-93	Cl.+P	0	0	196	4	0	2
	V/67	Oct-93	Cl.+P	2	0	194	4	0	2

Cl.+P: Clorambucil y prednisona.

Tabla 1 (continuación): Datos de HIS en muestras de SP de pacientes diagnosticados de Linfoma cutáneo de células T con expresión leucémica Síndrome de Sézary (200 células analizadas/muestra)

Paciente Nº	Sexo/ Edad	Fecha del estudio	Tratamiento	HIS fluorescente Nº de señales				% de trisomía 12	
				0	1	2	3		4
P1	V/49	Oct-91	No	0	2	196	4	0	2
	V/50	Abr-92	No	0	2	194	4	0	2
	V/50	Oct-92	No	2	0	192	6	0	3
	V/51	Abr-93	No	0	0	194	6	0	3
	V/51	Oct-93	No	0	0	194	6	0	3
P2	H/52	Oct-91	No	2	0	196	2	0	1
	H/52	Abr-92	No	2	0	196	2	0	1
	H/53	Oct-92	No	4	0	194	2	0	1
	H/53	Abr-93	Rad.	0	0	198	2	0	1
	H/54	Oct-93	Cl.+P	0	0	198	2	0	1

Cl.+P: Clorambucil y prednisona.
Rad.: Radioterapia.

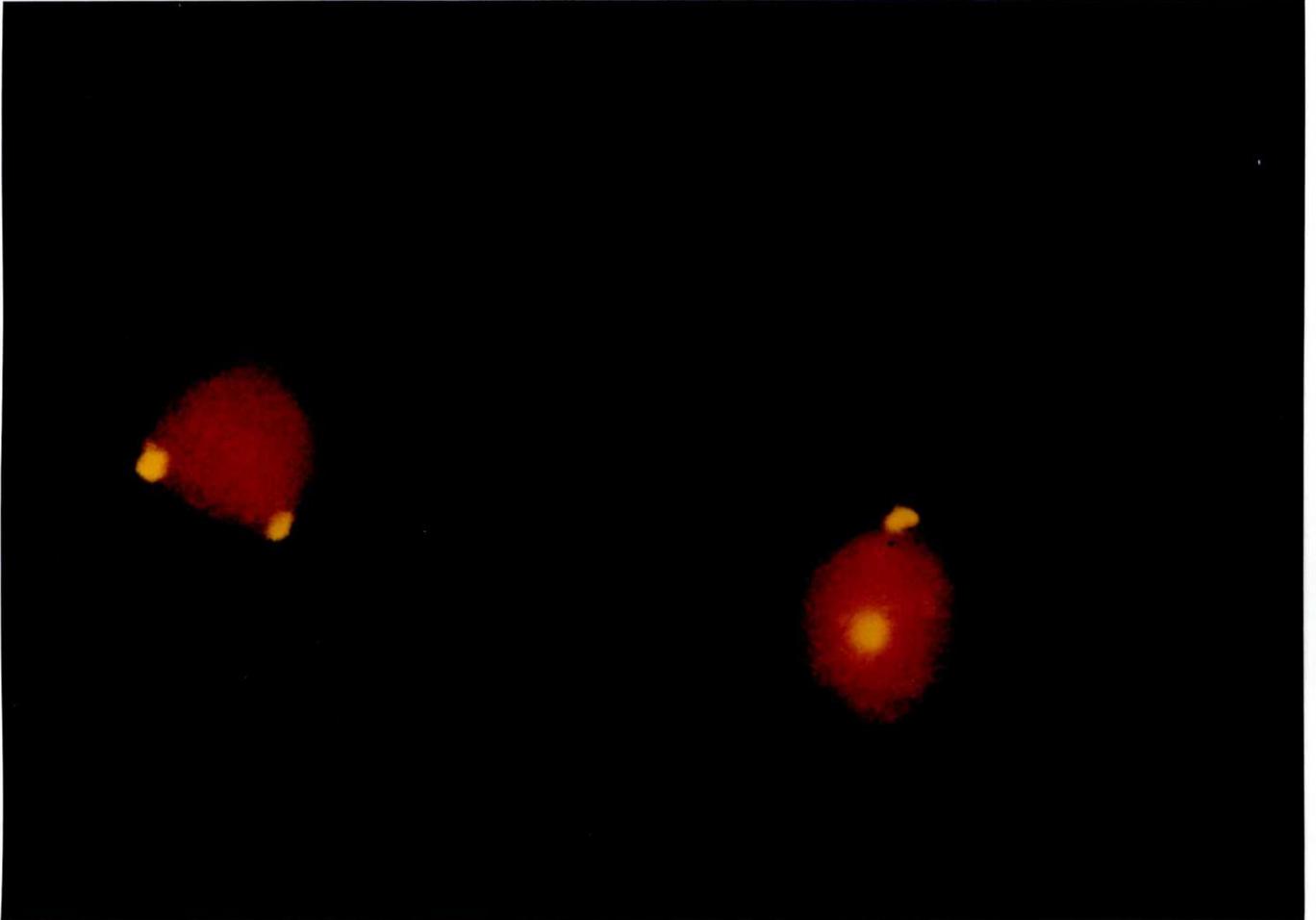


Figura 1: P3, diagnosticado de LLCT. Células en interfase después de la HIS con una sonda específica para el cromosoma 12 α satélite, mostrando dos señales de hibridación en cada una de sus células.

V.- LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA.

V. 1. CONTROLES.

EL porcentaje medio de núcleos en interfase con una aparente señal de fusión para las series de los 10 controles normales de SP fue de 3.4% (rango 1% a 7%; intervalo de confianza, 1.88 a 4.92; DE 2.1%). Esto implica un "cut-off" $\geq 10\%$ de células con fusión Mbc_r/abl en 200 células analizadas para clasificar cualquier muestra como anormal (media \pm 3DE de los controles).

En este estudio, se clasificó cada una de las 3 muestras como normal o anormal por análisis en interfase usando el "cut-off" de 10%.

V.2. PACIENTES.

La tabla 1 muestra los resultados obtenidos en muestras de SP de 3 pacientes con LMC mediante análisis citogenético e HIS fluorescente. Las características clínicas de los pacientes se muestran en la tabla 2.

En P1 no se lograron obtener metafases analizables. En el P2, de 13 metafases analizadas, 4 son Ph positivas (Fig 1). En P3, de 15 metafases analizadas, 8 son Ph positivas. Mediante HIS fluorescente, se pudo apreciar en P1, un 45% de núcleos en interfase Ph positivos, con una señal de fusión Mbc_r/abl. En P2, un 38% de los núcleos en interfase tenían un cromosoma Ph. En P3 se apreció un 72% de los núcleos en interfase con una señal de fusión Mbc_r/abl (Fig 2). Estos porcentajes obtenidos mediante HIS fluorescente se pudieron apreciar al realizar los dos protocolos diferentes de HIS fluorescente para la detección de la translocación cromosómica Mbc_r/abl.

La hibridación fue realizada con sondas cósmidos obteniéndose señales pequeñas, pero claras.

En núcleos en interfase normales, se vieron dos señales verdes y dos señales rojas fluorescentes, que están distribuidos en cualquier zona de los núcleos.

En las células de SP de los pacientes con LMC que eran Ph+, los núcleos en interfase mostraron dos puntos fluorescentes rojos y dos verdes después de la doble hibridación con las sondas cósmidos abl y Mbc_r. Una de las señales fluorescentes rojas y una verde estaban juntas o solapadas (Fig 2).

Tabla 1: Resultados de estudios de citogenética convencional y de HIS fluorescente en muestras de SP de pacientes con LMC.

Paciente	Cariotipo	Citogenética <u>convencional</u> Metafases analizadas	HIS fluorescente con Mbcrr/abl		
			%Ph+	%Ph+	<u>Interfase</u> Células analizadas
P1	No se lograron metafases			45	200
P2	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)	13	4	38	200.
P3	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2)	15	8	72	200

Tabla 2: Características clínicas de los pacientes con LMC.

Paciente N°	Sexo	Fecha del estudio	Leuco. ($\times 10^9/L$)	Plaq. ($\times 10^9/L$)	Gran. (%)	Basof. (%)	Blastos (%)	Displasia	Hepato.	Espleno.
P1	H	5-94		525		14	1	si	si	si
	H	8-94	6.14	155	67.1	1	4	si	no	si
P2	V	12-93		289	93.2	2	1	no	no	no
	V	8-94	7.9	243	66.8	3.2	1	si	no	si
P3	V	11-92	42.4	240		3	3	si	si	no
	V	8-94	11.2	113	79.6	0.6	1	si	no	no

(A)

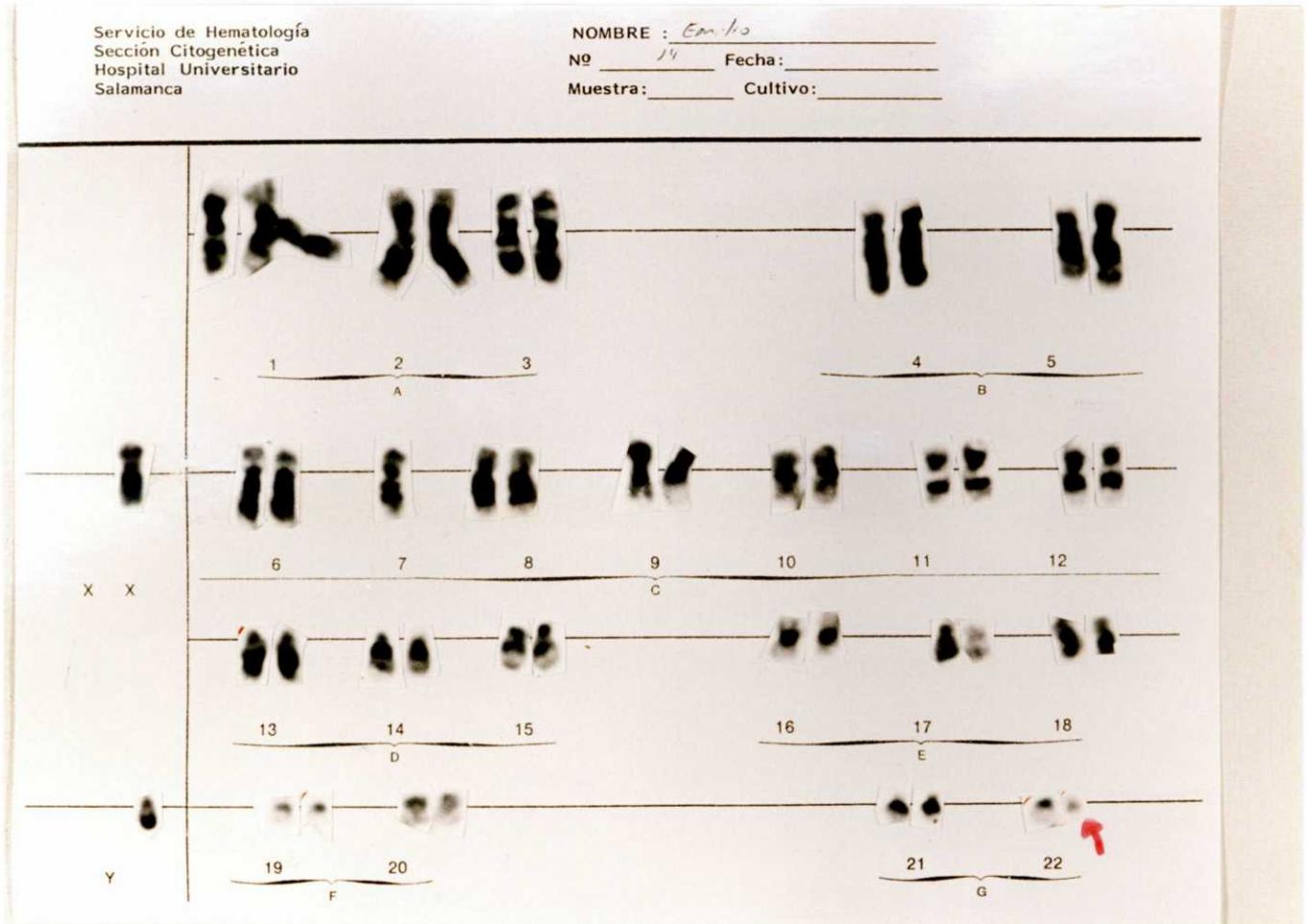
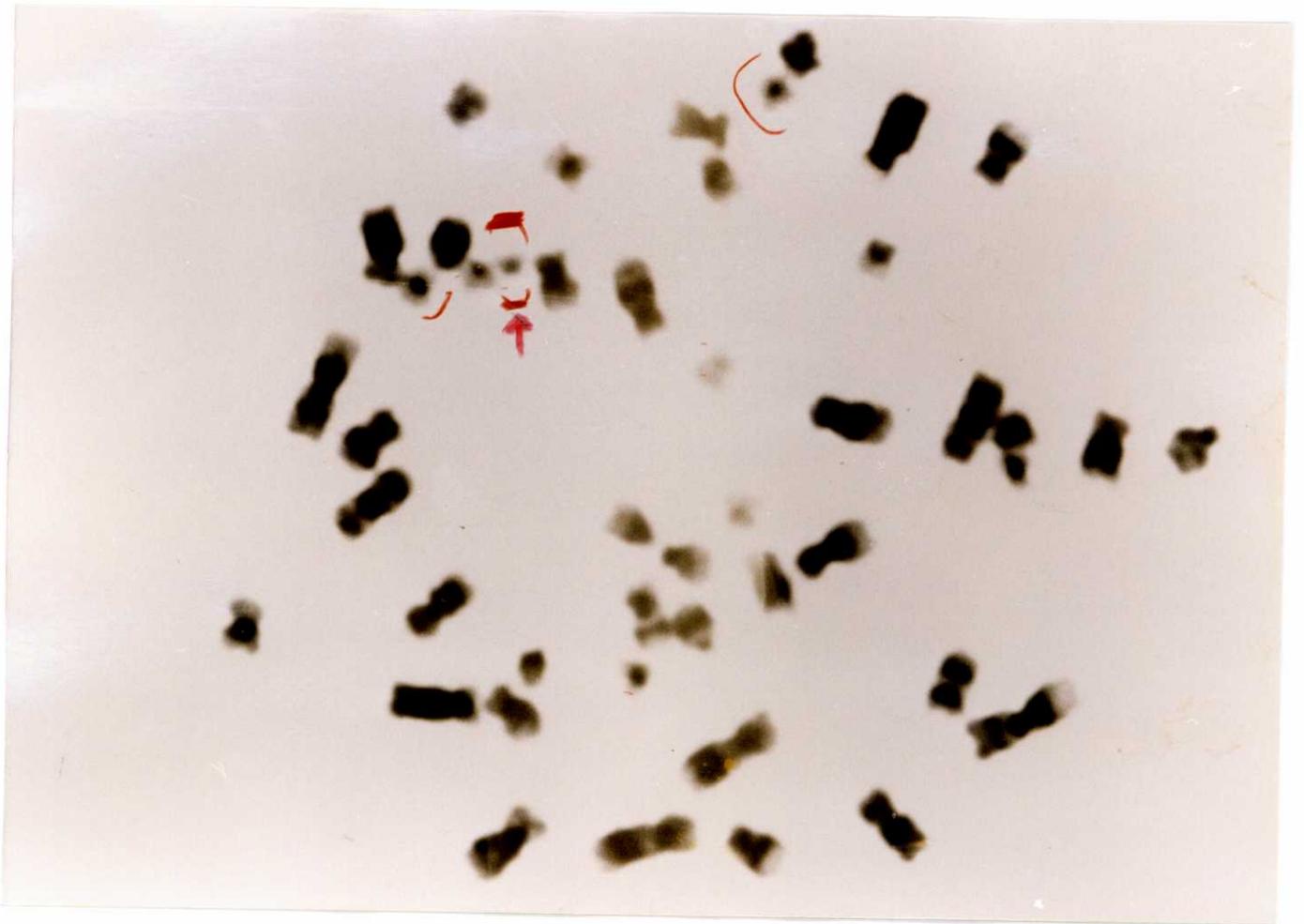


Figura 1: (A, B) Cariotipo de las células de SP de P2, afecto de LMC.

(B)



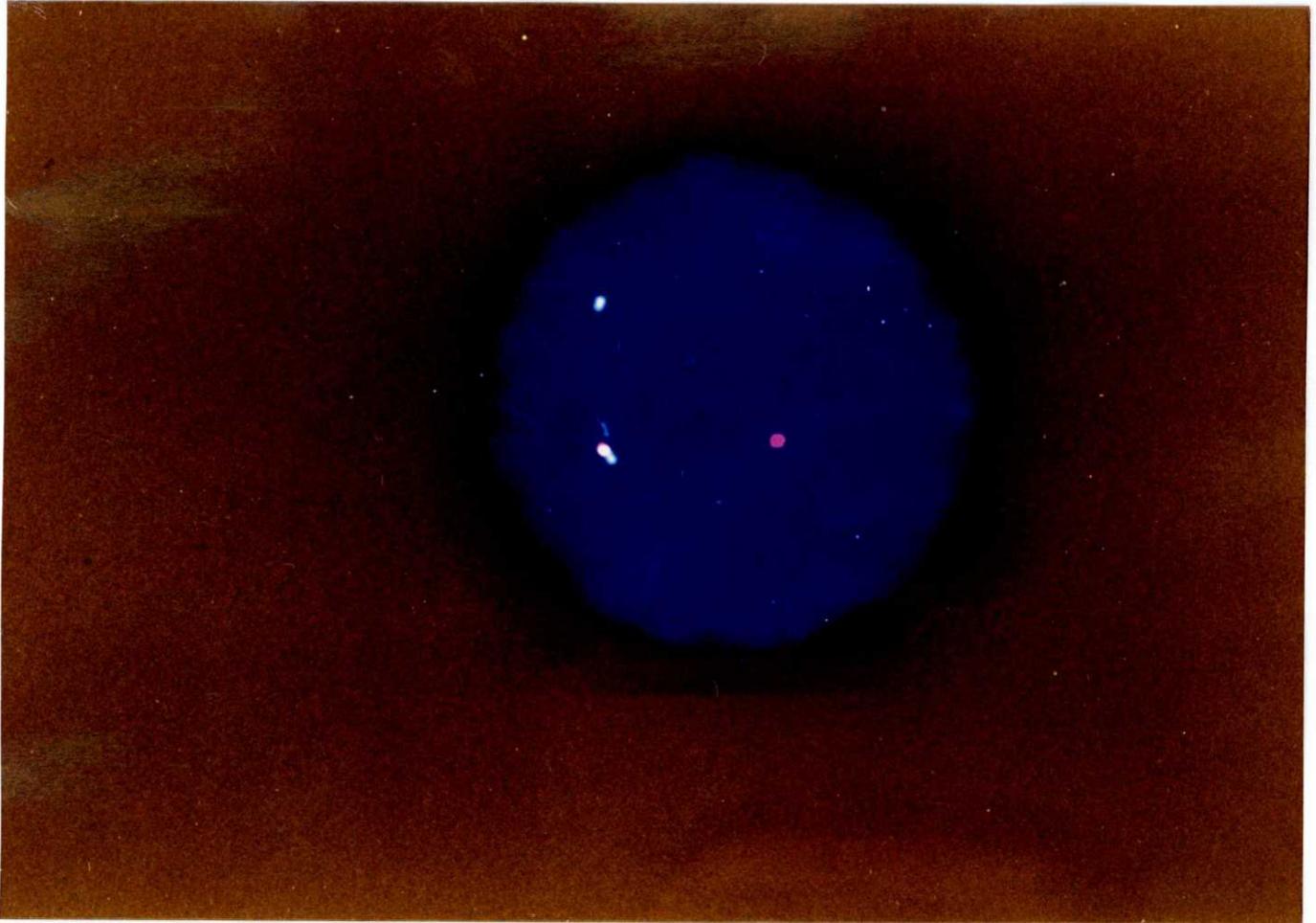


Figura 2: Doble hibridación con las sondas cósmidos para *abl* y *Mbcr* en núcleos en interfase de P3 diagnosticado de LMC, que muestra el cromosoma Ph. Los genes *abl* y *bcr* en núcleos en interfase detectados con la sonda, para la translocación *Mbcr/abl* de Oncor. La sonda *bcr* está marcada con rodamina (roja), la sonda *abl* está marcada con fluoresceína (amarilla-verde), y el ADN nuclear está contrateñido con DAPI (azul). Se observan señales amarillas o roja/verde, juntas, que indican la translocación *Mbcr/abl* que es característica del cromosoma Ph.

DISCUSSION

V. DISCUSION

I.- LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DE ORIGEN B.

La trisomía 12 ha sido la anomalía cariotípica observada con mayor frecuencia en pacientes con LLCB (Gahrton et al, 1980a,b; Gahrton et al, 1982; Datta et al, 1991).

Su presencia parecía que se asociaba a un peor pronóstico (Pittman y Catovsky, 1983; Knuutila et al, 1986; Han et al, 1988; Juliusson y Gahrton, 1990a; Juliusson et al, 1990b).

Aunque las anomalías cromosómicas son importantes en la LLC desde el punto de vista pronóstico, aproximadamente el 50% al 70% de los pacientes presentan un cariotipo normal o bien no producen metafases adecuadas para el estudio. En estudios recientes en LLCB, HIS fluorescente detectó una mayor incidencia de trisomía 12 que los estudios de citogenética convencionales. Con el uso de HIS fluorescente, Escudier et al en 1993, pudieron detectar 2.6 veces más casos de trisomía 12, que los detectados mediante análisis citogenético convencional. Esto fue debido a la detección de trisomía 12 en muestras que fueron clasificadas como diploides o que tenían metafases insuficientes para el análisis convencional. La sensibilidad de la detección de la trisomía 12 mediante HIS fluorescente fue por lo tanto mayor que la de la citogenética convencional. Por ello, el cariotipo no parecía ser un método sensible de detectar aneuploidía en LLC. Así, la discrepancia entre varios estudios respecto a la significación pronóstico en la LLC de la trisomía 12, se podía explicar debido al uso de la citogenética convencional (Han et al, 1984a,b; Pittman y Catovsky, 1984; Juliusson y Gahrton, 1985; Juliusson et al, 1990b).

En el presente estudio, entre los 10 pacientes que mostraron cariotipos normales, se detectó mediante HIS fluorescente, trisomía 12 en 5 casos en un 4%-26% de las células (P10, P16, P19, P32, P44) y de 4 pacientes en los que no se obtuvieron metafases evaluables, se detectó trisomía 12 en 2 pacientes (P6, P15), en el 5% y 18% de las células, respectivamente. Este estudio comparativo de estos 14 pacientes mediante citogenética y mediante HIS fluorescente demuestra la mayor sensibilidad de la citogenética en interfase frente a la citogenética convencional, permitiendo determinar la presencia de trisomía 12 en una fracción de pacientes con LLCB no evaluables citogenéticamente o con un cariotipo normal.

Esta discrepancia entre los resultados de metafase e interfase que se encuentra en este estudio, corroboran los trabajos de Pérez Losada et al, que mostraron que 2/13 pacientes que eran citogenéticamente normales presentaban trisomía 12 por HIS y también el estudio de Cuneo et al,

en 1992, que vieron que de 25 pacientes (20 con cariotipo normal y 5 inadecuados para citogenética), 4 presentaban trisomía 12 por medio de HIS fluorescente.

Cuneo et al en 1992, dicen que la discrepancia para detectar trisomía 12, entre los estudios citogenéticos y los de HIS fluorescente, ocurren cuando el porcentaje de células en interfase con trisomía 12 era inferior a 45%. Anastasi et al, 1992 ; Qumsiyeh y Tharapel, 1992 y Coignet et al, 1993, indicaron que altos niveles de células positivas mediante HIS fluorescente, eran sólo observadas en pacientes que mostraban trisomía 12 mediante análisis citogenético convencional (66%-97.5%). Esto coincide con los resultados de este estudio, ya que en 14 pacientes en los que se aportó un estudio citogenético, el porcentaje de células trisómicas por medio de estudios en interfase no superó el 26%. En las sucesivas revisiones a las que fueron sometidos estos pacientes, aunque en algunos casos se encontraron, mediante HIS fluorescente, porcentajes de células trisómicas superiores (P33=53%) al 45% que había indicado Cuneo et al, no se realizó análisis cariotípico para comprobar si también se podía demostrar la presencia de trisomía 12, mediante dicho análisis en estos casos.

Cuneo et al en 1992, en una segunda revisión de un paciente, cuando el porcentaje de células en interfase con trisomía 12 era de 50%, si detectó algunas metafases con trisomía 12 mediante citogenética convencional, que no se habían detectado en la primera revisión, cuando el porcentaje de células en interfase por HIS fluorescente que mostraban trisomía 12 era menor del 45%. Por ello, concluyen que HIS fluorescente es importante para detectar trisomía 12 en LLCB, especialmente cuando el porcentaje de células con trisomía 12 era inferior al 50% y cuando no se pueden obtener metafases de los cultivos con mitógenos. En este estudio, aunque no se ha hecho análisis citogenético para ver si en las sucesivas revisiones, cuando el porcentaje de células trisómicas es superior al 50% se detecta la presencia de trisomía 12, sí se puede concluir, que la HIS fluorescente es importante en detectar trisomía 12 en LLCB cuando no se obtienen metafases de los cultivos con mitógenos o cuando se muestra un cariotipo normal.

En este estudio, así como en los de Pérez-Losada et al en 1991 y Cuneo et al en 1992, se encuentra trisomía 12 en células en interfase de pacientes citogenéticamente normales o que no producen metafases aptas para su estudio, sin embargo, estudios de genética molecular empleando sondas para la detección de RFLPs en el cromosoma 12, no produjeron evidencia de trisomía 12 en este cromosoma, en 13 pacientes citogenéticamente normales (Einhorn et al en 1990). Posiblemente la heterogeneidad de la población de pacientes en las series diferentes pueda explicar

estas diferencias. Así, mientras la mayoría de los pacientes indicados por Einhorn et al en 1990 estaban en estadio 0 ó I, de acuerdo a la clasificación de Rai, los pacientes incluidos en el estudio de Cuneo, estaban en estadios II y IV y fueron sometidos a HIS en el momento de su hospitalización por progresión de la enfermedad. En este estudio, los 5 pacientes que eran citogenéticamente normales y positivos mediante HIS, estaban 3 en estadio B (P10, P19, P32) y 2 en estadio C (P16, P44) y además dos de ellos se encontraban en fase de evolución de su enfermedad (P32, P44). Los 2 pacientes en los que no se pudieron obtener metafases para su estudio citogenético, pero que eran positivos mediante HIS fluorescente, se encontraban en estadio B (P6, P15).

En este estudio, la proporción de células control con dos señales, era de 95% a 98% pero nunca 100%. 1%-2% de las células control normales tenían una señal de hibridación. No se sabe si las células con cero o una señal representan nulisomías o monosomías 12, o si ellas son debidas a una peor penetración de la sonda, desnaturalización incompleta del ADN blanco o diana o posible daño del ADN durante el almacenamiento de las células en solución de fijación. Se vieron tres señales de hibridación en 1%-3% de las células. Las muestras fueron consideradas positivas para la trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación. Estos resultados son similares a otros que han sido descritos previamente (Pérez-Losada et al, 1991; Poddinghe et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992; Chen et al, 1992a,b; Qumsiyeh y Tharapel, 1992).

Otros investigadores seleccionaron, al igual que en el presente estudio, como controles, muestras de SP de sujetos normales. Así, Pérez-Losada et al, seleccionaron 6 controles normales, aunque incluyeron también 1 paciente con trisomía 12 como control positivo y 1 paciente que tenía una anomalía estructural del cromosoma 12. Cuneo et al, seleccionaron también 2 sujetos normales como controles, e incluyeron también 1 paciente con trisomía 12 como control positivo. Anastasi et al, seleccionaron como controles, individuos con otras enfermedades no hematológicas, que eran sometidos a TMO. Lalkin et al, emplearon en su estudio como controles, únicamente individuos normales. Por último, Escudier et al emplearon para su estudio como controles, sujetos normales y otros que tenían otras anomalías distintas de la trisomía 12.

Las células para este estudio, fueron recogidas de SP en los 45 casos y no de MO, ya que Delhomme-Bachy et al en 1992, demostraron que era más fácil el estudio en SP.

La mayoría de los estudios realizados sobre trisomía 12 en LLCB mediante HIS fluorescente fueron realizados en muestras de SP (Pérez-Losada et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al,

1992; Escudier et al, 1993; Lalkin et al, 1993; Que et al, 1993). Aunque, en algunos casos fueron realizados también, en muestras de MO (Anastasi et al, 1992; Escudier et al, 1993; Que et al, 1993) o incluso, en muestras de nódulo linfático (Anastasi et al, 1992; Döhner et al, 1993).

En el presente estudio se ha observado por medio de HIS fluorescente, una alta frecuencia de trisomía 12 en pacientes con LLCB [al inicio del estudio 20/45 (44.4%) de los pacientes mostraban trisomía 12, pero si se tiene en cuenta la evolución de estos pacientes, se encuentra una incidencia un poco mayor (24/45, 53.3%)]. Esta frecuencia es mayor que la previamente indicada basada en análisis citogenético y también más elevada que la reportada mediante análisis por medio de HIS fluorescente, con excepción de la indicada por Qumsiyeh y Tharapel en 1992 (4/7, 57.14%) y Lalkin et al en 1993 (12/19, 63%). En el trabajo de Qumsiyeh y Tharapel en 1992, que estudiaron 7 pacientes, encontraron la presencia de trisomía 12 en un 57.14%, mientras que Coignet et al, 1993, que estudiaron 75 pacientes, encuentran trisomía 12 en un 42.6%. Los resultados de este trabajo son más coincidentes con estos estudios.

Existen 12 estudios anteriores en la detección de trisomía 12 en la LLCB mediante HIS fluorescente (Pérez-Losada et al, 1991; Raghoebier et al, 1991a,b; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992; Chen et al, 1992a; Qumsiyeh y Tharapel, 1992; Coignet et al, 1993; Döhner et al, 1993; Escudier et al, 1993; Lalkin et al, 1993; Que et al, 1993; Tabernero et al, 1994). La trisomía 12 fue revelada 15% de 13 casos, 30% de 40 casos, 20% de 20 casos, 30% de 10 casos, 57% de 7 casos, 11.5% de 61 casos, 42.6% de 75 casos, 14.3% de 42 casos, 35% de 117 casos, 63% de 19 casos, 11.5% de 183 casos y 20% de 104 casos, respectivamente.

Que et al y Raghoebier et al, encontraron mediante HIS fluorescente una incidencia de un 11.5% de trisomía 12 en LLC, que es más baja que la encontrada en la mayoría de los otros trabajos, también mediante HIS fluorescente, en la cual la incidencia de trisomía 12 varió entre 15% y 63% (Perez Losada et al, 1991; Raghoebier et al, 1991a; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992; Chen et al, 1992a; Qumsiyeh y Tharapel, 1992; Coignet et al, 1993; Döhner et al, 1993; Escudier et al, 1993; Lalkin et al, 1993; Que et al, 1993; Tabernero et al, 1994) o en trabajos mediante citogenética convencional (Bird et al, 1989; Juliusson et al, 1990a,b; 1991; Castoldi et al, 1987). La diferente incidencia de trisomía 12 en estos estudios, así como también la encontrada en este trabajo, puede deberse a diferencias en la selección de pacientes o a diferencias en la distribución geográfica de esta anomalía cromosómica.

La mayoría de los estudios citogenéticos (recopilación del IWCCLL) comenzaron en los años 80, cuando no estaba hecha una clasificación precisa de las enfermedades linfoides de origen B, y así se incluyeron algunos casos con un diagnóstico que probablemente no era LLC (Han et al, 1984a,b; 1988; Juliusson et al, 1985a,b,c; Bird et al, 1989). Juliusson et al en 1985 estudiaron 17 pacientes con trisomía 12 por medio de análisis de citogenética convencional: 6 fueron clasificados con morfología típica de LLC; 10 pacientes tenían inmunocitoma, que es la designación de linfoma linfoplasmocítico en la clasificación de Kiel y uno no fue clasificado. Además, Han et al en 1983, encontraron una alta incidencia de trisomía 12 en pacientes con Waldeström y LLC asociada a macroglobulinemia de Waldeström, que también son clasificados con inmunocitomas. En algunos de los estudios usando HIS, que indican una elevada incidencia de trisomía 12 (Perez Losada et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992), se han investigado casos con LP (Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992). Anastasi et al, por ejemplo, incluyeron una elevada proporción de casos de LLC morfológicamente atípicos. Además uno de los 4 casos con trisomía 12, indicado por Cuneo et al, tenía LP y los otros dos mostraban morfología atípica (LLC/LP). Esto está en concordancia con los descubrimientos de asociación entre trisomía 12 y LLC con características morfológicas atípicas así como con casos de LNH de bajo grado en fase leucémica (como se pudo demostrar en el presente estudio). En este estudio únicamente se incluyeron casos de LLCB típica, demostrados por medio de marcadores y de morfología, por ello, la elevada incidencia que se encuentra de trisomía 12, se da en pacientes con LLCB típica.

Castoldi et al en 1987 y Oscier et al en 1990, mediante análisis citogenético convencional, habían sugerido, que la frecuencia de trisomía 12 podía ser mayor en estadios avanzados. Escudier et al en 1993, si encuentran esta mayor frecuencia en estadios más avanzados, pero no así otros investigadores, entre ellos Lalkin et al y Que et al en 1993, que no encuentran esta relación. En este estudio se encontró una correlación muy clara entre la presencia de trisomía 12 y el estadio. Se encuentra una mayor proporción de trisomía 12 en los estadios avanzados de la enfermedad (B, C). Esta relación con el estadio avanzado se va estrechando a medida que se sigue la evolución de estos pacientes, ya que algunos en estadio A con trisomía 12 evolucionan a estadio B o estadio C (P6, P33) o incluso algunos en estadio B o en estadio C, adquieren trisomía 12 en su evolución (P3, P14, P39). Esto demuestra que la trisomía 12 es un signo de peor pronóstico en la LLCB en esta población, ya que se ve que su presencia está asociado fundamentalmente a los estadio B y C, que son los estadios más avanzados de la enfermedad y de peor pronóstico. Aunque es necesario un

estudio más exhaustivo para confirmar esta correlación entre la incidencia de trisomía 12 y el estadio de la enfermedad, su presencia podría ser importante desde el punto de vista pronóstico.

En este estudio, los pacientes con trisomía 12 tendían a presentar una mayor incidencia de esplenomegalia y de adenopatías que los pacientes sin trisomía 12. Esto está de acuerdo con el estadio más avanzado visto en los pacientes con trisomía 12. Asimismo, en este trabajo la presencia de trisomía 12 también se relacionó con otros factores pronóstico de la enfermedad, como son el patrón difuso de infiltración medular, mayores niveles de leucocitosis periférica, hipogammaglobulinemia (IgG), lo que también está de acuerdo con el estadio más avanzado visto en estos pacientes con trisomía 12. Los pacientes con trisomía 12, también era más común, el que estuvieran tratados previamente. Esto puede ser debido al estadio más avanzado que requiere tratamiento más pronto, como ya indicaron algunos autores (Juliussen, 1986), o bien es un hecho secundario, asociado con la progresión de la enfermedad. No es frecuente que la trisomía 12 se desarrolle secundariamente a la quimioterapia. Así, en este estudio se puede ver como algunos pacientes presentaban trisomía 12 y no estaban sometidos a tratamiento (P1, P6, P7, P19, P22, P27, P30, P31, P32, P33).

Debido a que la trisomía 12 se había indicado que era indicador pronóstico independiente (Juliussen et al, 1985a,b,c; 1990), era muy interesante controlar el porcentaje de células en interfase que llevan la trisomía 12 en estos pacientes en diferentes momentos de su evolución, durante el curso de la enfermedad. Un aumento del porcentaje de células en interfase con tres señales fue vista en 11 pacientes (P1, P3, P6, P7, P14, P24, P32, P33, P39, P43 y P44), después de 2 años de estudio. En estos pacientes se apreció una progresión de su enfermedad durante su seguimiento. Este aumento en el porcentaje de células trisómicas en sucesivas revisiones, sugiere que las células con trisomía 12 pueden tener ventaja proliferativa sobre las que no la presentan, y este aumento en el tiempo no se debe a diferentes susceptibilidades al tratamiento de los diferentes pacientes, ya que por ejemplo, P7, no estaba sometido a tratamiento durante su seguimiento y, si se observó un aumento en el porcentaje de células trisómicas. Por lo tanto se puede concluir que la HIS fluorescente puede ser útil en controlar el porcentaje de células trisómicas durante la evolución de la enfermedad.

En otros 9 pacientes (P8, P10, P15, P16, P21, P22, P30, P31, P45), el porcentaje de células trisómicas realmente no ha aumentado significativamente en el período de 2 años. En estos pacientes, aunque no se observó una progresión de su enfermedad, no se había alcanzado tampoco

la remisión clínica y analítica, aunque algunos pacientes estaban sometidos a tratamiento (P8, P10, P15, P16, P21, P45) y presentaban una buena respuesta.

P2, P5, P9, P11, P12, P13, P17, P18, P20, P25, P26, P28, P29, P34, P35, P40, P42 (no estaban sometidos a tratamiento quimioterapéutico) y P23, P36, P37, P38 (si estaban sometidos a tratamiento quimioterapéutico), estos pacientes presentaron un progreso clínico y analítico satisfactorio durante toda su evolución y no mostraron la presencia de trisomía 12 en ningún momento de su evolución.

P4, P19, P27 y P41 mostraron la presencia de trisomía 12 al comienzo de este estudio, pero esta trisomía 12 no se evidenció una vez alcanzada la remisión clínica y analítica, a excepción del paciente P4, en el que si hubo una disminución del porcentaje de células trisómicas, pero no desaparecieron totalmente. Tras recaída de su LLCB se evidenció nuevamente la presencia de la trisomía 12 en el paciente P19, así como en los pacientes P3, P7, P14 y P39.

Estos datos parecen indicar que hay alguna correlación entre la presencia de la trisomía 12 y la evolución de la LLCB en estos pacientes.

La proporción de células con tres señales al inicio de este estudio estaba entre 4%-38%, mientras que en la última revisión era de 6%-55%. Estas proporciones de células trisómicas son generalmente, menores que las previamente indicadas por otros autores, también mediante HIS fluorescente en pacientes con LLCB. Así, Escudier et al en 1993 y Que et al en 1993, encontraron que la proporción de células trisómicas era de 4%-89% y 5.5%-76%, respectivamente. Por el contrario, Qumsiyeh y Tharapel en 1992 y Lalkin et al en 1993, mostraron que los pacientes con trisomía 12, presentaban una proporción entre 4%-44% y 6%-35% de células trisómicas, respectivamente. Estas diferencias pueden ser debidas también, a diferencias en la selección de pacientes o a diferencias en la distribución geográfica de esta anomalía cromosómica.

En el presente estudio se obtuvieron bajos porcentajes de células trisómicas, confirmadas en todos los casos (4%-9%), en 4 pacientes (P10, P15, P32, P44). Sólo 1 de los pacientes diagnosticado como tener trisomía 12 (P44), presentaba 4% de células en interfase con tres señales de fluorescencia. Comparado a los pacientes que eran disómicos para el cromosoma 12, esta frecuencia estaba sobre el nivel "cut-off" indicando la presencia de trisomía 12.

En este estudio no se puede ver si las células mitóticas normales presentes en estos casos eran derivadas del clon leucémico que no exhibe trisomía 12 o si ellas se originaron de linfocitos B ó T normales. Sin embargo, los estudios de Knuutila (1986), Autio (1987) y Pérez-Losada (1991) usando

inmunofenotipaje secuencial y análisis cariotípico, sugieren que las células mitóticas normales en pacientes con trisomía 12 representan linfocitos T normales. Estos datos fueron corroborados por estudios de RFLPs de genes polimórficos localizados en el brazo largo del cromosoma 12 (Einhorn et al, 1989).

En este estudio, 33 pacientes no fueron estudiados desde el momento de su diagnóstico (P1, P3, P4, P6, P9, P11, P12, P13, P14, P15, P17, P18, P19, P20, P21, P23, P24, P25, P26, P28, P29, P32, P34, P35, P36, P37, P38, P39, P40, P42, P43, P44, P45). Aunque en estos pacientes no se pudo saber si la positividad en la HIS fluorescente estaba presente en el momento del diagnóstico en aquellos pacientes que presentaban esta trisomía 12 durante toda su evolución (P1, P4, P6, P15, P21, P24, P32, P43, P44, P45) o si aquellos pacientes que eran positivos al inicio de este estudio y que posteriormente se negativizaron, si realmente eran negativos al comienzo de este estudio (P19) o si eran positivos o por el contrario, si pacientes que eran negativos al inicio de este estudio (P3, P14, P39) y que posteriormente presentaron trisomía 12, si realmente eran positivos al inicio de este estudio o negativos. Los otros 12 pacientes si pudieron ser estudiados durante toda su evolución (P2, P5, P7, P8, P10, P16, P22, P27, P30, P31, P33, P41) y así se vieron casos donde era positivo durante toda su evolución (P8, P10, P16, P22, P30, P31, P33) , casos negativos durante toda su evolución (P2, P5, P28, P42), casos donde se apreció una progresión (P7) y casos donde va disminuyendo esta trisomía (P27, P41) hasta desaparecer o incluso volver a presentarse en un caso (P41). Estos resultados pueden informar acerca de lo que podría ocurrir en los otros pacientes en los momentos en los que no fueron estudiados.

Otros estudios tampoco fueron hechos en el momento del diagnóstico. Pérez-Losada et al en 1991, analizaron muestras de SP de 13 pacientes con LLCB que fueron diagnosticados 1-2 años antes. Los 40 pacientes con LLCB analizados por Anastasi et al en 1991, habían sido diagnosticados anteriormente. Cuneo et al en 1992 analizaron también mediante HIS fluorescente, muestras de SP de 20 pacientes, con LLCB y con un cariotipo normal, que habían sido diagnosticados 2-4 años antes. Escudier et al en 1993 analizaron también mediante análisis citogenético y mediante HIS fluorescente, muestras de SP y de MO de 56 pacientes (ya diagnosticados anteriormente) y 61 (no diagnosticados anteriormente) con LLCB.

En los linfomas foliculares, la progresión de la enfermedad se caracteriza por la presencia de otras anomalías cromosómicas además de aquellas que se encuentran en la fase temprana de la enfermedad. Sin embargo algunos autores dicen que en la LLC, tal evolución carotípica es rara (Han

et al, 1986; Ohtaki et al, 1986; Juliusson et al, 1988a,b; Nowell et al, 1988; Oscier et al, 1991), pacientes con trisomía 12 la muestran tempranamente en la enfermedad y durante toda la progresión, mientras que la adquisición de células con trisomía 12 en pacientes con cariotipos normales o con otras anomalías cromosómicas durante el curso de la enfermedad es extremadamente rara .

Han et al en 1987 sugirieron que la trisomía 12 era el primer cambio cariotípico en la LLCB y que otros cambios cromosómicos se desarrollaron más tarde como resultado de la evolución.

El análisis secuencial con una media de 3.7 muestras de 41 pacientes durante un intervalo medio de 4.2 años mostró cambios en las anomalías cromosómicas en un 15% (Juliusson et al, 1988a). Resultados similares fueron alcanzados por Nowell et al (1988) y por Oscier et al (1991). Los cambios cariotípicos eran nuevas anomalías en pacientes con cariotipos ya complejos en el momento del diagnóstico. Ningún paciente adquiere trisomía 12 en el curso de la enfermedad. Esto indicaba que la trisomía 12 no era un cambio secundario en la LLCB. Por consiguiente, al contrario de otras neoplasias linfoides, la evolución cariotípica parecía ser un fenómeno raro en la LLC, y, cuando ocurría, no parecía correlacionarse con progresión de la enfermedad (Geisler et al, 1989; Juliusson et al, 1990a,b).

Sin embargo, algunos autores indicaban que la trisomía 12 podría ser adquirida por las células leucémicas en el curso de la enfermedad. Raghoeber et al en 1992 concluyeron que la trisomía 12 no es un cambio primario en la LLCB. Cuneo et al en 1992 sugieren que la adquisición de un cromosoma 12 extra no es un hecho temprano en la génesis de la LLCB y que el desarrollo de algunas anomalías cromosómicas en esta enfermedad pueden resultar de la inestabilidad genética de los linfocitos B ya transformados (Rechavi et al, 1989).

Este estudio está de acuerdo con esta última observación ya que algunos pacientes muestran esta trisomía 12 en el momento del diagnóstico, pero no durante toda su evolución (P27, P41). Por lo tanto la adquisición de trisomía 12 en el curso de la enfermedad no es raro como habían indicado algunos autores (Juliusson et al, 1988a,b; Nowell et al, 1988; Oscier et al, 1991). En este estudio se encontró por lo tanto una evolución, ya que algunos pacientes muestran trisomía 12 durante toda su evolución (P1, P4, P6, P8, P10, P15, P16, P21, P22, P24, P31, P32, P33, P43, P44, P45), mientras que otros la adquieren posteriormente (P3, P7, P14, P39) e incluso en otros la trisomía 12 va disminuyendo (P4, P19, P27, P41), hasta incluso desaparecer (P19, P27).

En este estudio se encontró que esta trisomía 12 desaparecía a lo largo de la evolución en algunos pacientes (P19, P27, P41). No se sabe si se debe al tratamiento quimioterapéutico al que

están sometidos algunos de estos pacientes (P19, P41) o no (P27). Así, en P22, P27, P30, P31, persiste la trisomía 12 durante todo el seguimiento y no están sometidos estos pacientes a tratamiento, otro paciente (P7), desarrolla trisomía 12 durante su evolución y no está sometido a tratamiento y en otros pacientes, esta trisomía 12 se mantiene a pesar del tratamiento (P1, P4, P6, P8, P10, P15, P16, P21, P24, P32, P33, P43, P44, P45). Todo ello parece indicar que la trisomía 12 no se desarrolla como consecuencia de la quimioterapia, como ya se había indicado anteriormente.

En sucesivas revisiones, al igual que se había observado al inicio de este estudio, también se apreció como los pacientes con trisomía 12 también era más común el que estuvieran sometidos a tratamiento. Esto puede ser debido como ya se ha indicado, al estadio más avanzado que requiere tratamiento más pronto, como ya indicaron algunos autores (Juliusson, 1986), o bien es un hecho secundario asociado con la progresión de la enfermedad. Aumenta el número de pacientes sometidos a tratamiento en las sucesivas revisiones, y algunos pacientes también evolucionan a un estadio más avanzado.

El conteo de señales ha de ser muy cuidadoso ya que en algún paciente, aunque no se diagnosticó como portador de trisomía 12, parecía como si sus porcentajes de células trisómicas estuvieran sobre el nivel "cut-off". Ello se debía a que en algunas células dos de los tres puntos estaban conectados por un hilo fluorescente fino y por lo tanto estos 2 puntos tenían que ser considerados como una región pericentromérica. En estas células había enorme descondensación del ADN dando falsos porcentajes de células trisómicas positivas. La causa de esta descondensación del ADN no es conocida. Esto demuestra que la evaluación de la señal ha de ser hecha cuidadosamente para no sobreestimar el porcentaje de células trisómicas.

En 1984 Han et al indicaron que la supervivencia de los pacientes con trisomía 12, como única anomalía cromosómica, no era significativamente diferente de la de los pacientes con un cariotipo diploide. La supervivencia media para los pacientes con LLC se ha visto que es de 9 años aproximadamente (Foon et al, 1990). Los pacientes que presentan anomalías cromosómicas tienden a presentar una supervivencia más corta. Así, anomalías complejas, porcentajes elevados de metafases anormales, anomalías del brazo largo del cromosoma 14 y trisomía 12 han sido asociadas con una menor supervivencia (Juliusson et al, 1986; 1990a,b; 1991). En el estudio de Anastasi et al en 1991, se sugirió la existencia de una menor supervivencia en los pacientes con trisomía 12. Escudier et al confirmaron estos resultados con una supervivencia más corta en pacientes con trisomía 12 (7.8 años) comparada con pacientes con carotipos diploides (14.4 años).

Cuando se observan datos de supervivencia en el presente estudio, se encuentra una tendencia que indica peor supervivencia asociada a trisomía 12, aunque no estadísticamente significativa, quizás debido a que el número de pacientes estudiados no es muy elevado. De confirmarse esta tendencia, esta anomalía cromosómica podría tener una significación clínica.

Ya que sólo se empleó una sonda específica para el cromosoma 12, no se pudo valorar la posibilidad que podría tener la presencia de otras anomalías cromosómicas en estos pacientes con LLCB.

Algunos autores analizan 500 células/paciente. Sin embargo, muchos autores analizan menos células, incluso 100 células/paciente. Por ello, se cree que 200 células/paciente es un número de análisis adecuado. Anastasi et al, analizaron 100-300 células/paciente. Coignet et al, analizaron un número variable de células, 200 células/paciente en algunos casos, 300 células/paciente en otros casos, y en algunos casos analizan sólo 100 ó hasta 600 células/paciente. Döhner et al, analizaron 300 células/paciente aunque en algunos casos analizaron 600 células/paciente ó 700 células/paciente. Pérez Losada et al, analizaron 250 células/paciente. Escudier et al, 200-250 células por paciente y por último, Que et al, analizaron 200 células por paciente al igual que Cuneo et al.

Los resultados del presente estudio muestran que la HIS con una sonda alfa satélite específica para el cromosoma 12 es una técnica más simple, rápida y sensible, para detectar la trisomía 12 en la LLCB, lo que está de acuerdo con estudios anteriores (Perez Losada et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992). Su principal ventaja es que permite estudiar células en interfase.

No obstante, ya que el análisis convencional da más información sobre otras anomalías cromosómicas además de la trisomía 12, la mejor elección sería usar las dos técnicas en paralelo para combinar la información de la citogenética y de la HIS fluorescente (Nederlof et al, 1989; Cremer et al, 1986; Eastmond et al, 1989; Hopman et al, 1989; Van Dekken et al, 1990). Sin embargo, nuevas técnicas están haciendo posible usar un número grande de sondas juntas y así contar simultáneamente múltiples aberraciones, incluyendo translocaciones así como anomalías numéricas. Otras técnicas han sido ensayadas para la detección de la trisomía 12 en la LLCB usando "Southern blot" (Einhorn et al, 1990). Pero estas técnicas tendrían éxito si una proporción adecuada de células mostraran trisomía 12. Esto se debe a que una pequeña población de células con trisomía 12 podría no traducirse en una diferencia observable en intensidad de banda en la autoradiografía.

Este estudio sugiere además, que la presencia de trisomía 12 en la LLCB podría ser un útil marcador para indicar un peor pronóstico en dicha enfermedad y que en vista de lo sugerido, podría

utilizarse la trisomía 12 en la LLCB, junto con otros factores pronóstico. La HIS fluorescente podría además ayudar a controlar el porcentaje de células trisómicas a lo largo de la evolución del paciente.

II. LEUCEMIA DE CELULAS PELUDAS.

En 1978, Golomb et al, evaluaron los cromosomas de 20 pacientes con tricoleucemia para averiguar la frecuencia y tipo de anomalías cromosómicas. Se obtuvieron muestras de 17 pacientes a partir de cultivos de SP. Después de esto, ampliaron su estudio incluyendo seis pacientes más (n=26) y en este caso, se obtuvieron metafases adecuadas en 21 pacientes. En ambos estudios, sólo dos pacientes tenían trisomía 12 (9.5%-12%) y en un tercer paciente varón, el cariotipo fue 46,X,+C marcador, el brazo largo distal del marcador C recordaba más claramente a un cromosoma 12, pero el brazo corto y el brazo largo proximal eran de origen no determinado. En 1988, Han et al estudiaron 28 pacientes con tricoleucemia por medio de análisis citogenético de linfocitos de SP que fueron cultivados con poderosos mitógenos. Se obtuvieron metafases adecuadas en sólo 24 pacientes. Sólo en un paciente con tricoleucemia (3%) se vió trisomía 12 como única anomalía. En 1989, utilizando células leucémicas de SP, MO, bazo de 9 pacientes con tricoleucemia, identificaron con éxito líneas celulares y describieron la presencia de trisomía 12 en 2 de las 5 líneas celulares con tricoleucemia (40%). Recientemente, Lewis et al en 1993, estudiaron 24 pacientes con tricoleucemia, mediante HIS fluorescente, usando sondas específicas para 16 cromosomas humanos. La trisomía 12 no fue detectada en ninguno de los 24 pacientes. La tricoleucemia parece ser diploide para los 16 cromosomas estudiados y muestra el fenómeno de apareamiento del centrómero y del brazo p del cromosoma 15 durante la interfase. Asimismo, Haglund y Juliusson en un trabajo reciente de 1994, estudiaron mediante análisis citogenético las células estimuladas con mitógenos de células B de 36 pacientes con tricoleucemia. Se obtuvieron metafases evaluables en 30 pacientes y 20 (67%) mostraban anomalías cromosómicas. Las anomalías cromosómicas afectaban a los cromosomas 1, 2, 5, 6, 11, 19 y 20. Las anomalías eran, comunmente, inversiones y deleciones, mientras que translocaciones y anomalías numéricas, excepto trisomía 5, eran poco frecuentes. No se detectó la presencia de trisomía 12.

Varios estudios han detectado una disminución en la respuesta a la estimulación con mitógenos de los tricoleucocitos, lo cual hace el análisis citogenético en la tricoleucemia difícil. HIS fluorescente en células en interfase tiene la capacidad de complementar las técnicas de citogenética clásicas. En este trabajo se ha empleado HIS fluorescente de núcleos humanos en interfase, una simple y rápida técnica, para detectar trisomía 12 en pacientes con tricoleucemia. Los resultados de este estudio fueron también comparados a otros estudios que describen la presencia de trisomía 12 en tricoleucemia. Estos últimos estudios fueron llevados a cabo por medio de análisis citogenético

usando SP o líneas celulares cultivadas. Asimismo, también se compararon los resultados de este estudio con otro dos estudios de la tricoleucemia mediante HIS fluorescente.

En el presente trabajo la proporción de células control con dos señales era de 95% a 98% pero nunca 100%. 1%-2% de las células control normales tenían una señal de hibridación. No se sabe si las células con cero o una señal representan nulisomías o monosomías 12, o si ellas son debidas a una peor penetración de la sonda, incompleta desnaturalización del ADN blanco o diana o posible daño del ADN durante el tiempo de almacenamiento de las células en solución de fijación. Se vieron tres señales en 1%-3% de las células. Las muestras fueron consideradas positivas para la trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación. Estos resultados son similares a otros que han sido previamente descritos (Pérez- Losada et al, 1991; Poddinghe et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992; Chen et al, 1992a; Qumsiyeh y Tharapel, 1992). En este trabajo se ha observado, por medio de HIS fluorescente, una alta frecuencia (3/5; 60%) de trisomía 12 en pacientes con tricoleucemia en algún momento de la evolución de la enfermedad. Esta frecuencia es más alta que la previamente reportada basada en análisis citogenético.

Tras recaída de la tricoleucemia la trisomía 12 fue evidente en 3 pacientes (tabla 1). P2, (tabla 2), había sido esplenectomizado tras el diagnóstico de su tricoleucemia, después de lo cual se alcanzó remisión clínica y analítica y la trisomía 12 desapareció. La trisomía 12 fue nuevamente detectada tras recaída, pero desapareció después de alcanzar la remisión de la enfermedad y estar sometido a tratamiento con INF y esteroides. Después de esplenectomía, P4 fue tratado con INF, por lo tanto alcanzándose remisión clínica y analítica. La trisomía 12 fue detectada tras recaída, detectándose un aumento en el porcentaje de células trisómicas, pero también desapareció una vez el tratamiento con INF y esteroides fue reiniciado y la remisión fue alcanzada. P1 había sido esplenectomizado 7 años antes de este estudio y mostró un progreso satisfactorio clínica y analíticamente, así como ausencia de trisomía 12. Sin embargo, tras recaída de la tricoleucemia la trisomía 12 persistió a pesar del tratamiento con INF y se observó una progresión de la enfermedad, apreciándose también un aumento en el porcentaje de células trisómicas. Los otros dos pacientes eran negativos para la trisomía 12. P5 había estado sometido a tratamiento con INF hasta 5 meses antes de este estudio y se alcanzó la remisión de la enfermedad. El estudio de P3 empezó cuando la tricoleucemia fue diagnosticada primeramente, y el paciente está actualmente sujeto al correspondiente seguimiento.

Estos datos parecen indicar que hay alguna correlación entre trisomía 12 y evolución de la tricoleucemia. En este estudio se puede apreciar como la HIS fluorescente con una sonda para el cromosoma 12 es un método simple y sensible para la detección de trisomía 12 en la tricoleucemia, así como es útil para controlar el porcentaje de células trisómicas a lo largo de la evolución de la enfermedad del paciente.

En el presente estudio se ve que hay una evolución variable en el porcentaje de células trisómicas en estos pacientes. Hay algunos pacientes que muestran esta trisomía 12 a lo largo de toda su evolución (P1) y otros pacientes la adquieren en el curso de la enfermedad (P2). Por último, en otros pacientes esta trisomía 12 desaparece en el transcurso de la enfermedad (P2 y P4).

Estos pacientes no fueron estudiados en el momento del diagnóstico. Por esta razón se desconoce:

a) si la positividad en la HIS fluorescente estaba ya presente en el momento del diagnóstico en aquellos pacientes que mostraban positividad a lo largo de su evolución (P1).

b) si P4 era negativo en el momento del diagnóstico o si era inicialmente positivo y llegó a ser negativo después de la terapia.

Sin embargo, a pesar de la falta de esta información, los datos recogidos desde el comienzo de este estudio, creemos, nos permiten apuntar las conclusiones indicadas aquí.

Otros estudios no fueron hechos tampoco en el momento del diagnóstico. En el trabajo de Golomb et al cinco pacientes habían sido sometidos a esplenectomía antes de ser remitidos al centro para su estudio. Cuatro pacientes habían sido esplenectomizados una vez realizado el estudio cromosómico original. En el trabajo de Haglund et al, 13 pacientes habían sido esplenectomizados y/o habían recibido tratamiento con INF antes de su estudio. 5 pacientes habían sido sometidos a múltiples tratamientos antes del estudio cromosómico.

Ya que sólo una sonda específica para el cromosoma 12 fue usada en el presente estudio, no se pudo valorar la posibilidad que en estos pacientes con tricoleucemia podrían haber tenido otras anomalías.

La razón para la discrepancia entre el presente estudio y el de Lewis, que no encontró ninguna trisomía 12 en los 24 pacientes con tricoleucemia mediante HIS fluorescente, no está clara. En este trabajo se encontró positividad mediante HIS fluorescente, en el 60% de los pacientes (3/5) y Lewis en ninguno (0/24), incluso analizando material esplénico después de esplenectomía. Aunque, la serie de pacientes de este trabajo no es tan grande como la de Lewis, la razón para esta

discrepancia no está completamente clara. Probablemente, pueda ser debido a diferencias en la distribución geográfica de esta anomalía cromosómica o de selección de pacientes. Además, Lewis et al, analizan 50 células/paciente y en este estudio se analizan 200células/paciente. Por ello, se cree que estos resultados podrían ser más aceptables.

Por otra parte, Haglund y Juliusson en su trabajo, emplearon análisis citogenético en células de 36 pacientes con tricoleucemia estimuladas con mitógenos de células B. Se obtuvieron metafases evaluables en sólo 30 pacientes. Como ya se ha indicado en la introducción, el análisis citogenético presenta importantes limitaciones con respecto a la técnica de HIS fluorescente. El análisis citogenético es realizado después del cultivo de las células con mitógenos que estimulan las células B, pero este es un método difícil, debido al bajo índice mitótico de las células leucémicas de origen B y a su peor respuesta a la estimulación con mitógenos. En muchos casos no se producen metafases analizables o cuando las metafases están presentes, presentan un cariotipo normal. La HIS fluorescente es un método rápido para detectar las anomalías cromosómicas en células en interfase o durante la metafase. Se puede analizar un mayor número de células que por medio del análisis citogenético convencional. La HIS fluorescente detecta anomalías cromosómicas en muchos casos en donde no se puede hacer un análisis citogenético convencional. La HIS elimina el sesgo introducido al depender el análisis citogenético de la división de las células B gracias a la acción de mutágenos, evitando así los peligros de división de células normales frente a células cancerosas y facilita el rápido análisis y hace posible el análisis de casos en los que las células en metafase no se pueden obtener. Escudier et al dicen que la HIS fluorescente identifica la trisomía 12 aproximadamente 2.6 veces más a menudo que el análisis citogenético.

Deducimos, que no está suficientemente demostrado que la trisomía 12 sea un predictor de la evolución en la tricoleucemia, ya que en el presente trabajo sólo se estudiaron 5 casos. Asimismo, su significado de peor pronóstico no está demostrado por datos suficientes, para indicar una necesidad para suministrar tratamiento en un período temprano o la necesidad para una temprana intervención por la misma razón, pero sí, como indican los resultados de este estudio, la trisomía 12 podría ser un marcador útil, ya que los datos de los pacientes parecen indicar que hay alguna correlación entre trisomía 12 y evolución de la tricoleucemia, aunque muchos casos más deberían ser estudiados.

Algunos autores analizan 500células/paciente. Sin embargo, muchos autores analizan menos células, incluso 100células/paciente. Así, se cree que 200células/paciente es un número

adecuado. Anastasi et al, analizaron 300 células/paciente. Coignet et al, analizaron un número variable de células, 200 células/paciente en algunos casos, 300 células/paciente en otros casos, y en algunos casos, analizan sólo 100 ó hasta 600 células/paciente. Döhner et al, analizaron 300 células/paciente, aunque en algunos casos ellos analizaron 600 células/paciente ó 700 células/paciente. Pérez Losada et al, analizaron 250 células/paciente.

Esta técnica permite identificar pacientes con trisomía 12. Este estudio sugiere que, como ha sido demostrado para otras anomalías cromosómicas, la presencia de trisomía 12 en pacientes con tricoleucemia podría ser un útil marcador para indicar evolución de la tricoleucemia. No obstante, estudios posteriores serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

III. LINFOMAS LEUCEMIZADOS DE ORIGEN B.

Sandberg en 1981, concluye que las anomalías en los cromosomas 3 y 12 parecen ser comunes y no al azar en enfermedades hematológicas de tipo maligno y premaligno.

Yunis et al en 1982, estudiaron mediante técnicas citogenéticas de alta resolución, biopsias de nódulos linfáticos de 44 pacientes diagnosticados de varios subtipos de LNH. Se obtuvieron metafases adecuadas para el estudio en 42 pacientes. Pudieron ver que la $t(14;18)$ era la anomalía cromosómica observada, con mayor frecuencia, en 16 de los 19 pacientes diagnosticados de linfoma foliculares y la $t(8;14)$ en 5 de 6 pacientes afectos de LNH tipo inmunoblástico de células grandes. Asimismo, pudieron detectar trisomía 12 en 4 de 11 pacientes afectos de LLCP. En uno de los 11 pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células pequeñas se ven deleciones del cromosoma 12, pero no se ve trisomía 12. De 3 pacientes afectos de linfoma folicular de células grandes, se pudo apreciar la presencia de trisomía 12 en uno de ellos. En 2 de 3 pacientes afectos de linfoma inmunoblástico se pudo ver una $t(8;14)(q24.1;q32.3)$, pero no trisomía 12. No se conoce el significado de estas anomalías, quizás ellas proporcionen una ventaja funcional al proceso neoplásico, por ello en los subtipos de linfomas ocurren defectos cromosómicos característicos.

Levine et al en 1985, analizaron mediante estudios citogenéticos en nódulos linfáticos u otras masas del tumor, 120 pacientes diagnosticados de diferentes subtipos de LNH. En su trabajo, el más extenso de los realizados en pacientes afectos de esta patología, indican que se disponen de pocos datos con respecto a las anomalías cromosómicas en los LNH, aunque casi todos los casos presentan anomalías cromosómicas y han sugerido que las anomalías cromosómicas se correlacionan con características morfológicas específicas. La $t(14;18)(q32;q21)$ ha sido asociada con los linfomas foliculares. En los 19 casos diagnósticos de LLCP las anomalías cromosómicas más frecuentes, afectan a los cromosomas 14 (53%), 11 (37%) y 12(32%). Las anomalías del cromosoma 12 son, fundamentalmente, trisomía 12 en 4 casos y una ruptura 12p13 en 2 casos, aunque dicen que la trisomía 12 no era más común en este subtipo que en los otros. En los 28 casos diagnosticados de linfoma folicular de células pequeñas las anomalías observadas con mayor frecuencia, afectaban a los cromosomas 14(89%) y 18(68%). En los 13 casos diagnosticados de linfoma folicular de células grandes, las anomalías del cromosoma 14 correspondían a un 85% y las del cromosoma 18 a un 62%. Ninguna anomalía específica de estos cromosomas fue más común que en los otros subtipos de linfomas. Por último en los 3 pacientes pertenecientes al grupo inmunoblástico de células grandes se pudo apreciar una $t(6;11)(q21;p14)$ en un caso y una $del(6)(q21)$ en 2 casos. En su trabajo concluyen

que dada la manera como las anomalías cromosómicas segregan, puede ser que ellas añadan información pronóstico significativa a la histológica y nos permitan predecir aquellos pacientes que tendrán una mayor supervivencia.

Juliusson et al en 1985, analizan mediante análisis citogenético muestras de SP de 29 pacientes con LLCP y sólo se obtuvieron metafases evaluables en 16 pacientes, de los cuales 9 presentaban trisomía 12. La trisomía 12 la asociaron con un peor pronóstico y parecía que la trisomía 12 era un marcador más para los linfomas que para la LLCB.

Cabanillas et al en 1986, obtuvieron metafases evaluables en 17 de 25 pacientes diagnosticados de varios subtipos de LNH. En muestras de nódulo linfático y MO de 2 pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células grandes se apreció la presencia de t(14;18) y en muestras de bazo de 1 de 3 pacientes diagnosticados de LLCP, se detectó la presencia de +12. No está claro si la presencia de una anomalía cromosómica específica tiene impacto en su pronóstico.

Yunis et al en 1987, vieron que varios pasos en la evolución clínica de las neoplasias humanas son asociadas con una variedad de defectos cromosómicos que podrían ser esenciales para el entendimiento del cancer. Encontraron, mediante análisis citogenético, en muestras de tejido linfoide fresco, 15 tipos de anomalías cromosómicas en un estudio de 71 pacientes con linfomas foliculares. Una t(14;18) observada en el 85% era el patrón determinante en el tipo folicular. Además de esta translocación, se observaron otras anomalías cromosómicas con una frecuencia variable y la mayoría correlacionadas con un subtipo histopatológico dado y un peor pronóstico. Una delección 6q junto con una completa o parcial +7 ó +12 ó las dos, fueron asociadas con el linfoma folicular de células grandes que a menudo proviene del linfoma folicular de células pequeñas (+12, en 1 de 7 pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células pequeñas y en 8 de 17 pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células grandes). Una +2 ó duplicación 2p aparece en todos los linfomas foliculares acompañando un curso clínico acelerado y una peor respuesta al tratamiento. Este estudio sugiere que varios defectos genómicos discretos pueden gobernar la evolución de una enfermedad maligna.

Nishida et al en 1989, estudian 17 pacientes con LNH mediante análisis citogenético. Observan una t(14;18) en 4 de los 5 pacientes con linfomas foliculares y una t(8;14) en 1 de los pacientes con linfoma inmunoblástico de células grandes. Dicen que las anomalías cromosómicas pueden tener valor pronóstico.

En este trabajo, se ha empleado HIS fluorescente en células en interfase, que es una técnica más simple y más rápida que el análisis citogenético clásico, para la detección de trisomía 12 en estos pacientes. Estos resultados fueron comparados con otros estudios que describen la presencia de trisomía 12 en diferentes subtipos de linfomas leucemizados mediante análisis citogenético, todos ellos en nódulo linfático o bazo, a excepción del trabajo de Juliusson que fue realizado en muestras de SP.

En el presente estudio la proporción de células control con dos señales era de 79% a 98% pero nunca 100%. 0%-2% de las células control normales tenían una señal de hibridación. Al igual que ocurría en la tricoleucemia, no se conoce si las células con cero o una señal representan nulisomías o monosomías 12, o si ellas son debidas a una peor penetración de la sonda, incompleta desnaturalización del ADN blanco o diana o posible daño del ADN durante el tiempo de almacenamiento de las células en solución de fijación. Se vieron tres señales en 1%-19% de las células. Las muestras fueron consideradas positivas para la trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación. Estos resultados son similares a otros que han sido previamente descritos (Pérez- Losada et al, 1991; Poddinche et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992; Chen et al, 1992a; Qumsiyeh y Tharapel, 1992).

En este trabajo se ha observado por medio de HIS fluorescente la presencia de trisomía 12 en varios subtipos de linfoma. Tras recaída del LNH, la trisomía 12 fue evidente en 5 pacientes (5/11; 45.5%) con LLCP (Tabla 1). Esta frecuencia es bastante elevada.

Tras recaída del LNH, la trisomía 12 fue también evidente, en 1 paciente con linfoma folicular de células grandes (1/3) (Tabla 1).

No se detectó mediante HIS fluorescente la presencia de trisomía 12 en los otros dos subtipos de LNH, inmunoblástico de células grandes y folicular de células pequeñas.

Pacientes con LLCP.

P1 (tabla 2) había estado a tratamiento con clorambucil alcanzándose la remisión clínica y analítica. Pero 2 años más tarde se apreció una recaída de la enfermedad observándose la presencia de trisomía 12, cuyo porcentaje de células trisómicas aumentó en sucesivas revisiones. Esta trisomía 12 se mantuvo pese al tratamiento con clorambucil y CHOP apreciándose una progresión de la enfermedad que llevó a su fallecimiento.

P2 fue tratado con clorambucil, obteniéndose una buena respuesta clínica y analítica y la trisomía 12 desapareció.

P3 alcanzó la RC tras una buena respuesta al tratamiento con radioterapia y CHOP para su LNH de bajo grado localizado a nivel perifaríngeo. Pero 2 años más tarde, su linfoma de bajo grado se transforma en un linfoma de grado intermedio y se observa la presencia de trisomía 12 que persiste pese al tratamiento con MIME, apreciándose asimismo una actividad intensa de su proceso neoplásico y un aumento en el porcentaje de células trisómicas.

P5 fue tratado inicialmente con COP, lográndose una RP de su enfermedad, mostrando un progreso clínico y analítico satisfactorio, así como ausencia de trisomía 12. Tras recaída de su linfoma, se apreció la presencia de trisomía 12, así como un aumento en su porcentaje, que persistió pese al tratamiento con CHOP y una progresión lenta de la enfermedad.

P6 había estado sometido a tratamiento con clorambucil y prednisona obteniéndose la remisión clínica y analítica. Se le suspendió el tratamiento, pero 2 años más tarde tras recaída de su linfoma se le objetivó la presencia de trisomía 12 que persistió pese al tratamiento con clorambucil y prednisona, observándose al mismo tiempo una progresión de su neoplasia.

P4 y P7 estaban sometidos a tratamiento con clorambucil y CHOP respectivamente hasta 2 meses después de iniciar este estudio, alcanzándose la remisión clínica y analítica y no se detectó la presencia de trisomía 12.

Los otros cuatro pacientes (P8, P9, P10 y P11) no habían estado ni se encontraron sometidos a tratamiento durante este estudio, encontrándose analíticamente estables, y no se observó la presencia de trisomía 12.

En los pacientes pertenecientes al grupo inmunoblástico de células grandes no se detectó la presencia de trisomía 12 en ninguno de los 4 pacientes estudiados así como tampoco en el paciente diagnosticado de linfoma folicular de células pequeñas.

En 1 de los 3 pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células grandes, se detectó la presencia de trisomía 12. Este paciente (P3) había estado sometido a tratamiento con CHOP lográndose la remisión clínica y analítica de la enfermedad y no se observó la presencia de trisomía 12. Tras recaída de su linfoma se le reinstaura el tratamiento con CHOP y se aprecia la presencia de trisomía 12 (10%). Los otros dos pacientes (P1 y P2) no habían estado sometidos a tratamiento y se encontraban analíticamente estacionarios y asintomáticos, no apreciándose la presencia de la trisomía 12.

Estos datos parecen indicar, al igual que ocurría en la tricoleucemia, que hay alguna correlación entre trisomía 12 y evolución en algunos subtipos de linfomas concretamente en el LLCP

y, quizás también, en el folicular de células grandes, pero en este caso sólo se han estudiado 3 casos que son muy pocos.

Estos pacientes no fueron estudiados en el momento del diagnóstico. Por ello no se puede saber:

a) si la positividad en la HIS fluorescente estaba presente en el momento del diagnóstico en aquellos pacientes que mostraban positividad a lo largo de su evolución (P1, P3, P6).

b) si P2 era negativo en el momento del diagnóstico o si el era inicialmente positivo. Se conoce que la mayoría de las leucemias y linfomas son asociados con anomalías cromosómicas características.

c) si P5 era positivo en el momento del diagnóstico o si el era inicialmente negativo.

A pesar de no disponer de estos datos, se cree que los datos de los que se disponen permiten indicar las conclusiones antes mencionadas.

Los trabajos mencionados anteriormente, tampoco fueron realizados en el momento del diagnóstico. En el trabajo de Juliusson et al en 1985, 7 de los pacientes que analizaron habían recibido tratamiento antes del estudio, incluso varios años antes del análisis citogenético. Yunis et al en 1982, estudiaron 27 pacientes antes del tratamiento y 18 pacientes habían recibido ya quimioterapia, radioterapia o ambas cuando fue iniciado su estudio. El análisis en los pacientes no tratados fue realizado en o dentro de pocos meses después de su diagnóstico. La mayoría de los pacientes tratados fueron estudiados dentro de 6 meses a 5 años después de su diagnóstico. Levine et al analizaron 78 pacientes en el momento del diagnóstico, antes de la recaída y 42 pacientes fueron estudiados en recaída.

Como en el presente estudio se ha empleado una sonda para el cromosoma 12 únicamente, no se puede valorar la presencia o ausencia y el significado de otras anomalías cromosómicas en estos pacientes.

En 1985 con el trabajo de Juliusson se tuvo la impresión que la trisomía 12 era más común entre los pacientes con LLCP y tenía un mayor pronóstico adverso que en la LLCB, pero con el estudio de un mayor número de pacientes y su seguimiento las diferencias desaparecieron. No obstante, en el presente estudio, mediante HIS fluorescente, se encuentra una elevada frecuencia de trisomía 12 en este grupo de pacientes en muestras de SP, al igual que en el trabajo de Juliusson, mediante análisis citogenético convencional. Esto quizás se pueda explicar porque, como ya se ha visto esta anomalía cromosómica es la que se encuentra más frecuentemente en la LLCB, y el LLCP

es una enfermedad muy similar a la LLCB, es el equivalente a la LLCB en el nódulo linfático. El que esta anomalía cromosómica aparezca en algunos pacientes antes del tratamiento indica que no es inducida por dicho tratamiento (P1, P2, P6). A excepción de Levine que había dicho que esta anomalía podría significar una peor supervivencia y Juliusson que significaba un peor pronóstico, los otros autores no sabían su significado. En este estudio se puede ver una relación entre la presencia de trisomía 12 y la evolución del LNH.

En este estudio se ve que los pacientes con LLCB (P1, P2, P3, P5, P6) presentan una evolución variable en el porcentaje de células trisómicas. Hay algunos pacientes que muestran esta trisomía 12 a lo largo de toda la evolución de la enfermedad (P1, P3, P6) y algunos pacientes adquieren células con trisomía 12 durante el curso de la enfermedad (P5), así como en otros pacientes esta trisomía 12 desaparece a lo largo de la evolución de la enfermedad del paciente (P2).

En los pacientes con linfoma folicular de células grandes se detectó la presencia de trisomía 12 en un paciente y también se relacionó su presencia con la evolución de la enfermedad. Yunis en 1982, vió la presencia de trisomía 12, en 1 de 3 pacientes estudiados y en 1987 en 8 de 17 pacientes analizados. En este estudio no se puede concluir nada sobre su importancia ya que sólo se analizaron 3 pacientes y su presencia fue vista sólo en uno de ellos, pero en este paciente que se ha analizado, se relaciona su presencia con la evolución de la enfermedad y se apreció también una evolución en el porcentaje de células trisómicas en este paciente (P3).

En los otros dos subtipos de LNH, folicular de células pequeñas e inmunoblástico no se ha encontrado presencia de trisomía 12 en los casos analizados, no obstante se ha estudiado un número muy reducido de casos. Únicamente, Yunis et al en 1987, habían descrito su presencia mediante análisis citogenético, en 1 de los 7 pacientes diagnosticados de linfoma folicular de células pequeñas. En el presente estudio, por medio de HIS fluorescente, se ha analizado únicamente un paciente con este diagnóstico en el que no se encontró trisomía 12, esto no es significativo ni extrapolable a lo que puede ocurrir entre estos pacientes.

En este estudio se puede ver como la HIS fluorescente con una sonda para el cromosoma 12 es un método sensible y rápido para la detección de la trisomía 12 en los pacientes con LNH y para controlar el porcentaje de células trisómicas a lo largo de la evolución de estos pacientes.

Se considera que la trisomía 12 podría ser un marcador útil, como indican los resultados del presente estudio, ya que los datos de los pacientes parecen indicar que hay alguna correlación entre

trisomía 12 y evolución en algunos subtipos de linfomas, aunque muchos más casos deberían ser estudiados para poder confirmar esta hipótesis.

Para confirmar la asociación de esta alteración cromosómica con un peor pronóstico o una evolución de la enfermedad, se requiere un estudio de un gran número de pacientes. Esta anomalía cromosómica no sólo es observada en un subtipo histológico. Esto sugiere que esta anomalía no siempre determina un fenotipo linfoide distinto.

IV. SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS DE ORIGEN T.

Los datos de cambios cromosómicos en los pacientes con SLPc de origen T son muy escasos.

Nowell et al en 1980 estudiaron mediante análisis citogenético, clones anormales en cultivos de células T de 9 pacientes con LLCT. Ningún cambio cromosómico consistente fue detectado en estos pacientes, los cromosomas afectados fundamentalmente eran 2, 14 y 18. Un paciente tenía trisomía 12, 18 y 19 y dos pacientes tenían un clon con una translocación que envolvía el cromosoma 14: uno era una translocación entre los cromosomas 14 y 18 y el otro entre los cromosomas 14 y 11.

En 1981 Sandberg analizó, mediante análisis citogenético nódulos linfáticos, bazo o masas de tejido en pacientes diagnosticados de linfomas cutáneos de células T. En este estudio, concluyen que la aneuploidía es muy frecuente en esta enfermedad, así como las anomalías cariotípicas numéricas y estructurales. Los cambios estructurales afectan fundamentalmente a los cromosomas 7, 14, 16, 6 y 9 en orden de frecuencia. Los cambios numéricos afectan fundamentalmente a los cromosomas 8, 15, 11, 17, 22 y 10. Así los cambios más frecuentes son una $t(4;14)$ que lleva a un $4q+$ y $14q-$, $t(2;9)$, $t(2;13)$, $17p+$, $19p+$, y otras, así como una gran variedad de cambios numéricos. En los pacientes con LLCT describieron la presencia de $14q+$ en algunos casos. Pero se desconocía si existía alguna correlación entre las anomalías cariotípicas y otras características de la enfermedad.

Ueshima et al en 1984 analizaron mediante estudios citogenéticos 3 pacientes con LLCT. Todos los pacientes tenían un reordenamiento del brazo largo del cromosoma 14, con una ruptura en la banda $14q11$, que puede conferir una ventaja proliferativa.

Zech et al en 1984 también vieron mediante análisis citogenético, que en los pacientes con LLCT la inversión del cromosoma 14, $inv(14)(q11.2q32.3)$, ocurre frecuentemente.

Knuutila et al en 1986, desarrollaron un método citogenético que permitía el análisis simultáneo de la morfología de la célula, fenotipo inmunológico, y cariotipo en la misma célula. Estudiaron dos pacientes con LLCB y vieron que la trisomía 12 en la LLCB ocurre en las células B pero no en las células T.

Autio et al en 1987, analizaron mediante la técnica MAC, que permite el análisis simultáneo de la morfología, fenotipo inmunológico y cariotipo de la misma célula mitótica, linfocitos de 14 pacientes con LLCB y uno con LLCT. En los pacientes con LLCT una inversión del cromosoma 14 es la anomalía cromosómica más frecuente.

Escudier et al en 1991 también confirmaron la restricción de la trisomía 12 a las células B y su ausencia en células T usando la técnica HIS fluorescente/FACS.

Debido a la dificultad que presentan los estudios cromosómicos en las células LLC neoplásicas, los estudios cromosómicos en estos pacientes son escasos así como en los pacientes afectos de síndrome de Sézary. Las células LLC neoplásicas tienen un bajo índice mitótico. Por ello, ha sido difícil inducir divisiones mitóticas en las células malignas en los cultivos de linfocitos o cuando se obtienen metafases, muchas veces son normales. HIS fluorescente en células en interfase tiene la capacidad de complementar las técnicas de citogenética clásicas. En este trabajo, se ha usado HIS fluorescente, en núcleos en interfase de muestras de SP, para detectar la trisomía 12 en pacientes con SLPc de origen T. Estos resultados fueron comparados con otros estudios llevados a cabo por medio de análisis citogenético en pacientes con SLPc de origen T.

Como ya se ha descrito anteriormente, en el presente estudio la proporción de células control con dos señales era de 95% a 98% pero nunca 100%. 1%-2% de las células control normales tenían una señal de hibridación. No se conoce si las células con cero o una señal representan nulisomías o monosomías 12, o si ellas son debidas a una peor penetración de la sonda, incompleta desnaturalización del ADN blanco o diana o posible daño del ADN durante el tiempo de almacenamiento de las células en solución de fijación. Se vieron tres señales en 1%-3% de las células. Las muestras fueron consideradas positivas para la trisomía 12 cuando $\geq 4\%$ de las células tenían tres señales de hibridación. Estos resultados son similares a otros que han sido previamente descritos (Pérez- Losada et al, 1991; Poddinche et al, 1991; Anastasi et al, 1992; Cuneo et al, 1992; Chen et al, 1992a; Qumsiyeh y Tharapel, 1992).

En el presente trabajo, no se ha observado por medio de HIS fluorescente la presencia de trisomía 12 en pacientes con SLPc de origen T, durante los 2 años de estudio. Estos datos coinciden con los previamente reportados, a excepción del estudio de Nowell en 1980.

Tras recaída de los SLPc, la trisomía 12 no fue evidente en ninguno de los 5 pacientes (tabla 1). P1, P2 y P3, diagnosticados de LLCT (tabla 3), alcanzaron la remisión clínica y analítica después de tratamiento con quimioterapia y no se observó la presencia de trisomía 12. Tras recaída de su LLCT, se reinstauró el tratamiento quimioterapéutico y tampoco se evidenció la presencia de trisomía 12.

P1, diagnosticado de síndrome de Sézary (tabla 3), mostró un progreso satisfactorio clínica y analíticamente, alcanzándose la remisión de su enfermedad tras el tratamiento con INF y prednisona y

no se detectó la presencia de trisomía 12. P2, también diagnosticado de síndrome de Sézary (tabla 3), alcanzó la remisión clínica y analítica de su enfermedad tras el tratamiento con INF y no se detectó la presencia de trisomía 12. Tras recaída de su linfoma se reinstauró el tratamiento con INF y tampoco se evidenció la presencia de trisomía 12.

En este estudio no se detectó la presencia de la trisomía 12 en estos pacientes, no pudiendo evidenciarse diferencias con respecto a su presencia y a la evolución de la enfermedad como ocurría en los pacientes afectados de LNH o de tricoleucemia.

Este estudio, a excepción del paciente P2, no fue hecho en el momento del diagnóstico, sino 1-5 años después del diagnóstico. Por ello se desconoce si en el momento del diagnóstico presentaba trisomía 12. Pero a pesar de la falta de esta información, los datos recogidos desde el comienzo de este estudio, se cree, se pueden apuntar las conclusiones que se indican.

Además muchos de los estudios antes mencionados no fueron realizados en el momento del diagnóstico. Así por ejemplo, los 3 pacientes analizados por Ueshima con LLCT, habían sido ya diagnosticados entre 2-5 años antes de que él realizara su estudio en muestras de SP y de MO.

Ya que sólo se empleó una sonda específica para el cromosoma 12 en este estudio, no se pudieron valorar la posibilidad que en estos pacientes podrían haber tenido otras anomalías cromosómicas.

La razón para la discrepancia entre el presente trabajo, que no encuentra trisomía 12 en ningún paciente con LLCT mediante HIS fluorescente, y el estudio de Nowell es debido a que el diagnóstico de los pacientes estudiados por él podría ser LLCB y no LLCT. Nowell encuentra en sus pacientes, pocos linfocitos B, un número superior al normal de linfocitos T y muchos linfocitos que clasifica como "null". Las células B cuando están enfermas, expresan pocas Igs de membrana y se confunden, por ello podría ser que esas células que Nowell clasificara como "null" fuesen linfocitos B.

En los otros estudios realizados mediante análisis citogenético no se detectó la presencia de trisomía 12 e incluso, Knuutila y Autio, mediante análisis citogenético, y Escudier mediante HIS fluorescente, demostraron que la trisomía 12 ocurría en células B y no en células T. En el presente estudio, sin las limitaciones que se han visto al emplear las técnicas citogenéticas convencionales, y mediante el uso de la HIS fluorescente, que es una técnica rápida y simple, no se ha visto tampoco la presencia de trisomía 12 en estos pacientes. Por ello la trisomía 12 no podría ser un marcador útil en los pacientes con SLPC de origen T, al contrario de lo que parece en pacientes con LLCB, tricoleucemia y LLCP, pero muchos más casos han de ser estudiados.

V. LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA.

La aplicación de la HIS para la detección del cromosoma Ph en LMC fue descrita inicialmente por Bartram et al en 1983. Emplearon HIS radioactiva con sondas tritadas e identificaron la translocación al contar granos de plata.

Arnoldus et al en 1990, estudiaron mediante HIS fluorescente, células en metafase y núcleos en interfase de muestras de MO de 3 pacientes con LMC y de SP de un donante sano. Esta colocalización fue vista en los 3 pacientes con LMC mientras que sólo en el 0.5% de los linfocitos normales se apreció esta colocalización.

Tkachuk et al en 1990, usaron HIS fluorescente para detectar la fusión bcr-abl en muestras de SP de un paciente y en muestras de MO de seis pacientes. La fusión fue detectada en todos los casos analizados, de los cuales tres eran citogenéticamente negativos.

Dewald et al en 1993, investigaron la utilidad de la HIS fluorescente con sondas para M-bcr y abl. El rango normal de fusión entre Mbc y abl fue establecido en la MO de 25 controles normales. Estudiaron las sondas en 35 muestras de MO de 5 sujetos normales y de 29 pacientes con LMC o LLA. Este método permitió la identificación del cromosoma Ph en pacientes con LMC. En células en metafase de pacientes con LLA este método estableció cromosomas Ph con puntos de ruptura en la región "minor" del bcr.

Estos estudios demuestran como HIS fluorescente es un método más sensible que la citogenética convencional para la detección del cromosoma Ph en la LMC.

En el presente estudio se ha demostrado, al igual que se venía apuntando en otros trabajos, como la HIS no radioactiva es más sensible para detectar el cromosoma Ph, con la ventaja añadida que la técnica permite el estudio de núcleos en interfase, que la citogenética convencional.

El análisis citogenético no fue posible en el P1, ya que no se pudieron obtener metafases para dicho análisis, debido a que el análisis citogenético convencional presenta serias limitaciones, como son que en muchos casos no se pueden obtener metafases analizables para el estudio como ocurrió en este caso.

Sin embargo el análisis por medio de HIS fluorescente pudo ser posible en los 3 casos. Uno de ellos, era citogenéticamente negativo (P1) y en cambio por medio de HIS fluorescente era Ph+, lo que demuestra la mayor sensibilidad de esta técnica como ya se indicaba en los trabajos antes mencionados. Los otros dos casos eran Ph+ (P2, P3) por medio de análisis citogenético convencional y de HIS fluorescente.

En este estudio se compararon dos protocolos de HIS fluorescente para la detección del cromosoma Ph en pacientes con LMC y se pudo ver como los dos protocolos de HIS permiten la detección de dicha translocación. En el primer protocolo, no se han empleado ningún pretratamiento, mientras que en el segundo protocolo, sí han empleado distintos pretratamientos (RNAsas para eliminar el ARN endógeno, pepsinas para eliminar las proteínas y formaldehído para fijar las células). Los dos protocolos permiten detectar el cromosoma Ph con igual sensibilidad, por ello no es estrictamente necesario someter a estos pretratamientos a las preparaciones para poder detectar el cromosoma Ph, simplificando por ello todavía más el protocolo de HIS fluorescente.

La detección del cromosoma Ph ya sea mediante análisis citogenético convencional o mediante HIS fluorescente, había sido hecha, principalmente, en muestras de MO, porque la enfermedad, fundamentalmente, estriba en una neoplasia del sistema granulopoyético de la MO, y en SP era más difícil detectar su presencia si no se encontraba el paciente en fase de evolución de la enfermedad.

En el presente estudio se realizó citogenética convencional e HIS fluorescente en SP de estos 3 pacientes con LMC. Se detectó la presencia de dicha translocación mediante citogenética en 2 casos, en el otro caso no se pudo realizar análisis citogenético. El análisis mediante HIS fluorescente, fue posible en los 3 casos. Los 3 pacientes Ph+, por HIS fluorescente, no estaban en fase de evolución de la enfermedad ya que estaba muy controlada por el tratamiento. En estos pacientes se detectó dicha translocación en un 45%, 38% y 72% respectivamente de núcleos en interfase. Esto permite demostrar también la sensibilidad de HIS fluorescente, ya que pese a que estaba ya muy controlada su enfermedad, se detecta la presencia de un cromosoma Ph en un porcentaje elevado, y además, en SP, ya que la mayor sensibilidad en la detección del cromosoma Ph, según distintos investigadores, es obtenida en muestras de MO.

El presente estudio fue realizado empleando una mezcla de sondas cósmidos marcadas con digoxigenina para la detección del gen bcr y de un cósmido conjugado con biotina para la detección del oncogén abl. Los cósmidos dan señales pequeñas pero visibles. Arnoldus et al, 1990, dicen que las librerías no pueden ser aplicadas con éxito a núcleos en interfase.

En este estudio se ha identificado en células en interfase o en metafase, cromosomas Ph con un Mbcr. Este es el lugar de ruptura en el 100% de las LMC. Dewald en 1993, indicó que esta técnica podría permitir diferenciar células en interfase o en metafase con un Mbcr de aquellos con un mbc.

Dewald indicó que ya que ninguno de los 10 controles normales tenían ninguna célula con más de una aparente señal de fusión Mbc^r/abl, HIS fluorescente parecía ser altamente sensible para la detección de células con múltiples cromosomas Ph. En el presente estudio, no se detectaron ni en los controles ni en las muestras de los 3 pacientes, ningunas células con más de un cromosoma Ph.

Este concepto es importante porque la observación de núcleos con múltiples cromosomas Ph ha sido asociada con los estadios más agresivos de LMC. Así, la utilidad de métodos citogenéticos para proporcionar evidencia de progresión de la enfermedad, podría ser aumentada significativamente, por el análisis de células con HIS fluorescente. En este estudio, no se ha encontrado más de un cromosoma Ph en cada uno de los pacientes, quizás pueda ser debido también a que estos pacientes estaban ya muy tratados y su enfermedad estaba ya muy controlada.

La posibilidad de resultados falso positivos debido a colocación al azar de señales abl y bcr en células normales es baja, teniendo en cuenta que el tamaño de las señales es pequeño comparado al tamaño de la célula. Resultados falso negativos debido a fracaso de la hibridación puede ocurrir, sin embargo, la optimización de la HIS y de los sistemas de detección reducen este problema.

La HIS puede ser de gran ayuda para detectar aberraciones cromosómicas estructurales, particularmente cuando la calidad de las metafases no es bastante buena para el análisis citogenético clásico.

VI. METODO DE HIS FLUORESCENTE

Las técnicas de HIS han sido usadas con éxito en la mayoría de los tejidos biológicos incluyendo células totales, secciones de tejidos, cromosomas y núcleos aislados. La técnica de HIS fluorescente está basada en el mismo principio simple del análisis de "Southern Blot", la capacidad del ADN de cadena única para unirse al ADN complementario. Numerosos investigadores han descrito DISTINTOS procedimientos detallados para HIS fluorescente (Pinkel et al, 1988 ; Rowley et al, 1990; Poddinghe et al, 1991; Le Beau 1993; Price et al, 1993; De Vita et al, 1993; Taberner et al, en prensa). Los pasos esenciales en HIS fluorescente son comunes en todos estos protocolos. Como en el análisis "Southern Blot", el ADN blanco se une a un sustrato; en el caso de HIS fluorescente, el ADN blanco es el ADN nuclear de las células en interfase o el ADN de los cromosomas en metafase que son fijados a un porta de cristal de microscopio (HIS fluorescente también puede ser llevado a cabo con preparaciones de MO, de SP o de tejidos fijados y seccionados). La sonda es marcada, comunmente por incorporación enzimática de nucleótidos modificados. Para permitir que se lleve a cabo la hibridación de secuencias complementarias, el ADN celular y el ADN de la sonda marcada son desnaturalizados por calor en una solución de formamida para formar ADN de cadena única. Una solución que contiene la sonda de ADN es aplicada al porta, los portas son cubiertos con cubres y sellados, y la hibridación tiene lugar por incubación toda la noche de 37°C a 40°C. Después, la sonda no unida es quitada por lavados en formamida-SSC, y los portas son procesados para la detección de la sonda.

Pero en cada uno de estos pasos generales de la técnica de HIS fluorescente, se pueden tener en cuenta algunas consideraciones importantes y que no son comunes a todos los métodos empleados, muchas de las cuales no se han empleado en este estudio, alcanzándose, igualmente, niveles de sensibilidad elevados.

La técnica de HIS por método no-radioactivo consta de cuatro apartados:

- 1) Preparación adecuada de la muestra y de los portas.
- 2) Tratamiento enzimático y fijación celular.
- 3) Hibridación.
- 4) Revelado inmunológico de la sonda hibridada.

VI.1. PREPARACION ADECUADA DE LA MUESTRA Y DE LOS PORTAS.

La metodología empleada en la **preparación de muestras** para HIS es variable.

En este estudio se ha empleado directamente muestras de SP en los tres protocolos de HIS fluorescente utilizados, para la detección de la trisomía 12 ó del cromosoma Ph, observándose correctamente la presencia de estas dos anomalías cromosómicas, a pesar de que numerosos investigadores indicaban que la mayor sensibilidad para la detección del cromosoma Ph o de trisomía 12 en pacientes con tricoleucemia era directamente en muestras de MO o de bazo [tejidos sólidos, que han de ser disgregados empleando métodos mecánicos (bisturí y pinzas) y/o enzimáticos], respectivamente y no en SP.

Otros investigadores han visto que se pueden utilizar también directamente improntas y preparaciones de citocentrífuga de diferentes tejidos, suspensiones celulares de tumores sólidos o incluso cortes de tejido incluidos en parafina.

En la mayoría de los pacientes analizados en este trabajo, el estudio no se realizó de forma inmediata por ello se fijaron las células en una solución 3:1 de metanol/ácido acético de forma idéntica a la utilizada en las técnicas citogenéticas habituales. De esta forma los núcleos celulares se almacenaron a -20°C hasta el momento de realizar la hibridación, no alterándose la calidad de los resultados de la hibridación, aunque estas muestras no estuvieron almacenadas más de dos meses, ya que Anastasi et al en 1992, vieron que el almacenamiento de las muestras durante largo período de tiempo en solución de fijación, deteriora las muestras, reduciendo la hibridación posterior.

Además, se le cambió el fijador al menos una vez al mes, para evitar el deterioro de las muestras por su almacenamiento en esta solución.

Preparación de los portas.

En el caso de los pacientes con LMC para la detección del cromosoma Ph, los portas fueron limpiados con alcohol/éter 1:1 mientras que para la detección de la trisomía 12 se emplearon portas que habían estado en metanol (al menos 1 día) y en agua (1 día), demostrando que son válidos uno u otro procedimiento de preparación de portas para la detección de anomalías cromosómicas.

VI.2. TRATAMIENTO ENZIMATICO Y FIJACION CELULAR.

El objetivo del tratamiento enzimático es facilitar la entrada de la sonda en el núcleo y permitir su hibridación con la secuencia de ADN correspondiente. La fijación con formaldehído de los núcleos interfásicos y de los cromosomas metafásicos contribuye a preservar su integridad morfológica durante la desnaturalización y la hibridación. En este estudio se puede ver como estos

pretratamientos son opcionales y aunque algunos investigadores decían que eran necesarios cuando se demanda una alta sensibilidad, ésta puede conseguirse sin su utilización.

Entre estos pretratamientos cabe destacar los siguientes:

1-Inactivación enzimática endógena. Cuando un enzima es usado como marcaje final, la actividad enzimática endógena puede tener que ser inactivada.

2-Digestión con RNasas. Este tratamiento sirve para quitar el ARN endógeno que puede reducir la eficiencia de la hibridación debido a que éstos pueden competir con la sonda marcada. Por otra parte, la posible formación de híbridos entre la sonda y estos RNAs aumenta el ruido de fondo y puede dificultar la interpretación de los resultados (Pardue et al, 1970).

3. Inhibición de RNasas. Si se utilizan sondas de ARN, puede ser necesario inhibir la actividad de las RNasas presentes en la preparación lo cual, por otra parte, asegura, la preservación de los RNAs de la preparación (Singer et al, 1989).

3- Digestión con enzimas proteolíticos. Este tratamiento sirve para aumentar la accesibilidad por medio de la digestión de las proteínas que están alrededor del ADN blanco facilitando la entrada de la sonda en el núcleo y permitiendo su hibridación con la secuencia de ADN correspondiente. Se ha demostrado que incrementa significativamente la eficacia de la hibridación y reduce el ruido de fondo. Se realiza por medio de incubación de las preparaciones en Proteinasa K o en pepsina (Burns et al, 1985).

4. Tratamiento detergente. Incubaciones con Triton X-100, NP-40 ó dodecilsulfato sódico pueden ser usadas cuando se sospecha que los componentes de membrana lipídicos no han sido extraídos por otros procedimientos como fijación, deshidratación y procedimientos de inactivación enzimática endógena.

6. Prehibridación. Cuando se observa demasiada tinción de fondo, se puede intentar una prehibridación, usando una mezcla que contiene todos los componentes de una mezcla de hibridación excepto la sonda y dextrán sulfato.

En 2 de las técnicas de HIS fluorescente empleadas en este estudio no se han empleado, ninguno de estos tratamientos enzimáticos alcanzándose igualmente una alta sensibilidad en la detección tanto de la trisomía 12 como del cromosoma Ph.

En la técnica de HIS fluorescente empleada para la detección de la trisomía 12, no se emplearon ninguno de estos pretratamientos, únicamente se utilizó un primer lavado en CIH 0.1N y 0.05% de Tritón X-100 que ayuda a eliminar el ruido de fondo.

En el primer protocolo empleado para la detección del cromosoma Ph, no se emplearon ninguno de estos pretratamientos, al contrario del segundo protocolo en el que se realizó primero una digestión con RNasas, que permite la digestión del ARN endógeno, y posteriormente una digestión con pepsina, para la digestión de las proteínas que están alrededor del ADN blanco. Al comparar los resultados obtenidos en estos dos protocolos, se aprecia una sensibilidad equivalente en la detección del cromosoma Ph mediante ambos procedimientos, con y sin ningún pretratamiento enzimático.

La fijación es uno de los aspectos esenciales en la preparación del material y no todos los fijadores son adecuados para las técnicas de hibridación. Se ha demostrado que las fijaciones con aldehídos incrementan la intensidad de la señal de hibridación y proporcionan resultados más reproducibles al mejorar la retención de los ácidos nucleicos en la preparación (Hafen et al, 1983).

Se ha visto que la utilización de formaldehído interfiere menos en la desnaturalización del ADN (Narayanswami y Hamkalo, 1987).

En este estudio, en el protocolo de HIS fluorescente para la detección de trisomía 12 y en el segundo protocolo de HIS para la detección del cromosoma Ph, el fijador empleado fue el formaldehído consiguiéndose excelentes resultados, reflejados en una intensa señal de hibridación, que es por ello reflejo de una buena retención de los ácidos nucleicos en la preparación, de una correcta desnaturalización del ADN retenido en la preparación para que éste pueda hibridar con la sonda y por último de que la fijación ha preservado correctamente la estructura del material. Pero este paso de fijación tampoco es estrictamente necesario, ya que en el primer protocolo de HIS para la detección del cromosoma Ph, no se emplea ningún fijador, y pese a ello, se consigue una buena retención de los ácidos nucleicos en la preparación y una correcta desnaturalización para su posterior hibridación con la sonda, traducido en una correcta detención del cromosoma Ph. El único tratamiento que se emplea en este caso, es un lavado en 2xSSC a 37°C, lo que envejece los cromosomas, haciéndolos por ellos menos sensibles a la sobredesnaturalización.

VI.3. HIBRIDACION.

En numerosos ensayos de HIS a ADN, así como en los tres protocolos vistos en este estudio, se ha observado que es imprescindible realizar un tratamiento de **desnaturalización** para que la sonda pueda hibridar con la secuencia de interés. La desnaturalización del ADN puede realizarse mediante incubación en medio alcalino a elevada temperatura o bien en presencia de formamida. En los 3 protocolos empleados en este estudio se empleó la formamida que desestabiliza los híbridos

reduciendo su temperatura de fusión (T_m) (1% formamida reduce 0.72°C la T_m de un ADN nativo) y en consecuencia permite realizar la hibridación a temperaturas más bajas (Bishop, 1972; Casey y Davidson, 1977). Así, por ejemplo, en presencia de formamida al 40-50% la HIS puede realizarse a $30-40^\circ\text{C}$. Este descenso en la temperatura de hibridación suele ser favorable para evitar el deterioro morfológico del material.

La presencia de formamida en la mezcla de hibridación eleva el nivel de astringencia evitando así en gran medida uniones inespecíficas de la sonda. La formamida se disocia en amonio y ácido fórmico, resultando en un aumento del pH bajo mezcla con solución acuosa. Por lo tanto numerosos investigadores han dicho que la formamida para ser usada en soluciones de hibridación ha de estar desionizada, pero en este estudio en el protocolo de HIS fluorescente para la detección de la trisomía 12 y en el primer protocolo de HIS fluorescente para la detección del cromosoma Ph se empleó formamida no desionizada, mientras que en el segundo protocolo empleado para la detección del cromosoma Ph se empleó formamida desionizada, demostrando que la formamida desionizada no es estrictamente necesaria, para la sensibilidad de la técnica de HIS fluorescente, para la detección de las anomalías cromosómicas.

Numerosos investigadores han indicado también que sea cual sea el método empleado para la desnaturalización es conveniente desnaturalizar la preparación justo antes de realizar la hibridación.

El tiempo de desnaturalización es variable dependiendo fundamentalmente de la concentración de formamida utilizada y del tipo de muestra a analizar. En este estudio vemos como en el caso de la detección de la trisomía 12 se emplean 4 minutos mientras que en la detección del cromosoma Ph se emplean 2 minutos. La preparación de hibridación no debe dejarse secar nunca ya que esto incrementa el ruido de fondo.

Condiciones de hibridación. Aunque la cinética de formación de híbridos "in situ" es poco conocida, se ha demostrado que es muy similar a la que presentan las reacciones de hibridación sobre filtro (Szabo et al, 1977). En consecuencia, cabe esperar que los factores que afectan a la tasa de hibridación y a la estabilidad de los híbridos sean los mismos en ambos casos. Un concepto básico a considerar en cualquier proceso de hibridación es la astringencia definida como el límite mínimo de homología o de estabilidad que debe presentar un híbrido para que su formación sea posible en las condiciones en las que se realiza la hibridación. Así en condiciones de alta astringencia sólo pueden formarse híbridos entre secuencias que compartan un elevado grado de complementariedad. Los dos factores principales que condicionan la astringencia de una hibridación son la temperatura y la

fuerza iónica del medio. En general las condiciones de alta astringencia están asociadas a temperaturas elevadas y a concentraciones salinas bajas.

Uno de los factores que condiciona la tasa de hibridación es la concentración de sonda, puesto que la formación de híbridos depende de los choques al azar entre las dos moléculas implicadas. La concentración de sonda necesaria en ensayos de HIS suele ser superior a la que se utiliza en otros tipos de hibridación, debido a que la interacción entre la sonda y su secuencia complementaria en la preparación está dificultada por la presencia de otros componentes celulares. Una posible estrategia para incrementar la tasa de hibridación consiste en utilizar polímeros de inertes que aumentan la concentración efectiva de sonda por exclusión de volumen. En el protocolo de HIS fluorescente empleado en este estudio para la detección de trisomía 12, se utilizó dextrán sulfato al 10% en la solución de hibridación, lo cual proporciona tasas de hibridación 10 veces más altas (Wahl et al, 1979).

La temperatura y la fuerza iónica del medio también influyen en la tasa de hibridación (Britten et al, 1974).

A bajas concentraciones salinas la tasa de hibridación aumenta proporcionalmente a la concentración de sales en la solución de hibridación. Por otra parte, la estabilidad de los híbridos es más alta a mayor fuerza iónica.

La Longitud del fragmento de la sonda también influye en la tasa de hibridación. Ya que con la HIS las moléculas de sonda tienen que difundir dentro de la matriz densa de células y cromosomas, la reducción de la longitud del fragmento es un prerequisite. La longitud óptima del fragmento es de 200-400 nucleótidos.

Otro factor que ha de ser considerado para una buena hibridación es la complejidad de la sonda (Landegent et al, 1987).

De acuerdo con los protocolos clásicos de HIS las preparaciones son hibridadas durante toda la noche (aproximadamente 12-18 h), como fue realizado en el presente estudio. Sin embargo, algunos autores han cuantificado la densidad de marcaje obtenida tras distintos tiempos de hibridación y han determinado que el máximo se alcanza a las 4-5 horas, después de las cuales el nivel de señal permanece constante (Binder et al, 1986). La temperatura de hibridación no debería bajar de 37°C para minimizar la hibridación cruzada de secuencias alfa satélite al centrómero de otros cromosomas. La temperatura de hibridación no debería subir de 37°C para asegurar intensidad de señal máxima.

Una vez realizada la hibridación, las preparaciones deben ser lavadas a fin de eliminar el exceso de sonda. Durante la hibridación se forman dúplex entre las secuencias perfectamente emparejadas y las menos homólogas. Para retirar la sonda hibridada a secuencias menos homólogas, las preparaciones son lavadas con la astringencia deseada. La astringencia de los lavados puede ser controlada variando las concentraciones de sal, de formamida y la temperatura. Es imprescindible que la hibridación permita la formación del híbrido deseado, pero serán las condiciones de lavado las que, en última instancia, permitan el mantenimiento de aquellos híbridos que presenten una determinada estabilidad. Los procesos de detección posteriores a la hibridación deben evitar cualquier tratamiento que pudiera producir desnaturalización.

VI.4. REVELADO INMUNOLOGICO DE LA SONDA.

Puede llevarse a cabo por dos métodos diferentes empleando método inmunofluorescente o inmunohistoquímico.

VI.4.1. Método fluorescente

Es el método empleado en los 3 protocolos de HIS fluorescente analizados en este estudio. Antes de empezar la detección inmunocitoquímica los lugares de unión inespecíficos tienen que ser bloqueados. Para ello se usa leche en polvo que reduce el fondo, como en el caso del segundo protocolo empleado para la detección del cromosoma Ph. El uso de leche en polvo en vez de BSA o suero normal en los tampones ha resultado ser muy ventajoso con respecto al fondo. No obstante en el caso del protocolo para la detección de trisomía 12 se han empleado altas concentraciones de sal (4xSSC) que proporcionan ventajas, ya que ayudan a reducir las señales de fondo a un mínimo, pero sólo se pueden emplear cuando la unión antígeno/anticuerpo sobrevive a estas condiciones.

Se pueden usar varias reacciones de detección para visualizar sondas de ADN biotiniladas y digoxigenadas en únicas y múltiples hibridaciones. Las sondas biotinadas pueden ser detectadas gracias a la alta afinidad que presenta la avidina frente a la biotina (Heitzman y Richard, 1974). Esta molécula es muy estable y puede unirse fácilmente, a anticuerpos o a moléculas marcadoras (fluorocromos, enzimas, oro coloidal) que permiten la detección de los híbridos formados sobre preparaciones citológicas. La avidina es una glicoproteína y en consecuencia puede unirse a determinados componentes celulares, lo cual no ocurre con la estreptavidina.

Para detectar pequeñas secuencias blanco de copia única el sistema biotin-avidín y su método de amplificación es preferido generalmente (Pinkel et al, 1986) y es el que se ha empleado en este estudio con óptimos resultados.

VI.4.2. Método inmunohistoquímico.

Pueden emplearse todos los enzimas utilizados en inmunocitoquímica. Los más usados son peroxidasa y fosfatasa alcalina. Con peroxidasa, la reacción DAB (Graham y Karnovsky, 1966; Scospi y Larson, 1986; Cremers et al, 1987) es la preferida. De las reacciones con fosfatasa alcalina la más usada es la reacción (BCIP/NBT) (Hopman et al, 1986).

VI.4.3. Amplificación inmunológica.

En aquellos casos en los que independientemente del método empleado para el revelado, la señal de hibridación no sea suficientemente visible o fuerte ha de llevarse a cabo una amplificación inmunológica de la señal. Después de la incubación con avidín-FITC, las señales son amplificadas por incubaciones seguidas con antiavidín biotinilado y avidín-FITC. Como la afinidad por el avidín-biotina y el antiavidín al avidín, es alta, estas incubaciones pueden ser hechas en altas concentraciones de sal (4xSSC Lawrence et al, 1988), lo cual ayuda a reducir al mínimo las señales de fondo, como se puede apreciar en este estudio en el protocolo de HIS fluorescente empleado para la detección de la trisomía 12.

Para la detección de grandes secuencias blanco de copia única como por ejemplo cósmidos, como es el caso en este estudio de la detección del cromosoma Ph, el sistema digoxigenina es una buena alternativa.

Los anticuerpos marcados con FITC pueden ser reemplazados por anticuerpos conjugados con otros fluorocromos como ácido acético aminometilcumarina (AMCA) (azul) (Khalfan et al, 1986), tetrametilrodamina (TRITC) (rojo) y "Texas red" (rojo profundo).

Se debe cuidar mucho la elección de las condiciones de sal correctas para cada incubación: generalmente se recomienda usar alta concentración de sal en los tampones inmunológicos, sin embargo no todas las interacciones antígeno-anticuerpo aguantan altas fuerzas iónicas.

En las reacciones de detección inmunocitoquímica nunca se debe dejar secar los portas durante los procedimientos inmunocitoquímicos, porque aumenta el ruido de fondo y los tampones de lavado deben contener detergentes no iónicos como Tween-20, Tritón X-100 y NP40 para reducir el fondo y prevenir que los portas se sequen. Así en el presente estudio se incluyeron estos detergentes no iónicos en los tampones de lavado: NP40 en el tampón 4xSSC para los lavados posthibridación en el protocolo de HIS fluorescente para la detección de la trisomía 12 y Tween-20 en el tampón 4T, en el segundo protocolo para la detección del cromosoma Ph.

Después de haber realizado las reacciones de tinción inmunocitoquímica, se realiza la contratinción general del ADN.

VI.4.4. Contratación general del ADN.

Para poder visualizar el material celular, los portas son contratañidos con fluorocromos que se unen al ADN, tales como el rojo fluorescente (IP) o con el azul fluorescente (DAPI). La tinción con DAPI induce un patrón de bandeo cromosómico que es idéntico a las bandas G ó Q; así DAPI es preferido para el análisis de células en metafase. Es aconsejable añadir un agente "antifade" tal como "p-phenylenediamine" (Johnson y Nogueira, 1981) ó n-propilgallate (Giloh y Sedat, 1982), ó DABCO (Johnson y Nogueira, 1981) al medio ya que por esta razón se retrasa la pérdida de fluorescencia o de color. En el presente estudio se le añade "p-phenylenediamine" como agente "antifade". A causa de su elevada eficacia cuántica, FITC es el fluorocromo más usado en HIS fluorescente. Se usa, principalmente, en combinación con el IP como una contratación y DABCO como un reactivo "antifade", aunque en este estudio, se empleó con "p-phenylenediamine" como reactivo "antifade". Ambos FITC y IP pueden ser vistos al mismo tiempo con luz de excitación azul apareciendo FITC como amarillo y IP como rojo/naranja. Próximo a FITC, TRITC se usa ampliamente. En este caso, al coincidir el espectro de emisión de TRITC y el del IP, éste no puede utilizarse, siendo sustituido por otro fluorocromo que emita en una longitud de onda diferente como el DAPI (75µg/mL). Al no sobreponerse prácticamente los espectros de emisión de FITC y de TRITC ambos fluorocromos pueden emplearse de forma simultánea en marcajes con dos sondas diferentes, como en el caso de la detección del cromosoma Ph en el presente estudio. En este caso se emplea como contratación nuclear el DAPI y el reactivo "antifade p-phenylenediamine". Debido a que TRITC fluoresce rojo bajo luz de excitación verde y DAPI fluoresce azul bajo luz de excitación ultravioleta, ambos fluorocromos pueden ser sólo visualizados mediante combinación de dos filtros fluorescentes diferentes, como son FITC y TRITC (Johnson y Nogueira, 1981).

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

I. RELACIONADAS CON EL METODO DE HIBRIDACION IN SITU (HIS) FLUORESCENTE UTILIZADO PARA LA DETECCION DE TRISOMIA 12.

1) Este método es más sencillo que otros protocolos de HIS fluorescente propuestos, siendo por ello más accesible a cualquier laboratorio. No son necesarios los pretratamientos, entre ellos, RNAsa y pepsina, comunes a distintos protocolos de HIS fluorescente, para eliminar el ruido de fondo y también para facilitar la entrada de la sonda en las células, simplificando por ello la técnica, pero manteniendo su sensibilidad.

II. GENERALES SOBRE LA DETECCION DE LA TRISOMIA 12 EN SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS (SLPc) DE ORIGEN B.

1) HIS fluorescente, en muestras de sangre periférica (SP), es una técnica sensible y rápida para la detección de trisomía 12 en estos pacientes.

2) El momento de detección de la trisomía 12 y su evolución en estos pacientes es variable, así algunos pacientes adquieren esta anomalía cromosómica en el curso de la enfermedad, mientras que otros pacientes la presentan durante toda su evolución.

3) Los datos del presente estudio parecen indicar que hay alguna correlación entre trisomía 12 y evolución de la enfermedad, por ello su presencia parece constituir un buen marcador de la evolución clínica del proceso. Serán necesarios estudios posteriores para confirmar esta hipótesis.

III. RELACIONADAS CON LA LEUCEMIA LINFATICA CRONICA DE ORIGEN B (LLCB).

1) El estudio comparativo de 14 pacientes mediante citogenética y mediante HIS fluorescente demuestra la mayor sensibilidad de la técnica de HIS fluorescente frente a la citogenética convencional, permitiendo determinar la presencia de trisomía 12 en una fracción de pacientes con LLCB no evaluables citogenéticamente o con un cariotipo normal.

2) La trisomía 12 se relaciona con el estadio, siendo más frecuente en los estadios avanzados de la LLCB. Asimismo, la presencia de trisomía 12 se relaciona con otros parámetros pronóstico de la LLCB. Así, los pacientes con trisomía 12 tienden a presentar una mayor incidencia de esplenomegalia y de adenopatías. Preséntan mayores niveles de leucocitosis periférica, menores valores de inmunoglobulina G (IgG) y patrón difuso de infiltración medular. Ello está de acuerdo con el estadio más avanzado visto en los pacientes con trisomía 12. Estos pacientes, en su mayoría, están previamente tratados y muestran una tendencia hacia una peor supervivencia.

Este estudio sugiere que la presencia de trisomía 12 en la LLCB podría ser un útil marcador para indicar un peor pronóstico en dicha enfermedad y que podría utilizarse la trisomía 12 en la LLCB, junto con otros factores pronóstico.

IV. RELACIONADAS CON LA TRICOLEUCEMIA.

1) La trisomía del cromosoma 12 se detectó en la tricoleucemia mediante HIS fluorescente con mayor frecuencia que la referida en otros estudios basados en análisis citogenético ya sea a través de cultivo de SP, incluso de cultivo de líneas celulares o bien mediante HIS.

V. RELACIONADAS CON LOS LINFOMAS LEUCEMIZADOS DE ORIGEN B.

1) Esta anomalía cromosómica no se observa sólo en un subtipo histológico. Esto sugiere que dicha anomalía no siempre viene determinada por un fenotipo linfoide distinto.

VI. RELACIONADAS CON LOS SLPc DE ORIGEN T.

1) No se ha observado la presencia de trisomía 12 en los pacientes con SLPc de origen T analizados en el presente estudio.

VII. RELACIONADAS CON LA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC).

1) HIS fluorescente es más sensible que los métodos de citogenética convencionales para la detección del cromosoma Filadelfia (Ph) y permite su detección no sólo en muestras de médula ósea (MO) sino incluso en muestras de SP, aunque no se encuentre el paciente en fase de evolución de la enfermedad, lo que demuestra también la mayor rentabilidad y comodidad de dicha técnica. La sensibilidad de HIS fluorescente para detectar núcleos con múltiples cromosomas Ph permite un mejor control y seguimiento de los pacientes con LMC.

2) No son necesarios los pretratamientos en los protocolos de HIS fluorescente para la detección del cromosoma Ph, simplificando por ello la técnica.

BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA.

1. Adachi M, Tefferi A and Greipp PR. Preferential linkage of bcl-2 to immunoglobulin light chain gene in chronic lymphocytic leukemia. *Journal of Experimental Medicine*, 1990; 171: 559-564.
2. Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW, and Westbrook CA. Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol*, 1990; 136: 131.
3. Anastasi J, Thangavelu M, Vardiman JW, Hooberman AL, Bian ML, Larson RA, and Le Beau MM. Interphase cytogenetic analysis detects minimal residual disease in a case of acute lymphoblastic leukemia and resolves the question of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 1991a; 77: 1087.
4. Anastasi J, Vardiman JW, Rudinsky R, Patel M, Nachman J, Rubin CM, and Le Beau MM. Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization: An analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1991b; 77: 2456.
5. Anastasi J, Le Beau MM, Vardiman JW et al. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood*, 1992; 79: 1796-1801.
6. Arnoldus EPJ, Wiegant J, Noordermeer IA, Wessels JW, Beverstock GC, Grosveld GC, Van der Ploeg M, Raap AK. Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet Cell Genet*, 1990; 54: 108-111.
7. Arnoldus EPJ, Dreef EJ, Noordermeer IA, et al. Feasibility of in situ hybridization with chromosome specific DNA probes to paraffin wax embedded tissues. *J Clin Pathol*, 1991; 44: 900-904.
8. Autio K, Elonen E, Teerenhovi L and Knuutila S. Cytogenetic and immunologic characterization of mitotic cells in chronic lymphocytic leukemia. *European Journal of Haematology*, 1987; 39: 289-298.
9. Baccarani M, Cavo M, Gobbi M et al. Staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1982; 59: 1191-1196.
10. Bandini G, Michallet M, Rosti G and Tura S. Bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 1991; 7: 251-253.

11. Bartl R, Frisch B, Burkhardt R et al. Assessment of bone marrow trephine in relation to staging in chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology*, 1982; 51: 1-15.
12. Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A et al. Translocation of c-abl oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 1983; 306: 277-281.
13. Bastion Y, Felman P, Dumontet C et al. Intensive radio-chemotherapy with peripheral blood stem cell transplantation in young patients with chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplantation*, 1992; 10: 467-468.
14. Bauman JGJ, Wiegant J, Borst P, Van Dujin P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochrome labeled RNA. *Exp Cell Res*, 1980; 138: 485-490.
15. Bauman JGJ, Wiegant J, Van Dujin P. Cytochemical hybridization with fluorochrome-labelled RNA. III. Increased sensitivity by the use of anti-fluorescein antibodies. *Histochemistry*, 1981; 73: 181-193.
16. Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT et al. The French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemias. *J Clin Pathol*, 1989; 42: 567-584.
17. Berard CW, Dorfman RF, Kaufman N (eds). *Malignant lymphoma*. Baltimore, Williams and Wilkins, 1987.
18. Berger R, Bernheim A, Valensi F and Flandrin G. 14q- in two hairy cell leukemia patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1985; 16: 91-93 (letter).
19. Binder M, Tourmente S, Roth J, Renaud M, Gehring WJ. In situ hybridization at the electron microscope level: localization of transcripts on ultrathin sections of Lowicryl K4M-embedded tissue using biotinylated probes and protein A-gold complexes. *J Cell Biol*, 1986; 102: 1646-1653.
20. Binet JL, Leparrier M, Dighiero G et al. A clinical staging system for chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1977; 40: 855-864.
21. Binet JL, Auquier A, Dighiero G et al. A new prognostic classification of chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer*, 1981; 48: 198-206.
22. Bird ML, Ueshima Y, Rowley JD et al. Chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia and their clinical correlations. *Leukemia*, 1989; 3: 182-191.

23. Bishop JO. Molecular hybridization of ribonucleic acid with large excess of deoxyribonucleic acid. *Biochem J*, 1972; 126: 171-185.
24. Boggs DR, Soffer SA, Wintrobe MM et al. factors influencing the duration of survival of patients with chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Medicine*, 1966; 40: 243-254.
25. Bloomfield CD, Goldman AI, Alimena G et al. Chromosome abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 1986; 67: 415-420.
26. Bouroncle BA, Wiseman BK, Doan CA. Leukemic reticuloendotheliosis. *Blood*, 1958, 13: 609-615.
27. Bouroncle BA. Leukemic reticuloendotheliosis (Hairy-cell leukemia). *Blood*, 1979; 53: 412-436.
28. Boveri T. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren* Jena: Fischer, 1914.
29. Brito-Babapulle V, Pittman S, Melo JV et al. The 14q+ marker in hairy cell leukemia. A cytogenetic study of 15 cases. *Leukemia Research*, 1986; 10: 131-138.
30. Brito-Babapulle V, Ellis J, Matutes E et al. Translocation t(11;14)(q13;q32) in lymphoid leukemias of B-cell type. *Blood*, 1991; 78 (supplement 1): 324 (abstract).
31. Britten RJ, Graham DE, Neufeld BR. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. *Methods in Enzymol*, 1974; 29E: 363-418.
32. Broder S, Bunn PA Jr. Cutaneous T cell lymphomas. *Semin Oncol*, 1980; 7: 310-331.
33. Brown AG, Ross FM, Dunne EM et al. Evidence for a new tumour suppressor locus (DBM) in human B-cell neoplasia telomeric to the retinoblastoma gene. *Nature Genetics*, 1993; 3: 67-72.
34. Brouet JC, Flandrin G, Sasportes M, Preud'Homme JL, Seligmann M. Chronic lymphocytic leukemia of T cell origin. *Lancet*, 1975; ii:890-893.
35. Burns J, Chan VTW, Jonasson JA, Fleming KA, Taylor S, McGee JO'D. Sensitive system for visualizing biotinylated DNA probes hybridized in situ: rapid sex determination of intact cells. *J Clinical Pathol*, 1985; 38: 1085-1092.
36. Butturini A and Gale RP. Oncogenes in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Research*, 1988; 12: 89-92.

37. Buun PA, Whang-Peng J, Carney DN, Schlam ML, Knutsen T, Gazdar AF. DNA content analysis by flow cytometry and cytogenetic analysis in mycosis fungoides and Sézary syndrome. Diagnostic and prognostic implications. *J Clin Invest*, 1980; 65: 1440-1448.
38. Caballero MD, González M, Cañizo MC et al. Concomitant chronic lymphocytic leukemia (CLL) and acute myeloid leukemia. Complete remission of CLL achieved with high-dose cytosine arabinoside. *Leukemia*, 1992: 856-858.
39. Cabanillas F, Trujillo JM, Barlogie B, McLaughlin P, Cork A, Butler JJ, Manning JT, Riggs SA. Chromosomal abnormalities in lymphoma and their correlations with nucleic acid flow cytometry. *Cancer Genet Cytogenet*, 1986; 21: 99-106.
40. Callen DF and Ford JH. Chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia revealed by TPA as a mitogen. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1983; 10: 87-93.
41. Casey J, Davidson N. Rates of formation and thermal stabilities of RNA/DNA and DNA/DNA duplexes at high concentrations of formamide. *Nucleic Acids Res*, 1977; 4: 1539.
42. Caspersson T, Gahrton G, Lindsten J and Zech L. Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Experimental Cell Research*, 1970; 63: 238-249.
43. Caspersson T, Lomakka G and Zech L. The 24 fluorescence patterns of the human metaphase chromosomes-distinguishing characters and variability. *Hereditas*, 1971; 67: 89-102.
44. Cassileth PA, Chevart B, Spiers ASD et al. Pentostatin induces durable remissions in hairy cell leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 1991; 9: 243-246.
45. Castoldi GL, Lanza F and Cuneo A. Cytogenetic aspects of B-cell chronic lymphocytic leukemia: their correlation with clinical stage and different polyclonal mitogens. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987; 26: 75-84.
46. Catovsky D and Foa R. *The Lymphoid Leukaemias*. London: Butterworth, 1990.
47. Catovsky D. Diagnosis and treatment of CLL variants. In Cheson BD (ed.) *Chronic Lymphocytic Leukemia. Scientific Advances and Clinical Developments*, 1993: pp 369-397. New York: Marcel Dekker.
48. Cawley JC, Burns GF, Hayhoe FGJ. A chronic lymphoproliferative disorder with distinctive features: a distinct variant of hairy-cell leukemia. *Leukemia Res*, 1980; 4: 547-559.

49. Cervantes F, Rozman C, Ballesta F et al. Leucemia mieloide crónica. Descripción de una serie de 207 casos. *Sangre*, 1983; 83: 140-150.
50. Cervantes F, Ballesta F, Milá M, Rozman C. Cytogenetic studies in blast crisis of Ph-positive chronic granulocytic leukemia: results and prognostic evaluation in 52 patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 1986; 21: 238-246.
51. Chanana AD, Cronkite EP and Rai KR. The role of extracorporeal irradiation of blood in the treatment of leukemia. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1976; 1: 539-545.
52. Chen Z, Morgan R, Berger CS and Sandberg AA. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1992a; 63: 62-69.
53. Chen Z, Morgan R, Stone JF and Sandberg AA. Fine tuning with 'FISH' of clinical stages in hematological disorders. *Blood*, 1992b; 80 (supplement 1): 26 (abstract).
54. Chen-Levy Z, Nourse J and Cleary ML. The bcl-2 candidate proto-oncogene product is a 24-kilodalton integral-membrane protein highly expressed in lymphoid cell lines and lymphomas carrying the t(14;18) translocation. *Molecular and Cellular Biology*, 1989; 9: 701-710.
55. Cheson BD, Bennet JM, Rai KR et al. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia (CLL): recommendations of the NCI-sponsored working group. *American Journal of Hematology*, 1988; 29: 152-163.
56. Cheson BD. Chronic lymphocytic leukemia: staging and prognostic factors. In Cheson BD (ed.) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances and Clinical Developments*, 253-280. New York: Marcel Dekker, 1993.
57. Ciscar F, Farreras P, Diagnóstico hematológico. Laboratorio y clínica. Vol. II. Editorial Jims. Barcelona. Tercera edición 1972. Capítulo 16, pp 1070-1147.
58. Coeur P, Gentilhomme O, Morel P and Germain D. Valeur pronostique de l'hémogramme et du myelogramme initial dans la leucémie lymphoïde chronique (étude statistique de 310 observations par la méthode actuarielle). *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1970; 10: 566-575.
59. Coignet L, Berthéas MF, Vasselon C, Jaubert J, Reynaud J, Calmard-Oriol P, Brizard CP, and Guyotat D. Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: interphase study by in situ hybridization in 75 patients.

60. Come SE, Jaffe ES, Andersen JC et al. Non-Hodgkin's lymphomas in leukemic phase: clinicopathologic correlations. *Am J Med*, 1980; 69: 667.
61. Conlan MG and Mosher DF. Concomitant chronic lymphocytic leukemia, acute myeloid leukemia, and thrombosis with protein C deficiency. *Cancer*, 1989; 63: 1398-1401.
62. Cox DR. Regression models and life tables. *J R Stat Soc B*, 1972; 34: 187-192.
63. Cremer T, Landegent J, Bruckner A, et al. Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs. *Hum Genet*, 1986; 74: 346.
64. Cremer T, Lichter P, Borden J, Ward DC, Manuelidis L. Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by in situ hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum Genet*, 1988a; 80: 235.
65. Cremer T, Tesin D, Hopman AHN, and Manuelidis L. Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by in situ hybridization with chemically modified DNA probes. *Exp Cell Res*, 1988b; 176: 199.
66. Cremers AFM, Jansen in de Wal N, Wiegant J, Dirks RW, Weisbeek P, Ploeg M van der, Landegent JE. Non-radioactive in situ hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast microscopy and electron microscopy. *Histochemistry*, 1987; 86: 609-615.
67. Crossen PE. Giemsa banding patterns in chronic lymphocytic leukaemia. *Humangenetik*, 1975; 27: 151-156.
68. Crossen PE and Horn HL. Origin of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987a; 28: 185-186.
69. Crossen PE, Godwin JM, Heaton DC and Tully SM. Chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia revealed by cytochalasin B and Epstein-Barr virus. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987b; 28: 93-100.
70. Cuneo A, Wlodarska I, Sayed Aly M et al. Non-radioactive in situ hybridization for the detection and monitoring of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 1992; 81: 192-196.
71. Dameshek W. Chronic lymphocytic leukemia-an accumulative disease of immunologically incompetent lymphocytes. *Blood*, 1967; 29: 566-584.

72. Datta T, Bauchinger M, Emerich B and Reinchle A. Chromosome analysis in chronic lymphocytic leukemia and related B-cell neoplasias. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1991; 55: 49-56.
73. Delhomme-Bachy M, Bertheas MF, Vasselon C et al. Chromosome studies in stimulated lymphocytes of 50 patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1992; 34: 75-82.
74. Delpero JR, Mouvenaeghel G, Gastaut JA et al. Splenectomy for hypersplenism in chronic lymphocytic leukemia and malignant non-Hodgkin's lymphoma. *British Journal of Surgery*, 1990; 77: 443-448.
75. De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Important advances in Oncology 1993. Capítulo 3: Fluorescence in situ Hybridization in Cancer Diagnosis: pp 29-45.
76. Dewald GW, Schad CR, Christensen ER et al. The application of fluorescent in situ hybridization to detect Mbc_r/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993; 71: 7-14.
77. Dhodapkar M, Tefferi A, Su J and Phyliky RL. Prognostic factors and survival in young adults with early and intermediate stage chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1992; 80 (supplement 1): 466 (abstract).
78. Dighiero G, Travade Ph, Chevret S et al (French Co-operative Group on CLL). B-cell chronic lymphocytic leukemia: present status and future directions. *Blood*, 1991; 78: 1901-1914.
79. Dillman RO. Monoclonal antibodies for treating cancer. *Annals of Internal Medicine*, 1989; 111: 592-603.
80. Doane LL, Ratain MJ and Golomb HM. Hairy cell leukemia. Current management. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 1990; 4: 489-502.
81. Döhner H, Bentz M, Pohl S et al. Trisomy 12 in chronic lymphoid neoplasms-a metaphase and interphase cytogenetic analysis. *Blood*, 1993; 7: 516-520.
82. Dubner HN, Crowley JJ and Schilling RF. Prognostic value of nucleoli and cell size in chronic lymphocytic leukemia. *American Journal of Hematology*, 1978; 4: 337-341.
83. Duchayne E, Delsol G, Kuhlein E et al. Hairy cell transformation of a B-cell chronic lymphocytic leukemia: a morphological, cytochemical, phenotypic and molecular study. *Leukemia*, 1991; 5: 150-155.

84. Eastmond DA, Pinkel D. Aneuploidy detection by analysis of interphase nuclei using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific probes. In: Resnick MA and Vig BK, eds. Mechanisms of chromosome distribution and aneuploidy. New York: Alan R. Liss, 1989, pp 277-284.
85. Edelson RL, Berger CL, Raafat J, Warburton D. Karyotype studies of cutaneous T cell lymphoma: evidence for clonal origin. *J Invest Dermatol*, 1979; 73: 548-550.
86. Einhorn S, Burvall K, Juliusson G et al. Molecular analysis of chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 1989; 3: 871-874.
87. Einhorn S, Meeker T, Juliusson G et al. No evidence of trisomy 12 or t(11;14) by molecular genetic techniques in chronic lymphocytic leukemia cells with a normal karyotype. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1990; 48: 183-192.
88. Emilia G, Torelli G, Di Prisco AU et al. Cytogenetic investigations in hairy cell leukemia. *Panminerva Medica*, 1985; 27: 175-182.
89. Engelhard M, Brittinger G, Heinz R et al. Chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and immunocytoma (LP-IC): clinical and prognostic relevance of this distinction. *Leukemia and Lymphoma*, 1991; 5 (supplement): 161-173.
90. Ersboll J, Schultz HB. Non Hodgkin's lymphomas; recent concepts in classification and treatment. *Eur J Haematol*, 1989 (suppl 48) 42: 15-29.
91. Escudier SM, Pereira-Leahy JM, Drach JW, et al. Fluorescence in situ hybridization and cytogenetic studies of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1993; 81: 2702-2707
92. Farreras P y Rozman C. *Medicina Interna*. Vol II. Ed. Doyma 12 edición. 1992; sección 14: pp 1569-1768.
93. Ferrant A, Michaux JL and Sokal G. Splenectomy in advanced chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1986; 58: 2130-2136.
94. Flandrin G and Brouet J-C. The Sézary cell; cytologic, cytochemical and immunologic studies. *Mayo Clinic Proceedings*, 1974; 49: 575-583.
95. Foon KA, Rai KR, Gale RP. Chronic Lymphocytic leukemia: new insights into biology and therapy. *Ann Intern Med*, 1990; 113: 525-539.

96. Foucar K, McKenna RW, Frizzera G and Brunning RD. Incidence and patterns of bone marrow and blood involvement by lymphoma in relationship to the Lukes-Collins classification. *Blood*, 1979; 54: 1417-1422.
97. Freedman AS. Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology*, 1990; 4: 405-429.
98. French Co-operative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Long-term results of the CHOP regimen in stage C chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology*, 1989; 73: 334-340.
99. French Co-operative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia. Natural history of stage A chronic lymphocytic leukaemia untreated patients. *British Journal of Haematology*, 1990; 76: 45-57.
100. French Co-operative Group on CLL. Therapeutic results from the trials managed by the French Co-operative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Leukemia and Lymphoma*, 1991; 5 (supplement): 83-88.
101. Gahrton G, Zech L, Robèrt K-H and Bird AG. Mitogenic stimulation of leukemic cells by Epstein-Barr virus. *New England Journal of Medicine*, 1979; 301: 438 (letter).
102. Gahrton G, Robèrt K-H, Friberg K et al. Extra chromosome 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet*, 1980a; i: 146 (letter).
103. Gahrton G, Robèrt K-H, Friberg K et al. Nonrandom chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia revealed by polyclonal B-cell-mitogen stimulation. *Blood*, 1980b; 56: 640-647.
104. Gahrton G, Robèrt K-H, Friberg K et al. Cytogenetic mapping of the duplicated segment of chromosome 12 in lymphoproliferative disorders. *Nature*, 1982; 297: 513-514.
105. Gahrton G, Juliusson G, Robèrt K-H and Friberg K. Role of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Reviews*, 1987; 1: 183-192.
106. Gale RP and Foon KR. Chronic lymphocytic leukemia. *Annals of Internal Medicine*, 1985; 103: 101-112.
107. Galton DAG, Wiltshaw E, Szur L et al. The use of chlorambucil and steroids in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology*, 1961; 7: 73-81.

108. Galton DAG. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Canadian Medical Association Journal*, 1966; 94: 1005-1010.
109. Geisler CH, Ralfkiaer E, Hansen MM et al. The bone marrow histological pattern has independent prognostic value in early stage chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 1986; 62: 47-54.
110. Geisler CH, Philip P and Hansen MM. B-cell chronic lymphocytic leukemia: clonal chromosome abnormalities and prognosis in 89 cases. *European Journal of Haematology*, 1989; 43: 397-403.
111. Geisler CH, Larsen JK, Hansen MM et al. Prognostic importance of flow cytometric immunophenotyping of 540 consecutive patients in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1991; 78: 1795-1802.
112. Ghani AM and Krause JR. Investigation of cell size and nuclear clefts as prognostic parameters in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1986; 58: 2233-2238.
113. Giloh H, Sedat JW. Fluorescence microscopy: Reduced photobleaching of rodhamine and fluorescein protein conjugates by n-propyl gallate. *Science*, 1982; 217: 1252-1255.
114. Goh K-O. Chromosomal abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1985; 16: 103-107.
115. Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med*, 1988; 108: 806-814.
116. Golomb HM, Lindgren V and Rowley JD. Chromosomal abnormalities in patients with hairy cell leukemia. *Cancer*, 1978a; 41: 1374-1380.
117. Golomb HM, Lindgren V and Rowley JD. Hairy-cell leukemia: an analysis of the chromosomes of 26 patients. *Virchows Archiv B Cell Pathology*, 1978b; 29: 113-120.
118. Golomb HM, Catovsky D, Golde DW. Hairy-cell leukemia. A clinical review based on 71 cases. *Ann Intern Med*, 1978; 89: 677-683.
119. Graham RC, Karnovsky MJ. The early stages of absorption of injected horse radish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J Histochem Cytochem*. 1966; 14: 291-302.

120. Gray JL, Jacobs and Block M. Bone marrow and peripheral blood lymphocytosis in the prognosis of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1974; 33: 1169-1178.
121. Gunz FW. The dread leukemias and the lymphomas: their nature and their prospects. In Wintrobe MM (ed). *Blood, Pure and Eloquent* 1980, pp 511-546. New York: Mc Graw Hill.
122. Habeshaw JA, Lauder I (eds). *Malignant lymphomas. Current problems in tumor pathology*. edimburgo, Churchill-Livingstone, 1988.
123. Hafen E, Kuroiwa A, Gehring WJ. Spatial distribution of transcripts from the segmentation gene *fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development *Cell*, 1983; 37: 833-841.
124. Haglund U, Juliusson G, Stellan B, and Gahrton G. Hairy cell leukemia is characterized by clonal chromosome abnormalities clustered to specific regions. *Blood*, 1994; 83: 2637-2645.
125. Han T, Sadamori N, Takeuchi J et al. Clonal chromosome abnormalities in patients with Waldenström and CLL-associated Macroglobulinemia: significance of trisomy 12. *Blood*, 1983; 62: 525-531.
126. Han T, Ozer H, Bloom M et al. The presence of monoclonal cytoplasmic immunoglobulins in leukemic B cells from the patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1982; 59: 435-438.
127. Han T, Barcos M, Emrich I et al. Bone marrow infiltration patterns and their prognostic significance in chronic lymphocytic leukemia: Correlations with clinical, immunologic, phenotypic, and cytogenetic data. *Journal of Clinical Oncology*, 1984a; 2: 562-570.
128. Han T, Ozer H, Sadamori N et al. Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1984b; 310: 288-292.
129. Han T, Ohtaki K, Sadamori N et al. Cytogenetic evidence for clonal evolution in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1986; 23: 321-328.
130. Han T, Henderson ES, Emrich LJ and Sandberg AS. Prognostic significance of karyotypic abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia: an update. *Seminars in Hematology*, 1987; 24: 257-263.
131. Han T, Sadamori N, Block AMW et al. Cytogenetic studies in chronic lymphocytic leukemia, prolymphocytic leukemia and hairy cell leukemia: a progress report. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1988; 30: 393-395.

132. Han T, Dadey B, Xiao H, Block AW, Henderson ES. Cytogenetically abnormal leukemia cell lines established from patients with adult B-cell leukemias. Are cultured cell lines with normal karyotypes leukemia? (Meeting abstract). *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res*, 1989; 30: A891.
133. Hansen MM. Chronic lymphocytic leukemia. Clinical studies based on 189 cases followed for a long time. *Scandinavian Journal of Haematology*, 1973. Supplement 18: 1-286.
134. Hansen MM, Andersen E, Birgemes H et al. CHOP versus chlorambucil plus prednisolone in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 1991; 5 (supplement): 97-100.
135. Hanson CA, Gribbin TE, Schnitzer B et al. CD11c (Leu-M5) expression characterizes a B-cell chronic lymphoproliferative disorder with features of both chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood*, 1990; 76: 2360-2367.
136. Harper ME, Ullrich A, Saunders GF. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of the chromosome 11. *Chromosoma*, 1981; 83: 431-439.
137. Hayhoe FGJ. Chronic lymphocytic leukemia: clinical aspects. In *Leukaemia: Research and Clinical Practice*, 1960; pp 262-287. Boston: Little Brown.
138. Heinz R, Stacher A, Pralle H et al (Kiel Lymphoma Study Group). Lymphoplasmacytic/lymphoplasmacytoid lymphoma: a clinical entity distinct from chronic lymphocytic leukaemia. *Blut*, 1981; 43: 183-192.
139. Heitzmann H, Richard FM. Use of the avidin-biotin complex for specific staining of biological membranes in electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1974; 71: 3537-3541.
140. Henderson ES and Han T. Current therapy of acute and chronic leukemia in adults. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 1986; 36: 322-350.
141. Hernández-Nieto L, Montserrat E, Muncunill J et al. Leucemia linfática crónica. Tipos de patrón histopatológico medular y su relación con los estadios clínicos. *Sangre (Barcelona)*, 1977; 22: 882-889.
142. Hopman AHN, Wiegant J, Raap AK, Landegent JE, Van der Ploeg M, Van Duijn P. Bi-color detection of two target DNAs by non-radioactive in situ hybridization. *Histochemistry*, 1986; 85: 1-4.
143. Hopman AHM, Wiegant J, and van Duijn P. Mercurated nucleic acid probes, a new principle for non-radioactive in situ hybridization. *Exp Cell Res*, 1987; 169: 357.

144. Hopman AHN, Ramaekers FCS, Vooijs GP. Interphase cytogenetics on solid tumors. In: Polak JM and McGee JO, eds. *In situ hybridization: principles and practice*. Oxford: University Press, 1989, pp 165-186.
145. Hopman AHN, Moesker O, Smeets WGB, Pauwels RPE, Vooijs GP, and Ramaekers FCS. Numerical chromosome 1, 7, 9, and 11 aberrations in bladder cancer detected by *in situ* hybridization. *Cancer Res*, 1991; 51: 644.
146. Huret JL, Mossafa H, Brizard A et al. Karyotypes of 33 patients with clonal aberrations in chronic lymphocytic leukaemia. Review of 216 abnormal karyotypes in chronic lymphocytic leukaemia. *Annales de Génétique*, 1989; 32: 155-159.
147. International Workshop on CLL. Chronic Lymphocytic leukemia: proposals for a revised prognostic staging system. *Br J Haematol*, 1981; 48: 365-367.
148. International Workshop on CLL. Recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Annals of Internal Medicine*, 1989a; 110: 236-238.
149. International Workshop on CLL. Prognostic features of early chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet*, 1989b; ii: 968-969.
150. Jaksic B and Vitale B. A new parameter in chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology*, 1981; 49: 405-413.
151. Jaksic B, Brugiarelli M. High-dose continuous chlorambucil vs. intermittent chlorambucil plus prednisone for treatment of B-CLL-IGCI CLL-01 Trial. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1988; 30 NRFH: 437-442.
152. Jandl JH. Polymphocytic and hairy cell leukemias. In Jandl JH (ed.) *Blood, Textbook of Hematology*, 1987, pp 779-800. Boston: Little, Brown.
153. Jansen J, Schuit HRE, Meijer CJLM et al. Cell markers in hairy cell leukemia studied from cells of 51 patients. *Blood*, 1982a; 59: 52-60.
154. Jansen J, Le Bien TW and Kersey JH. The phenotype of neoplastic cells of hairy cell leukemia studied with monoclonal antibodies. *Blood*, 1982b; 59: 609-614.
155. Jarque I, Sanz G, Gomis F et al. Leucemia linfática crónica (II). Análisis de factores pronósticos y desarrollo de modelos predictivos de supervivencia. *Sangre*, 1991; 34: 285-294.

156. Jarque I, Palau J, Sanz GF et al. Delayed complete response following BMT in CLL. Abstracts of the 19th Annual Meeting of the EBMT, January 17-21 1993, Garmisch-Partenkirchen, Germany, pp 10.
157. Jenkins RB, Le Beau MM, Kraker WJ, et al. Interphase fluorescence in situ hybridization: A sensitive method for trisomy 8 detection in bone marrow specimens. *Blood*, 1992; 79: 3307.
158. Jhanwag SC, Neel BG, Hayward WS, Chaganti RSK. Localization of the cellular oncogenes ABL, SIS and FES on human germ-line chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 1984; 38: 73-75.
159. John H. Bimstiel M, Jones K. RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 1969; 223: 582-587.
160. Johnson GD and Nogueira GM. A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *Journal of Immunological Methods*, 1981; 43: 349-350.
161. Jovin TM, and Arndt-Jovin DJ. Luminiscence digital imaging microscopy. *Annu Rev Biophys Chem*, 1989; 18: 271.
162. Juliusson G and Gahrton G. Abnormal/normal metaphase ratio and prognosis in chronic B-lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1985; 18: 307-313.
163. Juliusson G, Robért k-H, Nilsson B and Gahrton G. Prognostic value of B-cell mitogen-induced and spontaneous thymidine uptake in vitro in chronic B-lymphocytic leukaemia cells. *British Journal of Haematology*, 1985a; 60: 429-436.
164. Juliusson G, Robért k-H, Ost A et al. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood*, 1985b; 65: 134-141.
165. Juliusson G, Robért k-H, Ost A et al. Del (3) (p13) in B-prolymphocytic leukemia, a new nonrandom chromosomal aberration. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1985c; 14: 191-195.
166. Juliusson G. Immunological and cytogenetic studies improve prognosis prediction in chronic B-lymphocytic leukemia: a multivariate analysis of 24 variables. *Cancer*, 1986; 58: 688-692.
167. Juliusson G and Gahrton G. Clinical implications of CLL cell proliferation in vitro. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1988a, 30: 399-401.

168. Juliusson G, Friberg K and Gahrton G. Consistency of chromosomal aberrations in chronic B-lymphocytic leukemia. A longitudinal cytogenetic study of 41 patients. *Cancer*, 1988b; 62: 500-506.
169. Juliusson G and Gahrton G. Chromosomal aberrations in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Pathogenetic and clinical implication. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1990a; 45: 143-160.
170. Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *New England Journal of Medicine*, 1990b; 323: 720-724.
171. Juliusson G, Oscier D and Gahrton G for the IWCCLL. Cytogenetic findings and survival in B-cell chronic lymphocytic leukemia. Second international compilation of data on 662 patients. *Leukemia and Lymphoma*, 1991; 5 (supplement): 21-25.
172. Juliusson G and Liliemark J. Rapid recovery from cytopenia in hairy cell leukemia after treatment with 2-chloro-2'-Deoxyadenosine (CdA): relation to opportunistic infections. *Blood*, 1992; 79: 888-894.
173. Juliusson G, Haglund U, Gahrton G. Constitutional and acquired abnormalities of chromosome 5 band q13 in patients with hairy cell leukaemia. *Blood*, 1993a; 82 (supplement 1): (abstract).
174. Juliusson G and Gahrton G. Chromosome abnormalities in B-cell chronic lymphocytic leukemia. In Cheson BD (ed) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances and Clinical Developments*, 1993b; pp 83-103. New York: Marcel Dekker.
175. Kaplan EL and Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observation. *J Am Stat Assoc*, 1958; 53: 457-461.
176. Kay NE, Oken MM, Mazza JJ and Bradley EC. Evidence for tumor reduction in refractory or relapsed B CLL patients with infusional interleukin 2. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1988; 30: 475-478.
177. Kay NE, Peterson LC and Ranheim E. Molecular and protein analysis of the retinoblastoma (13q12-14) locus in a subset of B-CLL patients with a retinoblastoma locus abnormality. *Blood*, 1991; 78 (supplement 1): 385 (abstract).
178. Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M et al. Fluradabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1989; 74: 19-25.

179. Keating MJ. Fluradabine phosphate in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Oncology*, 1990; 17 (supplement 8): 49-62.
180. Keating M. Chemotherapy of chronic lymphocytic leukemia. In Cheson BD (ed) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances and Clinical Developments*, 1993; pp 297-336. New York: Marcel Dekker.
181. Khalid G, Li Y-S, Flemans RJ and Hayhoe FGJ. Chromosomal abnormalities in a case of hairy cell leukemia. *Leukemia Research*, 1981; 5: 431-435.
182. Khalfan H, Abuknesha R, Rand-Weaver R, Price RG, Robinson D. Aminomethyl coumarin acetic acid: a new fluorescent labelling agent for proteins. *Histochem J*, 1986; 18: 497-499.
183. Khouri I, Thomas M, Anderson B et al. Purged autologous bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia : preliminary results. *Blood*, 1992; 80 (supplement 1): 66 (abstract).
184. Knuutila S, Elonen E, Teerenhovi L et al. Trisomy 12 in B cells of patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1986; 314: 865-869.
185. Kristoffersson U, Heim S, Mandahl N et al. Prognostic implication of cytogenetic findings in 106 patients with non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987; 25: 55-64.
186. Kurzrock R, Gutterman JU and Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome- positive leukemias. *New England Journal of Medicine*, 1988; 319: 990-998.
187. Lalkin A, Lishner M, Gaber E et al. In situ hybridization: a simple and sensitive method for detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993; 70: 21-24
188. Landegent JE, Jansen In de Wal N, Baan RA, Hoeumakers JHJ, Vn der Ploeg M. 2-acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp Cell Res*, 1984; 153: 61-72.
189. Landegent JE, Jansen in de Wahl, Dirks RW, Baas F, Van der Ploeg M. Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive in situ hybridization. *Hum Genet*, 1987; 77: 366-373.
190. Langer PR, Waldrop AA, y Ward DC. Enzymatic synthesis of biotin labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 6633.

191. Lawrence JH, Low-Beer BVA and Carpender JWJ. Chronic lymphocytic leukemia: study of 100 patients with radioactive phosphorus. *Journal of the American Medical Association*, 1949; 140: 585-588.
192. Lawrence JB, Villnave CA, Singer RH. Interphase chromatin and chromosome mapping by fluorescence detection of in situ hybridization reveals the presence and orientation of two closely linked copies of EBV in a human lymphoblastoid cell line. *Cell*, 1988; 52: 51-61.
193. Leary JL, Brigati DJ, Ward DA. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 4045-4049.
194. Leavell BS. Chronic leukemia: a study of incidence and factors influencing the duration of life. *American Journal of the Medical Sciences*, 1938; 196: 329-340.
195. Le Beau MM, y Rowley JD. Cytogenetics. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, y Lichtman MA, eds. *Hematology*. New York, McGraw-Hill, 1990: 78-88.
196. Le Beau MM. Detecting genetic changes in human tumor cells: have scientists "gone fishing?". *Blood*, 1993; 81: 1979-1983.
197. Lee JS, Dixon DO, Kantarjian HM et al. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate regression analysis of 325 untreated patients. *Blood*, 1987; 69: 929-936.
198. Lele KP, Filippa DA and Chaganti RSK. Cytogenetic studies of hairy cell leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1981; 4: 325-330.
199. Lennert K, Tamm I and Wacker H-H. Histopathology and immunocytochemistry of lymph node biopsies in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leukemia and Lymphoma*, 1991; 5 (supplement): 157-160.
200. Levine EG, Arthur DC, Frizzera G, Peterson BA, Hurd DD, Bloomfield CD. There are differences in cytogenetic abnormalities among histologic subtypes of the non-hodgkin's lymphomas. *Blood*, 1985; 66: 1414-1422.
201. Lewis SM, Verwilghen RL. Dyserythropoiesis and dyserythropoietic anaemia. *Br J Haematol*, 1972; 23: 1-3.
202. Lewis JP, Tanke HJ, Raap AK et al. Hairy cell leukemia (HCL): an interphase cytogenetic study. *Leukemia*, 1993; 7: 1334-1338.

203. Lichter P, Cremer T, Borden J, Manuelidis L, y Ward DC. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ supression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet*, 1988; 80: 224.
204. Lichter P, y Ward DC. Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age? *Nature*, 1990; 343: 448.
205. Lichter P, Boyle AL, Cremer T, Ward DC. Analysis of genes and chromosomes by non-isotopic in situ hybridization. *Genet Anal Techn Appl*, 1991; 8: 24-35.
206. Lipford E, Wright JJ, Urba W et al. Refinement of lymphoma cytogenetics by the chromosome 18q21 major breakpoint region. *Blood*, 1987; 70: 1816-1823.
207. Lipshutz MD, Mir R, Rai KR et al. Bone marrow biopsy and clinical staging in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1980; 46: 1422-1427.
208. Liu Y, Grandér D, Söderhäll S et al. Retinoblastoma gene deletions in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1992; 4: 250-256.
209. Liu Y, Szekely L, Grandér D et al. Chronic lymphocytic leukaemia cells with allelic deletions at 13q14 commonly have one intact RB1 gene. Evidence for a role of an adjacent locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1993; (in press).
210. Luo H, Biron G, Rubio M et al. IL-4 displays potent in vitro anti-proliferative activity in B chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1990; 76 (supplement 1): 298 (abstract).
211. Mandelli F, De Rossi G, Mancini P et al. Prognosis in chronic lymphocytic leukemia: a retrospective multicentric study from the GIMEMA group. *Journal of Clinical Oncology*, 1987; 5: 398-406.
212. McElwain JT, Lister TA (eds). *The lymphomas*. Baillière's Clinical Haematology, 1987; 1: 1-269.
213. McKenna RW, Bloomfield CD and Brunning RD. Nodular lymphoma; bone marrow and blood manifestations. *Cancer*, 1975; 36: 428-440.
214. McKenna RW, Arthur DC, Gajl-Peczalska KJ et al. Granulated T cell lymphocytosis with neutropenia: malignant or benign chronic lymphoproliferative disorder?. *Blood*, 1985; 66: 259-266.
215. Mecucci C, Delannoy A and van den Berghe H. The origin of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1988; 36: 203-204.

216. Meeker TC, Grimaldi JC, O'Rourke R et al. An additional breakpoint region in the bcl-1 locus associated with the t(11;14)(q13;q32) translocation of B-lymphocytic malignancy. *Blood*, 1989; 74: 1801-1806.
217. Melo JV, Catovsky D, Galton DAG. The relationship between chronic lymphocytic leukaemia and prolymphocytic leukaemia. I. Clinical and laboratory features of 300 patients and characterization of an intermediate group. *Br J Haematol*, 1986; 63: 377-388.
218. Melo JV, Robinson DSF, Oliveira MP et al. Morphology and immunology of circulating cells in leukaemic phase of follicular lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*, 1988; 41: 951-959.
219. Michallet M, Corront B, Hollard D et al. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia: 17 cases (report from the EBMT). *Bone Marrow Transplantation*, 1991; 7: 275-279.
220. Minot BG and Isaacs R. Lymphatic leukemia: age, incidence, duration and benefit derived from irradiation. *Boston Medical and Surgical Journal*, 1924; 191: 1-9.
221. Mitelman F and Levan G. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasms. IV. A survey of 1871 cases. *Hereditas*, 1981; 95: 79-139.
222. Mitelman F and Heim S. *Cancer cytogenetics*. New York, Liss, 1989.
223. Mitelman F, Kaneko Y, y Trent J. Report of the committee on chromosome changes in neoplasia (HGMII). *Cytogenet Cell Genet*, 1991; 58: 1053.
224. Molica S and Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1987; 60: 2712-2716.
225. Montserrat E and Rozman C. Combination chemotherapy in chronic lymphocytic leukemia: a brief review. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1984; 26: 87-89.
226. Montserrat E, Sánchez-Bisonó J, Viñolas N et al. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *British Journal of Haematology*, 1986; 62: 567-575.
227. Montserrat E and Rozman C. Clinicopathologic staging of chronic lymphocytic leukemia. In Gale RP and Rai KR (eds) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Recent Progress and Future Directions*, 1987: 215-224. New York: Alan R. Liss.

228. Montserrat E and Rozman C. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia. In Polliack and Catovsky D (eds) *Chronic Lymphocytic Leukemia*, 1988: 111-112. London: Harwood Academic Press.

229. Montserrat E. Tratamiento de los linfomas no hodgkinianos. *Med Clin*, 1989; 91: 104-108.

230. Montserrat E, Gomis F, Vallespi T et al. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood*, 1991a; 78: 1545-1551.

231. Montserrat E, Viñolas N, Reverter JC et al. Smouldering chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia and Lymphoma*, 1991b; 5 (supplement): 183-187.

232. Montserrat E, Villamor N, Urbano-Ispizua A et al. Treatment of early stage B-chronic lymphocytic leukemia with alpha-2b interferon after chlorambucil reduction of the tumoral mass. *Annals of Hematology*, 1991c; 63: 15-19.

233. Montserrat E, Gale RP and Rozman C. Bone marrow transplants for chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, 1992; 6: 619-622.

234. Montserrat E, Viñolas N, Reverter JC and Rozman C. Chronic lymphocytic leukemia in early stage: "smoldering" and "active" forms. In Cheson BD (ed) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances and Clinical Developments*, 1993; 281-296. New York: Marcel Dekker.

235. Moyzis RK, Albright KL, Bartholdi MF, et al. Human chromosome specific repetitive DNA sequences: Novel markers for genetic analysis. *Chromosoma*, 1987; 95: 375.

236. Nacheva E, Fischer P, O'Connor S et al. Complex chromosomal rearrangements in an unusual variant of hairy cell leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1992; 62: 186-190.

237. Narayanswami S, Hamkalo BA. Hybridization to chromatin and whole chromosome mounts. In: *Electronmicroscopy in molecular biology: a practical approach*. J. Sommerville and U. Scheer (eds). IRL Press, Oxford, UK, 1987: pp 215-232.

238. Nederlof PM, Robinson D, Abuknesha R, Wiegant J, Hopman AHN, Tanke HJ, and Raap AK. Three-color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry*, 1989; 10: 20.

239. Nishida K, Taniwaki M, Misawa S and Abe T. Nonrandom rearrangement of chromosome 14 at band q32.33 in human lymphoid malignancies with mature B-cell phenotype. *Cancer Research*, 1989; 49: 1275-1281.

240. Nowell PC and Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960; 132: 1497 (letter).
241. Nowell P, Daniele R, Rowlands D, Finan J. Cytogenetics of chronic B cell and T cell leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*, 1980; 1: 273-280.
242. Nowell PC, Vonderheid EC, Besa E et al. The most common chromosome change in 86 chronic B cell or T cell tumors: a 14q32 translocation. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1986; 19: 219-227.
243. Nowell PC, Moreau L, Growney P and Besa EC. Karyotypic stability in chronic B-cell leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1988; 33: 155-160.
244. O'Dwyer PJ, Wagner B, Leyland-Jones B et al. 2-Deoxycoformycin (pentostatin) for lymphoid malignancies. *Annals of Internal Medicine*, 1988; 108: 733-743.
245. Ohtaki K, Han T and Sandberg AA. Sequential chromosome abnormalities in B cell chronic lymphocytic leukemia: a study of 13 cases. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1986; 20: 73-87.
246. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Takeuchi J et al. Cytogenetic studies in hairy cell leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1987; 24: 109-117.
247. Orfao A, González M, San Miguel J et al. Clinical and immunological findings in large B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 1988; 46: 177-185.
248. Oscier DG, Stevens J, Hamblin TJ et al. Correlation of chromosome abnormalities with laboratory features and clinical course in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 1990; 76: 352-358.
249. Oscier D, Fitchett M, Herbert T and Lambert R. Karyotypic evolution in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1991; 3: 16-20.
250. Osler W. Leukaemia. In *The Principles and Practice of Medicine*. 7th edn, 1909; pp 731-738. New York: D. Appleton.
251. Pambo de Oliveira MS, Jaffe ES and Catovsky D. Leukaemic phase of mantle zone (intermediate) lymphoma: its characterisation in 11 cases. *Journal of Clinical Pathology*, 1989; 42: 962-972.

252. Pangalis GA, Roussou PA, Kittas C et al. B-chronic lymphocytic leukemia. Prognostic implication of bone marrow histology in 120 patients. Experience from a single hematology unit. *Cancer*, 1987; 59: 767-771.
253. Pangalis GA, Reverter JC, Boussiatis VA and Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia in younger adults: preliminary results of a study based on 454 patients-IWCLL/Working Group. *Leukemia and Lymphoma*, 1991; 5 (supplement 1): 175-178.
254. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci*, 1969; 64: 600-604.
255. Pardue ML, Gerbi SA, Eckhardt RA, Gall JG. Cytological localization of DNA complementary to ribosomal RNA in polytene chromosomes of Diptera. *Chromosoma*, 1970; 29: 268-290.
256. Perez Losada A, Wessman M, Tiainen M et al. Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia: an interphase cytogenetic study. *Blood*, 1991; 78: 775-779.
257. Peterson LC, Lindquist LL, Church S and Kay NE. Frequent clonal abnormalities of chromosome band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: multiple clones, subclones, and nonclonal alterations in 82 midwestern patients. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1992; 4: 273-280.
258. Philip P, Geisler C, Hansen MM et al. Aberrations of chromosome 6 in 193 newly diagnosed untreated cases of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1991; 53: 35-43.
259. Pinkel D, Straume T, y Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83: 2934.
260. Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, and Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 9138.
261. Piro LD, Carrera CJ, Beutler E et al. 2-Chlorodeoxy-adenosin: an effective new agent for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1988; 72: 1069-1073.
262. Pittman S and Catovsky D. Chromosome abnormalities in B-cell polymphocytic leukemia: a study of nine cases. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1983; 9: 355-365.

263. Pittman S and Catovsky D. Prognostic significance of chromosome abnormalities in chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Haematology*, 1984; 58: 649-660.
264. Plataniias LC and Golomb HM. Clinical use of interferons: hairy cell, chronic myelogenous, and other leukemias. In Baron S, Coppenhaver DH, Dianzani F et al (eds) *Interferon: Principles and Medical Applications*, 1992: pp 487-499. Galveston: University of Texas Medical Branch.
265. Poddighe PJ, Moesker O, Smeets D, Awwad BH, Ramaekers FCS, and Hopman AHN. Interphase cytogenetics of hematological cancer: Comparison of classical karyotyping and in situ hybridization using a panel of eleven chromosome specific DNA probes. *Cancer Res*, 1991; 51: 1959-1967.
266. Price CM. Fluorescence in situ hybridization. *Blood reviews*, 1993; 7: 127-134.
267. Que J, García Marco J, Ellis J et al. Trisomy 12 in Chronic Lymphocytic Leukemia detected by Fluorescence In Situ Hybridization: analysis by stage, immunophenotype, and morphology. *Blood*, 1993; 82: 571-575.
268. Qumsiyeh MB and Tharapel SA. Interphase detection of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia by fluorescence hybridization in situ. *Leukemia*, 1992; 6: 602-605.
269. Rabin M, Watson M, Barker PE, Ryan J, Breg WR, Ruddle FH. NRAS transforming gene maps to region p11-p13 on chromosome 1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*, 1984; 38: 70-72.
270. Rabinowe SN, Soiffer RJ, Gribben JG et al. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation (BMT) for patients with Binet stage B and C B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*, 1992; 80 (supplement 1): 170 (abstract).
271. Raghoebier S, Kibbelaar RE, Kielverda K et al. Mozaicism for trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia studied by non-radioactive in situ hybridisation. *Blood*, 1991a; 78 (supplement 1): 124 (abstract).
272. Raghoebier S, van Krieken JHJM, Kluin-Nelemans JC et al. Oncogene rearrangement in chronic B-cell leukemia. *Blood*, 1991b; 77: 1560-1564.
273. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP et al. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 1975; 46: 219-234.

274. Rai KR, Montserrat E. Prognostic factors in chronic Lymphocytic leukemia. *Semin Hematol*, 1987a; 24: 252-256.
275. Rai KR. A critical analysis of staging on CLL. In Gale RP, Rai KR (eds) *Chronic Lymphocytic Leukemia. Recent Progress and Future Directions*, 1987b; pp 253-264. New York: Alan R. Liss.
276. Rai KR. An outline of clinical management of chronic lymphocytic leukemia. In Cheson BD (ed.) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances and Clinical Developments*, 1993: pp 241-252. New York: Marcel Dekker.
277. Rechavi G, Katzir N, Brok-Simoni F et al. A search for bcl1, bcl2, and c-myc oncogene rearrangements in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 1989; 3: 57-60.
278. Ried T, Baldini A, Rand T, and Ward DC. Simultaneous visualization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc Natl Acad USA*, 1992; 89: 1388.
279. Robèrt KH, Moller E, Gahrton G et al. B-cell activation of peripheral blood lymphocytes from patients with chronic lymphatic leukemia. *Clinical and Experimental Immunology*, 1978; 33: 302-308.
280. Robèrt K-H, Gahrton G, Friberg K, Zech L and Nilsson B. Extra chromosome 12 and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Scandinavian Journal of Haematology*, 1982; 28: 163-168.
281. Robertson LE, Huh Y, Hirsch-Ginsberg C et al. Clinical, immunophenotypic and molecular analysis of the completeness of response in chronic lymphocytic leukemia after fluradabine. *Blood*, 1992; 80: 29-36.
282. Ross FM, Brown AG, Weir-Thomson EM et al. The influence of chromosome abnormalities on the survival of patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Blood*, 1988; 72 (supplement 1): 255 (abstract).
283. Rowley JD. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973; 243: 290-293.
284. Rowley JD and Fukuhara S. Chromosome studies in non-Hodgkin's lymphomas. *Semin Oncol*, 1980; 7: 255-266.

285. Rowley JD, Diaz MO, Espinosa R, et al. Mapping chromosome band 11q23 in human acute leukemia with biotinylated probes: Identification of 11q23 translocation breakpoints with a yeast artificial chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; 87: 9358.
286. Rozman C, Montserrat E, Feliu E et al. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 150 cases. *Blood*, 1982; 59: 1001-1007.
287. Rozman C, Montserrat E, Rodríguez-Fernández JM et al. Bone marrow histologic pattern-the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate analysis of 329 cases. *Blood*, 1984; 64: 642-648.
288. Rozman C, Montserrat E. Chronic Lymphocytic leukemia: when and how to treat. *Blut*, 1989; 59: 467-474.
289. Rozman C. Bailliere's Clinical Haematology. Chronic Lymphocytic Leukaemia and related disorders. Vol 6, N° 4. December 1993.
290. Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA:RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature*, 1977; 265: 472-473.
291. Sadamori N and Sandberg AA. 14q+ and 6q- anomalies in a case with hairy cell leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1983a; 8: 89-90 (letter).
292. Sadamori N, Han T, Minowada J et al. Possible specific chromosome change in prolymphocytic leukemia. *Blood*, 1983b; 62: 729-736.
293. Sadamori N, Han T, Block AMW and Sandberg AA. Cytogenetic studies of stimulated lymphocytes in hairy cell leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1985; 17: 69-74.
294. Sainati L, Matutes E, Mulligan S et al. A variant form of hairy cell leukemia resistant to α -interferon: clinical and phenotypic characteristics of 17 patients. *Blood*, 1990; 76: 157-162.
295. Sandberg AA. Chromosome changes in the lymphomas. *Human pathology*, 1981; 12: 531-540.
296. Sausville EA, Eddy JL, Makuch RW et al. Histopathologic staging at initial diagnosis of mycosis fungoides and Sézary syndrome. *Ann-Intern Med*, 1988; 109: 372-382.
297. Schröder J, Vuopio P and Autio K. Chromosome changes in human chronic lymphocytic leukaemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1981; 4: 11-21.

298. Schroeder WT, Lopez LC, Harper ME, Saunders GF. Localization of the human glucagon gene (GCG) to chromosome segment 2q36-37. *Cytogenet Cell Genet*, 1984; 38: 76-79.

299. Scospi L, Larson LI. Increased sensitivity in peroxidase immunocytochemistry. A comparative study of a number of peroxidase visualization methods employing a model system. *Histochemistry*, 1986; 84: 221-230.

300. Singer RH, Langevin GL, Lawrence JB. Ultrastructural visualization of cytoskeletal mRNAs and their associated proteins using double-label in situ hybridization. *J Cell Biol*, 1989; 108: 2343-2353.

301. Spiro S, Galton DAG, Wiltshaw E and Lohman RC. Follicular lymphoma: a survey of 75 cases with special reference to the syndrome resembling chronic lymphocytic leukemia. *British Journal of Cancer*, 1975; 31 (supplement II): 60-72.

302. Stansfeld AG, Diebold J, Kapanci Y et al. Updated kiel classification for lymphomas. *Lancet*, 1988; i: 292-293.

303. Stein RS, Weikert D, Reynolds V et al. Splenectomy for end-stage chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*, 1987; 59: 1815-1818.

304. Szabo P, Elder R, Steffensen DM, Uhlenbeck OC. Quantitative in situ hybridization of ribosomal RNA species to polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol*, 1977; 115: 539-563.

305. Taberner MD, Rios A, San Miguel JF, Orfao A. Hibridación in situ (HIS) por métodos no radioactivos para la detección de alteraciones numéricas de cromosomas. En prensa.

306. Tkachuk DC, Westbrook CA, Andreef M, et al. Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by in situ hybridization. *Science*, 1990; 250: 559.

307. Trask BJ. Fluorescence in situ hybridization: Applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends Genet*, 1991; 7: 149.

308. Travade P, Chastang C, Dighiero G and Binet JL. New trends in CLL treatment. *Blood Cells*, 1987; 12: 485-492.

309. Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*, 1984a; 226: 1097-1099.

310. Tsujimoto Y, Yunis J, Onorato-Showe L et al. Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation. *Science*, 1984b; 224: 1403-1406.
311. Tsujimoto Y. Oncogenes in chronic lymphocytic leukemia. In Cheson BD (ed) *Chronic Lymphocytic Leukemia: Scientific Advances and Clinical Developments*, 1993; pp 105-121. New York: Marcel Dekker.
312. Tura S, Finelli C, Bandini G et al. Cyclosporine A in the treatment of CLL associated pure red cell aplasia and bone marrow hypoplasia. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1988; 30: 479-481.
313. Ueshima Y, Alimena G, Rowley JD and Golomb HM. Cytogenetic studies in patients with hairy cell leukemia. *Hematological Oncology*, 1983; 1: 215-226.
314. Ueshima Y, Rowley JD, Variakojis D, Winter J, and Gordon L. Cytogenetic studies on patients with chronic T cell leukemia/lymphoma. *Blood*, 1984; 63: 1028-1038.
315. Vahdati M, Graafland H and Emberger JM. Etude du caryotype de 52 leucémies lymphoïdes chroniques B. *Nouvelle Revue Française d'Hématologie*, 1984; 26: 189-195.
316. Van Dekken H, Hagenbeek A, and Bauman JGJ. Detection of host cells following sex-mismatched bone marrow transplantation by fluorescence in situ hybridization with a Y chromosome-specific probe. *Leukemia*, 1989; 3: 724.
317. Van Dekken H, Pizzolo JG, Reuter VE, Melamed MR. Cytogenetic analysis of human solid tumors by in situ hybridization with a set of 12 chromosome-specific DNA probes. *Cytogenetic Cell Genet*, 1990; 54: 103-107.
318. Vogt P. Potential genetic functions of tandem repeated DNA sequence blocks in the human genome are based on a highly conserved "chromatin foldin code". *Human Genet*, 1990; 84: 301-306.
319. Wahl GM, Stern M, Stark GR. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979; 76: 3683-3687.
320. Waldeström J. Incipient myelomatosis or "essential" hyperglobulinemia with fibrinogenopenia, a new syndrome?. *Acta Medica Scandinavica*, 1944; CXVII: 216

321. Wang LM, Block AW, Fang X-E, Todd S, Naylor S, Han T, Sandberg AA, Sakaguchi AY. Analysis of trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukemia using polymorphic DNA probes. *Am J Hum Genet*, 1985; 37: A42.
322. Wiegant J, Ried T, Nederlof PM, van der Ploeg M, Tanke HJ, and Raap AK. In situ hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 3237.
323. Willard HF, Wage JS. Hierarchical order in chromosome-specific human alpha satellite DNA. *Trends Genet*, 1987; 3: 192-198.
324. Williams W, Beutler E, Erslev A, Lichtman M. Hematology. Editorial Mc Graw-Hill Inc. Cuarta edición 1990. Capítulos 22, 114 y 115: pp 202-222, 1005-1030.
325. Winkelmann RK. Clinical studies of T-cell erythroderma in the Sézary syndrome. *Mayo clinic Proceedings*, 1974; 49: 519-525.
326. Wintrobe MM and Hasenbush LL. Chronic leukemia: the early phase of chronic leukemia, the results of treatment and the effects of complicating infections; a study of eighty six adults. *Archives of Internal Medicine*, 1939; 64: 701-718.
327. Wormsley SB, Baird SM, Gadol N, Rai KR and Sobol RE. Characteristics of CD11c+, CD5+ chronic B-cell leukemias and the identification of novel peripheral blood B-cell subsets with chronic lymphoid leukemia immunophenotype. *Blood*, 1990; 76: 123-130.
328. Xiao H, Block AW, Romano J et al. i(12q) in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 1990; 50: 171-172 (letter).
329. Yunis JJ, Oken MM, Kaplan ME et al. Distinctive chromosomal abnormalities in histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 1982; 307: 1231-1236.
330. Yunis JJ, Brunning RD, Howe RB and Lobell M. High-resolution chromosomes as an independent prognostic indicator in adult acute nonlymphocytic leukemia. *New England Journal of Medicine*, 1984; 311: 812-818.
331. Yunis JJ, Frizzera G, Oken MM, McKenna J, Theologides A, Arnesen M. Multiple recurrent genomic defects in follicular lymphoma. *N Engl J Med*, 1987; 316: 79-84.
332. Zech L, Gahrton G, Hammarström L et al. Inversion of chromosome 14 marks human T-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 1984; 308: 858-860.

333. Zech L and Mellstedt H. Chromosome 13, a new marker for B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Hereditas*, 1988; 108: 77-84.

FE DE ERRATAS

Pag. 26 dice velocidad de sedimentación granulocítica y debería decir velocidad de sedimentación globular.

Pag. 38 dice cierytos y debería decir ciertos.

Pag. 38 dice balstos y debería decir blastos.

Pag. 85 dice antioveja y debería decir anticarnero.

Pag. 87 dice cojen y debería decir cogen.

Pag. 87 dice CIMg y debería decir Cl₂Mg.

Pag. 145 dice 95% a 98% y debería decir 96% a 99%.

Pag. 146 dice 11.5% de 61 casos y debería decir 57.14% de 7 casos.

Pag. 156 dice 95% a 98% y debería decir 96% a 99%.

Pag. 162 dice 79% a 98% y debería decir 96% a 99%.

Pag. 162 dice 0% a 2% y debería decir 1% a 2%.

Pag. 162 dice 1% a 19% y debería decir 1% a 3%.

Pag. 168 dice 95% a 98% y debería decir 96% a 99%.

UNIVERSIDADE DA CORUÑA
Servicio de Bibliotecas



1700759544