

Importancia de las alteraciones cromosómicas en la Leucemia Mieloide Crónica.

Alicia Rojas-Atencio^{*}, *Liliana Roldan-Paris*^{*}, *Lennie Pineda-Del Villar*^{*}, *Norbert Herrera*^{**}, *Adonay Herrera*^{**}.

^{*} Unidad de Genética Médica y ^{**} Programa de Investigación y Autodesarrollo, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.

Palabras claves: alteraciones cromosómicas, leucemia mieloides crónica, pronóstico.

Resumen. La Leucemia Mieloide Crónica es un subtipo particular de Leucemia, caracterizado por incremento de las células precursoras de tipo Mieloide, que ha sido asociada a la presencia del cromosoma Philadelphia, primera anomalía cromosómica asociada a malignidad, descrita por primera vez por Nowel y Hungerford en 1.960 como una deleción del brazo largo de uno de los cromosomas del grupo G. En 1.973 Rowley demostró que el cromosoma Philadelphia es un cromosoma 22 delecionado y que en su mayoría este segmento delecionado estaba traslocado al cromosoma 9. El objetivo de este trabajo fue reportar las anomalías cromosómicas observadas en 39 pacientes con Leucemia Mieloide Crónica, recibidos en la Unidad de Genética de la Facultad de Medicina de L.U.Z., durante los años 1.987-1.991. Un 59,9% de los pacientes presentó como única anomalía la t(9;22), 12,8% presentaron la t (9;22) asociada a otras anomalías tales como 2q-, iso 17q, poliploidías etc., y en el 15% restante no fueron detectadas anomalías cromosómicas. Clínicamente se pudo observar que aquellos pacientes que presentaron la t(9;22), como única anomalía, tuvieron una mayor sobrevida con recaídas menos frecuentes. El 50% de los pacientes que presentaron un cariotipo normal se comportaron como pacientes con la t(9;22) como única anomalía, mientras que el 50% restante presentó un curso más acelerado con recaídas mas frecuentes y/o muerte precoz. Se evidencia de esta forma que la presencia del cromosoma Philadelphia como única anomalía es indicativa de un mejor pronóstico y sobrevida y que su asociación con otras anomalías indica un curso más acelerado, que amerita tratamientos mas agresivos.

Recibido: 02-10-92. Aceptado: 27-09-93.

INTRODUCCION

La Leucemia Mieloide Crónica (L.M.C) es una enfermedad clonal de la médula ósea caracterizada por una sobreproducción neoplásica de granulocitos. Representa aproximadamente el 25% de todos los casos de leucemias con una prevalencia de un caso por cada 100.000 personas; puede ocurrir en todos los grupos de edad pero es mas frecuente en edades de 35 a 50 años, sin preferencia por sexo.

Morfológicamente la médula ósea de estos pacientes se caracteriza por hiperplasia granulocítica y megacariocítica, con frecuente eosinofilia y basofilia y en un tercio de los casos se observa mielofibrosis (3, 4, 19).

Después de la inicial y relativa fase crónica benigna, la cual usualmente dura cerca de 3 años, la enfermedad entra en una fase maligna acelerada y termina en crisis blástica. Morfológicamente los blastos pueden tener rasgos linfoides ó mieloides, sin embargo, su evolución principal es hacia la fase mieloide.

En 1.960 Nowel y Hungerford (11), describieron una aberración cromosómica, en un hombre con diagnóstico de L.M.C., que consistía en la deleción de un pequeño cromosoma del grupo G llamado cromosoma Philadelphia (Ph), ya que fue en esta ciudad donde se demostró por primera vez y que fue asignado al cromosoma 21. Posteriormente en 1.973 Rowley (17), con la utilización de las técnicas de bandeó, demostró que no era un cromosoma 21 delecionado, sino un cromosoma 22 y que además el segmento faltante de este cromosoma estaba traslocado al

cromosoma 9 en la mayoría de los casos. La presencia de esta anomalía como único hallazgo ha sido asociada a buen pronóstico y mayor sobrevida (10, 14, 15).

Cuando ocurre la progresión de la enfermedad hacia la fase aguda, 75 a 80% de los pacientes desarrollan una aberración cromosómica adicional; estos cambios ocurren varios meses antes de las manifestaciones malignas de la enfermedad y pueden servir como indicador pronóstico (11, 12). Tanto la ausencia del cromosoma Ph como la presencia de un cromosoma adicional o diferente al cromosoma Ph son indicativos de una evolución mas rápida de la enfermedad hacia la fase aguda y la muerte.

Desde 1.987 en el Laboratorio de Citogenética de la Unidad de Genética Médica de LUZ, se realizan rutinariamente estos estudios citogenéticos a pacientes con enfermedades hematológicas malignas. En el mismo sentido y con la finalidad de presentar el primer informe en el país en materia de Leucemia Mieloide Crónica, este trabajo tiene los siguientes objetivos: Identificar las anomalías cromosómicas en los pacientes referidos con diagnóstico de L.M.C. y relacionar estos hallazgos con su pronóstico y sobrevida.

MATERIAL Y METODOS

Entre los meses de enero de 1.987 y diciembre de 1.991 se recibieron en la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia 39 muestras de médula ósea de pacientes diagnosticados como L.M.C. y que no habían recibido tratamiento

con ningún citostático. En todos los casos se obtuvo material adecuado para ser analizado. La técnica empleada para los cultivos fue la descrita por Yunis en 1.981 (21) agregando fitohemaglutinina al cultivo. El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1.640 (Gibco) a pH 7,1 suplementando con 10 a 15% de suero fetal de ternera, 2% de penicilina-streptomicina y 2% de glutamina; a cada frasco de cultivo se le añadieron 5 ml del medio, 0,2 ml de fitohemaglutinina y 0,1 a 0,2 ml de médula ósea heparinizada. Para cada paciente se utilizaron 2 frascos de cultivo, que se incubaron por 48 a 56 horas, al final de lo cual se procedió a hacer los extendidos, los cuales se colocaron en estufa entre 37 a 40 °C

durante 1 a 2 semanas para su posterior coloración. La técnica de coloración empleada fue la de bandas G, descrita por Seabright en 1.972 (19).

Se analizaron de 20 a 50 metafases por paciente, dependiendo el número de la cantidad y calidad de las mismas. Las anomalías cromosómicas fueron descritas de acuerdo a la conferencia de París de 1.971 (13).

Un clon anormal fue definido por la presencia de al menos una anomalía en una de las metafases analizadas, si el defecto era de tipo estructural; en caso de anomalías numéricas, se consideró la alteración clonal si estaba presente en dos o más metafases.

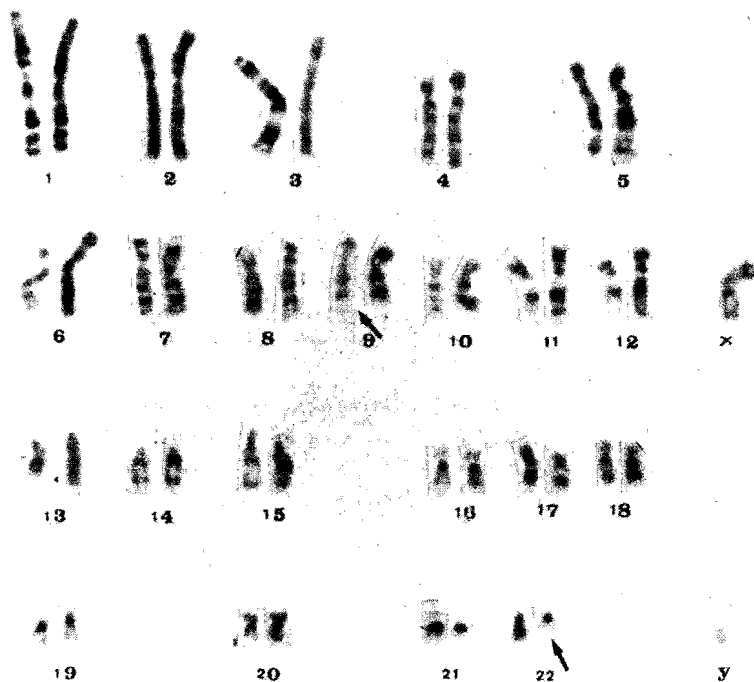


Fig. 1. Cariotipo masculino que muestra el cromosoma Ph⁺ 46,xy t(9q; 22q).

TABLA I
HALLAZGOS CROMOSOMICOS
EN LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

No. de Casos n	%	Estadio clínico	Anomalia cromosómica	Sobrevida Meses X ± DE
23	59,9	F. Crónica	Ph (+)	45.1 ± 7.9
3	7,6	F. Crónica	Ph (+) + Polip. 2q- 21q-	12.3 ± 0.2
2	5,2	F. Aguda	Ph i 17q +22	7 ± 0.5
5	12,8	F. Crónica	-12, t(8:22) 22p+, +8, Hipo	15.2 ± 1
6	15,0	F. Crónica	Ninguna	Variable

X ± D.E: Promedio + Desviación estándar.

El estudio de los casos y las fotografías se realizaron en un fotomicroscopio Nikon con cámara incorporada; la película utilizada fue panatomix X. El tratamiento utilizado para todos los pacientes fue a base de hidroxiurea y busulfan.

RESULTADOS

Las edades de los pacientes estuvieron comprendidas en un amplio rango de 2 y 67 años, 2 entre 2 y 16 años y el resto se ubicó entre 25 y 67 años con un promedio de 40,5 años. Se observó un predominio del sexo masculino (27 pacientes) sobre el femenino (12 pacientes).

Los hallazgos cromosómicos se presentan en la Tabla I observándose que de los 39 pacientes estudiados, 23 pacientes (59,9%) presentaron el cromosoma Ph como única

anomalía (Fig. 1). En 5 pacientes (12,8%) se observó el cromosoma Ph asociado a otra anomalía; 3 de los cuales se encontraban en fase crónica mostrando además del cromosoma Ph positivo, poliploidía, 21 q-, y 2q-; los dos pacientes restantes se encontraban en fase aguda y presentaron además del cromosoma Ph, un isocromosoma 17 de brazo largo (iso 17q), trisomía del cromosoma 22 (Fig. 2) e hipodiploidía. En otros cinco pacientes (12,8%) se observó una anomalía diferente al cromosoma Ph, tales como, monosomía 12, t(8:22), 22p+ (Fig. 3), hipodiploidía y trisomía 8. En los 6 pacientes restantes (15%) no se observaron anomalías cromosómicas.

En los 23 pacientes donde se detectó el cromosoma Ph como única anomalía, se observó una sobrevida entre 50 y 60 meses correspon-

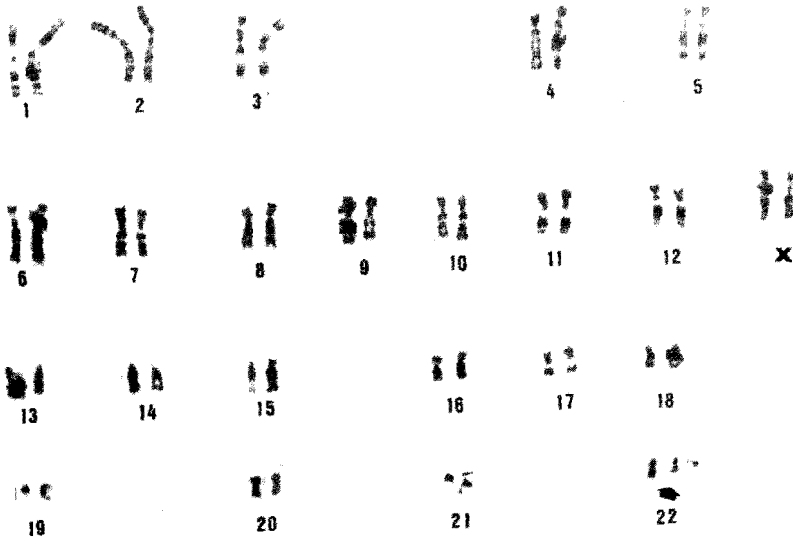


Fig. 2. Cariotipo femenino, muestra trisomía del cromosoma 22 (47, xx + 22).

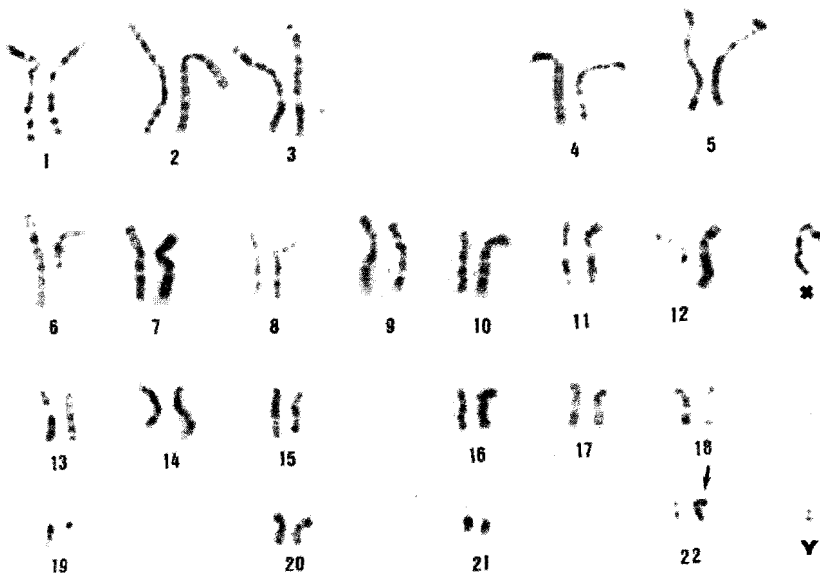


Fig. 3. Cariotipo masculino, muestra el cromosoma 22 con un segmento extra en su brazo corto (46, xx, 22 p⁺).

diendo a un promedio y desviación standar de 45.1 ± 7.9 meses con una o ninguna recaída. En la actualidad todos continúan con vida.

En el caso de los 3 pacientes que presentaron el cromosoma Ph asociado a otra anomalía y que fueron diagnosticados durante la fase crónica, la sobrevida estuvo comprendida entre los 12 y 24 meses, correspondiendo a un promedio de $12,3 \pm 0,2$ meses, la frecuencia de recaídas varió de 0 y 3, mientras que aquellos que fueron diagnosticados durante la fase aguda de la enfermedad apenas tuvieron una sobrevida media de $7 \pm 0,5$ meses.

En los 5 pacientes que presentaron una anomalía diferente al cromosoma Ph, se observó una sobrevida media de $15,2 \pm 1$ meses; estos pacientes tuvieron una progresión rápida de la enfermedad hacia la fase aguda y por consiguiente hacia la muerte, con excepción del paciente que presentó la traslocación 8;22, la que ha sido considerada como una variante del cromosoma Ph. Este paciente continúa en fase crónica por más de 24 meses.

Entre los pacientes que no presentaron anomalías cromosómicas detectables al microscopio de luz ordinario, 2 fueron diagnosticados como L.M.C juvenil y tuvieron una sobrevida media de 24 meses con progresión rápida hacia la fase aguda y muerte, 2 han permanecido en remisión por más de 28 meses y los otros 2 presentaron una sobrevida media de 11 meses con progresión rápida hacia la fase aguda y muerte (Tabla I).

DISCUSION

Aproximadamente el 90% de los pacientes presentan el cromosoma Ph como única anomalía al momento del diagnóstico de la enfermedad (2); en el 80% de ellos durante su evolución aparece una anomalía cromosómica adicional; en el resto la progresión clínica y hematológica de la enfermedad no está asociada con cambios en el cariotipo (1, 6, 12, 14, 18). Igualmente se han reportado incrementos en la heterogeneidad de las transformaciones blásticas con una alta incidencia de poblaciones mixtas o híbridas, que sugiere que los clones de la fase blástica así como también los clones de la fase crónica podrían acercarse al nivel de la célula madre pluripotencial. En el presente estudio, se identificó la relación existente entre la presencia del cromosoma Ph como única anomalía y la presencia de una aberración cromosómica adicional al momento del diagnóstico, con el tiempo de sobrevida, observándose que la presencia del cromosoma Ph como único hallazgo fue indicativa de un mejor pronóstico con una sobrevida mayor y con menor número de recaídas de la enfermedad. Los que presentaron una aberración cromosómica adicional al cromosoma Ph y que se diagnosticaron en fase crónica, presentaron una mayor sobrevida que aquellos que se diagnosticaron en fase aguda.

Podemos observar entonces, cómo la presencia de una alteración cromosómica adicional es indicativa o presagia la transformación blástica hacia la fase aguda. Sverre y Mitelman en 1.991 (20) señalaron que esta alteración cromosómica adicio-

nal puede ser detectada varios meses antes de que ocurra la transformación blástica, pudiéndose asumir entonces que nuevos clonos surgen constantemente de poblaciones de células neoplásicas inestables y que esta proliferación hace a esta forma de la enfermedad más maligna.

Por otra parte existen casos donde no es posible demostrar alguna alteración cromosómica por técnicas de bandedo ni por técnicas moleculares, los cuales deben ser mejor clarificados con el mejoramiento en el diagnóstico diferencial de la L.M.C; ya que estos pacientes L.M.C Ph negativo en especial los casos de L.M.C juvenil, Puchkova y otros investigadores han demostrado que son en realidad casos de Leucemia Mielomonocítica Crónica u otro síndrome mielodisplásico o mieloproliferativo (6, 12, 18).

Existen, por otro lado, casos de L.M.C. con un diagnóstico bien establecido donde no se observan anomalías cromosómicas y los cuales requieren una atención especial ya que un porcentaje alto de ellos presenta a nivel molecular un rearrreglo entre 2 genes, conocidos como b.c.r (breakpoint cluster region) y *cabl* (oncogen celular abelson). Estos casos involucran una inserción oculta de un fragmento de ADN de la región q34 del cromosoma 9 que incluye el gen *cabl*, en la región q11.2 del cromosoma 22, donde se une al gen *bcr* formando el complejo *abl-bcr* (5, 7).

Se ha demostrado que los pacientes que presentan este complejo a nivel molecular tienen una evolución clínica similar a los pacientes que presentan el cromosoma Ph como única anomalía, y se diagnosti-

can como L.M.C. Mientras que aquellos pacientes donde no se puede detectar este complejo, presentan una sobrevida menor con aceleramiento hacia la fase aguda y se consideran una patología diferente a la L.M.C. (9, 16, 20). Es por ello que en los pacientes donde no se pudo demostrar alguna alteración cromosómica, se hace necesaria la demostración molecular de este complejo para poder establecer tanto el diagnóstico como el pronóstico (1, 3, 8, 9).

ABSTRACT

Prognostic value of chromosomal abnormalities in Chronic Myelocytic Leukemia.

Rojas-Atencio, A. (Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela), Roldan-Paris, L., Pineda-Del Villar, L., Herrera, N., Herrera, A. *Invest Clin* 34(2): 75-83, 1993.

Chronic myelocytic leukemia is a particular subtype of leukemia characterized by increased myeloid precursor cells. It has been associated with the presence of the Philadelphia chromosome, described by Nowel and Hungerford in 1960, as a deletion of part of the long arm of a G group chromosome, the 22 chromosome. The present work reports the chromosomal abnormalities observed in 39 patients with chronic myelocytic leukemia, studied at the Genetic Unit, in the Faculty of Medicine of Zulia University, during the period from 1987 to 1991. Sixty per cent of the patients showed different abnormalities, such as 8 trisomy, t (8;22), and in the remaining 15%, no chromosomal changes were detec-

ted. The patients with t(9;22) as the only abnormality, had less relapses and longer survival. The clinical course of 50% of the patients with normal karyotype was similar to those with t(9;22) as the only abnormality; the other 50% had an accelerated course with frequent relapses and early death. The present findings confirm that the presence of the Philadelphia chromosome as the only karyotypical abnormality, is indicative of better prognosis, and its association with other chromosomal changes predicts a more accelerated course that will probably require a more aggressive treatment.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1- ALIMENA G., DALLAPICOLA B., GASTALDI R., MANDELLI F., BRANDT L., MITELMAN F., NISON P.G.: Chromosomal morphological and clinical correlations in blastic crisis of Chronic Myeloid Leukemia. A study of 69 cases. *Scand J Hematol* 28:103-117, 1982.
- 2- ALIMENA G., HAGEMEIJER A., BAKHIUS J.: Cytogenetic and Molecular characterization of a masked Philadelphia chromosome in Chronic Myelocytic Leukemia. *Cancer Genetic Cytogenetic* 27:21-26, 1987.
- 3- CHAMPLIN R.E., GOLDE D.W.: Chronic Myelogenous Leukemia: Recent advances. *Blood* 65:1039-1047, 1985.
- 4- GOLDMAN J.M., DAO-PEI, L.: New approaches in chronic granulocytic leukemia- Origen, prognosis and treatment. *Seminars in Hematol* 20(4): 241-250, 1982.
- 5- GROFFEN J., STEPHENSON J.R., HEISTERKAMP N., DE KLEIM A.: Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region bcr on chromosome 22. *Cell* 36:93-99, 1984.
- 6- HURET J.L.: Complex translocation, simple variant translocation and Ph¹-negative cases in chronic myelogenous leukemia. *Human Genetic* 85: 565-568, 1990.
- 7- HEISTERKAMP N., STAM K., GROFFEN J.: Chromosome 9 in variant Ph translocation. *Cancer Genetic Cytogenet* 14: 183-184, 1985.
- 8- KOVACKS J., MASUR, H.: Molecular Genetic advances in chronic myelogenous leukemia. *Ann Int Medic* 113:1-3, 1990.
- 9- KURSKOCK R., TALPAZ M., KANTARJIAN H.M., SHTALRID M., GUTTERMAN, J.U.: Philadelphia Negative C.M.L. without bcr rearrangement a chronic myeloid leukemia with a distinct clinical course. *Blood* 74 [Suppl 1]: 102, 1989.
- 10- LAWLER S.D.: Significance of chromosomal abnormalities in leukemia. *Seminars in Hematol* 19:257-272, 1982.
- 11- NOWEL P.C., HUNGERFORD D.A.: A minute chromosome in Human Granulocytic Leukemia. *Science* 132: 1497, 1960.
- 12- O'MALLERY F.M., GARSON D.M.: Chronic Granulocytic Leukemia: Correlations of blastic transformation type with karyotype evolution. *Am J Hematol* 20:313-323, 1985.
- 13- PARIS CONFERENCE. Standardization in Human Citogenetics 3:7, 1971. The National Foundation.
- 14- PRAKASH, YUNIS, J.: High Resolution Chromosome of the t(9;22) positive leukemias. *Cancer Genetic Cytogenet* 11:361-367, 1984.

- 15- PUCHKOVA G.P., PRIGONINA E.L., FLEISHMAN E.W., DROSDOVA T.S., MAYACOVA S.A., PETERSON I.S.: Chromosome abnormalities in chronic myeloid leukemia. *Human Genet* 41:143-156, 1983.
- 16- PUGH W.C., PEARSON M., VARDIMAN J.W., ROWLEY J.D.: Philadelphia chromosome negative Chronic Myeloid Leukemia: a Morphological reassessment. *Br J Haematol* 69:457-467, 1985.
- 17- ROWLEY J.D.: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescent and Giemsa stain. *Nature* 243:290-293, 1973.
- 18- SATO Y., KITANO K., TSONUDA S., YOSHIDA M., SAITO M., MIURA Y.: Karyotype evolution and multilineage involvement of Philadelphia chromosome positive clones in blastic transformation of two patients with Chronic Myelocytic Leukemia. *Blood* 71:1561-1567, 1988.
- 19- SEABRIGHT M.: The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangement in the chromosome of a man. *Chromosome* 36:204-210, 1982.
- 20- SVERRE H., MITELMAN F.: *Cancer Cytogenetic*, pp 41-64. Alan Liss, Inc New York, 1991.
- 21- YUNIS J.: *New Chromosome Techniques in the study of human neoplasia*. *Human Pathology* 12(6):540-549, 1981.