

ESTUDIO CITOGENÉTICO DE UN CASO DE LEUCEMIA CRÓNICA LINFOCÍTICA DE CÉLULAS T

Dra. VIRGINIA SOLIS A.*

RESUMEN

Se presenta el caso de un hombre de 55 años de edad con leucemia crónica linfocítica en curso de tratamiento, al cual se le realizó un estudio citogenético, utilizando un medio de cultivo con fitohemaglutinina.

Se encontró las siguientes anomalías: una clase predominante con 46 cromosomas de estructura pseudodiploide y una tendencia de crecimiento de la población celular hacia valores más altos del número de cromosomas. Se presentaron aberraciones numéricas de los cromosomas 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 y dos cromosomas nuevos formados por medio de translocaciones, la primera entre los cromosomas 12 y 20, $t(12q; 20q)$, y la segunda entre los cromosomas 21 y 22, $t(21q; 22q)$.

SUMMARY

A cytogenetic study is presented using a culture medium with phytohaemagglutinin it was carried out on a 55 years old man undergoing treatment for chronic lymphocytic leukaemia.

The following abnormalities were detected: a predominant class with 46 chromosomes of pseudodiploid structure and a tendency for the cellular population to obtain greater numbers of chromosomes; numerical aberrations of chromosomes 8, 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22 and two new chromosomes formed by translocations, the first between chromosomes 12 and 20, $t(12q; 20q)$, and the second between chromosomes 21 and 22, $t(21q; 22q)$.

INTRODUCCION

La frecuencia y naturaleza de las anomalías cromosómicas en la leucemia crónica linfocítica, son considerablemente desconocidas, ya que es típicamente una enfermedad de las células B y éstas no responden a los mitógenos disponibles (2, 5, 16, 25).

La variante con células T de la leucemia crónica linfocítica es relativamente rara, representando únicamente el 5 % de los casos de este tipo de leucemia (13, 15).

La mayoría de estudios citogenéticos de pacientes con esta clase de leucemia, han sido hechos en linfocitos periféricos estimulados con fitohemaglutinina, un mitógeno para las células T, mientras que las células que proliferan en más del 95 % de los pacientes son linfocitos B (2, 11, 13, 15) y la mayor parte de casos han tenido cariotipo normal (11). Muchos autores piensan que las respuestas a los mitógenos y los datos citogenéticos que han sido informados, representan proliferación de las pocas células T normales entre las células B neoplásicas, más que las células leucémicas mismas (15).

En 1981 Nowell y colaboradores logran la proliferación de linfocitos B, cultivándolos con un número igual de

* Escuela de Biología e Instituto de Investigaciones en Salud (INISA), Universidad de Costa Rica "Rodrigo Facio".

células mononucleares de sangre normal, tratadas con mitomicina y estimulándolas con diferentes mitógenos (17). A partir de entonces se desarrollan técnicas para cultivo corto de linfocitos B de leucemia crónica linfocítica (11), que permitirán lograr un mejor entendimiento de las alteraciones celulares en esta enfermedad.

El presente informe constituye el único caso de leucemia crónica linfocítica, de 9 pacientes investigados, en el cual fue posible obtener células en división para estudio citogenético.

MATERIAL Y METODOS

A un hombre de 55 años de edad con leucemia crónica linfocítica en curso de tratamiento, se le tomó una muestra de sangre venosa utilizando una jeringa heparinizada. La sangre fue cultivada por 72 horas a 37°C, utilizando un medio de cultivo con la siguiente composición: 80 ml. de medio de cultivo IC-65, 20 ml. de suero bovino fetal, 2,5 0/0 de L-glutamina y 2 ml. de fitohemaglutinina. Se agregó 0,5 ml. de sangre a cada 10 ml. de medio de cultivo. No se utilizó colquicina.

A las 72 horas de cultivo se hizo un choque hipotónico con KCl al 0,5 0/0 por 30 minutos, a 37°C, y cuatro fijaciones sucesivas con una mezcla 3:1 de alcohol metílico absoluto, ácido acético glacial a 4°C, por 30 minutos cada una (24).

Las láminas secadas al aire fueron bandeadas utilizando el siguiente procedimiento: fueron sumergidas en una solución de Giemsa al 6 0/0 a la que se agregó 2 ml. de solución de Na H₂PO₄=H₂O al 5 0/0 por 40 minutos. Se destiñeron con alcohol metílico absoluto, se lavaron con agua destilada y se conservaron a temperatura ambiente por un día, al cabo del cual fueron teñidas con solución Giemsa al 6 0/0, a la que se añadió 2 ml. de Na₂ N PO₄= 12H₂O al 5 0/0, por 10 minutos (24).

Se hizo conteo del número de cromosomas a 170 células.

Veinte metafases de buena calidad fueron fotografiadas, cariotipadas según el modelo estándar dado en la conferencia de París 1971 (3) y analizadas.

RESULTADOS

El conteo del número de cromosomas por célula mostró la existencia de una línea celular principal con 46 cromosomas pseudodiploide y una tendencia de crecimiento de la población celular hacia valores más altos del número de

Cuadro 1.

NUMERO DE COPIAS POR CELULA DE CADA TIPO DE CROMOSOMA. 20 METAFASES ANALIZADAS

Número del cromosoma	Copias		
	1	2	3
1		20	
2		20	
3		20	
4		20	
5		20	
6		20	
7		20	
8	1	19	
9	6	14	
10		20	
11	2	18	
12	6	14	
13		19	1
14		20	
15	1	19	
16		19	1
17		20	
18	2	18	
19		19	1
20	3	12	5
21	3	15	2
22	5	15	
X	20		
Y	20		
A	6		
B	7		

cromosomas (32 0/0 de las células tuvieron más de 46 cromosomas y solamente el 25 0/0 tuvieron menos de 46) (Fig. I).

El análisis del número de copias de cada tipo de cromosoma reveló variaciones numéricas en 12 cromosomas (Cuadro I). Se encontraron dos cromosomas marcadores A y B. El cromosoma A presentó una frecuencia de 30 0/0 y fue probablemente formado por medio de una translocación, entre los brazos largos del cromosoma 12 que sufrió una fractura cerca del centrómero, con un cromosoma 20 que se fracturó en la región distal de sus brazos largos. El marcador B presentó una frecuencia de 35 0/0 y se formó con probabilidad por medio de una translocación entre los cromosomas 21 y 22, el 22 fue el que conservó el centrómero y el 21 sufrió una ruptura cerca del centrómero en los brazos largos (Figs. II, III y IV).

Figura I

DISTRIBUCION DE LAS CELULAS DE ACUERDO
AL NUMERO DE CROMOSOMAS

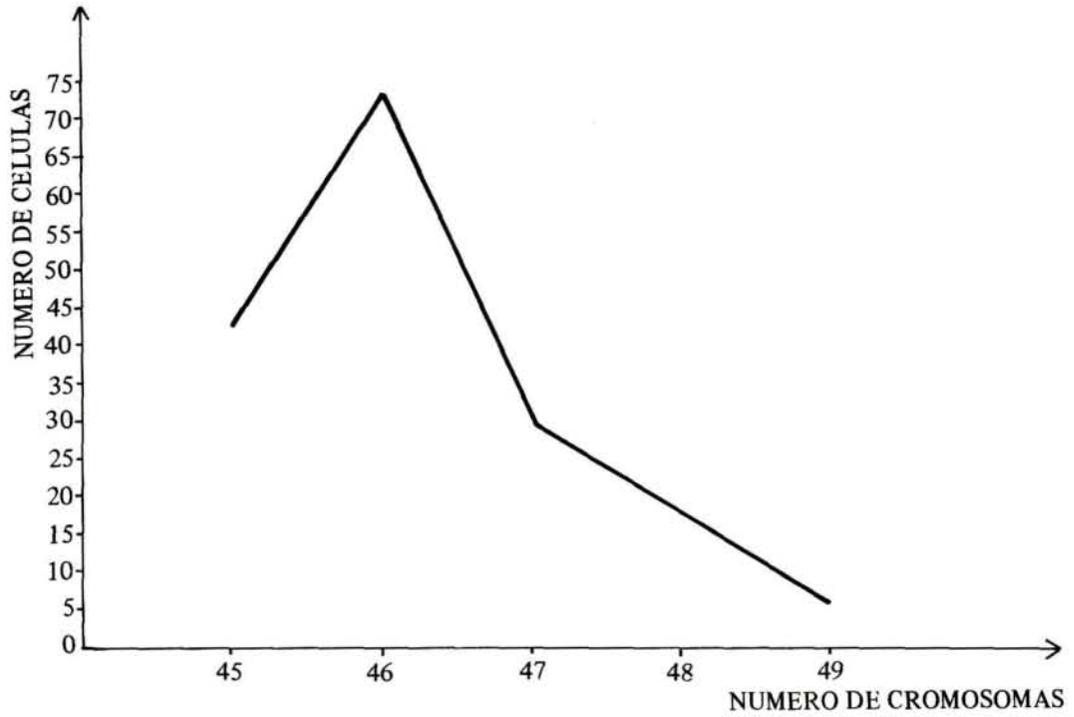


Figura II

CARIOTIPO MOSTRANDO LA PRESENCIA DEL
MARCADOR CROMOSOMICO A



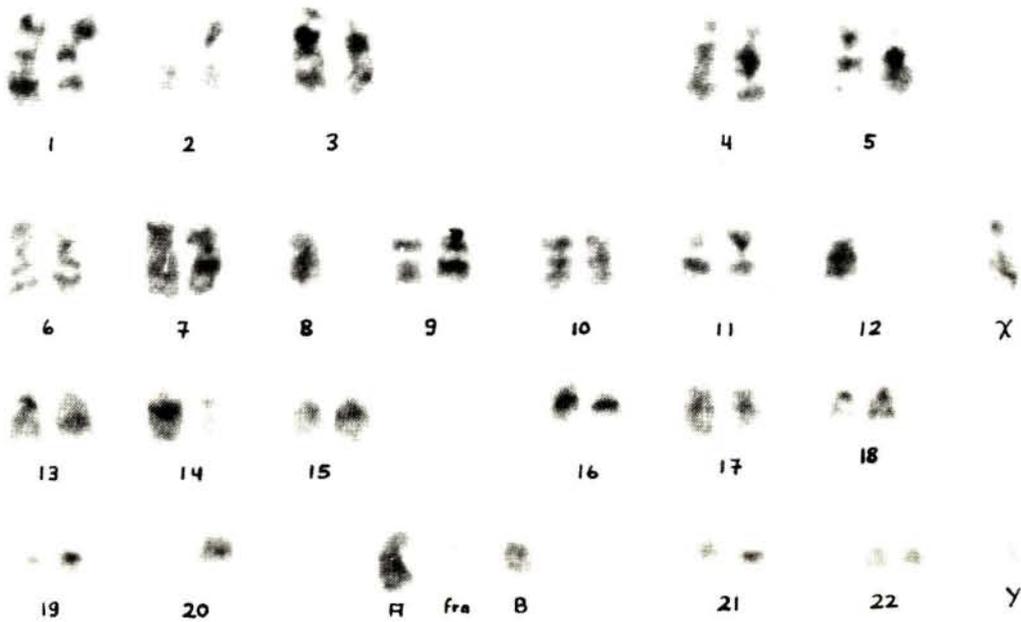
Figura III

CARIOTIPO MOSTRANDO ABERRACIONES NUMERICAS Y LA PRESENCIA DEL MARCADOR CROMOSOMICO B.



Figura IV

CARIOTIPO ANORMAL EN EL QUE SE OBSERVAN ABERRACIONES NUMERICAS Y LA PRESENCIA DE LOS MARCADORES CROMOSOMICOS A Y B



DISCUSION

Se conocen numerosos informes de patrones cromosómicos normales en la leucemia crónica linfocítica, estimulada con fitohemaglutinina, pero como fue notado antes, las células en división en estos casos son probablemente células T residuales normales más que células B neoplásicas (15).

El hecho que todas las metafases analizadas fueron anormales, claramente indica que la respuesta proliferativa observada para la fitohemaglutinina involucró la población leucémica y que las células afectadas fueron células T.

En el presente, está bien establecido, que casi todas las células tumorales de mamífero tienen alteraciones cromosómicas, que usualmente indican un patrón clonal de crecimiento (15).

Estudios citogenéticos hechos en diferentes enfermedades del sistema hematopoyético han demostrado que la implicación frecuente de determinados cromosomas en aberraciones numéricas y estructurales no es al azar (6, 9, 10, 11, 14, 18, 22, 23).

Fuera del cromosoma Ph¹ (Philadelphia), característico de la mayoría de pacientes con leucemia crónica mieloide (1,19,22) y del cromosoma 14q + presente en la mayor parte de pacientes con linfoma Burkitt (12), no han sido identificados otros tipos de marcadores cromosómicos que puedan ser considerados específicos del cariotipo, de una condición maligna determinada del sistema hematopoyético.

Aunque los cromosomas marcadores tienen carácter particular (a excepción de los antes mencionados), como los estudiados en el presente caso, su importancia reside en que pueden indicar la naturaleza maligna de las células que los poseen y el origen común de éstas a partir de una sola célula original, lo que tiene utilidad en el seguimiento de la evolución de la población tumoral (8). Estos marcadores pueden servir para el establecimiento de aquellos cromosomas que participan más frecuentemente en reestructuraciones, y en la determinación de las zonas cromosómicas que sufren más frecuentemente fracturas, ayudando en alguna medida al conocimiento de los mecanismos de la evolución de los cariotipos neoplásicos (24).

Pedersen encontró en la leucemia crónica mieloide que la ganancia y pérdida de cromosomas son inversamente proporcionales a la longitud del cromosoma, siendo más frecuentemente implicados los grupos con cromosomas pequeños (C,E,F,G) (20).

Kato y Yoshida (7) usando un tratamiento con colchicina produjeron artificialmente no-disyunciones de los cromosomas en las células del hamster chino y encontraron

que la pérdida y ganancia de los cromosomas se producen sobre todo en los cromosomas pequeños.

En nuestro caso, sucedió el mismo fenómeno, y muchos de los cromosomas implicados aparecen informados como participantes en aberraciones numéricas, en otros estudios citogenéticos, de pacientes con leucemia crónica linfocítica (4, 11, 15, 16).

Los hallazgos cromosómicos en este caso son de interés ya que ellos no solamente comprueban el carácter neoplásico de los linfocitos circulantes, sino también la naturaleza clonal de su proliferación en el cuerpo.

BIBLIOGRAFIA

1. Caspersson, T., Gahrton, G., Lindsten, J. y L. Zech. Identification of the Philadelphia chromosome as a number 22 by quinacrine mustard fluorescence analysis. *Exptl. Cell. Res.*, 1970, 63: 238-240.
2. Catovsky, D. y P.J.L. Holt. Tor B lymphocytes in chronic lymphocytic leukaemia. *The Lancet*, 1971, 1: 976-977.
3. Conferencia de París (1971). Standardization in human cytogenetics. Birth Defects. Original article series. The National Foundation, New York, 1972, 46 p.
4. Crossen, P.E. Giemsa banding patterns in chronic lymphocytic Leukaemia *Humangenetik*, 1975, 27: 151-156.
5. Finan, J.B., Daniele, R.P., Rowlands, D.T. y P.C. Nowell. Chronic T cell leukemia: cytogenetics and response to mitogens. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 1978, 19:48.
6. Hsu, T.C., Billen, D. y A. Levan. Mammalian chromosomes in vitro XV. Patterns of transformation. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1961, 27: 515-541.
7. Kato, H. y T.H. Yoshida. Isolation of aneusomic clones from chinese hamster cell line following induction of non-disjunction. *Cytogenetics*, 1971, 10: 392-396.
8. Koller, P.C. The role of chromosomes in cancer biology. Springer Verlag, New York, 1972, 124 p.
9. Levan, A., Levan, G. y F. Mitelman. Chromosomes and cancer. *Hereditas*, 1977, 86: 15-30.
10. Makino, S., Sasaki, M.S. y A. Tonomura. Cytological studies of tumors. XL. Chromosome studies in fifty-two human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1964, 32: 741.

11. Mitelman, F. y G. Levan. Clustering of aberrations to specific chromosomes in human neoplasm. III Incidence and geographic distribution of chromosome aberrations in 856 cases. *Hereditas*, 1978, 89: 207-232.
12. Mitelman, F. Cytogenetics of experimental neoplasms and non-random chromosome correlations in man. *Clin. Haematol.*, 1980, 9: 195-219.
13. Najfeld, V., Fialkow, P.J., Karande, A., Klein G. y K. Nilsson. Cytogenetics of lymphoid cell lines derived from patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, 32: 82.
14. Nowell, P.C. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukaemia. *Science*, 1960, 132: 1497.
15. Nowell, P., Jensen, J., Winger, L., Daniele, R. y P. Growney. T cell variant of chronic lymphocytic leukaemia with chromosome abnormality and defective response to mitogens. *Brit. J. Haematol.*, 1976, 33: 459-468.
16. Nowell, P., Daniele, R., Rowlands, D. y J. Finan. Cytogenetics of Chronic B-cell and T-cell leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1980, 1: 273-280.
17. Nowell, P., Shankey, T.V., Finan, J., Guerry, D. y E. Besa. Proliferation, differentiation, and cytogenetics of chronic leukemia B lymphocytes cultured with mitomycin-treated normal cells. *Blood*, 1981, 57: 444-451.
18. Oshimura, M. y A.A. Sandberg. Chromosomes and causation of human cancer and leukemia. XXV. Significance of the Ph¹ (including unusual translocations) in various acute leukemias. *Cancer*, 1977, 40: 1149-1160.
19. Pedersen, B. The karyotype evolution in chronic granulocytes leukaemia. I. The chromosomes gained and lost during initiation of the evolution. *Eur. J. Cancer*, 1973, 9: 503-507.
20. Pedersen, B. The karyotype evolution in chronic granulocytic leukaemia. II. The chromosome and karyotype pattern of advanced evolution. *Eur. J. Cancer*, 1973, 9:509-513.
21. Rowley, J.D. A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa stain. *Nature*, 1973, 243: 290-293.
22. Rowley, J.D. Nonrandom chromosomal abnormalities in hematologic disorders of man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1975, 72: 152-156.
23. Secker-Walker, L.M. y J.D. Hardy. Philadelphia chromosome in acute leukemia. *Cancer*, 1977, 38: 1619-1624.
24. Solís, V. Estudio comparativo de las modificaciones cromosómicas en diferentes tipos de proliferaciones malignas (humanas y experimentales). Tesis. Universidad de Bucarest, Bucarest, 1978, 187 p.
25. Wilson, J.D. y G.J.V. Nosal. The T or B cell nature of chronic lymphocytic leukemia lymphocytes. *The Lancet*, 1971, 1: 1153-1154.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco su gran colaboración al Dr. Ioan Moraru, a la Dra. Liliana Georgian, a la Dra. Cornelia Geormaneanu, a las Asistentes médicas Mariana Suba y Grapina Vrabie, del Instituto de Patología y Genética Médica Dr. Víctor Babes, Bucarest.