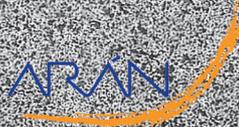
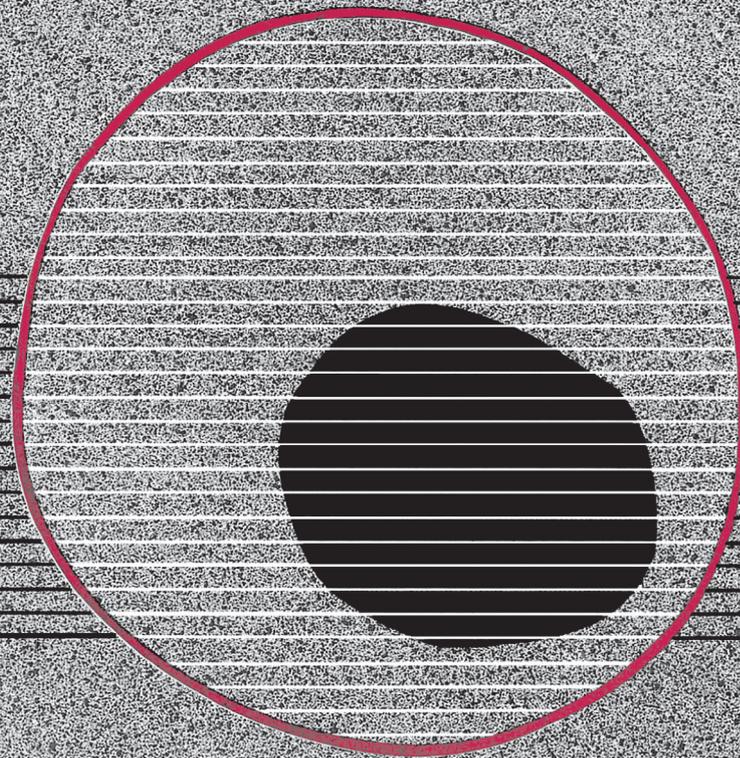


revisiones en

CANCER

ONCOGENES Y CÁNCER IV

VOL. 13, NÚM. 4, 1999



revisiones en

CANCER

SUMARIO

VOL. 13

NÚM. 4

Biología molecular de la célula eucariótica: estructura del DNA, genes y los procesos de expresión génica M. Lorenzo	135
Patología molecular de la linfomagénesis M. Sánchez-Beato, A. Sáez, R. Villuendas, J. F. García, J. C. Martínez-Montero, M. A. Piris	142
Tratamiento de los linfomas con anticuerpos monoclonales J. García-Conde, I. Benet	153
Alteraciones moleculares en las leucemias agudas E. Anguita Mandly, F. A. González Fernández, A. Villegas Martínez	166
Alteraciones moleculares en el adenocarcinoma de páncreas exocrino V. M. Barberá, N. Malats, M. Porta, F. Real, A. Carrato	192

Biología molecular de la célula eucariótica: estructura del DNA, genes y los procesos de expresión génica

M. LORENZO

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid

INTRODUCCIÓN

Las leyes básicas de la herencia fueron enunciadas en 1866 por Mendel basándose en el análisis de una serie de cruzamientos genéticos entre cepas de pura raza de guisantes de jardín, *Pisum sativum*, los cuales diferían entre sí en ciertos caracteres bien definidos, como la forma de la semilla (lisa o rugosa), el color de la semilla (amarillo o verde), el color de la flor (púrpura o blanco). Casi 100 años después, en 1953, Watson y Crick descubrieron la estructura del DNA abriendo paso a la Biología Molecular moderna; tan sólo cuatro décadas después el proyecto Genoma Humano, que pretende cartografiar en un plazo razonable de tiempo los aproximadamente 100.000 genes y 3.000 millones de pares de bases que componen nuestros cromosomas, se está convirtiendo en una realidad. En dichos cromosomas se encuentra toda la información, que en continua interacción con el medio ambiente hace, de cada uno de nosotros, personas con características diferenciales prácticamente únicas. Existe un consenso generalizado acerca de que el conocimiento adquirido de la cartografía y secuencia del genoma humano generará en un futuro próximo un gran beneficio para la salud y el bienestar humanos. Términos como clonación, animal transgénico, DNA recombinante o terapia génica forman ya parte habitual de nuestro vocabulario y nuestra realidad. En nuestras manos está que esa realidad sea cada vez mejor conocida.

La *célula eucariótica* tiene toda su información confinada en el núcleo, en una estructura química conocida como ácido desoxirribonucleico (DNA). La composición de esta molécula así como su organización en cromatina (cromosomas durante la mitosis) es fundamental para la funcionalidad de esta doble hebra de DNA. Esta estructura informativa tiene que mantenerse invariable entre distintas generaciones de células, por lo que debe copiar su contenido en un proceso de gran precisión conocido como replica-

ción del DNA. Igualmente, el DNA tiene que expresar su potencial de información para producir aquellas proteínas características de cada tipo celular y en aquel momento del desarrollo que van a generar el *fenotipo* de cada célula. La expresión de genes estructurales (aquellos segmentos del DNA con información para proteínas) es un proceso complejo en el que se tiene que transcribir el gen para dar una molecular precursora en el núcleo (un ácido ribonucleico o RNA), que tras un proceso madurativo también en el núcleo, origina el RNA mensajero (mRNA), cuya secuencia de nucleótidos dirigirá la traducción o síntesis de proteínas en el citoplasma. Para que la síntesis de proteínas, dirigida por el mRNA tenga lugar, es necesario que participen los ribosomas (integrados por RNA ribosómicos o rRNAs, y proteínas) y los RNAs de transferencia (tRNAs) que son los que llevan los aminoácidos al lugar donde ocurre la traducción. La información para la síntesis de estos rRNAs y tRNAs también está en el DNA y los genes que codifican para ellos deben de transcribirse para la formación de los mismos. Finalmente, los ribosomas, los tRNAs activados con aminoácidos y el mRNA, dirigidos por factores proteicos en el citosol, y mediante un diccionario conocido como código genético, dirigirán la traducción de la información de tripletes de nucleótidos del mRNA a cadenas polipeptídicas (1). La regulación de todos estos procesos es tremendamente compleja y alteraciones en cualquiera de estos puntos originan un amplio marco de enfermedades englobadas en la llamada Patología Molecular. Cuando los genes/proteínas alterados controlan el crecimiento celular y se altera el equilibrio del este proceso, se produce el cáncer.

ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DEL DNA

El DNA eucariótico está compuesto primariamente por dos hebras enrolladas helicoidalmente a derechas e interac-

cionando entre sí, en una estructura que se conoce como *hélice B* del DNA. Cada una de estas hebras es un polideoxirribonucleótido con esqueletos azúcar (desoxirribosa)-fosfato formando enlaces fosfodiéster 3'-5' y enlaces N-glicosídicos entre los azúcares (Carbono 1') y las bases nitrogenadas (Nitrógeno 9 de Adenina, A o Guanina, G y N1 de Timina, T o Citosina, C). Cada hebra tiene una polaridad 5'-3' y las dos hebras se asocian en la hélice B de forma antiparalela, dejando los esqueletos azúcar-fosfato hacia el exterior en contacto con el medio acuoso fisiológico y las bases nitrogenadas hacia el interior, apiladas y perpendiculares al eje de la hélice, en un entorno hidrofóbico. Las bases de una hebra interactúan con las de la otra mediante puentes de hidrógeno, de acuerdo con los llamados apareamientos de Watson-Crick, es decir A con T mediante dos puentes de hidrógeno y C con G mediante tres puentes de hidrógeno. Esta hélice B tiene un diámetro de 2 nm, cada par de bases está girado respecto del anterior 36° y separado en el eje de la hélice 0.34 nm, siendo esta la forma de disposición del DNA en condiciones de humedad (>80%) y en presencia de cationes para apantallar la carga negativa de los esqueletos azúcar-fosfato (1). Existen otras formas helicoidales del DNA, como la Z (hélice levógira) o la A (una hélice más corta y estrecha) pero que no vamos a entrar a describir en este capítulo.

Sin embargo, este nivel de organización del DNA no es suficiente para dar cabida en la célula a todo el contenido de DNA, ya que el genoma humano tiene aproximadamente 3×10^9 pares de bases (pb) que organizados en doble hélice tendría una longitud de centímetros, lo que es incompatible con el tamaño del núcleo. Se impone por tanto un nivel de organización superior, que tienda a condensar el DNA, y este nivel son los superenrollamientos negativos. Las superhélices negativas tienen déficit de vueltas, lo que además de condensar permite un fácil desenrollamiento del DNA. Esto es muy importante ya que el genoma se tiene que desenrollar y relajar en muchas circunstancias, durante la replicación y durante la expresión de genes, volviéndose después a empaquetar en superhélices. Los procesos de relajación y de formación de superhélices negativas son dirigidos por enzimas específicas llamadas Topoisomeras. De ellas la *Topoisomerasa I* relaja las superhélices negativas del DNA, mientras que las *Topoisomerasas II* ayudan a la condensación y segregación de cromosomas durante la mitosis y meiosis y participan en la topología del DNA durante la transcripción (2). La importancia del conocimiento de estas enzimas es grande ya que muchas drogas antitumorales actúan sobre las topoisomerasas y su ciclo catalítico, pudiendo ser utilizadas en tratamientos antineoplásicos.

El DNA se encuentra en el núcleo asociado a proteínas básicas formando una estructura llamada cromatina (en la que el DNA está densamente empaquetado), que en estado de máxima condensación durante la metafase mitótica da lugar a los cromosomas. Las histonas son una familia de proteínas básicas pequeñas, de tamaño que oscila entre 11 a 23 kilodaltons (kDa), muy básicas debido a la presencia de Arginina y Lisina y muy conservadas en la escala evolutiva. Se conocen 5 tipos de Histonas, de las cuales la H2A, H2B, H3 y H4 están presentes en dos copias formando octámeros de histonas, mientras que

sólo hay una molécula de H1 por cada dos de las otras histonas. Sobre los octámeros de histonas se dispone el DNA de modo que segmentos de aproximadamente 160 pb dan una vuelta y tres cuartos de otra sobre cada octámero, conectando uno con otro con fragmentos de DNA de 40-50 pb, conociéndose esta estructura como *nucleosomas*. Sobre estos fragmentos de conexión entre nucleosomas se disponen las histonas H1, que se fosforilan e interactúan entre sí, condensando los nucleosomas en una estructura conocida como fibra de cromatina, visible al microscopio electrónico (3). Niveles superiores de condensación de la fibra de cromatina que se alcanzan durante la mitosis, dan lugar al máximo estado de condensación, los cromosomas visibles al microscopio óptico, que alcanzan un grado de empaquetamiento de 10.000 veces respecto de la hélice de DNA. Así, cada *cromátida* de un cromosoma que corresponde a una única molécula de DNA de tamaño cm en doble hélice, está condensada en un tamaño de mm durante la metafase mitótica. Las dos cromátidas de DNA están unidas por una zona más o menos central, o *centrómero*, que separa un brazo corto (p) de un brazo largo (q) en cada cromosoma. El número de cromosomas es característico de cada especie. Las células humanas tienen 46, de los que 44 son parejas de cromosomas homólogos llamados *autosomas* y los dos cromosomas sexuales que en el caso de las mujeres son también homólogos (XX), no siendo así en los varones (XY). Todas las células del organismo tienen en el núcleo estas 23 parejas de cromosomas, por ello se denominan *diploides*, a excepción de las células germinales que como consecuencia de la meiosis sólo contienen un ejemplar de cada pareja y por tanto son haploides. Así, su fusión generará, en la concepción, un cigoto que será diploide, que generará un nuevo individuo. Como cada célula diploide del organismo contiene 23 pares de cromosomas homólogos, tendrá dos copias o alelos de cada gen. Los *alelos* estarán localizados en las mismas regiones, *locus*, de los cromosomas homólogos. Estos datos están resumidos en la figura 1.

Una vez conocida la estructura básica del genoma humano, vamos a fijarnos en su organización. Uno de los primeros hechos que llaman la atención es que aunque por el tamaño del genoma humano sería esperable un número elevadísimo de genes, sin embargo y aunque el Proyecto Genoma todavía no está terminado, el número de genes que podemos esperar es mucho más modesto, no más allá de 100.000 genes. Esto se debe a que nuestro genoma no está totalmente constituido por secuencias únicas, muy al contrario, existe una parte del mismo que está mediana o altamente repetido. Por ejemplo, existen más de 10^6 copias de secuencias que codifican para el DNA satélite, aquel que integra los centrómeros de los cromosomas y por tanto tiene un papel estructural. El *DNA telomérico*, que forma los extremos cromosómicos, también presenta un alto grado de repetición a lo largo del genoma (4). Otras secuencias repetitivas muy cortas y dispuestas en tandem, los *microsatélites*, son muy abundantes en las células eucarióticas. Su enorme variabilidad las convierte en herramientas valiosas para confeccionar mapas genéticos. Muchos de estos microsatélites están alojados cerca o dentro mismo de genes implicados en

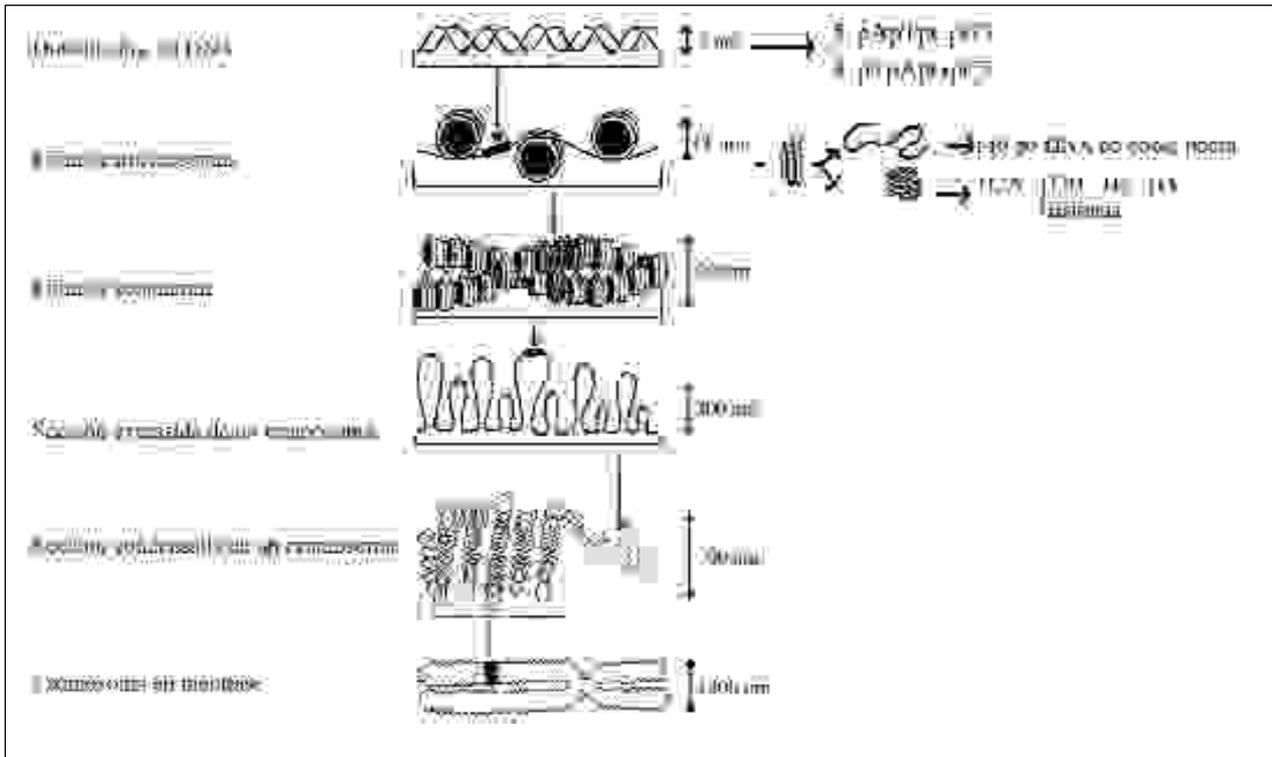


Fig. 1. Organización del DNA en el cromosoma eucariótico.

vías reguladoras de procesos fundamentales. Igualmente los genes que codifican para los tRNAs, los rRNA, las histonas o los RNAs pequeños nucleares (snRNAs) cuya función en la maduración de mRNAs es muy importante, tienen un grado medio de repetición que oscila entre 50 y 20.000 copias. Por el contrario, los genes estructurales que codifican para proteínas son generalmente secuencias únicas, de tamaño variable, pero que sólo aparecen normalmente una vez a lo largo de todo el genoma. Además, estos genes estructurales no son totalmente informativos, ya que gran parte de su contenido son *intrones*, secuencias sin información, que han de ser eliminadas para dar mRNAs maduros y poder dirigir la formación de proteínas específicas. Además, existe gran cantidad de DNA espaciador intergénico organizado también como secuencias únicas. Todo ello nos hace comprender cómo sólo una parte pequeña del genoma es informativa.

REPLICACIÓN

Las células eucarióticas replican su genoma, es decir duplican su material genético, durante la fase S del ciclo celular, que dura aproximadamente 8-10 h en un ciclo celular típico. Para ello el DNA se tiene que desempaquetar simultáneamente en muchos puntos llamados orígenes de replicación, siendo un replicón todo el DNA parental copiado entre dos orígenes de replicación (5). El proceso de replicación es semiconservativo, cada hebra parental sirve de molde, es decir da la pauta de los nucleótidos que se tienen que disponer en cada hebra hija, conforme a los apareamientos de Watson-Crick, de modo que donde en

la hebra parental haya A, en la nueva habrá T, y donde haya C en la parental, se polimerizará G en la hija. En cada origen de replicación se produce un desenrollamiento transitorio de la doble hélice del DNA por una *helicasa*, y bidireccionalmente se replica el genoma. La maquinaria enzimática que se ocupa de la replicación es un dímero asimétrico de *DNA polimerasa* y *DNA polimerasa*. La subunidad es un tetrámero que lleva asociada intrínsecamente una actividad primasa (sintetiza primers o cebadores, fragmentos de RNA de 12 nucleótidos) y se ocupa de copiar la hebra rezagada en forma de fragmentos de Okazaki de aproximadamente 100-200 nucleótidos de tamaño. La subunidad es poco procesiva salvo cuando se asocia a la proteína *PCNA* (específica de fase S) y se encarga de sintetizar el DNA nuevo utilizando como molde la hebra adelantada, haciendo la síntesis del DNA de forma continua. Las dos polimerasas trabajan sincrónicamente formando enlaces fosfodiéster 3'-5' y avanzando en el sentido 5'-3', siendo ayudadas durante la elongación por un tercer tipo de *DNA polimerasa* que junto con - podrían rellenar los huecos entre los fragmentos de Okazaki (6). En células eucarióticas existen otros dos tipos de *DNA polimerasas*, la encargadas de los procesos de reparación del DNA y las que se ocupan de la replicación del genoma mitocondrial. Como el DNA eucariótico no está desnudo sino asociado con histonas, según se va formando nuevo DNA se va asociando con nuevas histonas que previamente se han sintetizado. Un aspecto muy importante asociado a la replicación es el mantenimiento de la longitud de los extremos de los cromosomas. En el proceso de replicación del DNA, tras la eliminación del último cebador en la hebra rezagada,

queda un hueco que no puede ser rellenado por las DNA polimerasas convencionales. Debido a ello, las nuevas cadenas resultantes son un poco más cortas por uno de sus extremos (5'), perdiendo el extremo de un cromosoma lineal entre 4-6 nucleótidos en cada ciclo de división celular. Si las células no compensasen ese defecto del mecanismo de replicación, los cromosomas se acortarían inexorablemente, provocándose fusiones entre los mismos y una gran inestabilidad cromosómica. Por ello, los extremos de los cromosomas presentan una secuencia de seis nucleótidos repetida en tandem unas 2000 veces que constituye el telómero. Dicha secuencia es formada por una DNA polimerasa RNA dependiente llamada *telomerasa*, muy activa en la vida embrionaria y fetal, y ausente en las células somáticas adultas. Cuando los telómeros se acortan críticamente en las células somáticas normales, esta entra en una fase de senescencia y muere (7). Este mecanismo podría ser de gran importancia para eliminar células con crecimiento descontrolado. Sin embargo, las células tumorales sortean este mecanismo ya que reactivan la capacidad telomérica. La inhibición de la actividad telomérica puede ser una alternativa como terapia antitumoral.

REPARACIÓN

A pesar de la fidelidad del proceso de replicación y de la capacidad autocorrectora (por su actividad exonucleasa 3'-5') de las DNA polimerasas tanto eucarióticas como bacterianas, se pueden producir errores asociados a la replicación que deben ser corregidos antes de la iniciación de un nuevo ciclo de duplicación. Igualmente, los agentes externos, radiaciones y productos químicos, pueden dañar el DNA produciendo sustituciones de bases o pérdida o ganancias de las mismas. Si estos errores no se reparan a tiempo en el DNA, se originan mutaciones en el producto, la proteína, que pueden ser tanto puntuales, es decir afectar a un único aminoácido, como alterar completamente la pauta de lectura o producir una proteína truncada. Las lesiones en el DNA se reparan continuamente. Los mecanismos de reparación implican a muchos genes, que básicamente han de reconocer la hebra dañada, eliminar por delante y por detrás del nucleótido o nucleótidos incorrectos la zona afectada con escisión con nucleasas, rellenar el hueco con una actividad polimerásica leyendo la hebra molde correctamente y sellándose con DNA ligasas la hebra reparada (8).

Se ha observado que la inestabilidad de microsatélites en células cancerosas humanas se asocia con alteraciones en ciertos genes, los genes de reparación de los errores de replicación del DNA o *genes MMR* (9). Son mutaciones que causan mutaciones, apoyando la idea aportada por Loeb que propuso para las células cancerosas un fenotipo mutador, es decir, que han adquirido una capacidad anormalmente alta de mutar sus genes. Esta hipótesis se ha estudiado y comprobado en el cáncer colorrectal hereditario de tipo no poliposo (10). Un sistema de proteínas distinto se encarga de la reparación de las lesiones en el DNA causadas por la luz ultravioleta, o los carcinógenos químicos, un complejo mecanismo denominado repara-

ción por escisión de nucleótidos, escinucleasa o NER, compuesto en el hombre por al menos 17 proteínas. En síndromes hereditarios como *Xeroderma pigmentosum* algunos genes NER están alterados (11).

TRANSCRIPCIÓN

Transcripción es el proceso por el que los genes, tanto los estructurales (dirigen la síntesis de proteínas) como los que codifican para rRNA o tRNA, se copian a cadenas de polirribonucleótidos (RNAs), siguiendo la pauta dada por los apareamientos de Watson-Crick. Como la naturaleza de estos genes es muy distinta, van a existir enzimas especializadas en transcribir los distintos grupos de genes, denominándose respectivamente *RNAs polimerasas* II, I y III (12). Los procesos de transcripción en sí no van a originar directamente RNAs maduros, sino precursores que van a madurar en el propio núcleo, originando RNAs maduros que saldrán al citoplasma para realizar su función en la síntesis proteica. De los tres tipos de RNAs existentes, el ribosomal es cuantitativamente el más abundante (80%), frente al tRNA que supone un 15% del RNA total. Paradójicamente, el mRNA, que dirige la síntesis proteica, representa apenas entre 1-2% del RNA total celular.

El rRNA de mamíferos se va a transcribir por la RNA polimerasa I en una región nuclear conocida como nucleolo, como una única molécula precursora de pre-rRNA, que después será procesada en 3 tipos distintos de RNA, 18S (1900 nucleótidos), 5.8S (160 nucleótidos) y 28S (5100 nucleótidos). El rRNA 18S se asociará con 30 proteínas para formar la subunidad ribosomal pequeña eucariótica 40S. Los rRNAs 28S y 5.8S junto con el rRNA 5S (formado en el nucleoplasma por la RNA polimerasa III) se asociarán con aproximadamente 50 proteínas para formar la subunidad ribosomal grande 60S. Ambas subunidades constituyen el ribosoma eucariótico de 80S, unidad de sedimentación indicativa del tamaño. El ensamblaje de los rRNAs con proteínas para la formación de ribosomas tiene lugar en el nucleolo. Una vez formados, los ribosomas migrarán al citoplasma, tanto al lado externo del retículo endoplásmico como libres, para posibilitar la síntesis de proteínas.

Los genes que codifican para los precursores de tRNAs están organizados en tandem y repetidos, y van a ser transcritos en el nucleoplasma por la RNA polimerasa III. Una vez transcritos, sufren un proceso de maduración que implica la modificación de los extremos 5' (pérdida de una secuencia) y 3' (adición de CCA, donde se ligan los aminoácidos), así como la modificación de algunas bases nitrogenadas. Finalmente se produce el plegamiento de la molécula debido a la formación de regiones helicoidales internas que dejan bucles característicos, entre ellos el bucle del *anticodón*, por donde se producirá el reconocimiento de los *codones* o tripletes de los mRNAs durante la síntesis proteica.

Pero evidentemente vamos a describir con más detalle la transcripción de los llamados genes de clase II, que son aquellos transcritos por la RNA polimerasa II, concretamente los genes estructurales que codifican para proteí-

nas y los genes que controlan la formación de los llamados RNAs pequeños nucleares (*snRNAs*). Estos *snRNAs* se asocian a proteínas específicas pequeñas nucleares y forman complejos de ribonucleoproteínas (*snRNPs*) muy importantes en la transcripción de los pre-mRNAs: concretamente en el complejo de terminación (corte y poliadenilación) y en la post-transcripción (eliminación de intrones por corte y empalme). En primer lugar vamos a describir el modelo general de estructura de los genes de clase II. Las secuencias inmediatamente anteriores al lugar donde se inicia la transcripción tienen toda la información para la transcripción de ese gen y se conocen con el nombre de *promotores*. La secuenciación de muchos promotores de diferentes genes ha demostrado la existencia en la mayoría de los genes eucarióticos de unas secuencias "consenso" entre las que son de destacar la caja TATA entre 20 y 30 pb antes del inicio de transcripción (posición +1), la secuencia GC sobre -50, la secuencia CAAT un poco más alejada en el promotor (13). Estas secuencias son reconocidas por proteínas específicas llamadas *factores generales de transcripción*, como el TFIID que se une a TATA, SP1 lo hace a GC, NF1 a CAAT, y también interactúan con otros factores como TFIIB y TFIIF, facilitando la unión a la RNA polimerasa II y a la helicasa, lo que posiciona correctamente al complejo multiproteico para que empiece a transcribir el gen en la posición correcta (14).

Pero además de estos factores generales de transcripción que se unen a cajas o secuencias consenso del promotor, existen otros factores proteicos (*Activadores transcripcionales*) que se unen a secuencias más alejadas del promotor como las SDE (secuencias distales específicas), y que pueden estar incluso muy alejadas del promotor o detrás del gen o incluso dentro del gen, como las secuencias *intensificadoras* (15). Sobre estas secuencias interactúan proteínas que generalmente se caracterizan por actuar de forma dimerica, poseer un dominio de unión al DNA (región básica) y un dominio de transactivación por el que interactúan con el complejo proteico formado por los factores generales de transcripción-RNA polimerasa II y activan la transcripción (16). A este grupo de secuencias (que suelen ser repeticiones directas o palíndromos invertidos) pertenecen la mayoría de los elementos de respuesta a hormonas que se han secuenciado en los promotores eucarióticos, y sobre ellos actúan los activadores transcripcionales que en algunos casos pueden ser directamente receptores hormonales y en otros factores de transcripción expresados en respuesta a una determinada hormona o factor de crecimiento.

Los motivos estructurales que tienen estas proteínas que actúan como activadores transcripcionales y que interactúan con el DNA normalmente responden a alguna de las siguientes formas (17):

a) motivo hélice-vuelta-hélice, la primera hélice reconoce la secuencia del DNA en el surco mayor, mientras que la otra mantiene a la primera en la posición correcta. La proteína de unión al DNA *c-myc*, que se activa en respuesta a factores de crecimiento y diferenciación, presenta esta estructura.

b) cremalleras de leucina, que es un dímero en el que 4-5 leucinas quedan colocadas en una zona de hélice a un-

que en la secuencia lineal cada una estaba alejada 7 aminoácidos de la otra; los monómeros interactúan por dominios básicos con el surco mayor de la doble hélice. El complejo fos-jun, que es el factor de transcripción API que se activa en respuesta a factores de crecimiento, responde a esta estructura. Los CREBs y C/EBPs que son factores de transcripción que median la respuesta a cAMP también presentan estructura de cremalleras de leucina.

c) dedos de zinc, en los que la cadena polipeptídica se pliega y en la base dos pares de cisteínas o un par de cisteínas-par de histidinas quedan coordinados por un átomo de zinc. Esta estructura es característica de los receptores de hormonas tiroideas y de estrógenos, que además de poseer dominios de unión al DNA y de transactivación, presentan dominios de unión a su ligando específico, la hormona agonista (18-20).

Una vez que los factores generales de transcripción han reconocido al promotor, interactúan con la RNA polimerasa II y en su caso, son transactivados por activadores transcripcionales, se inicia el proceso de transcripción en dirección 5'-3', habiendo un desenrollamiento parcial de la doble hebra que permite el copiado de la hebra antisentido por parte de la RNA polimerasa II. Los nucleótidos recién polimerizados en el RNA naciente (A,U,C y G) interactúan por apareamientos de Watson-Crick con los complementarios en el molde durante un trecho, para según va desplazándose la horquilla de transcripción ir saliendo de la misma el RNA naciente (11,12). Cuando se han transcrito unos cuantos pares de bases, el extremo 5' del RNA naciente va a ser modificado por un sistema enzimático que le añade al primer nucleótido del RNA (normalmente una G) un GTP metilado, interactuando con un enlace especial 5'ppp5', lo que le da una estructura característica conocida como *cap*, que protegerá al RNA naciente del ataque de exonucleasas 5' y que también será una señal de reconocimiento para la lectura de ese mensajero durante la síntesis proteica. La transcripción sigue de forma continua hasta que en el gen aparece una secuenciación de terminación del tipo AATAAA. La RNA polimerasa continua transcribiendo más allá de esta secuencia, pero la secuencia AAUAAA es un reclamo para el llamado complejo de corte-poliadenilación por el que se va a formar el extremo 3' de los precursores de mRNAs. El proceso de corte-poliadenilación lo realiza un complejo *snRNPs*, concretamente el U11. El *snRNA* del complejo ribonucleoproteico reconoce la secuencia de terminación y uno de los factores proteicos del complejo corta detrás de la secuencia, generando un extremo 3'OH libre para la acción de otra enzima del complejo, la poli(A)polimerasa que añade colas de *poli(A)* de hasta 200 residuos. Esta será una característica de los RNAs mensajeros eucarióticos, la poliadenilación en su extremo 3', lo cual permite separarlos por cromatografía de afinidad en columnas de oligo-dT-celulosa.

Una vez sintetizado el transcrito primario, con sus características en el extremo 5'-cap y sus colas de poli(A) en el extremo 3', es necesario todavía eliminar los intrones o secuencias no codificantes, para la formación de mRNAs maduros. Este proceso lo llevan a cabo también complejos *snRNPs*, que incluyen *snRNAs* para reconocer secuencias y proteínas para aportar la activi-

dad catalítica. Las señales que indican la existencia de un intrón, como no podría ser de otro modo, son secuencias consenso que aparecen en el comienzo y en el final del intrón, flanqueadas por secuencias que también indican el final y el comienzo de los exones adyacentes. Normalmente, los intrones en su extremo 5' presentan la secuencia GU y en su extremo 3' la AG. También existe una A dentro del intrón situada sobre 40 nucleótidos antes del extremo 3' del intrón que es importante en el reconocimiento del intrón y que participa en el proceso de eliminación por corte y empalme de ese intrón. Todas estas secuencias actúan de reclamo para el reconocimiento por parte de los snRNAs asociados a la maquinaria proteica de corte y empalme. El complejo snRNPU1 reconoce el extremo 5' del intrón (G), rompiéndose el enlace fosfodiéster con el exón que le precede, mientras que el complejo U2 reconoce la A del interior del intrón, formándose un enlace fosfodiéster 2'-5' entre G y A, de manera que parte del intrón forma un lazo. A continuación, el complejo U5 reconoce el extremo 5' del intrón, y ayudado por otros complejos ribonucleoproteicos lo excinde, así como sella los dos exones anterior y posterior al intrón, eliminándose este en forma de lazo (21). De esta forma el transcrito primario de la RNA polimerasa II queda convertido en un mRNA maduro, con su extremo 5'-cap, su cola de poli(A) y sin intrones. Todo este procesamiento tiene lugar en el núcleo y una vez formado el mRNA saldrá por los poros nucleares al citoplasma donde tendrá lugar la síntesis de proteínas (22). Estos datos se resumen en la figura 2.

Aunque la mayoría de los genes estructurales eucarióticos responden a este modelo, algunos como las histonas no son poliadenilados ni presentan intrones, teniendo un mecanismo de formación algo distinto. Igualmente, otros genes distintos de los de la clase II presentan en ocasiones intrones, debiendo ser eliminados por mecanismos de corte y empalme que difieren de los mencionados anteriormente.

SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

La última etapa de la expresión génica es la que conduce a la síntesis de proteínas, que se produce en el citoplasma y en la que intervienen los mRNAs que llevan la información, los tRNAs activados con sus aminoácidos correspondientes, los ribosomas y una serie de factores proteicos que dirigen todas las etapas de la síntesis proteica.

Antes de entrar en el mecanismo de la síntesis de proteínas hay que hacer un pequeño resumen de como se produce el flujo de información de nucleótidos a aminoácidos. Los tRNAs poseen tripletes llamados anticodones que son complementarios a los tripletes informativos o codones de los mRNAs. Como el *código genético* está degenerado, es decir hay más tripletes distintos (64) que aminoácidos (20), un mismo tRNA puede reconocer varios codones distintos siempre que sólo cambien en la tercera posición del codón (hipótesis del balanceo). Por otro lado, es importante también reseñar que el código genético es un código universal para todas las especies, que en él existen codones de iniciación, como AUG que

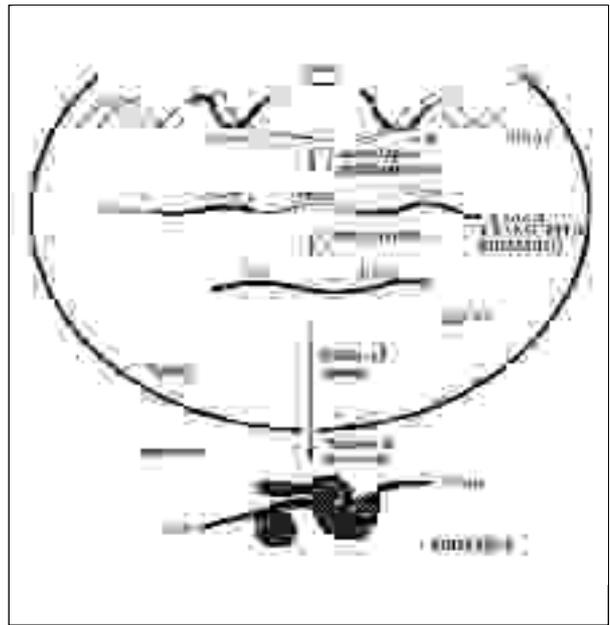


Fig. 2. Procesos de expresión génica en eucariotas.

codifica para Metionina y codones de terminación de lectura, como UAA, UAG y UGA, y que una vez que se empieza a leer un mensajero, se lee ininterrumpidamente hasta que aparece una señal de terminación.

La etapa más comprometida de la síntesis proteica es la iniciación de la misma. En esta etapa intervienen hasta nueve Factores de Iniciación eucarióticos (*eIFs*) facilitando secuencialmente la interacción de los distintos componentes. En primer lugar, el ribosoma 80S se separa en sus dos subunidades por la acción del *eIF3* y el *eIF1A*. La unión del metionil-tRNA iniciador a la subunidad 40S ribosomal, es mediada por el *eIF2* en su forma GTP activa, para formar el complejo de preiniciación 43S. Sobre este complejo se posiciona el mRNA ayudado también por una serie de factores proteicos de iniciación, reconociendo el Met-tRNA dirigido por *eIF2* al codón de iniciación AUG más cercano al extremo 5'-cap. Ahora se produce la interacción codon-anticodon, y ya sólo falta que se posicione la subunidad ribosómica grande 60S (dirigida por *eIFs*) sobre este complejo, para que se complete el complejo de iniciación 80S de la síntesis proteica. De todos los *eIFs* que intervienen en la iniciación, el *eIF2* es una proteína activa en su forma GTP, que cuando hidroliza este GTP a GDP se inactiva y se separa del complejo, necesitando un ciclo de intercambio de nucleótidos para volver a ser activa. Algunas subunidades proteicas ribosómicas son las que presentan la actividad GTPásica implicada en la inactivación y salida del factor del complejo (23). Otro de los factores claves de la iniciación es el complejo *eIF4F*, encargado del reconocimiento del 5'-cap del mRNA. Dicho complejo consigue unirse al mRNA cuando se disocia de sus proteínas de unión, lo que se produce por múltiples fosforilaciones de las mismas en respuesta a activadores de la síntesis proteica como la insulina (24).

Una vez situadas las dos subunidades ribosómicas sobre el mRNA y colocado el Met-tRNA sobre el codón

de iniciación, se podría decir que se definen dos posiciones en el ribosoma, una ocupada sobre AUG (posición peptídico) y una libre sobre el triplete adyacente en el sentido 5'-3' del mRNA llamada aminoacilo. En este momento se inicia la etapa de elongación, cuando factores específicos proteicos de elongación EF1a conducen a un nuevo aminoacil-tRNA, que tenga el anticodon complementario al codon presente en la posición aminoacilo, produciéndose su unión al sitio aminoacilo. Este factor también es una proteína G, con un ciclo de activación similar al descrito anteriormente. Por tanto, hay dos aminoácidos unidos a su tRNA correspondiente en las posiciones peptídico y aminoacilo. Estos aminoácidos interactúan entre sí por una actividad peptidil transferasa de la subunidad ribosómica 60S, formando un enlace peptídico y por tanto un dipéptido sobre la posición aminoacilo, quedando el primer tRNA que ocupa la posición peptídico descargado y tras lo cual abandona la misma. Ahora se produce un avance de todo el complejo, de forma que el tRNA que cargado con el dipéptido pasa a ocupar la posición peptídico, quedando de nuevo la posición aminoacilo libre para recibir a un nuevo aminoacil-tRNA portador del anticodon complementario al del codon que ocupa la posición aminoacilo. Esta traslocación de la cadena peptídica en formación del sitio aminoacilo al peptídico lo realiza un factor EF-2. Así continúa la síntesis proteica, leyéndose el mRNA en el sentido 5'-3' y formándose la cadena polipeptídica desde el extremo NH₂- hasta el -COOH terminal, hasta que en el lugar aminoacilo aparece un codon de terminación, que es reconocido por un factor proteico de terminación eRF, el cual introduce una molécula de H₂O y separa la cadena polipeptídica del tRNA, liberándose el

ribosoma y el mRNA. Debido a la poca abundancia de muchos mRNAs y a su vida media, que en ocasiones es muy corta, varios ribosomas pueden leer al mismo tiempo un mRNA, lo que se conoce como polisomas. Las proteínas nacientes contienen señales que determinan su destino final, pudiendo dirigirse hacia lugares internos de la célula, tales como lisosomas, mitocondrias o hacia el núcleo celular, o bien seguir la ruta secretora, para ser enviadas a vesículas de secreción o a la membrana plasmática. Estas señales forman parte de la propia secuencia proteica y por tanto vienen predeterminadas en el DNA.

CONSIDERACIONES FUTURAS

Todas las etapas de la expresión de genes son extraordinariamente complejas y están muy reguladas, especialmente aquellas de iniciación de la transcripción, mecanismo de eliminación de intrones, vida media de los mensajeros e iniciación de la síntesis proteica. Se conocen muchos genes eucarióticos que están regulados a uno o varios de esos niveles por factores hormonales, nutricionales, estadio del desarrollo, tipo tisular, etc. La aparición en línea germinal o somáticamente de alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales, deleciones, ampliaciones, sobreexpresión de genes etc, conducen en muchos casos a un crecimiento incontrolado de las células y a su malignización. El conocimiento molecular de los genes y de sus procesos de expresión será muy importante en el futuro de la Oncología para el diseño de terapias génicas que permitan el tratamiento y control del cáncer en las próximas décadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Lewin B (1997) Genes VI. Oxford University Press
- Sherratt DJ, Wigley DB (1998) Conserved themes but novel activities in recombinases and topoisomerases. *Cell* 93: 149-152
- Travers A (1999) An engine for nucleosome remodeling. *Cell* 96: 311-314 (1999)
- Greider CW (1999) Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell* 97: 419-422
- Diller JD, Raghuraman MK (1994) Eukaryotic replication origins: control in space and time. *Trends Biochem Sci* 19:320-325
- Waga S, Stillman B (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 67: 721-751
- Greider C (1998) Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future. *Current Biology* 8: 178-181.
- Weinert T (1998) DNA damage and checkpoints pathways: molecular anatomy and interaction with repair. *Cell* 94: 555-558
- Wiesendanger M, Scharff MD, Edelman W (1998) Somatic hypermutation, transcription and DNA mismatch repair. *Cell* 94: 415-418
- Perucho M (1996) Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biological Chem.* 377: 675-684
- Muñoz A (1997) Cáncer: genes y nuevas terapias. Editorial Hélice.
- Hahn S (1998) The role of TAFs in RNA polymerase II transcription. *Cell* 95: 579-582
- Burley SK, Roeder RG (1998) TATA box mimicry by TFIID: autoinhibition of Pol II transcription. *Cell* 94: 551-553
- Workman JL, Kingston RE (1998) Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem* 67:545-579
- Bjorklund S, Almouzni G, Davidson I, Nightingale KP, Weiss K (1999) Global transcription regulators of eukaryotes. *Cell* 96: 759-767
- Ogbourne S, Antalis TM (1998) Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem J.* 331: 1-14
- Tjian R, Maniatis T (1994) Transcription Activation: a complex Puzzle with few easy pieces. *Cell* 77:5-8
- Lucas PC, Granner DK (1992) Hormone response domains in gene transcription. *Annu Rev Biochem* 61:1131-1173.
- Pabo CO (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053-1095.
- Gasic GP (1994) Basic-Helix-Loop-Helix Transcription Factor and Sterol Sensor in a Single Membrane-Bound Molecule. *Cell* 77:17-19
- Murray HL, Jarrell KA (1999) Flipping the switch to an active spliceosome. *Cell* 96: 599-602
- Decker CJ, Parker R (1994) Mechanism of mRNA degradation in eukaryotes. *Trends Biochem Sci* 19:336-340
- Porse BT, Garret RA (1999) Ribosomal mechanics, antibiotics and GTP hydrolysis. *Cell* 97: 423-426
- Proud CG, Denton RM (1997) Molecular mechanism for the control of translation by insulin. *Biochem J.* 328: 329-341

Patología molecular de la linfomagénesis

M. SÁNCHEZ-BEATO, A. SÁEZ, R. VILLUENDAS, J. F. GARCÍA, J. C. MARTÍNEZ-MONTERO, M. A. PIRIS

Servicios de Anatomía Patológica y Genética, Hospital Virgen de la Salud, Toledo

MARCADORES MOLECULARES EN EL DIAGNÓSTICO DE LINFOMAS

La clasificación de linfomas está basada en una mezcla integrada de criterios clínicos, morfológicos y moleculares. El peso específico de los criterios moleculares se incrementa a lo largo del tiempo, de acuerdo a nuevos hallazgos que informan acerca de eventos genéticos específicos para tipos singulares de procesos linfoproliferativos o etapas diferentes dentro de un mismo proceso.

El uso de marcadores moleculares ha incrementado la reproducibilidad y significación clínica de la clasificación de linfomas, llevando a una propuesta unitaria, la Clasificación REAL, que está siendo actualizada como clasificación de la OMS.

De hecho, para un alto porcentaje de las neoplasias linfoides están siendo descritos marcadores moleculares específicos, como:

—*Linfoma folicular*: sobreexpresión de bcl2, derivada de translocación t(14;18)(q32;q21). La proteína bcl2 es un inhibidor universal de apoptosis, que en estos tumores protege a las células neoplásicas de la muerte celular.

—*Linfoma del manto*, sobreexpresión de ciclina D1, derivada de translocación t(11;14)(q13;q32). La ciclina D1 regula progresión en el ciclo celular, estando implicada en la transición del punto G1/S.

—*Linfoma de Burkitt*: sobreexpresión de c-myc, derivada de translocación t(8;14)(q24;q32), t(8;22)(q24;q11), o t(2;8)(p12;q24). La proteína c-myc es un factor de transcripción multifuncional implicado en progresión a lo largo del ciclo celular.

—*Linfoma B de célula grande*: alteración de bcl6, derivada de diversas translocaciones y mutaciones afectando al locus 3q27.

—*Linfoma linfoplasmacítico/inmunocitoma*: sobreexpresión de pax5, derivada de translocación t(9;14)

(p13;q32). Pax-5 es un gen homeobox que juega un papel en la regulación de la proliferación y diferenciación de células B.

—*Linfomas MALT*: t11;18(q21;q21). También han sido descritas translocaciones afectando 1q21, lugar donde ha sido identificado el gen bcl10 (Willis 1999). Bcl10 es un gen pro-apoptótico (contiene un dominio CARD), inactivado por mutaciones derivadas de su translocación junto con el gen IgH (mutaciones somáticas). Mutaciones del gen Bcl10 son comunes no solo en linfomas, sino en multitud de neoplasias de diferentes tipos celulares.

—*Leucemia Linfocítica Crónica-B (LLC-B)*: trisomía del cromosoma 12, deleciones del 13q.

—*Linfoma esplénico de la zona marginal (LEZM)*: La presencia de deleciones de un fragmento comprendido entre 7q31 y 7q32 es característica de esta neoplasia, lo que sugiere la localización de un gen supresor en esta localización.

—*Mieloma*: la t(6;14)(p25;q32) es un frecuente hallazgo, que yuxtapone el gen MUM1, en 6p25, con el gen IgH.

—*Linfoma T anaplásico*: la t(2;5)(p23;q35) es un hallazgo característico, que yuxtapone el gen NPM2 (proteína nucleolar), con el gen ALK (tirosin-quinasa).

No obstante, aún subsisten numerosos tipos de enfermedades linfoproliferativas para los que carecemos de marcadores moleculares precisos, o alteraciones genéticas de relevancia todavía desconocida.

Los genes implicados en estas translocaciones no parecen (con excepción de c-myc) conferir una ventaja dramática en el crecimiento a las neoplasias, sino permitir la acumulación de células que posteriormente sufrirán alteraciones genéticas y estímulos ambientales adicionales que condicionaran progresión tumoral. En suma, su papel es quizás similar al que juega el gen APC en el cáncer colorectal (Tabla II).

TABLA I

CLASIFICACIÓN REAL ACTUALIZADA POR LA OMS

Linfomas de células B
CÉLULAS PRECUSORAS <i>Linfoma / leucemia linfoblástico B</i>
CÉLULAS MADURAS <i>Leucemia Linfocítica crónica B / linfoma de linfocitos pequeños</i> <i>Leucemia Prolinfocítica B</i> <i>Linfoma B esplénico de la zona marginal</i> <i>Leucemia de células peludas</i> <i>Linfoma linfoplasmácico</i> <i>Linfoma de células del manto</i> <i>Linfoma folicular</i> <i>Linfoma B de la zona marginal, del Tejido Linfoide asociado a Mucosas</i> <i>Linfoma ganglionar de la zona marginal</i> <i>Linfoma B de células grandes difuso</i> <i>Linfoma de Burkitt</i> <i>Plasmocitoma</i> <i>Mieloma múltiple</i>
Linfomas de células T
CÉLULAS PRECURSORAS <i>Linfoma/leucemia linfoblástico T</i>
CÉLULAS MADURAS <i>Leucemia Prolinfocítica T</i> <i>Leucemia de células T grandes granulares</i> <i>Síndrome de Sezary</i> <i>Leucemia de células NK</i> <i>Linfoma extraganglionar NK/T, tipo nasal</i> <i>Micosis fungoide</i> <i>Linfoma T cutáneo primario de células grandes anaplásico</i> <i>Linfoma T paniculítico subcutáneo</i> <i>Linfoma T hepatoesplénico</i> <i>Linfoma T intestinal, tipo asociado a enteropatía</i> <i>Linfoma T angioinmoblástico</i> <i>Linfoma T periférico no especificado</i> <i>Linfoma/leucemia T del adulto (HTLV-1+)</i> <i>Linfoma anaplásico de célula grande, sistémico</i>
LINFOMA DE HODGKIN (ENFERMEDAD DE HODGKIN) Predominio linfocítico, nodular Hodgkin clásico: <i>Esclerosis nodular</i> <i>Rico en linfocitos</i> <i>Celularidad mixta</i> <i>Pobre en linfocitos</i>

Tipos en cursiva: linfomas más frecuentes.

REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

El papel protagonista en el entramado de moléculas que controla el ciclo celular le corresponde a un grupo de proteínas con actividad serina/treonina quinasa, llamadas CDKs (por *cyclin dependent kinases*: quinasas dependientes de ciclinas). Estos complejos enzimáticos

TABLA II

ALGUNOS MARCADORES GENÉTICOS COMUNES DE LOS LINFOMAS NO-HODGKIN

Linfoma	Tran'slocación	Gen	Función
IM LPL	t(9;14) (p13;q32)	pax 5	gen homeobox
LF	t(14;18) (q32;q21)	bcl-2	inhibe apoptosis
LCM	t(11;14) (q13;q32)	bcl-1	regula fase G1/S
Burkitt	t(8;14) (q24;q32) t(2;8) (q11;q24) t(8;22) (q24;q11)	c-myc	factor de transcripción
LDBCG	t(3;14) (q27;q32) t(3;22) (q27;q11) t(2;3) (p12;q27)	bcl-6	factor de transcripción
LACG	t(2;5) (p23;q35)	alk	tirosina-quinasa

IM LPL: Inmunocitoma/Linfoma Linfoplasmático; LF: Linfoma Folicular; LCM: Linfoma de la células del manto; LDBCG: Linfoma Difuso B de Célula Grande; LACG: Linfoma Anaplásico de Célula Grande.

cos están compuestos por una subunidad con actividad quinasa, CDK, y una subunidad reguladora, la Ciclina. La actividad quinasa del complejo está regulada positivamente por la unión de ambas subunidades, así como por la fosforilación de la subunidad catalítica. La responsable de esta fosforilación es otra proteína-quinasa: la proteína CAK (quinasa activadora de CDKs), compuesta ella misma por una quinasa (CDK7) y por una ciclina (Ciclina H). En la activación de las CDKs también participa la fosfatasa cdc25A. Además, las CDKs están reguladas negativamente por su interacción con un grupo de proteínas de bajo peso molecular llamadas CDKIs (por *cyclin dependent kinase inhibitor*: inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina), que inhiben su actividad. En los últimos años se ha descrito otro mecanismo de regulación del ciclo celular que va cobrando cada vez más importancia: la degradación de ciclinas y CDKs por la vía de la ubiquitina, por la cual se eliminan las proteínas que ya han llevado a cabo su función y/o impiden la progresión a lo largo del ciclo.

En las células de mamífero, se forman y se activan diferentes complejos Ciclina/CDK en momentos específicos del ciclo celular. Los complejos implicados en el control del ciclo celular, así como sus puntos de actuación aparecen esquematizados en la figura 1.

TABLA III

CDK Y CICLINAS

Ciclinas	CDK asociada	Fase del ciclo	CDKI
D (1,2,3)	CDK4-6	G1	INK4, KIP
E	CDK2	G1, G1/S	KIP
A	CDK2-1	S, G2/M	KIP
B(1,2)	CDK1	G2/M	(P21)

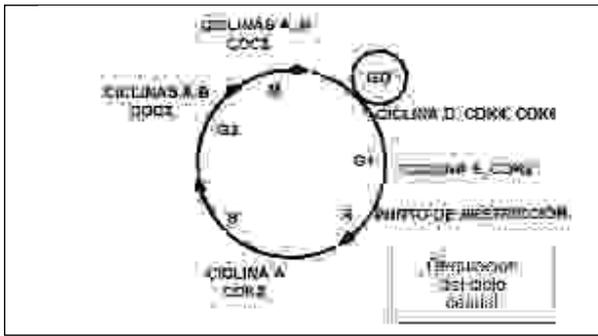


Fig. 1. Complejos CDK-kinasa a lo largo del ciclo celular.

Una de las dianas principales de las quinasas que actúan en la fase G1 del ciclo es la proteína Rb, así como otras proteínas relacionadas (p107 o p130). La proteína Rb está ausente o alterada en el tumor ocular retinoblastoma (de donde toma su nombre) y en otros tipos tumorales como son sarcomas, carcinomas de pulmón de célula pequeña y carcinomas de vejiga, próstata, mama, paratiroides e hígado. Rb es una proteína supresora de tumores cuyo estado de fosforilación varía a lo largo del ciclo, determinando su actividad en el mismo. Durante la transición G0/G1 permanece defosforilada, siendo fosforilada consecutivamente en múltiples residuos por los complejos CDKs durante la progresión del ciclo celular desde G1 hasta el final de la mitosis. Su efecto inhibitorio lo lleva a cabo en la forma defosforilada, mediante formación de complejos con otras proteínas, principalmente con los miembros de la familia E2F/DP1. E2F es un factor de transcripción capaz de inducir la expresión de múltiples genes implicados en el desarrollo de la fase S, como son ADN polimerasa- α , cdc2, c-myc, timidina quinasa, DHFR.

PUNTOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR

Para que una célula pueda finalmente llegar a dividirse, todo el proceso proliferativo ha de estar sometido a estrictos controles que aseguren la integridad genómica y la correcta duplicación y distribución de las organelas celulares. Para ello la célula dispone de sistemas de control con capacidad para frenar el ciclo celular y asegurar la reparación del genoma antes de la progresión del mismo.

Durante la fase G1 se decide si la célula continúa progresando a lo largo del ciclo celular, o por el contrario lo abandona y entra en un estado de quiescencia. El punto de restricción R define el momento en G1 en el que la célula puede progresar de forma autónoma a lo largo del ciclo, independientemente de la presencia de factores de crecimiento. El control de este punto de restricción lo llevan a cabo las CDKs, reguladas consecutivamente por las ciclinas D, E y A. La diana principal de este control parece ser la proteína Rb.

La expresión de la Ciclina D depende en mayor medida de factores externos que de la fase del ciclo en que se encuentre la célula. Cuando la célula abandona el estado de quiescencia, se induce la síntesis de Ciclina D

y sus niveles y los de sus quinasas asociadas, CDK4-6, se mantienen más o menos constantes mientras prosiga el ciclo celular. Su actividad, por tanto, ha de estar regulada por otros mecanismos, entre otros su interacción con CDKIs, más concretamente con los miembros de la familia de p16/INK4a. La proteína Rb es fosforilada por la Ciclina D/CDK4-6. Por tanto, p16/INK4a actuaría impidiendo la fosforilación de Rb y bloqueando la progresión del ciclo celular. Estas cuatro proteínas, Rb-p16/INK4a-Ciclina D-CDK4, constituyen una ruta de gran importancia en el control de la transición G1/S. De hecho, se han encontrado alteraciones en alguna de ellas en una proporción importante de tumores.

La Ciclina E, unida a CDK2, acelera la fosforilación de Rb. El factor de transcripción E2F activa la síntesis de Ciclina E, con lo que la ciclina E/CDK2 actuaría a través de un bucle de retroalimentación positiva fosforilando Rb y liberando E2F. Es en este momento cuando la fosforilación de Rb pasa de ser dependiente de mitógenos u otros estímulos extracelulares (ciclina D) a ser independiente (ciclina E). Los complejos ciclina D, E y A/CDK, pueden ser inhibidos por los CDKIs de la familia KIP, siendo p27^{KIP1} el que está más directamente relacionado con el paso por el punto de restricción. (Fig. 2).

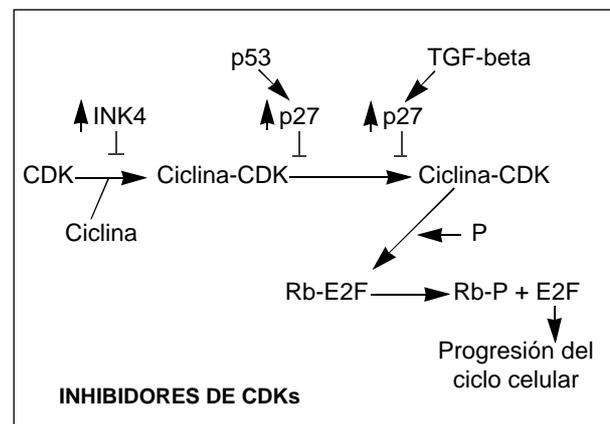


Fig. 2. Papel de los diferentes CDK inhibidores a lo largo de las diferentes fases del ciclo.

Durante la transición G1/S entra en juego otra proteína de gran importancia en la oncogénesis: la proteína p53, una proteína multifuncional involucrada en diferenciación y control del ciclo celular en diversidad de situaciones. Una de sus funciones principales es la inducción de parada del ciclo celular en G1 tras daño a ADN para facilitar su reparación. Sus niveles también se incrementan en respuesta a otras situaciones de estrés celular como son alteración en las reservas de nucleótidos, hipoxia, etc. De hecho, células que tienen este gen alterado o ausente son incapaces de parar el ciclo en G1 en respuesta a radiación-gamma. p53 funciona como factor de transcripción activando varios genes, entre los que se encuentran el gen que codifica la proteína MDM2 y el del inhibidor de quinasas p21^{WAF1} (El-Diery, 1993), siendo este último responsable, al menos parcial-

mente, de la parada del ciclo celular provocada por p53.

La inducción de la expresión de p21^{WAF1} por p53 tiene como consecuencia la inactivación de los complejos CDK y por tanto el bloqueo en la fosforilación de Rb (Harper, 1993), manteniendo este último su estado activo de represor del crecimiento, al no permitir la liberación del factor de transcripción E2F. De esta forma, indirectamente, la inducción de p53 impide la fosforilación de Rb. La relación existente entre p53 y Rb en el control del ciclo celular se basa en la acción no sólo de p21^{WAF1} (inducida por p53 e inactivadora de Rb), sino también en la de MDM2. Esta proteína es inducida por p53 y ambas se regulan mutuamente por un proceso de retroalimentación negativo (p53 induce la expresión de MDM2 que se une a p53 y la inactiva induciendo su degradación) (Haupt, 1997). Se ha identificado una región en su extremo C-terminal capaz de interactuar con Rb (Xiao, 1995), impidiendo su unión a E2F. Además, MDM2 también se une al factor E2F potenciando su función. De esta forma MDM2 sería capaz de inactivar ambas proteínas (p53 y Rb) (Xiao, 1995) de la misma forma que algunas proteínas virales. Esto sugiere la existencia de colaboración entre Rb y p53 en la regulación del ciclo celular, apoptosis y progresión tumoral.

INHIBIDORES DE CDKS (CDKIS)

La regulación negativa ejercida por los CDKIS (principalmente p16^{INK4a}, p21^{WAF1} y p27^{KIP1}) se ha revelado como uno de los mecanismos principales en el control del ciclo celular. El primer inhibidor de CDKs que se descubrió fue p21^{WAF1}, el cual se sabe que es inducido por la proteína p53 (El-Deiry, 1993). Posteriormente se describió que un nuevo inhibidor, p16^{INK4a}, se encontraba alterado en gran número de líneas celulares (Kamb, 1994), lo cual sugería que estos genes podrían actuar como supresores de tumores.

Hay descritas dos familias de CDKIS: la familia KIP y la familia INK4. La familia KIP está constituida por p21^{WAF1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}, y se caracteriza porque sus miembros son inhibidores universales; es decir se asocian con todos los complejos Ciclina/CDK de la fase G1/S. Por el contrario los miembros de la familia INK4: p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, sólo se unen y actúan sobre los complejos Ciclina D/CDK4-6. El mecanismo de inactivación de las CDKs también es distinto en ambas familias. Así, mientras p21^{WAF1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2} se unen a los complejos Ciclina/CDK, inactivándolos, p16^{INK4a} y su familia se unen a las quinasas CDK4-6 compitiendo con la Ciclina D e impidiendo de esta forma la activación de la quinasas. La inhibición de las CDKs llevada a cabo por ambas familias también se debe a que al unirse al complejo quinasas impiden la fosforilación de las mismas llevada a cabo por la proteína CAK (Fig. 3).

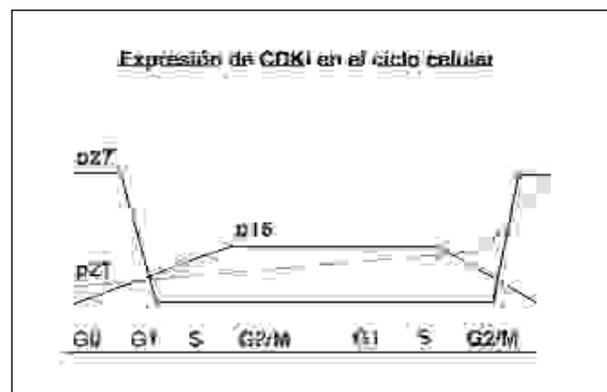


Fig. 3. Variaciones en el nivel de expresión de CDKIs en el ciclo celular.

FAMILIA KIP

p21^{WAF1}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2} forman una familia de proteínas capaces de unirse e inactivar múltiples complejos Ciclina/CDKs necesarios para el inicio de la fase S. Aunque los tres comparten la capacidad de unirse a las CDKs, sólo p21^{WAF1} puede también unirse a PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), inhibiendo la replicación de ADN dependiente de PCNA al impedir que este factor active la ADN-polimerasa.

Las tres proteínas contienen un dominio de unos 60 aminoácidos similar (36-47% de identidad de secuencia) en la región N-terminal siendo este dominio necesario y suficiente para la unión e inactivación de los complejos Ciclina/CDKs. Estos tres CDKIs tienen también una señal de localización nuclear cerca del extremo C-terminal. p21^{WAF1} tiene, sin embargo, una zona de unión a PCNA en la región C-terminal, independiente de la zona de unión a CDKs.

Las proteínas p27^{KIP1} y p57^{KIP2} tienen, además una secuencia consenso de fosforilación por CDKs (llamada caja QT). La presencia de esta región fosforilable por sus moléculas diana hace suponer la existencia de un proceso de retro-regulación entre las quinasas y sus inhibidores.

P21^{WAF1}

p21^{WAF1} (al que se le han asignado multitud de nombres: CIP1, CAP20, SDI1, MDA6) se identificó en fibroblastos humanos al coprecipitar con Ciclina D1 y CDKs (Xiong, 1992). En este modelo celular, la mayoría de las CDKs están formando complejos cuaternarios con ciclinas, PCNA y p21^{WAF1}. p21^{WAF1} se describió simultáneamente por varios grupos independientes, cada uno de los cuales le asignó uno de los múltiples nombres con que se denomina a esta proteína. Harper y cols. la identificaron como una proteína que interactuaba con CDK2 (CIP1) usando el sistema de dos híbridos en levaduras. También se identificó como un inhibidor de la síntesis de ADN en fibroblastos senescentes (SDI1). La proteína homóloga murina, CAP20 se aisló

al coprecipitar con la quinas CDK2. El-Deiry y cols. describieron a p21^{WAF1} como una proteína cuya expresión se induce por la proteína p53 normal pero (WAF1) no por la mutada (El-Deiry, 1993).

En estudios de transformación de células tumorales con p21^{WAF1} se consiguió parar el ciclo celular, así como alterar la morfología y la diferenciación celular; sin embargo no se indujo apoptosis. Al introducir p21^{WAF1} con vectores adenovirales en tumores humanos también se consiguió reducir el crecimiento tumoral. Esto en un principio hizo suponer que p21^{WAF1} se podía comportar como gen supresor de tumores.

A pesar de ser un inhibidor de CDKs, p21^{WAF1} se encuentra unido a complejos Ciclina/CDK activos. Parece ser que estos complejos activos contienen una sola molécula de p21^{WAF1} mientras que los complejos inactivos requieren la presencia de múltiples moléculas del inhibidor. Incluso se ha sugerido que niveles bajos de p21^{WAF1} facilitan la asociación de la ciclina con su quinas.

P21^{WAF1}, además de poseer la capacidad de inhibir la actividad de las CDKs, también inhibe la replicación dependiente de PCNA. De esta forma p21^{WAF1} tiene la capacidad tanto de bloquear la entrada en la fase S impidiendo el inicio de la síntesis de ADN, como de parar esta síntesis ya en la misma fase S, al inhibir al factor PCNA.

La región promotora del gen p21^{WAF1} contiene secuencias consenso de unión de la proteína p53. El hecho de que la proteína p53 nativa, tras producirse daño en el ADN induzca la expresión de p21^{WAF1} para permitir su reparación en la fase G1, ha sido confirmado en varios estudios, entre otros los que demuestran que agentes que dañan al ADN y aumentan los niveles de la proteína p53, también inducen la síntesis de p21^{WAF1}. La inducción de p21^{WAF1} por p53 para parar el ciclo celular ha aportado evidencia conclusiva de la relación existente entre un gen supresor de tumores (p53) y el control del ciclo celular.

Esta expresión de p21^{WAF1}, después de daño a ADN, es dependiente del estado funcional de la proteína p53, y por consiguiente falta en células con p53 alterada o ausente. Así, en fibroblastos murinos derivados de ratones deficientes en p21^{WAF1}, no se conseguía una parada efectiva del ciclo celular en respuesta a daño a ADN. Sin embargo, otras acciones de p53 no parecen mediadas por p21^{WAF1}, y así la inducción de apoptosis por p53 no está mediada por p21^{WAF1}.

p21^{WAF1} también se ha relacionado con el proceso de diferenciación celular ya que distintos estudios *in vitro* parecen demostrar que p21^{WAF1} podría estar involucrada en la salida del ciclo celular en un programa de diferenciación celular, al inducir parada del ciclo por mecanismos independientes de p53. Sin embargo, los ratones p21^{-/-} no presentan alteraciones en el desarrollo, lo que sugiere que el papel de p21^{WAF1} en la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario debe ser redundante con otras proteínas.

El gen que codifica p21^{WAF1} se encuentra localizado en el cromosoma 6p21.2. A pesar del papel crucial que p21^{WAF1} parece desempeñar en el control del ciclo celu-

lar, no se han encontrado alteraciones en dicho gen en los estudios realizados en varios tipos tumorales. Ratones carentes de p21^{WAF1} tampoco muestran una predisposición mayor a la aparición de tumores.

P27^{KIP1}

Esta proteína se identificó por primera vez como un inhibidor de Ciclina E/CDK2, unida a dicho complejo en células que habían parado su proliferación en la fase G1 en respuesta a estímulos extracelulares como son la adición de TGF- al medio de cultivo, o tras contacto celular (Polyak, 1994). Toyoshima y Hunter la identificaron también como una proteína que interacciona con el complejo ciclina D-cdk4.

Varios estudios *in vitro* muestran la capacidad que tiene p27^{KIP1} de frenar la progresión del ciclo celular en respuesta a distintos estímulos como son, TGF- en células epiteliales, inhibición del crecimiento por contacto celular, eliminación del suero del medio de cultivo, tratamiento con AMPc en macrófagos de ratón y rapamicina en linfocitos T. Los niveles de p27^{KIP1} disminuyen drásticamente cuando la célula deja el estado quiescente. Sin embargo, la disminución se detecta sólo a nivel de expresión de la proteína, ya que los niveles de ARNm no varían al estimular la proliferación celular. Por lo tanto p27^{KIP1} ha de estar sometida a control post-transcripcional, como se demuestra también en los estudios realizados por Pagano y cols., en los que se detecta una mayor actividad proteolítica sobre p27^{KIP1} llevada a cabo por la ruta ubiquitina-proteosoma.

Aunque p27^{KIP1} tiene la capacidad de unirse a distintos complejos CDKs, parece que es sobre el complejo Ciclina E/CDK2 donde ejerce su efecto inhibitorio. En distintos estudios *in vitro* se ha observado que aunque la actividad de la quinas CDK2 es bloqueada por p27^{KIP1}, no ocurre lo mismo con CDK4-6, cuya actividad quinas no se altera en células cuyo crecimiento ha sido parado por p27^{KIP1} (Soos, 1996). Se ha sugerido que el complejo Ciclina D/CDK6, que aún es activo unido a p27^{KIP1}, regularía la cantidad de p27^{KIP1} unida al complejo Ciclina E/CDK2, el cual sí es inactivo en presencia de p27^{KIP1} (Soos, 1996). En fibroblastos murinos se ha demostrado que p15 y p27^{KIP1} cooperan en la inducción de la parada del ciclo celular provocada por TGF-. La inducción de p15 provocaría el desplazamiento de las moléculas de p27^{KIP1} unidas a Ciclina D/CDK4 hacia los complejos Ciclina E/CDK2 a los cuales inhibe.

Hay autores que sugieren que p27^{KIP1} es el inhibidor de CDKs más directamente implicado en el control del punto de restricción ya que está presente en células quiescentes y sus niveles disminuyen drásticamente en la transición G1/S. Esto es consistente con los hallazgos efectuados en ratones p27^{KIP1}^{-/-} los cuales presentan un tamaño mayor debido a un aumento en el tamaño tisular y en el número de células, lo cual indica que hay un descontrol en la proliferación.

También se ha asociado la expresión de p27^{KIP1} con el proceso de diferenciación. Kranenburg y cols. sugie-

ren que la sobreexpresión de p27^{KIP1}, que provoca la inhibición de CDKs y el bloqueo en la fosforilación de Rb, inducen diferenciación neuronal en células de neuroblastoma de ratón.

Diversos estudios realizados por Catzavelos y cols. (1997) en carcinoma de mama y Loda y cols. (1997) en carcinoma colorrectal muestran una clara relación entre ausencia de p27^{KIP1} y baja supervivencia, proponiéndolo como factor pronóstico.

Las alteraciones en este gen, localizado en la región cromosómica 12p12 son muy raras en tumores, al igual que ocurre con p27^{KIP1}. Únicamente se han detectado deleciones en un linfoma B-inmunoblástico y en 1 Linfoma T asociado a HTLV-I, y una mutación stop en otro caso de Linfoma T asociado a HTLV-I. En el estudio realizado por Kawamata y cols. en multitud de tumores de distintos tipos –ováricos, de pulmón, testículo, endometrio, gástricos, cervicales, sarcomas, neuroblastomas, leucemias mieloides agudas, y leucemias linfoblásticas agudas– así como 20 líneas celulares no se han encontrado alteraciones en p27^{KIP1} (Kawamata, 1995).

P57^{KIP2}

p57/KIP2 es la última proteína perteneciente a la familia KIP descubierta hasta el momento (Lee, 1995). Se ha descrito que la sobre-expresión de esta proteína puede provocar un completo bloqueo del ciclo celular.

La distribución tisular de p57^{KIP2} (músculo esquelético, corazón, riñón, pulmón y cerebro) es más restringida que la de p21^{WAF1} o p27^{KIP1}. Su expresión en células completamente diferenciadas, sugiere que participa en la salida del ciclo celular.

El gen que codifica para p57^{KIP2} se encuentra localizado en el cromosoma 11p15.5. Esta región se encuentra frecuentemente delecionada en rhabdomyosarcoma, tumor de Wilms y sufre LOH en varios tumores humanos, (mama, vejiga, pulmón,...) y reordenamientos en pacientes con síndrome de Beckwith-Wiedemann (BW). Esta enfermedad se caracteriza por la pérdida específica del alelo materno, lo que sugiere que el imprinting genómico puede jugar un papel en la aparición de alteraciones genéticas en esta enfermedad. Por tanto, su papel inhibitorio del crecimiento, su localización cromosómica (implicada en tumores) y su expresión asociada a *imprinting* genómico, le convierten en un candidato a gen supresor de tumores. El fenotipo observado en los ratones carentes de p57^{KIP2}, parecen confirmar la relación entre p57^{KIP2} y el síndrome BW, no habiéndose observado sin embargo una mayor predisposición al desarrollo de tumores en estos ratones.

Tampoco se han encontrado mutaciones en el gen p57^{KIP2} (en la secuencia que codifica la región de unión a CDKs), al igual que ocurre con los otros miembros de la misma familia. Además, en estudios funcionales realizados, se ha observado que la expresión de p57^{KIP2} no se correlaciona con la supresión del crecimiento tumoral.

FAMILIA INK4a

Los miembros de esta familia, p16^{INK4a}, p15^{INK4b}, p18^{INK4c} y p19^{INK4d}, comparten por un lado su propiedad bioquímica de unión e inactivación exclusivamente de los complejos ciclina D/CDK4-6 y por otro su estructura proteica: todas poseen cuatro repeticiones del dominio de ankirina. Estos dominios se han identificado en proteínas que interactúan con otras macromoléculas. En estudios *in vitro* se ha descrito que alteraciones en regiones fuera de estos dominios no afectan a la actividad de la proteína. Parece que son estas regiones las involucradas en su interacción con las quinasas. p16^{INK4a} y p15^{INK4b} tienen un 50% de similitud en la región N-terminal y un 69% en la carboxilo terminal.

P16^{INK4a}

La proteína p16^{INK4a} se describió por primera vez como “proteína asociada” a CDK4 en células humanas. Posteriormente se clonó y caracterizó como un inhibidor específico de los complejos Ciclina D/CDK4-6 (Serrano, 1993). La diana principal de fosforilación de este complejo CDK es la proteína supresora de tumores Rb. Por tanto, p16^{INK4a} parece ser responsable de la inactivación de las CDKs al final de la fase G1, una vez que Rb se ha fosforilado en determinados residuos, permitiendo de esta forma la entrada de las células en la fase S. De hecho, la sobre-expresión de p16^{INK4a} tiene como consecuencia la parada en G1 en células con proteína Rb normal o funcional, pero sin embargo no parece ejercer ningún efecto en aquellas células en que Rb está inactivado. Estudios de transfección de p16^{INK4a} en células tanto p16^{-/-}, como con el promotor hipermetilado e incluso con el gen p16^{INK4a} normal, muestran bloqueo en el crecimiento en la fase G0-G1, lo que confirma su función reguladora negativa de la proliferación. También se han detectado altos niveles de p16^{INK4a} en células epiteliales. De acuerdo con esta observación, Serrano y cols. han demostrado que la inducción de senescencia en fibroblastos tanto murinos como humanos, al ser transfectados con ras, va acompañada por un incremento en la expresión de p16^{INK4a}, junto con p53. De acuerdo a estos resultados proponen que la inducción prematura de senescencia podría ser un mecanismo de supresión tumoral.

La región cromosómica 9p21 se encuentra delecionada en melanomas malignos, gliomas, cáncer de pulmón y en algunas leucemias. Buscando un gen supresor que se localizara en esta región, Kamb, Nobori y Okamoto identificaron el locus de p16^{INK4a}. En un principio se vio que p16^{INK4a} se encontraba alterado (mutado o delecionado) en un porcentaje muy alto de líneas celulares tumorales humanas. Sin embargo, el porcentaje de alteraciones en tumores primarios era mucho menor. Esto hizo suponer que la aparición de mutaciones en líneas celulares se debía a la selección durante el “establecimiento” de las mismas. Sin embargo, esta controversia parece zanjada por el descubrimiento de la existencia de múltiples mecanismos de inactivación como

son deleciones, reordenamientos, mutaciones y metilación de novo, dependiendo el tipo concreto de alteración en gran medida del tipo tumoral. Así, por ejemplo, las mutaciones puntuales y pequeñas deleciones son frecuentes en melanoma y cáncer pancreático familiares, carcinomas de esófago, cáncer de tracto biliar, y adenocarcinoma pancreático. La existencia de deleciones homocigotas de grandes fragmentos que eliminan el locus INK4a son comunes en carcinoma de célula pequeña de pulmón, gliomas malignos, carcinomas de células renales, tumores de cabeza y cuello, tumores de próstata, carcinomas de vejiga y leucemias linfoblásticas agudas. Por último, la metilación de novo parece que es común en cáncer de mama y colon y también se ha encontrado en la transformación de linfomas.

En el caso de neoplasias hematológicas, p16^{INK4a} aparece alterado muy frecuentemente en leucemias linfoblásticas agudas, habiéndose descrito deleciones que van desde un 22% hasta un 86% en leucemias linfoblásticas T. En linfomas B, se han encontrado alteraciones hasta en un 15% de los casos, la mayoría de ellos de alto grado.

P15^{INK4b}

El gen p15^{INK4b} se encuentra localizado muy próximo al de p16^{INK4a}: sólo a 25 Kb, y ambos genes están estrechamente relacionados. La función de p15^{INK4b} es similar a la de p16^{INK4a}. Sin embargo, p15^{INK4b} se diferencia de p16^{INK4a} en que induce parada en el ciclo celular en respuesta al factor TGF- β , por lo que p15^{INK4b} podría estar involucrada en la parada del ciclo celular inducida por esta citoquina.

Los estudios realizados hasta la actualidad sobre alteraciones de este gen en tumores humanos, demuestran que dicha alteración suele deberse a deleción asociada, en la mayoría de los casos, a p16^{INK4a} (leucemias, gliomas, mesoteliomas). La existencia de alteraciones genéticas de p15^{INK4b}, independientes de p16^{INK4a}, no parecen frecuentes en neoplasias humanas. Por este motivo se piensa que el gen diana de estas alteraciones es p16^{INK4a} y no p15^{INK4b}.

Sin embargo, se ha detectado hipermetilación del promotor de p15 en casi un 90% de AML sin alteraciones en p16, y es también bastante frecuente en ALL. De este estudio se desprende que alguno de los dos genes, p15 o p16 está involucrado en la mayoría de los tumores hematológicos examinados.

P18^{INK4c} Y P19^{INK4d}

Se han descrito otras dos proteínas pertenecientes a la familia INK4 de inhibidores de quinasas. Estas proteínas son p18^{INK4c} y p19^{INK4d}. Los genes que las codifican se encuentran localizados en las regiones 1p32 y 19p13 respectivamente. Aunque las alteraciones descritas en p16^{INK4a} y p15^{INK4b} son frecuentes, no ocurre lo mismo con p18^{INK4c} y p19^{INK4d} ya que muy raramente se han encontrado mutaciones en estos genes (se ha descrito la

existencia de deleción de p18 en un único caso de 20 mielomas múltiples analizados). Esto hace suponer que aunque los miembros de esta familia se encuentren evolutivamente relacionados y tengan funciones bioquímicas iguales, sus funciones biológicas tal vez sean distintas.

P19^{ARF}

Los estudios del locus INK4a han revelado la existencia de un transcrito con diferencias en el extremo 5', denominado p19^{ARF}, y derivado de un primer exón, (exón 1), centromérico al primer exón de p16 (exón 1). Aunque los exones 2 y 3 son comunes para p16 y p19^{ARF}, la secuencia de lectura difiere y consiguientemente ambas proteínas carecen de similitud en la secuencia de aminoácidos. Estudios recientes por Kamijo y cols. han mostrado que ratones con fenotipo p19^{ARF} nulo tienen alteraciones similares a las descritas previamente para los ratones con disrupción del exón 2, común para p16 y p19^{ARF}. También muestran como la parada del ciclo por p19^{ARF} actúa en relación con p53, ya que es abolida por pérdida de p53 (Kamijo, Cell, 1997).

p19^{ARF} no se adhiere a CDK o inhibe complejos formados por ciclina-CDKs, pero su sobreexpresión conduce a parada en el ciclo en G1-S y G2-M. p19^{ARF} interacciona físicamente con MDM2 bloqueando la degradación de p53 inducida por MDM2, y así impidiendo la neutralización de p53 vía MDM2. Así, en un mismo locus, 9p21, están presentes y comparten dos exones dos genes involucrados en la dos rutas supresoras de cáncer más comunes, la ruta de p53-ARF y la de p16-Rb. Ni mutaciones ni metilación parecen tener lugar en p19^{ARF}, pero su expresión puede perderse en algunas neoplasias como consecuencia de deleciones que, comúnmente afectan también a p16 y p15. Observaciones experimentales y modelos teóricos coinciden en mostrar cómo la inactivación de estas dos rutas es un proceso concertado en el que se asocian de forma significativa metilación de p16 con mutación de p53 por un

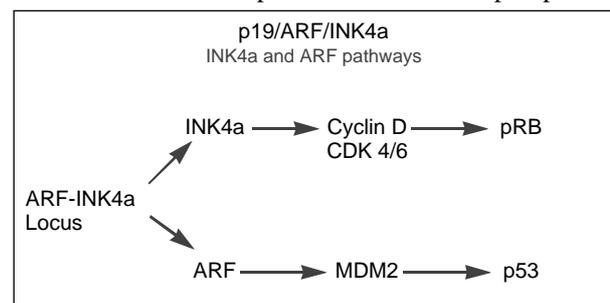


Fig. 4. Vías de supresión dependiente del locus 9p21.

lado y deleción de ambos p16^{INK4a} y p19^{ARF} por el otro.

ALTERACIONES EN LA RUTA DE LOS GENES SUPRESORES

A pesar del gran número de oncogenes existentes, las rutas controladas por los genes supresores Rb y p53 son

las que con más frecuencia se hallan alteradas en tumores humanos. El gen p53 se ha encontrado mutado aproximadamente en la mitad de los tumores humanos. Pero existen otros mecanismos diferentes a la existencia de mutaciones capaces de bloquear la actividad de p53. En algunos tumores, como sarcomas y gliomas, la proteína p53 es inactivada por amplificación del gen MDM2, que codifica una proteína que se une a p53 bloqueándola y degradándola (Haupt 1997, Kubbutat, 1997). De igual forma, es bien conocida la inactivación de p53 por proteínas virales como el antígeno T de SV40, la proteína E6 del virus del papiloma humano, el adenovirus E1B, EBNA-5 del virus de Epstein-Barr. El mismo efecto que producen las mutaciones de p53 se puede conseguir alterando la funcionalidad de proteínas transactivadas por p53 y mediadoras de su función. Así ocurre en un grupo de casos de carcinoma colorrectal con fenotipo mutador en los que no se detectan mutaciones de p53 y en los que en cambio se encuentran mutaciones *frameshift*, inserciones y/o deleciones en el gen que codifica para la proteína bax, proteína transactivada por p53 y mediadora de su función inductora de apoptosis.

La detección de alteraciones en la ruta de Rb en tumores humanos es también un fenómeno frecuente. De hecho, se han encontrado alteraciones de alguna de las proteínas que participan en esta ruta (Rb-p16-CDK4-ciclina D) en multitud de ellos. La consecuencia final de todas las alteraciones que ocurren en cualquiera de estos cuatro genes (la pérdida de p16 provoca el mismo efecto que el aumento en la expresión de Ciclina D o CDK4) es la inactivación de Rb. El ejemplo más claro se da en carcinoma de célula pequeña de pulmón donde la inactivación de Rb es muy frecuente y sin embargo p16^{INK4a} parece normal. Al contrario de lo que ocurre en el de célula no pequeña donde Rb es normal y p16^{INK4a} está frecuentemente delecionado. En glioblastomas en los que p16^{INK4a} y CDK4 no están alterados, se han encontrado mutaciones de Rb. En células uroteliales humanas se han detectado niveles altos de p16^{INK4a} en casos con Rb alterado. En un grupo de líneas celulares, sin embargo, se han detectado alteraciones concurrentes de p16^{INK4a} y ciclina D lo que sugiere que ambas proteínas pueden cooperar en la tumorigénesis.

Esto sugiere que esta ruta supresora, se comporta como una única diana en el proceso oncogénico, estando alterado en la mayoría de los tumores humanos.

MODELO MULTITAPAS EN LA GÉNESIS DE LINFOMAS

Hay bastantes evidencias a favor de que, en linfomas como en otras neoplasias, la situación clínica de linfoma es el resultado de un proceso complejo jalonado por etapas en las que juegan un papel tanto alteraciones genéticas como interacción entre las células neoplásicas y el medio en el que se desenvuelven.

Una secuencia posible de acontecimientos es la descrita a continuación:

1.- Translocación 14;18 u otro evento genético, que lleva a la presencia de celular con mayor capacidad de supervivencia.

2.- Estímulo antigénico que induce proliferación. El papel del medio extracelular es crítico en esta fase. Ejemplos de estímulos proliferativos derivados del medio están bien caracterizados en los linfomas MALT donde la presencia de una bacteria, *Helicobacter pylori* induce la activación de linfocitos T que, a través de la expresión del ligando para CD40, estimulan el crecimiento de linfocitos B. El virus de Epstein-Barr aparece también involucrado en la inducción de proliferación tanto de celular B como T.

3.- Inactivación del control de la transición entre las fases G1 y S del ciclo celular. El control de la progresión del ciclo celular mas allá del punto R se ejerce mediante un bucle complejo en el que participan diversos genes, como Retinoblastoma, p16, ciclonas D y quinasas CDK4-6. Alteraciones de alguno de estos genes permitiría la progresión a lo largo del ciclo.

4.- Inactivación de la ruta de parada del ciclo en respuesta a alteraciones del ADN. Este es un acontecimiento que distingue a neoplasias agresivas, y que tiene lugar a través de mutaciones de p53, anulación funcional de p53 o interacción con la vía p53-p21.

5.- Adquisición de capacidad de diseminación, con expresión de moléculas de adhesión para células endoteliales o matriz extracelular.

ALTERACIONES EN CDKI EN ENFERMEDAD LINFOPROLIFERATIVA

La información derivada de estudios moleculares previos sobre los genes inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas han mostrado alguna de las alteraciones genéticas que parecen jugar un papel en fases mas avanzadas de la progresión tumoral, especialmente las proteínas p21, p16 y p27.

—p21. Alteraciones en el locus de p21 son excepcionales en linfomas, como en otras neoplasias. Sin embargo, diferentes estudios en linfomas no-Hodgkin han mostrado que mutaciones de p53 bloquean la expresión de p21, aunque hay también mecanismos independientes de la mutación de p53 que llevan a la anulación funcional de este inhibidor de quinasas.

Bloqueo en la ruta p53-p21 no es un fenómeno muy frecuente en neoplasias linfoides, donde se suele ver en un porcentaje de 5 al 20%. Sin embargo, su frecuencia se incrementa de forma dramática en linfomas de alto grado secundarios a linfomas de bajo grado preexistentes. Además de asociarse a transformación agresiva, las mutaciones de p53 parecen inducir resistencia a drogas en diversos tipos de neoplasias linfoides.

SIGNIFICADO DE LA EXPRESIÓN DE P21, EN RELACIÓN CON EL STATUS DE P53

En linfomas no Hodgkin (LNH), el estudio simultáneo de las proteínas p53 y p21, en casos en los que se han secuenciado los exones 4 al 8 del gen p53, ha mostrado la existencia de diversos fenotipos:

- p53+, p21- : Casos con mutación sustitutiva de p53 (2/3). 1/3 sin alteraciones génicas de p53.
- p53+, p21+: Casos con p53 nativa.
- p53-, p21-: Casos con fenotipo silente (excepcionalmente debido a mutaciones sin sentido).
- p53-, p21+: Fenotipo inusual, presente en tumores diferenciados.

—p16. La pérdida en la expresión de p16 es la consecuencia común final de alteraciones genéticas y epigenéticas diversas y variables de unos modelos a otros que incluyen mutaciones génicas, pérdida de homocigosidad, metilación y alteraciones en la estabilidad de la proteína. Sin embargo, el nivel de expresión de esta proteína puede analizarse fiablemente mediante Inmuno-histoquímica (IHQ), dando una medida altamente informativa, ya que la mayoría de las alteraciones genéticas encontradas llevan a expresión defectuosa de p16 (Villuendas, 1998, Am J Pathol).

El análisis de la expresión de p16 en LNH muestra pérdida de la misma en el 37% de los linfomas analizados, siendo todos ellos de alto grado (el 58% de los linfomas agresivos estudiados presentaban pérdida de expresión focal o difusa de p16). Estos cambios, que llevan a la pérdida de p16, no se encuentran más que de forma excepcional en linfomas de bajo grado, caracterizados por índice proliferativo bajo, y sin embargo son un muy frecuente hallazgo en transformación agresiva de neoplasias indolentes (por ejemplo, un 75% de los linfomas B de célula grande secundarios a linfomas MALT presentan pérdida en la expresión de p16, siendo esta pérdida sólo detectable en el componente agresivo del tumor).

El gen que codifica la proteína p16 puede inactivarse por diferentes mecanismos, la mayoría de los cuales tienen como consecuencia final la ausencia de la proteína. p16 puede sufrir delección, mutación (generalmente sin sentido y "frameshift" que dan lugar a una proteína inestable y por tanto no detectable); reordenamientos y metilación de novo en las regiones CpG de la zona promotora (Merlo, 1995) (Cairns, 1995). En carcinomas laríngeos, se ha descrito sin embargo la existencia de mutaciones *frameshift* que dan lugar a proteínas detectables, con peso molecular diferente.

En el caso de las neoplasias linfoides, se sugiere que el mecanismo más frecuente de inactivación de p16 es la metilación de novo, ya que se ha detectado en un 25% de los casos estudiados, frente a un 18% de LOH o 5% de mutaciones (Villuendas, 1998). Otros autores describen un porcentaje de metilación en linfomas incluso mayor (48%), que aumenta hasta un 80% en linfomas de alto grado. La inactivación por hipermetilación de la región 5' podría explicar las peculiares características de los linfomas, en los cuales se observa frecuente coexistencia de tipos citológicos y velocidades de crecimiento diferentes. Esto refleja también la peculiar distribución de la proteína p16 en las secciones analizadas, donde con frecuencia sólo se observa pérdida parcial de la expresión, típicamente en las células grandes dotadas de mayor fracción de crecimiento. La metilación de novo no parece que ocurra en

un momento puntual, sino que es progresiva a lo largo de múltiples divisiones, lo que explicaría la presencia de pérdida selectiva de la expresión de la proteína p16 en algunas zonas del tumor.

SIGNIFICADO DE LA EXPRESIÓN DE P27 EN CASOS CON ALTO ÍNDICE DE PROLIFERACIÓN

La mayoría de los linfomas estudiados, tanto de EH como LNH, muestran una expresión de p27 similar a la encontrada en tejido linfoide no tumoral (siendo positivos los linfomas con bajo índice proliferativo y negativos los linfomas con índice proliferativo alto). Sin embargo, hay un grupo de casos de linfomas de alto grado (7%) que presentan expresión de p27, y por tanto una estabilización anómala de este inhibidor. Esta proteína p27 detectada anómalamente es probablemente inactiva, ya que está presente en tumores con alta fracción de crecimiento. Incluso, en contra de lo que se ha descrito en otras neoplasias, el alto nivel de expresión de p27 en linfomas agresivos (B de célula grande y Burkitt) aparece estadísticamente asociado con una más corta probabilidad de supervivencia.

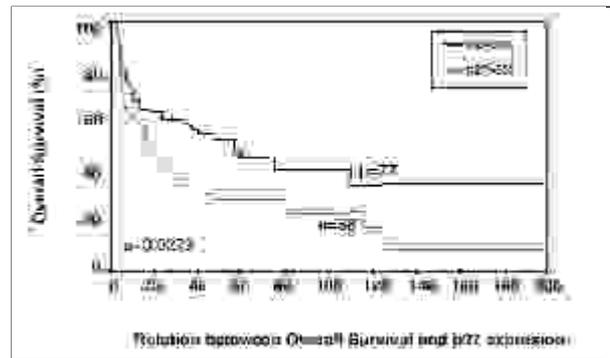


Fig. 5. En Linfomas B agresivos, la alta expresión de p27KIP1 se asocia a un curso clínico desfavorable.

El complejo Ciclina-CDK al que está unido la proteína p27 parece determinar el estado funcional del mismo. Se ha descrito que la proteína p27 unida al complejo Ciclina D/CDK4 no es activa (Soos, 1996), por lo que puede que p27 esté secuestrada por este complejo impidiéndose por tanto su efecto inhibitor sobre Ciclina E/CDK2. Por esto, se han analizado los complejos ciclina-CDK a los que está unido este inhibidor, encontrándose que los casos caracterizados por este incremento anómalo de p27 tiene a su vez sobreexpresión de ciclinaD3, lo cual puede explicar esta doble situación de incremento en la expresión de p27 y anulación funcional por secuestro de la misma. Esto ha sido confirmado mediante estudios de colocalización y coimmunoprecipitación (Sanchez-Beato, 1999, en prensa).

No obstante, existen otras hipotéticas vías para la anulación funcional de p27. Se han descrito algunos mecanismos de inactivación de p27, entre otros el llevado a cabo por la proteína Myc. Vlach y cols. han demos-

trado que el complejo Myc-Max supera la parada del crecimiento celular inducida por p27 al inducir el secuestro de p27 por una proteína aún no identificada (Vlach, 1996). También recientemente se ha descrito que la expresión de cdc25 es dependiente de c-myc (Galaktinov, 1996), justificando estos hallazgos el análisis de estos casos para sobreexpresión de c-myc y la posible adhesión entre p27 y cdc25.

Distintas proteínas virales, como son bZIP del VEB, E1a del Adenovirus y E7 del papilomavirus humano tipo 16, inactivan p27 estabilizándola, por lo que la infección por VEB podría ser otra posibilidad. Las mutaciones del gen p27 son muy raras, y, aunque se han detectado alteraciones aisladas en tumores hematológicos, estas son deleciones que darían lugar a ausencia de expresión. A pesar de esto y aunque sea un hecho improbable, no se pueden excluir las mutaciones como causantes de la estabilización de p27. Finalmente cabe también la posibilidad de que esté alterada la degradación de p27 por la vía de la ubiquitina, como se ha demostrado en casos de carcinoma colorrectal (Loda, 1997).

ANÁLISIS GLOBAL DE CDKIS

La proteína central en las rutas reguladas por los CDKIs en la transición G1/S del ciclo celular es la proteína Rb. La consecuencia final de las alteraciones en la expresión de los CDKIs en linfomas parece ser la inactivación de Rb.

Los mecanismos implicados son los siguientes:

—Inactivación de p16: esta proteína es la más directamente implicada en el control de la fosforilación de Rb en la fase G1 del ciclo celular. El alto porcentaje de LNH con ausencia de esta proteína la convierten en la alteración más frecuente en los mismos descrita hasta el momento, estando asociada a transformación agresiva de los mismos.

BIBLIOGRAFÍA

Citas generales:

1. Harper JW, Adami JR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip 1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75: 805.
2. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Tavitian SV, Stockert E, Day RS, Johnson BE, Skolnick MH: A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440
3. Kawamata N, Morosetti R, Miller CW, Park D, Spirin KS, Nakamaki T, Takeuchi S, Hatta Y, Simpson J, Wilczinski S, Lee YY, Bartran CR, Koeffler HP. Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor gene p27/KIP1 in human malignancies. *Cancer Res* 1995; 55: 2266.
4. Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J: Cloning of p27KIP1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. *Cell* 1994; 78: 59-66.



Fig. 6. Resumen de las diferentes etapas en la progresión neoplásica de las enfermedades linfoproliferativas.

—Mutación o inactivación funcional de p53: esta proteína sería incapaz de transactivar p21 y por tanto de frenar la fosforilación de Rb. En linfomas se observa pérdida de p21 en casos con niveles altos de p53 en linfomas con alto grado de proliferación.

—Inactivación de p27: ocurriría algo similar a lo que ocurre en ausencia de p16, p27 no podría inactivar el complejo Ciclina E/CDK2, involucrada también en el bloqueo de la fosforilación de Rb en el punto de restricción, lo que daría lugar a un crecimiento celular descontrolado. Ahora sabemos que los altos niveles de p27 encontrados en casos con un alto índice proliferativo se deben a secuestro y anulación funcional de p27 por complejos en los que forma parte la ciclinaD3.

—Ausencia de Rb: La pérdida parcial o total de la expresión de Rb está siendo encontrada como un fenómeno relevante tanto en linfomas no Hodgkin, como en enfermedad de Hodgkin, siempre asociada con una conducta clínica más agresiva. Las bases moleculares de esta pérdida son desconocidas. Algunos tumores concretos, como la variante blástica del linfoma del manto, han mostrado alteraciones en el grado de fosforilación de Rb (Jares, 1996).

p53-p21

5. Serrano M, Hannon GJ, Beach D, A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366: 704.
6. Willis TG, Jadayel DM, Du M et al. Bcl10 is involved in t(1;14)(p22;q32) of MALT B cell lymphoma and mutated in multiple tumor types. *Cell* 1999; 1: 35-44.
7. Xiao Z, Chen J, Levine AJ, Modjtahedi N, Xing J, Sellers WR, Livstone DM. Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* 1995; 375: 694.
8. Xiong Y, Zhang H, Beach D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* 1992, 71: 505.
9. Chilosi M, Doglioni C, Magalini A, Inghirami G, Krampera M, Nadali G, Rahal D, Pedron S, Benedetti A, Scardoni M, Macri

- E, Lestani M, Menestrina F, Pizzolo G, Scarpa A: p21/WAF1 cyclin kinase inhibitor expression in nonHodgkin's lymphomas: a potential marker of p53 tumor suppressor gene function. *Blood* 1996; 88: 4012-20.
10. EL-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer E, Kinzler KW, Vogelstein B.: WAF1, a potential mediator of p53 tumour suppression *Cell* 1993; 75: 817-825.
 11. Flaman JM, Fregourg R, Moreau V, Charbonnier F, Martin C, Chappuis P, Sappino AP, Limacher JM, Bron L, Benhattar J, Tadar M, Van Mier EG, Estreicher A, & Iggo RD: A simple p53 functional assay for screening cell lines, blood and tumors. *PNAS* 1995; 92: 3863.
 12. Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387: 296-9.
 13. Kubbutat MHG, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 1997; 387: 299-303.
 14. Martínez JC, Sánchez-Beato M, Villuendas R, Orradre JL, Algara P, Sánchez-Verde L, García P, López C, Martínez P, Piris MA. Mdm 2 expression in lymphoid cells and reactive and neoplastic lymphoid tissue. Comparative study with p53 expression. *J Pathol* 177: 27-34.
 15. PM, Fornace AJ Jr: The apoptosis-associated gamma-ray response of BCL-X(L) depends on normal p53 function. *Oncogene* 1996; 13: 2287-93.
 16. Sánchez E, Chacón I, Plaza MM, Muñoz E, Cruz MA, Martínez B, López L, Martínez-Montero JC, Orradre JL, García JF, Piris MA: The clinical outcome in Diffuse Large B-cell lymphoma is dependent of the relationship between different cell cycle regulators proteins. *J Clin Oncol*, 1998; 16:1-10.
 17. Sánchez Beato M, Piris MA, Martínez Montero JC, García JF, Villuendas R, García FJ, Orradre JL, Martínez P: MDM2 and p21WAF1/CIP1, wildtype p53 induced proteins, are regularly expressed by SternbergReed cells in Hodgkin's disease *J Pathol* 1996; 180: 58-64.
 18. Sigalas I, Calvert H, Anderson JJ, Neal DE, Lunec J: Alternatively spliced mdm2 transcripts with loss of p53 binding domain sequences: Transforming ability and frequent detection in human cancer. *Nature Medicine* 1996, 2: 912.
 19. Villuendas R, Pezzella F, Gatter K, Algara P, Sánchez-Beato M, Martínez P, Martínez JC, Muñoz K, García P, Sánchez L, Kocalkowsky S, Campo E, Orradre JL, Suarez F, Piris MA. p21^{WAF1/CIP1} and MDM2 expression in NHL. Relation to p53 status. A p53+ MDM- p21- immunophenotype associated with missense p53 mutations *J Pathology* 1997; 181: 51-61.
 20. Wahl AF, Donaldson KL, Fairchild C, Lee FY, Foster SA, Demers GW, Galloway DA: Loss of normal p53 function confers sensitization to Taxol by increasing G2/M arrest and apoptosis *Nat Med*. 1996. 2(1). P 729.
 21. Zhan Q, Álamo I, Yu K, Boise LH, Cherney B, Tosato G, O'Connor
- P27/KIP1*
22. Catzalevos C, Bhattacharya N, Ung YC, Wilson JA, Roncari L, Sandhu C, Shaw P, Yeger H, Morava-Protzner I, Kapusta L, Franssen E, Pritchard KI, Slingerland JM: Decreased levels of the cell cycle inhibitor p27Kip1 protein: prognostic implications in primary breast cancer. *Nature Med*. 1997. 3: 227-30.
 23. Galaktionov K, Chen X, Beach D: Cdc25 cell-cycle phosphatase as a target of c-myc. *Nature*. 1996 382:511-7.
 24. Lodá M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, Draetta GF, Jessup JM, Pagano M: Increased proteasome dependent degradation of the cyclin dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat Med*. 1997 3: P 2314.
 25. Sáez A, Sánchez E, Sánchez-Beato M, Chacón I, Muñoz E, Camacho FL, Martínez-Montero JC, Mollejo M, García JF, Piris MA. p27/KIP1 is abnormally expressed in DLBCL, and associated with an adverse clinical outcome. *Br J Cancer*, 1999, en prensa.
26. Sánchez-Beato M, Al Sáez, JC Martínez-Montero, M S Mateo, L Sánchez-Verde, R Villuendas, G Troncone, MA Piris. Cyclin Dependent Kinase Inhibitor p27kip1 in lymphoid tissue: p27KIP1 expression is inversely proportional to the proliferative index. *Am J Pathol*. 1997. 151: 151-160.
 27. Sánchez-Beato M, Camacho FI, Martínez-Montero JC, Sáez AI, Villuendas R, Sánchez-Verde L, García JF, Piris MA. Anomalous high p27/KIP1 expression in a subset of aggressive B-cell lymphomas is associated with cyclinD3 overexpression. P27/KIP1 ñ CyclinD3 colocalization and coimmunoprecipitation in tumor cells. *Blood*, 1999, en prensa.
 28. Soos TJ, Kiyokawa H, Yan JS, Rubin MS, Giordano A, DeBlasio A, Bottega S, Wong B, Mendelsohn J, Koff A: Formation of p27-CDK complexes during the human mitotic cell cycle. *Cell Growth & Differ*. 7:135-146. 1996.
 29. Vlach J, Hennecke S, Alevizopoulos K, Conti D, Amati B D: Growth arrest by the cyclin dependent kinase inhibitor p27Kip1 is abrogated by cMyc. *EMBO J*. 1996 15: 6595604.
- P16/INK4*
30. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter JL, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho KR, Hedrick L, Bova GS, Isaacs W, Koch W, Schwab D, Sidransky D. Frequency of
 31. Herman JC, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *PNAS* 1996, 93: 9821
 32. Homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary tumours. *Nat Genet* 1995; 11: 210-212
 33. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. *Cell* 1997; 91: 649-659.
 34. Koppers R, Zhao M, Hansmann ML, Rajewsky K: Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 1993; 12: 4955.
 35. Merlo A, Herman JG, Mao L, Lee DJ, Gabrielson E, Burger PC, Baylin SB, Sidransky D. 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor p16/CDKN2/MTS1 in human cancers. *Nature Med* 1995; 1: 686-692
 36. Ogawa S, Hangaishi A, Miyawaki S, Hirosawa S, Miura Y, Takeyama K, Kamada N, Ohtake S, Uike N, Shimazaki C, Toyama K, Hirano M, Mizoguchi H, Kobayashi Y, Furusawa S, Saito M, Emi N, Yazaki Y, Ueda R, Hirai H. Loss of the cyclin dependent kinase 4 inhibitor (p16, MTS1) gene is frequent in and highly specific to lymphoid tumors in primary human hematopoietic malignancies. *Blood* 1995; 86: 1548-1556
 37. Sandig V, Brand K, Herwig S, Lukas J, Bartek J, Strauss M. Adenovirally transferred p16 and p53 genes cooperate to induce apoptotic tumor cell death. *Nature Medicine* 1997; 3: 313-319.
 38. Villuendas R, Sánchez Beato M, Martínez JC, Sáez AI, Martínez Delgado B, García JF, Mateo MS, Benítez J, Martínez P, Piris MA. Loss of p16/INK4A protein expression in nonHodgkin's lymphomas is a frequent finding associated with tumoral progression. *Am J Pathology* 1998, 153:887-897.
- P57/KIP2*
39. Lee MH, Reynisdottir I, Massague J :Cloning of p57KIP2, a cyclin dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev*. 1995; 9(6): P 639-49.
- Rb*
40. Morente M, Piris MA, Abraira V. Et al. Adverse clinical outcome in Hodgkin's disease is associated with loss of Rb expression, high proliferation index and absence of LMP-1 expression. *Blood* 1997; 90: 2429-2436.

Tratamiento de los linfomas con anticuerpos monoclonales

J. GARCÍA-CONDE, I. BENET

Servicio de Hematología. Hospital Clínico Universitario. Valencia

El tratamiento del cáncer con fármacos requiere que estos sean específicos, que posean actividad y que se conozca el mecanismo de su resistencia.

La especificidad establece una acción única sobre la célula tumoral respetando las células normales y por lo tanto minimizando la toxicidad. Esta actividad selectiva debe ser eficaz actuando sobre el sistema celular de todas las células tumorales que origine su destrucción. Puede existir especificidad sin que se consiga una acción lesiva celular. Los fármacos generan o poseen en las células tumorales mecanismos de resistencia que es necesario superar para realizar una actividad antitumoral.

Hace cerca de un siglo, Erlich (1) utilizó el sistema inmune y particularmente la potencial actividad de anticuerpos frente al cáncer con el concepto de "magic bullet" (bala mágica). En 1975 Kohler y Milstein (2) descubren la técnica del hibridoma con la cual se pueden fabricar en cantidades importantes anticuerpos frente a un antígeno determinado.

En 1997, la FDA autorizó el registro del primer anticuerpo monoclonal para su utilización en clínica, el IDEC-C2B8 o Rituximab.

El largo periodo de tiempo transcurrido entre la producción de anticuerpos monoclonales en cantidades suficientes y su aplicación reciente en clínica se debe a diversos obstáculos que se exponen en la tabla I.

1. - ANTICUERPOS Y ANTÍGENOS

Los protagonistas de la actividad antitumoral del sistema inmune están presentados por los anticuerpos, los antígenos, el tipo de tumor (Fig. 1) y los mecanismos celulares que intervienen en el reconocimiento y en los fenómenos de coestimulación.

El anticuerpo consiste en una secuencia de aminoácidos unidos en dos cadenas pesadas y dos ligeras. Cada

TABLA I

OBSTÁCULOS PARA LA INTRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES EN CLÍNICA

- Reactividad de los AcMo con los tejidos normales
- Ausencia de efecto citotóxico potente
- Modulación, desprendimiento o internalización del antígeno de superficie tras la unión con el anticuerpo en el caso de los anticuerpos no conjugados.
- Respuesta inmune del huésped frente al anticuerpo administrado.

cadena ligera a la pesada y las cadenas pesadas entre sí se unen por puentes disulfuro. La separación química permite obtener fragmentos Fab y Fc. Los anticuerpos tienen frente a un determinado tumor especificidad y afinidad variable. En cierto momento se consideró al

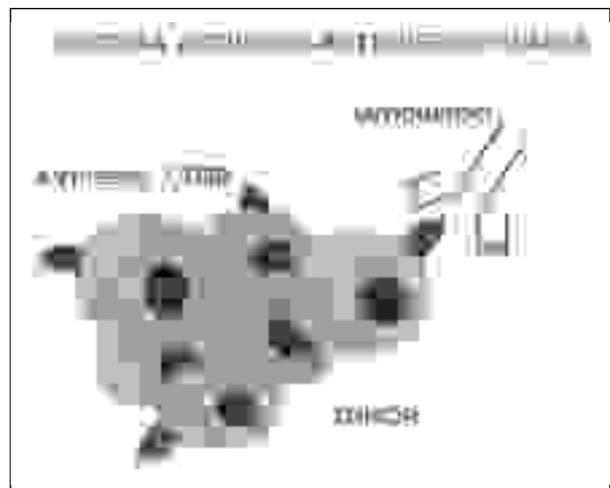


Fig. 1. Protagonistas del mecanismo inmune antitumoral: Anticuerpo, antígeno y tumor.

cáncer como una estructura extraña con antígenos tumorales específicos. Sin embargo, una parte importante de estas sustancias se han podido encontrar en tejidos normales, o como antígenos embrionarios (3).

El tratamiento con anticuerpos se ha realizado bajo dos formas: a) anticuerpos monoclonales nativos o modificados no conjugados o b) anticuerpos monoclonales a los que se unen radionucleidos, fármacos o toxinas potencialmente activos frente al tumor.

Los anticuerpos se emplearon en estudios iniciales con limitada eficacia y alta antigenicidad. Los anticuerpos quiméricos de ratón (Fig. 2) tienen secuencias de anticuerpo humano con sólo la región variable del anticuerpo original murino. Estos anticuerpos modificados tienen una vida media más larga *in vivo*, con menos inmunogenicidad y mayor actividad. En el anticuerpo denominado humanizado la única porción que queda de ratón son secuencias de aminoácidos que le proporcionan a este los tres puentes dimensionales de especificidad.



Fig. 2. Estructura de los anticuerpos quimérico murino-humano.

Los linfocitos B y T clonales de las distintas enfermedades linfoides expresan antígenos específicos de línea. Este antígeno tanto en su secuencia como en su estructura es único para cada célula del clon anormal. En el tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo (4) se emplea esta característica para su desarrollo y especificidad.

Los antígenos de las células tumorales son diversos en especificidad y funciones. La actividad del anticuerpo depende en gran parte de las funciones que la estimulación del antígeno puede realizar en la transmisión transmembrana y de su efecto de destrucción del tumor (Tabla II).

Por otra parte, los antígenos tienen propiedades como la densidad de expresión, presencia en la totalidad de las células tumorales, fenómenos de modulación, mutaciones o la propia función biológica las cuales tienen una importancia e implicación variable según el tipo del anticuerpo que se utilice (Tabla III).

El antígeno CD20 (Fig. 3) tiene una particular importancia como diana para el tratamiento de ciertos tipos de linfomas que tienen una alta expresión de esta molécula. La molécula CD20 se encuentra inserta en la membrana, atraviesa esta por las regiones hidrofóbicas. El CD20 es un componente del complejo de señales de

TABLA II
CARACTERÍSTICAS DE ANTÍGENOS TUMORALES DE LINFOMAS

Antígeno	Distribución	Modulación	Mutación	Función
CD20	Células B	No	No	Canales Ca ⁺⁺
CD19	Células B	Sí	No	Complejo de transducción señales
Ig idiотipo	Células B	Sí	Sí	Receptor Antígeno
CD40	Células B	Sí	No	Receptor molécula coestimuladora
CD22	Células B	Sí	No	Receptor adhesión
CD25	Células T	Sí	No	Receptor alfa IL-2
HLA-DR	Células B y T	No	Sí	Presentación antígeno
CD5	Células T	Sí	No	Ligando para CD72
CD52	Células T, B Monocitos, plaquetas	No	Sí	Desconocido
CD10	Células Pre-B Algunas B y T	Sí	No	Zinc metaloproteasa
CD4	Células T	Sí	No	Reconocimiento AgT en la célula
CD21	Células B	¿?	No	Receptor EBN/C3d en células B

transducción interviniendo en la regulación de los linfocitos B tras su activación (5).

La expresión del CD20 se extiende a toda línea de linfocitos B excepto a las células progenitoras iniciales y a las células plasmáticas⁶.

La estructura del CD20 sugiere una función como transportador de membrana o canales de iones particularmente canales de Ca⁺⁺ transmembrana. Otras actividades se dirigen hacia el ciclo celular y a la participación en funciones inmunes (Tabla IV).

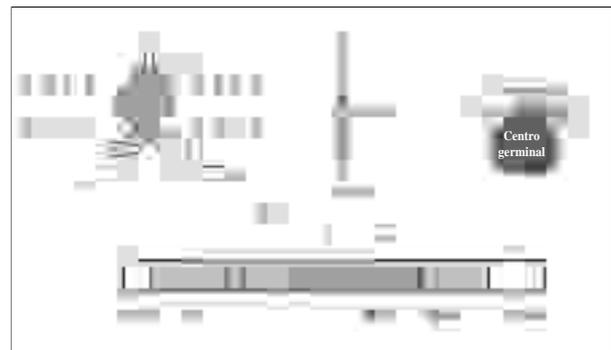


Fig. 3. Estructura del antígeno CD20 y su situación en la línea linfocitaria B. B: linfocito B; T: linfocito T; M: macrófago; N: neutrófilo; GR: glóbulos rojos; P: plaquetas.

2. MECANISMO DEL EFECTO ANTITUMORAL

Para que la actividad antitumoral de un anticuerpo sea importante, las células tumorales deben presentar el antígeno intensamente.

TABLA III
CARACTERÍSTICAS DE ANTÍGENOS PARA EL TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS MONOCLONALES

Características Antígeno	Tipos de Anticuerpo Monoclonal		
	No Conjugado	Radioconjugado	Inmunotoxina
Expresión alta densidad	Importante	Importante	Importante
Presente en todas las células tumorales	Necesario	Importante	Necesario
Modulación o Internalización	Inconveniente	Inconveniente para ¹³¹ I. Posible ventaja para radiometal ⁹⁰ Y.	Necesario
Secreción o Desprendimiento del Ag	Inconveniente	Inconveniente	Inconveniente
Mutación Ag o pérdida de variantes	Inconveniente	Inconveniente puede ser realizado efecto cruzado	Inconveniente
Función biológica	Muy importante	Menos importante	Menos importante
Expresión sobre las células críticas del huésped	Inconveniente	Inconveniente	Inconveniente

TABLA IV
CARACTERÍSTICAS DEL ANTÍGENO CD20

- Componente del complejo de transducción de señales implicado en la regulación del crecimiento de los linfocitos B tras su activación.
- Proteína situada en la membrana cuyas regiones hidrofóbicas la atraviesan.
- La función se realiza como un transportador transmembrana que regula los canales de calcio.
- Regula la progresión del ciclo celular.
- Induce fosforilación de proteínas celulares.
- Induce la apoptosis.
- Interviene en la respuesta inmune.
- No se encuentra expresado en las células más iniciales y en las plasmáticas.
- Los linfomas en los que el CD20 se expresa con más intensidad son: linfoma folicular, linfoma del manto y linfoma difuso de células grandes.

Los anticuerpos anti-CD20 presentan respecto a los linfomas de células B la mayor actividad respecto a la mayor intensidad del antígeno CD20 en las células. El linfoma folicular, el linfoma de células grandes y el linfoma del manto, tienen una mayor intensidad de CD20 y la eficacia del anticuerpo es superior a otros linfomas B como son los linfomas linfocíticos y los linfomas MALT, donde la intensidad del CD20 es más débil (Fig. 4 y 5).

El antígeno de la célula tumoral debe ser específico, no expresándose en las células normales.

Las relaciones entre antígeno y anticuerpo para que este sea eficaz se resume en la tabla V. Otros mecanismos antitumorales están relacionados con la inmunidad celular bien mediante el reconocimiento de antígenos tumorales por células T o a través de procesos de coestimulación.

Estudios *in vitro* con el antígeno anti-CD20 han demostrado que su actividad se realiza mediante dos mecanismos (Fig. 6):

a) Mecanismo citotóxico mediado por el complemento. La unión del C₁ se realiza en el dominio Fc de la IgG1 humana que coincide con una activación de la cascada del complemento y a la formación del “complejo



Fig. 4. Intensidad de antígeno CD 20 en diversos linfomas.

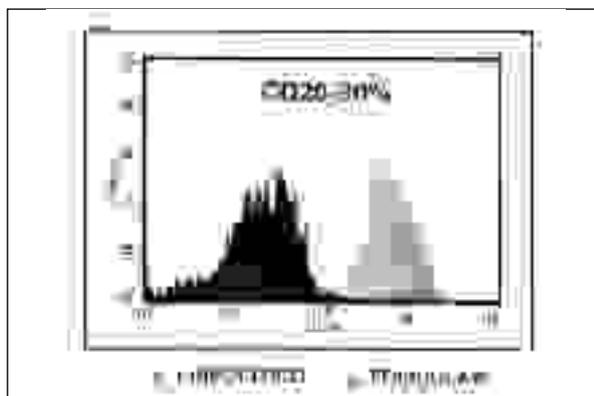


Fig. 5. Expresión citofluorométrica de la mayor y menor intensidad del antígeno CD20 en el linfoma linfocítico y en el linfoma folicular.

TABLA V

REQUISITOS DEL SISTEMA ANTÍGENO Y ANTICUERPO PARA QUE ESTE PUEDA SER EFICAZ EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

- El antígeno diana debe estar expresado en todas las células tumorales.
- La expresión del antígeno diana debe ser intensa.
- El antígeno no debe desprenderse de la superficie celular o estar inaccesible.
- No debe producirse modulación de la expresión del antígeno.
- El anticuerpo no debe poseer antigenicidad y por lo tanto generar una respuesta anticuerpo.
- Eficacia citotóxica

atacante de membrana". La célula se altera de tal forma que conduce a la apoptosis de la misma. Para que este mecanismo sea eficaz, es necesaria la fijación del complemento en la región Fc del anticuerpo quimérico y para ello, este debe tener humanizada esa porción (7,8).

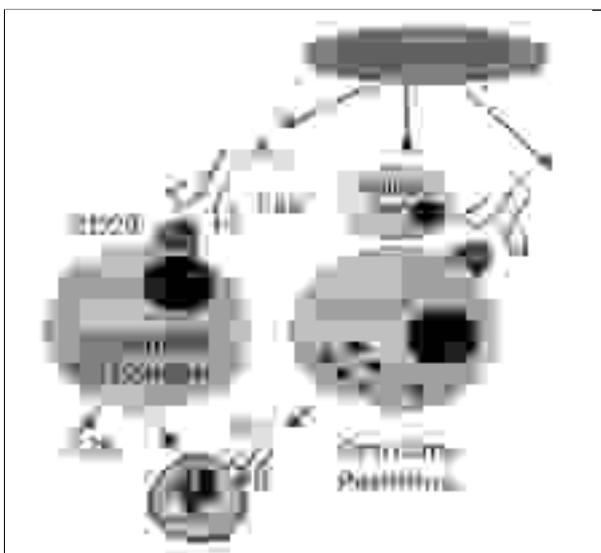


Fig. 6. Mecanismo antitumoral por anticuerpos quiméricos dependiente de complemento y mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

b) Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). El complemento se fija a la misma región Fc del anticuerpo. En las células tumorales, tanto en uno como en otro mecanismo, las regiones variables de ratón se unen específicamente al CD20 presente en la célula B. Las células que intervienen en este proceso (células NK) poseen receptores Fc que fijan complemento y permiten interactuar con ciertas células, las cuales liberan gránulos tóxicos tales como granzima y perforinas que contienen en su citoplasma. Estas sustancias perforan las células y producen apoptosis.

Los mecanismos antígeno anticuerpo verificados *in vitro* no han sido trasladados y comprobados *in vivo*. Es dudosa la participación del complemento ya que en humanos este no se reduce al administrar el anticuerpo.

La participación del mecanismo celular mediante células NK con actividad citotóxica es importante ya que el bloqueo del receptor Fc de estas células parece inhibir esta actividad. Por otra parte, se desarrollan actualmente estudios para estimular a las células NK con GM-CSF, IFN, IL-2, G-CSF (9), y otras citocinas que intentarán aumentar la eficacia activando esta vía.

En conclusión, para que la reacción antígeno-anticuerpo sea eficaz en cuanto a respuestas clínicas, el desarrollo de señales transmembrana representa un mecanismo fundamental. Este proceso conduce a cambios celulares que originan un mecanismo de apoptosis.

Los anticuerpos anti-idiotipo (10) actúan sobre receptores antigénicos de las células B. En la superficie de estas células hay Ig que son clonales para un tumor de forma específica. Ese tratamiento con este tipo de anticuerpos, es específico para cada tumor pero, requiere fabricar un anticuerpo para cada paciente. La actividad antitumoral de este anticuerpo puede ser directa sobre las células tumorales junto a acciones dependientes de complemento o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Esta actividad antitumoral se correlaciona con la inducción de fosforilación de tirosina. En esta actividad interviene la función biológica de la Ig y el estado de diferenciación del tumor. Esta actividad se expresa en términos de inducción de apoptosis en tumores con una alta expresión de bcl-2 y por lo tanto resistencia a la muerte celular por apoptosis.

El tratamiento con anticuerpos anti-idiotipo tiene una serie de problemas como la modulación antigénica, la secreción tumoral que bloquea el idioma en el suero y genera anticuerpos frente a él. Por otra parte, el aspecto más importante es el escape o recaída de pacientes con células tumorales con variantes idiotipos que deriva de mutaciones somáticas de esta estructura. Esta situación limita la actuación de un solo anticuerpo.

Las vacunas anti-idiotipo (11) inducen una respuesta inmune específicos frente al tumor. El procedimiento consiste en aislar la IG (idioma) del tumor y utilizarlo cuando el paciente está en remisión tras tratamiento con quimioterapia. La respuesta inmune requiere una proteína transportadora (KLH) y un adyuvante (SAF-1).

Esta vacuna idioma produce una respuesta inmune policlonal que implica la mayoría de las mutaciones de Ig que se detectan en el fenómeno de escape de los tratamientos con anticuerpos anti-idiotipo.

Estos tratamientos tienen el inconveniente de tener que confeccionar una vacuna para cada paciente. Sin

TABLA VI

MECANISMO DEL EFECTO ANTITUMORAL MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES NO CONJUGADOS

- Efectos mediados por mecanismo inmune.
 - *Lisis dependiente del complemento
 - *Citotoxicidad celular dependiente de antígeno
- Efecto directo antiproliferativo o apoptosis
 - *Imitación de un ligando
 - *Bloqueo de un ligando
 - *Interferencia con función
- Interacción o sensibilización con otras modalidades

embargo, técnicas nuevas permiten aislar genes tumorales idiotipo específicos procedentes del DNA que contienen secuencias aisladas de idiotipo o combinadas con secuencias inmunomoduladoras que reducen el tiempo de producción y aumentan la inmunogenicidad. Además del efecto antitumoral inmune, los anticuerpos monoclonales pueden tener un efecto directo antitumoral: a) mediante bloqueo con un ligando como el anti-CD25 con bloqueo de IL-2, b) imitación de un ligando natural, como el anti-idiotipo simulando un antígeno, c) interfiriendo con una molécula de superficie (CD20, CD19) (Tabla VI).

3. TRATAMIENTO CON ANTICUERPOS NO CONJUGADOS

Se han aplicado en procesos linfoproliferativos B y T encontrándose con diversas fases de desarrollo los ensayos y con resultados terapéuticos interesantes. La estructura de estos anticuerpos es diversa; mucina como en el caso del anti-CD25 y Lym-1 (HLA-DR), quimérica como el anti-CD20, humanizado como el anti CD52 o CAMPATH-1H y anti-idiotipo.

El Rituximab o anti-CD20 es el único registrado por la FDA y disponible en nuestro país.

3.1. TRATAMIENTO CON ANTI-CD20. RITUXIMAB

Es un anticuerpo quimérico que contiene IgG1-kappa murina en región variable e IG₁-kappa cadena pesada y ligera humana en región constante.

Ensayos fase I: fueron realizados en dos trabajos sucesivos por Maloney (12,13) con la intención de encontrar la dosis tóxica limitante. El primer estudio se basó en escalar la dosis de Rituximab de forma progresiva desde 10mg/m² a 500 mg/m². El segundo trabajo valoró 4 dosis semanales desde 125 mg/m²/semanal a 375 mg/m²/semanal. En ninguno de los dos ensayos se encontró la dosis tóxica limitante y se adoptó la dosis de 375 mg/m²/semanal. Con esta dosis se obtenía el mayor efecto y se reproducían los efectos biológicos y farmacocinéticos.

Los linfocitos B descienden considerablemente después de la 1ª administración y se inicia su recuperación después del 4º-6º mes (Fig. 7). El descenso de las inmunoglobulinas y complemento no es significativo. La

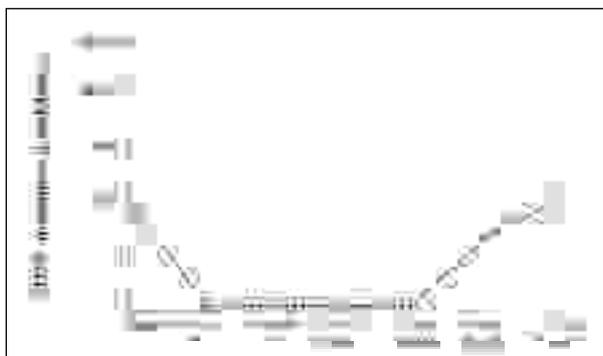


Fig. 7. Descenso de linfocitos B con la administración de anti-cuerpo anti-CD20.

reducción de plaquetas ocurrió en casos aislados, de forma particular si previamente había trombocitopenia.

La farmacocinética de los anticuerpos monoclonales es diferente a la de la quimioterapia. Los aspectos más característicos son los siguientes:

a) La vida media del anticuerpo monoclonal es prolongada, aproximadamente de 10 días y persisten niveles durante varios meses cuando el esquema de tratamiento es de 375 mg/m² x 4 semanas.

b) El nivel del anticuerpo es inicialmente elevado y a ello sigue un rápido descenso y luego persiste por varias semanas. La fase de descenso se debe a la unión del anticuerpo con la molécula CD20 del linfoma y con las células circulantes tanto del linfoma como con los linfocitos B.

c) En el esquema de 375 mg/m²/semana x 4 semanas el nivel del anticuerpo después de la rápida elevación inicial es mayor en cada una de las semanas siguientes a la primera. Es posible que este fenómeno se deba a la ocupación por la primera dosis de una parte de las moléculas CD20 del tumor y de las células CD20 que se encuentran en los linfocitos B de la sangre periférica. Los niveles del anticuerpo tienen una relación con la respuesta y cuando no hay respuesta el clearance de Rituximab es más rápido.

d) Los niveles séricos varían además de un paciente a otro y depende de una serie de factores además de la dosis del anticuerpo. La masa tumoral, la esplenomegalia, la respuesta del tumor y la presencia de células circulantes se expresan con niveles bajos del anticuerpo probablemente debido a la unión del fármaco al tumor o por un clearance rápido del anticuerpo cuando existe resistencia al tumor.

Ensayos fase II y III en Linfomas de bajo grado: (Fig 8). El ensayo fase II desarrollado por Maloney (14) en 37 pacientes con esquema semanal de 375 mg/m²/semana x 4 semanas en linfoma de bajo grado y folicular en recaída y que habían recibido una media de 2 tratamientos previos de quimioterapia mostró 46% de remisiones con 8% de RC. El tiempo medio a la progresión fue de 10,2 meses y 5 pacientes superaron 20 meses.

El estudio fase III dirigido por McLaughlin (15) con el esquema semanal de Rituximab en el que entraron 166 pacientes y en el que participaron 31 centros, aportó resultados similares al anterior (Tabla VII). Las respuestas dependen de varios factores los cuales se exponen en la tabla VIII.

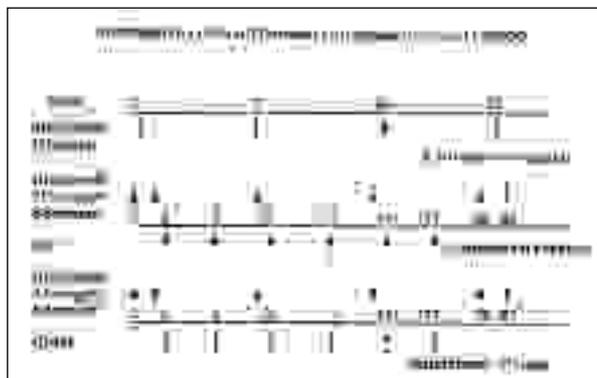


Fig. 8. Protocolos con Rituximab en linfomas de bajo grado.

TABLA VII

ENSAYO CON RITUXIMAB SEMANAL EN LINFOMAS
INDOLENTES EN RECAÍDA

—Respuestas	RG: 50%	RC: 6%
—Duración media de seguimiento:	11,8 m	
—Mediana tiempo a la progresión:	13m	
—47% de los respondedores se proyectan en remisión a los 3 años		
—Administración 1ª dosis	5,2 horas	
—Interrupciones en el 33%		
—Administraciones sucesivas	3,5 horas	
—Interrupciones:	6%, 2%, 1%	
—Toxicidad:	84% de los pacientes alguna	
—La mayor en la 1ª infusión		
—96% son grado 1 o 2		
—Anticuerpo anti quimérico < 1%		
—No aumento de infecciones		

P. McLaughlin *J Clin Oncol* 1998

Los efectos tóxicos (Tabla IX) inciden mayoritariamente en la primera administración y el 90% son grado 1 y 2. La producción de anticuerpos frente al anticuerpo quimérico (HACA) es inferior al 1%.

El estudio en linfomas B de bajo grado con CHOP y Rituximab (16) en el que se incluyen un grupo de pacientes cuyo tratamiento se realiza en primera línea aporta los resultados que figuran en la tabla X. Es importante destacar en este estudio la negativización de bcl-2 por PCR en una proporción importante de pacientes y la duración prolongada de la respuesta.

Tratamiento con Rituximab en los linfomas agresivos: (Fig. 9). El estudio de tratamiento con Rituximab de linfomas agresivos (17) en recaída o resistente, fue realizado por un grupo francés y australiano con un esquema de 8 administraciones semanales de 375 mg/m². Los resultados se exponen en la tabla XI.

TABLA VIII

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA A RITUXIMAB

FACTOR	RC + RP (%)	P
<i>Linfoma linfocítico</i>	13	0,01
<i>Linfoma folicular</i>	60	
<i>Masa Bulky</i>		
< 5 cm	56	NS
> 5 cm	43	
<i>Médula ósea</i>		
Negativa	61	0,03
Positiva	42	
<i>bcl-2 en sangre periférica</i>		
Positiva	71	0,03
Negativa	52	
<i>bcl-2 en médula ósea</i>		
Negativa	52	0,05
Positiva	71	
<i>2 lugares extraganglionares</i>	39	0,01
<i>Trasplante autólogo</i>		
Previo a Rituximab	78	0,01
No T Autólogo	43	

P. McLaughlin *J Clin Oncol* 1998

TABLA IX

MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN 5% PACIENTES
TRATADOS CON RITUXIMAB (N= 315)

Manifestación clínica	Incidencia (todos los grados) Número	Porcentaje
<i>Cualquier efecto adverso</i>	275	87%
<i>Generalidades</i>		
Fiebre	154	49%
Escalofríos	102	32%
Astenia	49	16%
Cefalea	43	14%
Angioedema	41	13%
Mialgia	21	7%
Mareo/Vértigo	23	7%
Irritaciones garganta	19	6%
Dolor abdominal	18	6%
<i>Cardiovasculares</i>		
Hipotensión	32	10%
<i>Respiratorios</i>		
Rinitis	25	8%
Broncoespasmo	24	8%
<i>Digestivas</i>		
Náuseas	55	18%
Vómitos	23	7%
<i>Dermatológicas</i>		
Prurito	32	10%
Rash	31	10%
Urticaria	24	8%
<i>Hematológicas</i>		
Leucopenia	33	11%
Trombocitopenia	25	8%
Neutropenia	21	7%

El estudio de Link (18) con 6 ciclos de CHOP y Rituximab en primera línea de tratamiento en linfomas agresivos no tratados previamente proporciona 63% de RC y 33% de RP.

3.2.- ANTI-CD52 CAMPATH 1H

El antígeno CD52 está compuesto por 12 aminoácidos glicosilfosfatidil inositol unido a una glicoproteína que se expresa en niveles elevados en linfocitos B y T.

El CAMPATH-1H es un anticuerpo compuesto por una Ig G1 kappa, con regiones hipervariables de ratón que se fijan directamente en el antígeno CD52 que no modula en la superficie celular.

El CAMPATH-1H (19,20) producen una lisis rápida del tumor y su mecanismo de acción se realiza mediante la fijación del complemento.

El tratamiento con este anticuerpo demuestra un efecto importante sobre las células circulantes de LLC pero, escaso sobre ganglios de linfoma. Además, induce una importante inmunosupresión. La administración produce fiebre, escalofríos e hipotensión debidos a la destrucción de linfocitos B y T y a la liberación de citoquinas como TNF alfa, IFN gamma e IL-6 a través del entrecruzamiento de CD16 (receptor Fc de IG de baja

TABLA X

TRATAMIENTO CON CHOP Y RITUXIMAB EN LINFOMAS DE BAJO GRADO

- RESPUESTAS RG: 95% RC: 55%
- Tiempo medio para la respuesta 47 días
- Duración media de la respuesta 27,8 + meses
- A los 29 meses 74% en RC
- Reducción de las respuestas en enfermedad bulky
- Conversión en bcl-2 PCR- en 7/8 casos
- Rituximab aumenta el efecto antitumoral de CHOP
- Factibilidad de la administración CHOP y Rituximab sin aumento de la toxicidad.

M.S. Cruzman 1999 J Clin Oncol

afinidad) sobre células NK. El efecto intenso sobre los linfocitos normales producen linfopenia e inmunosupresión habiéndose detectado infección por CMV en un caso.

La administración del anticuerpo CAMPATH-1H se realiza por vía subcutánea o intravenosa a dosis de 30mg/3 veces por semana.

Diversos estudios permiten comprobar el efecto del CAMPATH-1H en leucemias linfoides crónicas y sobre todo la leucemia prolinfocítica, particularmente la forma T (LPL-T).

- De 11 entre 15 pacientes con LPL-T, 9 pacientes obtuvieron RC.

- En 28 pacientes de 29 con LLC-B, desaparecieron las células tumorales de sangre periférica, 36% obtuvieron remisión en médula ósea, en un 32% se resolvió la esplenomegalia pero, sólo en 7 casos, el anticuerpo tuvo efecto sobre los ganglios.

Este anticuerpo puede tener un efecto destacado eliminando las células tumorales de la médula previo a trasplante autólogo de células hematopoyéticas.

En pacientes con LLC no tratados previamente, las RC y RP son superiores.

Se puede utilizar para liberar la sangre y la médula de células tumorales, en la enfermedad injerto frente a huésped y en pacientes con enfermedad autoinmune.

3.3.- OTROS ANTICUERPOS MONOCLONALES NO CONJUGADOS

- CD5: presente en células T y en la LLC. Es un antígeno que modula y por ello no permite la eficacia de los anticuerpos. Se están estudiando inmunotoxinas que permiten actuar modulando e internalizando el antígeno.

- CD19: se encuentra en las células B. No tiene la potencia del CD20 debido a su modulación.

- En los trastornos linfoproliferativos postransplante el VEB produce un trastorno policlonal que es sensible a la acción de anticuerpos.

- HLA-DR y CR2VEB: representa la molécula del anticuerpo Lym-1 y OKB7. Se observan escasas respuestas.

- CD25: se encuentra en la leucemia T del adulto. La célula puede ser modificada en sus fases iniciales por IL-2 y por un anticuerpo, el anti-TAC frente al receptor

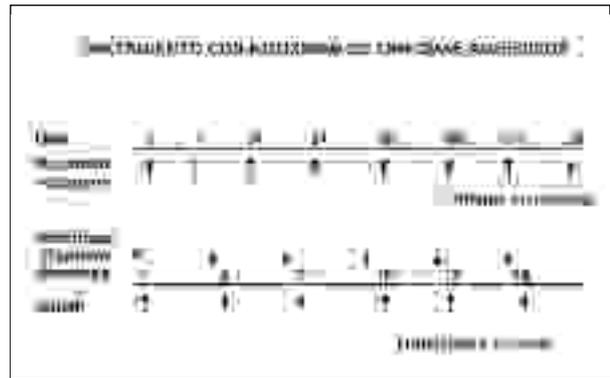


Fig. 9. Protocolos con Rituximab en linfomas de alto grado

CD25-IL-2. Se realizan estudios con el anticuerpo quimérico administrado en forma de radioconjugado.

- CD4: se expresa en las células T del subtipo helper (Th2). El anticuerpo quimérico monoclonal cMT412 demuestra una actividad antitumoral tanto en lesiones cutáneas como en ganglios.

- Otros tratamientos con anticuerpos monoclonales como el anti-IL-6 controla parcialmente manifestaciones clínicas de enfermedad en linfomas de células grandes así como en mieloma.

- El CD30 y el CD40 parecen dianas interesantes en el tratamiento de los linfomas. El CD30 se encuentra en la enfermedad de Hodgkin y en el linfoma anaplásico. El CD40 es una molécula clave en los fenómenos de coestimulación y comunicación celular.

TABLA XI

TRATAMIENTO CON RITUXIMAB EN LINFOMAS AGRESIVOS EN RECAÍDA O RESISTENCIA

RESPUESTAS	RG: 31%	RC: 9%
Tiempo medio para la respuesta:	56 días	
Tiempo medio a la progresión	246 días +	
RESPUESTA		
LDCG	37%	
L Manto	33%	
Recaída	41%	
Refractario	22%	
RESPUESTA Y TAMAÑO TUMORAL		
< 5 cm	46%	
5-10 cm	21%	
> 10 cm	0%	

No aumento de infecciones

B. Coiffier Blood 1998

4. ANTICUERPOS CONJUGADOS

4.1. INMUNOTOXINAS

El objetivo del tratamiento con anticuerpos monoclonales (AcMo) ligados a toxinas es aumentar el efecto antitumoral del anticuerpo. Se utilizan AcMo dirigidos a antígenos que se expresan en las células tumorales. Al

unirse a la célula, la toxina ligada al anticuerpo ejerce su efecto antitumoral (21). A diferencia de los AcMo libres, en los que el anticuerpo permanece unido al antígeno en la superficie de la célula, los anticuerpos ligados a toxinas precisan de la internalización del complejo antígeno-anticuerpo para que la toxina produzca el daño y muerte de la célula neoplásica (22). Dentro de la célula las toxinas interrumpen procesos y señales necesarios para su supervivencia. Para llevar a cabo este efecto han sido utilizados AcMo para el tratamiento de enfermedades linfoproliferativas frente a antígenos que se expresan en serie linfoide como CD5, CD10, CD19, CD21, CD22 y CD25. Sin embargo otros como el CD20 ampliamente utilizado como anticuerpo no conjugado, no es útil para el tratamiento como inmunocombinado ligado a toxinas debido a su incapacidad para internalizarse.

4.1.1. Características de las inmunotoxinas:

Las toxinas utilizadas son procedentes de plantas o bacterias, las más conocidas son la ricina y la toxina diftérica (TD). Son sustancias que tienen la capacidad de impedir la síntesis de proteínas a concentraciones picomolares. Estos conjugados poseen un efecto tóxico al menos 3 veces superior a los AcMo libres, que precisan dosis terapéuticas de miligramos.

La ricina es una proteína con 2 cadenas A y B que se unen a las moléculas de galactosa de la superficie celular, facilitándose el paso de la cadena A a través de la membrana endosómica hasta el citoplasma, donde inactiva el ribosoma 60S. A pesar de la especificidad de los AcMo para unirse a las células tumorales, los dominios de unión de las toxinas al unirse a otras células normales producen toxicidades secundarias no deseadas. Por esto se intenta modificar la estructura de la ricina, eliminando los dominios de unión (23). Para evitar los efectos no deseados de la cadena B, se han realizado pruebas utilizando la cadena A de la ricina sola (dgA), unida al anticuerpo, o con la molécula completa bloqueando los lugares de unión de la cadena B al AcMo (bR). Es el caso de la ricina RFB4-dgA contra el antígeno CD22 para el tratamiento de los LNH-B o la anti T101-RTA para el tratamiento de la LLC.

Al disminuir la capacidad de unión de la toxina completa, se disminuye en parte su efecto, por lo que han sido probadas otras alternativas que sin alterar los dominios de unión limitan la unión inespecífica. Una posibilidad es unir las secuencias de DNA que codifican la toxina a los elementos de DNA que codifican los lugares de reconocimiento antigénico (Fc) del AcMo (24). Así se crea una pequeña molécula con capacidad de unión y citotóxica. Es el caso de las toxinas de fusión DAB₄₈₆II-2 y DAB₃₈₉II-2, en las que secuencias de DNA de la II-2 sustituyen el dominio 1 de la toxina diftérica. Estas moléculas por su menor tamaño tienen mayor capacidad de penetración de especial interés en los tumores "bulky" y menor capacidad inmunogénica (25). Por el contrario su afinidad de unión es menor y son menos potentes que los anticuerpos conjugados completos.

4.1.2. Efectos secundarios:

La mayoría de los estudios realizados han sido tipo fase I, para determinar la máxima dosis tolerable (Tabla XII). La ricina B4-bloqueada (modificada a partir de la ricina completa con cadenas A y B) es la más utilizada. La mayor toxicidad limitante es la hepática con elevación transitoria de las transaminasas (26) y la trombopenia. La ausencia de cadenas B disminuye la captación por los receptores de carbohidratos hepáticos, disminuyendo dicha toxicidad. Otra toxicidad limitante es el síndrome de extravasación capilar con hipoalbuminemia, ganancia de peso, edema periférico, edema pulmonar, hipotensión, derrame pericardico (26-29) probablemente secundario al daño tisular provocado por la toxina. Esta ha sido la primera causa de toxicidad limitante en el uso de las ricinas construidas con la cadena A aislada y unida a los fragmentos Fab' intactos anti CD19 (HD37) y anti CD22 (RFB4) (30). La administración en bolus (26) o en infusión continua (27,28), no ha demostrado diferencias.

Otros efectos secundarios son debidos a la respuesta inmune con la aparición de anticuerpos frente a la ricina (HARA) o frente al anticuerpo de ratón (HAMA). De esta forma se limita la posibilidad de nuevas administraciones debido a que la inmunotoxina es rápidamente eliminada del suero y puede ser eliminada por los anticuerpos del huésped. Sin embargo en estudios con DAB₄₈₆II-2 (31) y DAB₃₈₉II-2, se han demostrado respuestas clínicas a pesar de la presencia de anticuerpos HAMA y títulos de anti-DT detectables, lo cual sugiere que no todas las respuestas son neutralizantes.

4.1.3. Resultados clínicos (Tabla XII):

Los tratamientos con anti-B4-bR (26,27), HD37-dgA/(29) o RFB4-dgA (25,28) han mostrado bajas respuestas 10-25% en pacientes con LNH. De forma similar los resultados con DAB₄₈₆II-1 en LNH y EH también han demostrado actividad limitada. Probablemente debido a las dificultades de penetración en los lugares de enfermedad *bulky* (27).

Sería de esperar que los mejores resultados se obtuviesen con enfermedad mínima. La anti-B4-bR ha sido utilizada de forma adyuvante en pacientes con LNH en RC después de tratamiento intensivo y trasplante (32). En un estudio fase I-II piloto inicial se mostró mejoría en la supervivencia libre de enfermedad frente a controles históricos. Sin embargo un estudio subsiguiente, fase III randomizado no mostró beneficio en la supervivencia libre de recaída y la global.

4.1.4. Nuevas direcciones:

En un futuro deberían buscarse toxinas menos inmunogénicas (33) y que no precisen la internalización. Estudios preclínicos y clínicos se han realizado con nuevas sustancias maytansinoides (34) y calicheamicinas (35) que son 2-3 veces más potentes que la quimioterapia

TABLA XII
ENSAYOS CON INMUNOTOXINAS

Enfermedad	Antígeno diana	Inmunotoxina	Nº Pts	Esquema	Dosis máxima tolerada	Toxicidad	HAMA/HARA	Respuesta	Referencia
LNH-B recaída	CD22	Fab'-RFB4-dga	15	iv en 4 h cada 48h x 2 hasta 6 dosis	75 mg/m ²	Fiebre, mialgias, afasiatransitoria, rabdomiolisis, SEC	4/14	5 RP, durando 1-4 meses	25
LNH-B recaída	CD22	IgG-RFB4-dgA	18	iv continuo durante 8 día	19,2 mg/m ² /8 días	SEC, afasia, hipotensión	6/16	4 RP	28
LNH-B recaída	CD19	IgG-HD37-dgA	23	iv bolus cada 48 h x 4	16 mg/m ² /8 días	SEC, acrocianosis	5/15	1 RC, 1 RP	29
LNH-B fase I adyuvante post TAMO	CD19	Anti-B4-br	12	iv continuo x 7 días	280 µg/Kg	Aumento transaminasas, trombopenia, disnea, fiebre SEC	7/12	7 libres de recaída, mediana de seguimiento 4 años	32
LNH recaída	CD25	DAB ₃₈₆ IL-2	18	iv bolus días 1, 3-5, 14-20	0,1 mg/Kg/día	Aumento transaminasas, fiebre, disnea, rash	7/18	1RC, 2RP, durando de 5-18 meses	31

convencional. La combinación de las mismas toxinas con quimioterapia es otra posibilidad ya que se ha mostrado sinergismo entre ambas (36).

En resumen, hasta el momento la actividad clínica de las inmunotoxinas es limitada, con efectos secundarios como el síndrome de extravasación capilar y la respuesta inmune (HARA, HAMA), por lo que a pesar del efecto tóxico específico sobre las células tumorales, son menos manejables y con más efectos secundarios que los AcMo no conjugados y no poseen la capacidad de destruir las células adyacentes como los radioconjugados.

4.2. RADIOINMUNOCONJUGADOS

Los radioinmunoconjugados (RIC) consisten en AcMo ligados a radionucleótidos que actúan emitiendo radiaciones en las células tumorales seleccionadas por el anticuerpo. Presentan ciertas ventajas respecto a los otros tratamientos con AcMo, como: a) no precisan ser internalizados, ni actuar sobre señales ni mecanismos específicos de las células, b) no necesitan que el sistema inmune del huésped se encuentre inalterado, c) la radiación actúa sobre las células seleccionadas y sobre las vecinas aunque no hayan captado el RIC, por el "fuego cruzado" de radiaciones que se produce. Esto supone una ventaja en casos de dificultad de penetración en masas tumorales, o cuando se han desarrollado nuevos clones tumorales que no expresan el antígeno. Por el contrario representa una desventaja relativa en cuanto a la toxicidad específica e inespecífica sobre las células no tumorales, lo cual hace que exista una toxicidad limitante de dosis que precisa ser adecuadamente ajustada.

La elección de los radionucleótidos más adecuados es crítica y debe basarse en: los antígenos diana seleccionados, el tamaño del AcMo y las características isotópicas del mismo (Tabla XIII).

4.2.1. Características de los RIC:

Los más conocidos son el yodo¹³¹ (I¹³¹) y el ytrio⁹⁰ (Y⁹⁰), que emiten partículas b- (electrones). El I¹³¹ es el más utilizado por ser fácilmente accesible, tiene una radioquímica sencilla, es menos caro y existe experiencia en su manejo en los cánceres de tiroides. Como desventaja, se degrada al ser internalizado en las células y se libera el I¹³¹ en la circulación. Además emite radiaciones que precisan del ingreso y aislamiento de los paciente durante el tratamiento y suponen un riesgo para el personal al cuidado de los mismos.

El Y⁹⁰ tiene una penetración media mayor (5mm vs 0,8 mm), lo cual permite llegar a regiones más profundas. No emite radiaciones y tiene una vida media más corta, esto supone una ventaja en cuanto a que produce mayor dosis de radiación con una distribución más homogénea, por lo que se pueden administrar dosis más altas. Después de la endocitosis se retiene de forma estable dentro del tumor. A pesar de ello cuando se libera tiende a acumularse de forma inespecífica en los huesos y en el hígado. Los métodos de quelación para radioinmunoterapia (ej. "DOTA": ácido tetracético-1,4,7,10-tetraazociclododecano) han disminuido este problema. La vida media corta y la ausencia de radiaciones, permiten la administración a pacientes ambulatorios. Como inconvenientes, la ausencia de radiaciones supone un problema para la radioinmunoescintigrafía, necesaria antes del tratamiento. Es más caro y menos accesible que el I¹³¹.

El indio¹¹¹ (In¹¹¹), ha sido utilizado en pacientes programados para Y⁹⁰, ya que su biodistribución es similar a la del Y⁹⁰.

Los radionucleótidos astadine-211 (At²¹¹) y bismuto-212 (Bi²¹²) emiten radiaciones y poseen una alta energía lineal transfiriéndose a dianas tumorales, pero su vida media es muy corta y la dificultad para conseguirlos limitan su uso. El I¹²⁵ emite electrones Auger, que

TABLA XIII
CARACTERÍSTICAS DE LOS RADIONUCLEÓTIDOS
UTILIZADOS EN RADIOINMUNOTERAPIA

Radioisótopo	vida media	Energía de la partícula (MeV)	Penetración (mm)*
<i>Emisores beta</i>			
Yodo-131	8,1 días	0,6	0,8
Ytrio-90	2,5 días	2,2	5,3
Cobre-67	61,5 días	0,4-0,6	0,6
<i>Emisores alfa</i>			
Bismuto-212	1 hora	6,1	0,04-0,08
Astatine-211	7,2 horas	5,9	0,04-0,08
<i>Capturadores de electrones</i>			
Yodo-125	60,1 días	7,5	0,001-0,02

La penetración se define como el radio de la esfera en la que se absorbe un 90% de la energía. Emitida por un radionucleido (X^{90})

teóricamente poseen efecto antitumoral, tiene penetración corta y solamente son citotóxicos si se depositan en el núcleo o regiones perinucleares.

4.2.2. Consideraciones para el tratamiento con RIC:

Previo al tratamiento con RIC es necesario realizar dosimetrías con AcMo marcadores, para asegurar que la radiación en los lugares tumorales sea superior a la de los órganos normales. Estos estudios de biodistribución se realizan en gamacámaras de imagen después de dosis bajas de radiación (5-10mCi) con RIC marcadores (37). Cuando se demuestra que la biodistribución es adecuada se puede realizar el tratamiento.

El tamaño del bazo es un problema que descarta el tratamiento en el 80% de los pacientes con esplenomegalia (38). Algunos estudios recientes con I^{131} -LYM-1 sugieren que solo esplenomegalias masivas impedirían el tratamiento. Cuando existen masas tumorales grandes disminuye la eficacia, para que sea efectivo la masa tumoral debe ser <500g (38,39).

Utilizando AcMo no marcados antes del RIC parece que mejora la biodistribución. De esta forma probablemente se saturan los receptores Fc de las células del sistema reticuloendotelial y se disminuyen las uniones inespecíficas a tejidos normales, mejorando los resultados terapéuticos.

Los tratamientos con RIC precisan medidas de seguridad en su manejo en lo que a las radiaciones se refiere. Los centros necesitan poseer radiofarmacia y posibilidad de realizar los cálculos dosimétricos.

A diferencia de las inmunotoxinas y los AcMo no conjugados, los RIC presentan toxicidad referente a mielosupresión. Aunque existen diferencias entre pacientes, en general el nadir se presenta a las 3-4 semanas y puede durar hasta 16 semanas.

Las dosis de radioactividad administrada, guarda relación con la rapidez, la profundidad y la duración del nadir (40,41). Algunos factores como el haber recibido radioterapia o quimioterapia previa, o que exista infiltración tumoral en médula ósea, potencian el efecto mielosupresor.

Cuando se administran dosis más altas con soporte de progenitores hematopoyéticos, la toxicidad limitante es la pulmonar (39). A dosis normales, como con las inmunotoxinas y los AcMo no conjugados, la administración puede asociarse a fiebre, escalofríos, náuseas y rash (39,41). Cuando se utilizan RIC con yodo pueden producir hipotiroidismo (39), el tratamiento previo con yodo no marcado puede disminuir el riesgo.

Los tratamientos con RIC también pueden producir HAMA en el 15-25% de los pacientes. Cuando después del primer tratamiento los HAMA permanecen negativos puede repetirse el tratamiento (38). La utilización de AcMo humanizados disminuye este riesgo pero altera la farmacocinética, prolongando la vida media, lo que aumenta la exposición de los órganos normales a la radiación.

4.2.3. Ensayos clínicos:

Diferentes ensayos han sido realizados con RIC y se muestran en la tabla XIV.

En un ensayo se trataron 44 pacientes con EH en recaída y enfermedad avanzada con Y^{90} marcado con anticuerpos policlonales antiferritina (43). En 39/44 la biodistribución fue adecuada y recibieron de 1-5 ciclos de 10-50mCi de Y^{90} y 2-5mg de la antiferritina policlonal conjugada, 51% obtuvieron respuestas objetivas con 10 RC. La toxicidad limitante fue la hematológica y la mitad recibieron trasplante. Las respuestas son más frecuentes en tumores pequeños (<30cc) que en los grandes (>500cc).

En pacientes con EH de mal pronóstico se ha ensayado RIC con Y^{90} marcada con antiferritina seguido de altas dosis de quimioterapia con trasplante autólogo de médula ósea en 14 pacientes (44), 5 pacientes fallecieron en relación con el trasplante, 2 no recibieron el tratamiento completo y 4 sobreviven libres de enfermedad a los 12 meses. La supervivencia libre de enfermedad proyectada fue del 36% con una supervivencia libre de progresión del 21%, lo cual supone resultados mejores que los de los programas de trasplante convencionales.

Vriessendorp (45) refiere 134 pacientes de diferentes ensayos con EH recurrente tratados con Y^{90} -antiferritina con respuestas en el 60% de los casos, siendo más frecuentes en los de larga historia de enfermedad (>3 años) y masas tumorales pequeñas habiendo recibido al menos 0,4mCi/kg.

En LNH-B se han utilizado conjugados de I^{131} frente a antígenos como HLA-DR (46), CD20 (47,48), CD21 (49) y CD22 (50) con RC o RP en el 6 y 79% de los pacientes. La duración de la respuesta fue más larga que con las quimioterapias anteriores y algunos pacientes con supervivencia libre de enfermedad después de 4 años de seguimiento.

En un estudio de 21 pacientes de LNH-B de bajo grado que incluía 8 con enfermedad *bulky* con I^{131} se obtuvo un 100% de respuestas con 15 RC (51,52).

Con dosis mieloablativas de RIC y trasplante en 25 pacientes con LNH-B en recaída, 22 mostraron estudios de biodistribución adecuados para el tratamiento con I^{131}

TABLA XIV
ENSAYOS CON RADIOCONJUGADOS

Enfermedad	Antígeno diana	Anticuerpo	Dosis (mg)	Isotopo (dosis mCi)	Nº pts	Respuesta	Toxicidad	HAMA	Referencia
LNH-B recaída	HLA-DR	LYM-1	8-676	¹³¹ I(23-1, 044 en 1-16 cursos)	57	11RC 20 RP	Mielosupresión, fiebre, rash, náuseas, hipotensión	3/18	46
LNH-B	CD21	OKB7	25	¹³¹ I(90-200 en 3-4 dosis)	18	1RP	Mielosupresión, elevación asintomática de TSH	12/16	49
LNH-B recaída	CD22	LL2	2,1-7,3	¹³¹ I(31-102 en 1-3 dosis)	7	2RP	Mielosupresión	3	50
LNH-B	CD20	B1	2,5/kg	¹³¹ I(345-785) mieloablatoivo con células progenitoras autólogas tratadas	25	16RC 2 RP DE 18 valorables	Náuseas, mucositis elevación asintomática de TSH, cardiomiopatía reversible, neumonía intersticial en 1 pte	4/25	38
LNH-B recaída	CD20	B1	15-20	¹³¹ I(34-161)	59	20RC 22 RP duración media de la respuesta 271 días	Leucopenia y trombopenia suaves, fiebre, náuseas, astenia, escalofríos	9	47,48
LNH-B bajo grado con tratamiento previo	CD20	B1	35-50	¹³¹ I(58-142)	21	15RC, 6RP 8/13 pts con enfermedad bulky	Mielosupresión, fiebre, dolor de cabeza, prurito, mialgias, artralgias	7	51,52
LNH-B recaída	CD20	B1	2,5/kg	¹³¹ I(318-840) +CPM(100mg/Kg) +VP16 (60 mg/kg) con trasplante progenitores hematopoyéticos	38	78% libres de progresión, mediana de seguimiento 1,5 años, 37 pts valorables	4 muertes (3 progresión de enfermedad, 1 infecciosa), mielosupresión, náuseas, infiltrados pulmonares, enfermedad venoclusiva	NR	53
LNH-B recaída	CD20	B1 o C2B8	10,3-13,5 mCi/mg	⁹⁰ Y(13,5-53,4 en 1-2 dosis)	18	6RC 7RP	Mielosupresión (2 pts trasplante progenitores hematopoyéticos) fiebre, infección	4	40
E Hodgkin recaída		Antiferritina	3-10	¹³¹ I(50-100 en 1-2 dosis)	37	1RC 14RP	Trombopenia neutropenia	0	42

-anti CD20 (B1). Obtuvieron RC 16 pacientes y 2 más RP con supervivencia libre de progresión y global de 62% y 93% respectivamente, con un seguimiento de 2 años. Como toxicidad hubo 1 muerte por sepsis, 2 infecciones severas un caso de cardiomiopatía reversible y uno de neumonitis intersticial (38).

Combinando quimioterapia convencional (ciclofosfamida y etoposido) con ¹³¹I -anti-B1 y soporte de trasplante hematopoyético en 38 pacientes con LNH-B en recaída, el 78% de los pacientes se encontraban libres de enfermedad con un seguimiento de 1,5 años (53).

Hay menos estudios en LNH-T dada su menor frecuencia (15% de los LNH). Rosen (54) estudia 7 pacientes con LNH cutáneo T con ¹³¹I -anti CD5 (T101). En 6 pacientes las dosis terapéuticas fueron de 100-150mCi ¹³¹I

conjugado a 9,9-16 mg de anticuerpo T101. Dos pacientes obtuvieron RP de 2 meses de duración y los otros 4 pacientes respuestas menores de 3-4 semanas. Todos sufrieron prurito durante el tratamiento y con la infusión fiebre, prurito y disnea en 2 pacientes. Tres pacientes sufrieron mielosupresión y 1 que había recibido 150 mCi precisó transfusiones plaquetarias. En todos los pacientes hubo internalización del anti-CD5 después del tratamiento con degradación intracelular (dehalogenización) del radioinmunoconjugado. Todos desarrollaron HAMA con interferencia en las infusiones repetidas.

Waldmann (55) trató 18 pacientes con leucemia/linfoma T del adulto con ⁹⁰Y y anti-Tac frente al receptor de la Il-2. Los primeros 9 pacientes fueron tratados con escalación de dosis recibiendo 5,10 y 15 mCi de ⁹⁰Y

conjugado a 2-10 mg de anti-Tac. En el segundo grupo del ensayo fase II las dosis fueron de 10mCi de con Y⁹⁰ - anti-Tac. Doce pacientes que respondieron recibieron de forma repetida hasta 9 ciclos en intervalos de 6 semanas. En 9/16 pacientes evaluables la respuesta fue del 56% con 2 RC (13%) y 7 RP (44%). Las remisiones duraron de 1,6-22,4 meses (mediana 9,2 meses). La limitación de dosis fue debida a la trombopenia y neutropenia, hubo toxicidad hepática transitoria a los 3 ciclos y proteinuria en 4 pacientes.

Los RIC han sido ensayados también en leucemias agudas. En un ensayo de 44 pacientes con LAM, LAL y síndromes mielodisplásicos, fueron tratados con I¹³¹ -anti CD45 con quimioterapia altas dosis, irradiación corporal total y trasplante de progenitores hematopoyéticos autólogos o alogénicos. Se obtuvo un 45% de RC (56).

4.2.4. Nuevas perspectivas:

Próximas investigaciones deben mejorar la eficacia de los RIC, probando dosis fraccionadas en lugar de altas dosis en bolus, puede reducirse la toxicidad (57) a pesar de que los HAMA pueden limitar las repeticiones de tratamiento. Recientemente se ha demostrado el efecto sinérgico con quimioterapia, especialmente con análogos de nucleótidos e inhibidores de la topoisomerasa (58). Los radioisótopos que emiten partículas como el bismuto 212 y el bismuto 213 pueden aumentar la potencia de los RIC por su capacidad de emitir partículas de alta energía a distancias más cortas 10-80 mm. Estos radioconjugados pueden ser 2-3 veces más citotó-

xicos que los emisores de partículas convencionales (59).

Otra cuestión es si los RIC ofrecen ventajas sobre la irradiación linfóide total convencional, cuando se administran al menos en dosis mieloablativas. La toxicidad es predecible y controlable en especial con las técnicas de dosimetría modernas. Es muy pronto para conocer la toxicidad a largo plazo relacionada con la hematopoyesis como los síndromes mielodisplásicos.

Mejorando los esquemas de dosificación y con radionucleótidos más potentes se mejorarán la seguridad y la eficacia. Los RIC podrán formar parte de los tratamientos en combinación con quimioterapia quizás sustituyendo a la irradiación corporal total.

4.3. ANTICUERPOS CONJUGADOS CON FÁRMACOS

Representan la unión de un anticuerpo monoclonal con un fármaco que haya demostrado actividad en un tumor determinado. Los fármacos más utilizados han sido methotrexate, doxorubicina, alcaloides de la vinca y mitomicina C. La preparación de estas moléculas es compleja y la eficacia limitada. La razón de ello puede estar relacionada con una baja actividad específica que es evidente *in vitro* al utilizar estos inmunconjugados comparativamente con las inmunotoxinas. Por otra parte los fármacos inmunconjugados presentan posiblemente una resistencia frente al tumor mientras que las inmunotoxinas tienen una elevada y específica capacidad citolítica *in vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

- Ehrlich P. On immunity with specific reference to cell life. Proc R Soc Lond 1900; 66: 424.
- Kholer G, Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 236: 495.
- Dillman RO. Antibodies as cytotoxic therapy. J Clin Oncol 1994; 12: 1497-1515.
- Vuist WM, Levy R, Maloney DG. Lymphoma regression induced by monoclonal anti-idiotypic antibodies correlates with their ability to induce Ig signal transduction and is not prevented by tumor expression of high levels of bcl-2 protein. Blood 1994; 83: 899-906.
- Tedder TF, Engel P. CD20: a regulator of cell-cycle progression of B lymphocytes. Immunology today 1994; 15: 450-454.
- Reff M, Carner K, Chambers K, et al. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. Blood 1994; 83: 435-445.
- Waldmann TA, White JD, Goldman CK, et al. The interleukin-2 receptor: a target for monoclonal antibody treatment of human T-cell lymphotropic virus I-induced adult T-cell leukemia. Blood 1993; 82: 1701-1712.
- Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, et al. Characterization of a human B-lymphocyte-specific antigen. J Immunol 1980; 125: 1678-1685.
- Janakiraman N, McLaughlin P, White DG, et al. Rituximab: correlation between effector cells and clinical activity in NHL. Blood 1998; 92: 337a (abstr 1384).
- Miller RA, Maloney DG, Warnke R, et al. Treatment of B cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. New Eng J Med 1982; 306: 517-522.
- Hsu FJ, Caspar CB, Czerwinski D et al. Tumor-specific idiotypic vaccines in the treatment of patients with B-cell lymphoma: long-term results of a clinical trial. Blood 1997; 89: 3129-3135.
- Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al. Phase I Clinical Trial Using Escalating Single-Dose Infusion of Chimeric Anti-CD20 Monoclonal Antibody (IDEC-C2B8) in Patients With Recurrent B-Cell Lymphoma. Blood 1994; 84: 2457-2466.
- Maloney DG, Grillo-López AJ, Bodkin DJ, et al. IDEC-C2B8: Results of a phase I multiple-dose trial in patients with relapsed Non-Hodgkin's Lymphoma. J Clin Oncol 1997; 15: 3266-3274.
- Maloney DG, Grillo-López AJ, White CA, et al. IDEC-C2B8 (Rituximab Anti CD20 Monoclonal Antibody Therapy) in Patients with relapse low-grade Non-Hodgkin's Lymphoma. Blood 1997; 90: 2188-2195.
- McLaughlin P, Grillo-López AJ, Link BK, et al. Rituximab Chimeric AntiCD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. J Clin Oncol 1998; 16: 2825-2833.
- Czuczuman MS, Grillo-López AJ, White CA, et al. Treatment of patients with low-grade B-cell lymphoma with the combination of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. J Clin Oncol 1999; 17: 268-276.
- Coiffier B, Haiun C, Ketterer N, et al. Rituximab (Anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. Blood 1998; 92: 1727-1932.
- Link BK, Grossbard ML, Fisher RI, et al. Phase II pilot study of the safety and efficacy of Rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated intermediate - or high- grade NHL. Proc ASCO 1998; 17: 3a (abstr 7).
- Dyer MJ, Kelsey SM, Mackay MJ et al. In vivo "purging" of residual disease in CLL with Campath-1H. Br Haematol 1997; 97: 669-672.

20. Osterborg A, Fassas AS, Anagnostopoulos A et al. Humanized CD52 monoclonal antibody Campath-1H as first-line treatment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 93: 151-153.
21. Grossbard ML, Nadler LM. Immunotoxin therapy of malignancy in Important advances in Oncology. Devita VT Jr, Hellman R, Rosenberg SA eds. Philadelphia 1992: 111-135.
22. van Oosterhout YV, van den Herik-Oudijk IE, Wessels HM, et al. Effect of isotype on internalization and cytotoxicity of CD19-ricin A immunotoxins. *Cancer Res* 1994; 54:3527-3532.
23. Byers VS, Rodvjen R, Grant K, et al. Phase I study of monoclonal antibody ricin A chain immunotoxin XomaZyme-791 in patients with metastatic colon cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6153-6160.
24. Kreitman RJ, Chaudhary VK, Kosak RW, et al. Recombinant toxins containing the variable domains of the anti-Tac monoclonal antibody to the interleukin-2 receptor kill malignant cells from patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1992; 80: 2344-2352.
25. Vitetta ES, Stone M, Amlot O, et al. Phase I immunotoxin trial in patients with B-cell lymphoma. *Cancer Res* 1991; 51: 4052-4058.
26. Grossbard ML, Freedman AS, Ritz J, et al. Serotherapy of B-cell neoplasms with anti-B4-blocked ricin: A phase I trial of daily bolus infusion. *Blood* 1992; 79: 576-585.
27. Grossbard ML, Lambert JM, Goldmacher VS et al. Anti-B4-blocked ricin: a phase I trial of 7-day continuous infusion in patients with B-cell neoplasms. *J Clin Oncol* 1993; 11: 726-737.
28. Sausville EA, Headlee D, Stetler-Stevenson M, et al. Continuous infusion of the anti-CD22 immunotoxin IgG-RFB4-SMPT-dgA in patients with B-cell lymphoma: A phase I study. *Blood* 1995; 85: 3457-3465.
29. Stone MJ, Sausville EA, Fay JW et al. A phase I study of bolus versus continuous infusion of the anti-CD19 immunotoxin, IgG-HD37-dgA, in patients with B-cell lymphoma. *Blood* 1996; 86: 1188-1197.
30. Osterborg A, Dyer MJ, Bunjes D, et al. Phase II multicenter study of human CD52 antibody in previously treated chronic lymphocytic leukemia. European Study Group of CAMPATH-1H Treatment in Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1567-1574.
31. LeMaistre CF, Meneghetti C, Rosenblum M, et al. Phase I trial of an interleukin-2 (IL-2) fusion toxin (DAB486 IL-2) in hematologic malignancies expressing the IL-2 receptor. *Blood* 1992; 79: 2547-2554.
32. Grossbard ML, Gribben JG, Freedman AS, et al. Adjuvant immunotoxin therapy with anti-B4-blocked ricin after autologous bone marrow transplantation for patients with B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993; 81: 2263-2271.
33. Ueda M, Psarras K, Yamamura T, et al. Molecular targeting of IL-2 receptor in adult T cell leukemias by human recombinant fusion protein. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1998; 39 (abstr): A433.
34. Liu C, Tadayoni BM, Bourret LA, et al. Eradication of large colon tumor xenografts by targeted of maytansinoids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 8618-8623.
35. Hollander IJ, Hamann PR. Preparation of monoclonal antibody-calicheamicin conjugates. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1996; 37 (abstr): A3187.
36. O'Connor R, Liu C, Ferris CA, et al. Anti-B4-blocked ricin synergies with doxorubicin and etoposide on multidrug-resistant and drug-sensitive tumors. *Blood* 1995; 86: 4286-4294.
37. DeNardo Da, DeNardo GL, O'Donnell Rt et al. Imaging for improved prediction of myelotoxicity after radioimmunotherapy. *Cancer* 1997; 80: 2558-2566.
38. Press OW, Eary JF, Appelbaum FR et al. Phase II trial of 131I-B1 (anti-CD20) antibody therapy with autologous stem cell transplantation for relapsed B cell lymphomas. *Lancet* 1995; 346: 336-340.
39. Press OW, Eary JF, Appelbaum FR, et al. Radiolabeled-antibody therapy of B-cell lymphoma with autologous bone marrow support. *N Engl J Med* 1993; 329: 1219-1224.
40. Knox SJ, Goris ML, Trisler K et al. Yttrium-90-labeled anti-CD20 monoclonal antibody therapy of recurrent B-cell lymphoma. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 457-470.
41. Kaminski MS, Fig LM, Zasadny Kr et al. Imaging, dosimetry, and radioimmunotherapy with iodine 131-labeled anti-CD37 antibody in B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1992; 10: 1696-1711.
42. Lenhard RE Jr, Order SE, Spunberg JJ et al. Isotopic immunoglobulin: A new systemic therapy for advanced Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1985; 3: 1296-1300.
43. Herpst JM, Klein JL, Leichner PK et al. Survival of patients with resistant Hodgkin's disease after polyclonal yttrium 90-labeled antiferritin treatment. *J Clin Oncol* 1995; 13(9): 2394-2400.
44. Bierman PJ, Vose JM, Leichner PK, et al. Yttrium 90-labeled antiferritin followed by high-dose chemotherapy and autologous bone marrow transplantation for poor-prognosis Hodgkin's disease. *J Clin Oncol* 1993; 11: 698-703.
45. Vriessendorp HM, Morton JD, Quadri SM. Review of five consecutive studies of radiolabeled immunoglobulin therapy in Hodgkin's disease. *Cancer Res* 1995; 55 (suppl): 5888s-5892s.
46. DeNardo GL, DeNardo SJ, O'Grady LF, et al. Fractionated radioimmunotherapy of B-cell malignancies with 131 I-LYM-1. *Cancer Res* 1990; 50: 1014s-1016s.
47. Stagg R, Wahl RL, Estes J, et al. Phase I/II study of iodine-131-anti-B1 antibody for non-Hodgkin's lymphoma (NHL): Final results. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17 (abstr): A150.
48. Kaminski MS, Zasadny KR, Francis IR et al. Iodine-131-anti B1 radioimmunotherapy for B-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1974-1981.
49. Czuczman MS, Straus DJ, Divgi CR, et al. Phase I dose-escalation trial of iodine 131-labeled monoclonal antibody OKB7 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol* 1993; 11: 2021-2029.
50. Goldenberg DM, Horowitz JA, Sharker RM, et al. Targeting, dosimetry, and radioimmunotherapy of B-cell lymphomas with iodine-131-labeled LL2 monoclonal antibody. *J Clin Oncol* 1991; 9: 548-564.
51. Kaminski MS, Estes J, Regan D, et al. Front-line treatment of advanced B cell low-grade lymphoma (LGL) with radiolabeled anti-B1 antibody: initial experience. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1997; 16(abstr): A51.
52. Kaminski MS, Gribben T, Estes J, et al. I-131 anti-B1 antibody for previously untreated follicular lymphoma (FL). Clinical and molecular remissions. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17(abstr): A6.
53. Press O, Eary J, Liu S, et al. A phase I/II trial of high-dose iodine-131 anti-B1 (anti-CD20) monoclonal antibody, etoposide, cyclophosphamide, and autologous stem-cell transplantation for patients with relapsed B-cell lymphomas. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17(abstr): A9.
54. Rosen ST, Zimmer AM, Goldman-Leikin R, et al. Progress in the treatment of cutaneous T-cell lymphomas with radiolabeled monoclonal antibodies. *Int J Rad Appl Instrum (B)* 1989; 16: 667-668.
55. Waldmann TA, White JD, Carrasquillo JA, et al. Radioimmunotherapy of interleukin-2R alpha-expressing adult T-cell leukemia with Yttrium-90-labeled anti-Tac. *Blood* 1995; 86: 4063-4075.
56. Matthews DC, Appelbaum FR, Gary JF et al. Phase I study of 131I-anti-CD45 antibody plus cyclophosphamide and total body irradiation for advanced acute leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 1997; 90(abstr): A1854.
57. Meredith RF, Khazaeli MB, Liu T et al. Dose fractionation of radiolabeled antibodies in patients with metastatic colon cancer. *J Nucl Med* 1992; 33: 1648-1653.
58. Johnson T, Appelbaum F, Maloney D, et al. Synergistic cytotoxicity of iodine-131-anti-B1 (anti-CD20) monoclonal antibody in combination with chemotherapy agents for treatment of Bcell lymphomas. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1998; 17(abstr):A106.
59. Nikula TK, Finn RD, Kozak R, et al. Alpha particle emitting constructs of recombinant humanized anti-CD33 for myeloid leukemia. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1994; 35(abstr): A3862.

Alteraciones moleculares en las leucemias agudas

E. ANGUITA MANDLY, F.A. GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, A. VILLEGAS MARTÍNEZ

Servicio de Hematología y Hemoterapia. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

CONCEPTO DE LEUCEMIA AGUDA

Las leucemias agudas (LAs) humanas son proliferaciones clonales de células hematopoyéticas inmaduras de tipo blástico. La leucemia surge tras la transformación maligna de un solo progenitor hematopoyético cuya proliferación determina la formación de un clon de células leucémicas. La célula en la cual se produce la transformación leucémica puede ser un precursor linfóide, un precursor mielóide o una célula madre primitiva con potencial de diferenciación multilineal (1-3).

ASPECTOS BÁSICOS DE GENÉTICA MOLECULAR DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS

El análisis de las alteraciones cromosómicas clonales en los blastos de los pacientes con leucemia ha permitido hallar translocaciones o inversiones en más del 65% de los casos. Estas alteraciones determinan la aparición de reordenamientos genéticos que constituyen la mayoría de las anomalías genéticas bien caracterizadas en las LAs, si bien el número de deleciones específicas descubiertas se halla en incremento. A diferencia de lo que ocurre en los tumores sólidos, la amplificación génica, o aumento del nivel de actividad de un gen normal, es rara y las mutaciones puntuales parecen ser poco frecuentes. Estas alteraciones genéticas determinan la aparición de oncogenes que son los genes responsables de la aparición de la proliferación maligna. Los oncogenes se originan por la desregulación de genes "normales" (genes silvestres) denominados proto-oncogenes u oncogenes celulares, los cuales tienen funciones relacionadas con la regulación de la división o la diferenciación celular. Algunos oncogenes son dominantes. Los oncogenes dominantes (también denominados simplemente oncogenes) están "activados" en las células tumorales produ-

ciendo una ganancia de función. Otros oncogenes son recesivos, en este caso la mutación oncogénica inactiva un proto-oncogén cuya función normal es inhibir la proliferación celular, son los genes supresores de tumor o antioncogenes. Se requiere la inactivación de las dos copias o alelos de estos últimos genes para eliminar el freno que ejercen sobre el ciclo celular (4,5).

Los oncogenes, como todos los genes, están compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN). El ADN está formado por 4 moléculas básicas llamadas nucleótidos, idénticas entre sí excepto en que cada una contiene una base nitrogenada diferente. Cada nucleótido contiene fosfato, un azúcar (desoxirribosa) y una de las 4 bases. Las cuatro bases son adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). Las bases A y G son de estructura similar y se denominan purinas. Las otras dos bases, C y T, también son similares entre sí, y se denominan pirimidinas. El hidroxilo 5' del azúcar de un desoxirribonucleótido se une al hidroxilo 3 del azúcar adyacente mediante un puente fosfodiéster formando un "esqueleto de azúcar-fosfato". La estructura del ADN es una doble hélice en la que dos "esqueletos de azúcar-fosfato" discurren en direcciones opuestas (antiparalelas), uno se denomina 5' 3' y el otro 3' 5' según el carbono que queda libre en el extremo, sea el 5' o el 3'. Las dos hélices se mantienen unidas gracias a puentes de hidrógeno (enlaces entre átomos de hidrógeno con una pequeña carga negativa y átomos con una pequeña carga positiva) que se producen entre las bases nitrogenadas. La A se une a la T mediante dos puentes de hidrógeno y la G a la C mediante tres. El ADN se replica de forma semiconservativa, de modo que una doble hélice se duplica en dos hélices idénticas. Cada una de estas dos hélices dobles está compuesta por una cadena vieja y otra polimerizada de nuevo. La replicación se lleva a cabo a través de varias enzimas incluyendo las polimerasas de ADN. Entre las características de las

polimerasas de ADN destaca que solamente actúan en la dirección 5' → 3' y que solamente pueden alargar una cadena, pero no iniciarla, por lo que la síntesis de ADN debe ser iniciada por un cebador u oligonucleótido que genera un segmento de ADN de doble cadena. Las polimerasas actúan añadiendo desoxinucleótidos al extremo 3' del cebador.

El ADN codifica la información que dirige la síntesis de las proteínas. Los eucariotas son aquellos organismos cuyas células poseen un núcleo rodeado de una membrana, como es el caso del humano. Para que la información genética pase del núcleo, donde se localiza el ADN en las células eucariotas, al citoplasma, donde se fabrican las proteínas, es necesario que otro ácido nucleico, el ácido ribonucleico (ARN), actúe como intermediario. El ARN se diferencia del ADN por ser siempre una cadena sencilla, poseer en sus nucleótidos el azúcar ribosa en lugar de desoxirribosa y contener la base uracilo (U) en lugar de T. La síntesis de moléculas de ARN a partir de un molde de ADN se denomina transcripción. La transcripción está catalizada por una enzima denominada polimerasa de ARN. Se distinguen por su valor de sedimentación (S) en un gradiente de densidad de sacarosa varios tipos de ARN, los principales son:

1. El ARN ribosómico (ARNr), forma junto con un conjunto de proteínas los ribosomas, que son los orgánulos celulares donde se produce la síntesis de las proteínas. En los eucariotas existen moléculas de ARNr de 28S-5.8S, 18S y 5S.

2. El ARN transferente (ARNt), es un conjunto de moléculas de 4S cada una, con especificidad de unión a un aminoácido concreto. Es el encargado de transportar los aminoácidos a los ribosomas donde se incorporan al polipéptido en formación para la síntesis de las proteínas.

3. El ARN mensajero (ARNm), contiene la información para la síntesis de las proteínas. La secuencia de bases del ARNm determina la secuencia de aminoácidos. La síntesis de un polipéptido a partir de una molécula de ARNm, mediada por los ribosomas se denomina traducción.

Se ha demostrado en la mayoría de los eucariotas superiores estudiados que no existe una correspondencia entre los mapas genéticos y las moléculas de ARNm. Este fenómeno también se ha observado en el ARNr y a veces en el ARNt. Ello es debido a que los segmentos de ADN que determinan la estructura de la proteína están interrumpidos por secuencias intermedias denominadas intrones. Las regiones que codifican la información para la síntesis de las proteínas se denominan exones. Antes de su transporte al citoplasma, el transcrito primario de ARN producido en el núcleo a partir de un molde de ADN se somete a diversas transformaciones (procesamiento del ARN). Primero se añade una caperuza consistente en un residuo de 7-metil guanosina unido al extremo 5' del transcrito. Luego se añade una serie de 150 a 200 residuos de adenosina al extremo 3', son las colas poli(A). Tras estas modificaciones se produce el proceso de corte y empalme o *splicing*, por el que se eliminan los intrones y se unen los

exones. En algunos casos, un mismo transcrito primario puede dar lugar a ARNms diferentes, siguiendo procesos de corte y empalme distintos (5).

REORDENAMIENTOS GENÉTICOS EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS

Los reordenamientos genéticos que se han detectado en las LAs pueden ser de dos tipos principales:

1. En el más frecuente se produce la ruptura de los dos genes afectados y su unión en un gen de fusión, el cual da lugar a un transcrito de ARN de fusión y a su traducción a una proteína quimérica. Este mecanismo de fusión génica se puede producir en leucemias de estirpes tanto linfóide como mielóide, y supone un cambio cualitativo que es relativamente tumor específico. La ruptura de los dos genes implicados está limitada a uno o un número limitado de intrones (sólo en escasos genes se produce en un exón), por lo que se produce un limitado número de transcritos de fusión que pueden ser retrotranscritos en ADN complementario (ADNc) mediante una transcriptasa reversa. Posteriormente, el ADNc se puede amplificar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), obteniéndose un producto de PCR idéntico en diferentes individuos con distintos puntos de ruptura en su ADN. La PCR en la que se realiza una retrotranscripción previa se conoce como RT-PCR.

2. En el segundo tipo de mecanismo se produce la movilización de un proto-oncogén a la vecindad del gen que codifica las inmunoglobulinas o a la del gen que codifica el receptor de células T (RCT), por un error en el proceso de reordenamiento fisiológico de estos últimos genes. Esto origina un cambio cuantitativo en la expresión del proto-oncogén translocado. Este proceso es frecuente en los linfomas, pero en las LAs es poco frecuente y aparece limitado a casos de leucemia linfoblástica (6)

CONCEPTO DE ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL

En el momento del diagnóstico los pacientes con LA pueden tener 10^{12} células malignas. Estos enfermos se consideran en remisión completa hematológica (RC) cuando se detecta menos de un 5% de blastos en la médula ósea mediante el microscopio óptico, no obstante podrían permanecer aún hasta 10^{10} células neoplásicas. Por ello se intenta detectar la enfermedad mínima residual (EMR) o aquella que todavía puede existir cuando las técnicas citológicas hacen considerar a un enfermo en remisión completa. Es de gran interés investigar si la EMR es indicativa de una recaída posterior de la enfermedad según los criterios clásicos (citológicos y clínicos) (7).

Las alteraciones genéticas al diagnosticar un paciente de LA y la EMR se pueden estudiar mediante los siguientes métodos:

a) Citogenética: si bien puede revelar la existencia de diversas alteraciones cromosómicas, muchas anormali-

dades genéticas pueden pasar desapercibidas, es un método poco sensible, se requiere MO como material de trabajo, y en un alto porcentaje de casos no se obtienen suficientes metafases para el realizar el estudio.

b) Hibridación *in situ* fluorescente (*fluorescence in situ hybridization* o FISH): esta técnica consiste en el uso de sondas específicas para un cromosoma o un gen que permiten identificar anomalías cromosómicas numéricas o estructurales por medio de un marcado directo o indirecto de la sonda con un fluorocromo. Tiene como ventaja el hecho de no ser requerida la MO para hacer el estudio y el que pueda realizarse sobre células en interfase. Sin embargo, es una técnica poco sensible (1%) (7) y no siempre de fácil interpretación.

c) Método de Southern o *Southern blot*: esta técnica presenta las ventajas del método anterior, pero, igualmente, su sensibilidad puede ser considerada insuficiente para hacer un estudio de EMR, ya que sólo permite detectar un reordenamiento si está presente en un 1-5% de las células analizadas (8,9). No obstante, permite detectar reordenamientos de un gen con diversas parejas y realizar análisis de deleciones.

d) PCR: es la técnica con más sensibilidad (puede detectar 1 célula maligna entre 10^5 - 10^6 o más) (7,10,11) y tiene alta especificidad (ambas se incrementan mediante una segunda ronda de amplificación con el uso de cebadores internos respecto a los empleados en la primera, PCR anidada o *nested PCR*).

GENES DE FUSIÓN EN LAS LEUCEMIAS AGUDAS

Los genes implicados en la leucemogénesis pueden afectar distintos niveles del funcionamiento celular, incluyendo la interacción receptor-ligando, la transducción de señales, localización intracelular, regulación de la transcripción, control del ciclo celular y la muerte celular programada. Sin embargo, la mayoría codifica factores de transcripción que pueden regular la función de diversos genes (4,6,12).

Factores de transcripción oncogénicos

Aspectos básicos

Todas las moléculas de ARNm son sintetizadas por la ARN polimerasa II. Para obtener un máximo nivel de transcripción la ARN polimerasa II se requieren dos formas de control:

1. Control en *cis* (que actúa sobre la propia molécula): depende de los promotores y los intensificadores. Los promotores son secuencias de ADN situadas "corriente arriba" (hacia el extremo 5') del sitio de iniciación del ARNm. Son la región TATA (*TATA box*) que indica a la ARN polimerasa que la transcripción comienza aproximadamente 30 pares de bases (pb) corriente abajo (hacia el extremo 3'). La secuencia TATA funciona mejor si hay otras dos, localizadas a unos 40 y 110 pb corriente arriba. La secuencia CCMT es una de ellas y una región rica en GC puede ser la otra.

Los intensificadores son secuencias de ADN que potencian la tasa de transcripción a partir de promotores que están en la misma molécula de ADN. Se caracterizan por actuar a distancias de varios miles de pares de bases (kilobases o kb) y poder funcionar actuar en cualquier orientación y corriente arriba o corriente abajo del promotor que potencian.

2) Control en *trans* de la transcripción (que actúa sobre otra molécula): se lleva a cabo por los factores de transcripción. Actúan uniéndose a elementos del promotor o a regiones intensificadoras. Muchos de ellos poseen dos dominios separados, uno que reconoce y se une a las secuencias de ADN que actúan en *cis* y otro que activa la transcripción. Los dominios de unión al ADN pueden clasificarse en varias familias según su estructura:

a) Proteínas que contienen un motivo hélice-giro-hélice. Estas proteínas contienen tres hélices. Las hélices 1 y 2 interactúan con otras proteínas y la hélice 3 es la de reconocimiento que realiza la unión con el ADN.

b) Proteínas con una región rica en cisteína e histidina en un dominio de unión al ADN que forma complejos con iones de zinc, dando lugar a unas protuberancias que parecen dedos, por lo cual estas estructuras se denominan dedos de zinc.

c) Proteínas con cremalleras de leucina. Pueden formar dímeros a través de una superficie de contacto hidrofóbica formada por varios residuos de leucina separados por seis aminoácidos. A los lados de la cremallera de leucina se encuentra el dominio de unión al ADN que contiene muchos residuos de lisina y arginina. Para que se pueda producir la unión al ADN se tienen que formar los dímeros, que pueden ser homodímeros o heterodímeros según se formen pares de proteínas idénticas o diferentes.

d) Proteínas hélice-bucle-hélice. También forman dímeros. La estructura de la superficie de contacto son dos hélices unidas por un bucle. El análisis de células progenitoras hematopoyéticas en ratones y humanos ha generado evidencias que indican que la acción de muchos factores de transcripción oncogénicos está relacionada con la regulación de los denominados complejos HOX (12).

En 1894 William Bateson describió un fenómeno denominado homeosis, por el cual se produce la sustitución local de una estructura normal por otra cuya ubicación anatómica no era aquella (por ejemplo la transformación en un artrópodo de una anténula en una mandíbula) (4,13,14). Aunque este fenómeno se ha observado en diversos grupos de animales, ha sido la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*, el organismo donde se ha estudiado con mayor profundidad. En esta mosca se han caracterizado mutaciones que causan este tipo de transformaciones las cuales se han denominado mutaciones homeóticas. El estudio de estas mutaciones permitió descubrir dos complejos de genes homeóticos en *Drosophila*: el complejo génico bithorax (BX-C) y *Antenapedia* (ANT-C). Los genes homeóticos en *Drosophila* se definen por transformar, cuando son defectivos, un metámero o un grupo de ellos en la apa-

riencia de otro y por compartir una secuencia de ADN muy similar de 180 pares de bases denominada secuencia homeótica (*homeobox*) (4, 13). Esta secuencia codifica un segmento polipeptídico de 60 aminoácidos denominada homeodominio. El homeodominio, que tiene una estructura de hélice-giro-hélice, se une al ADN de una forma específica de secuencia y activa o reprime otros genes diana.

Se han descubierto secuencias homeóticas homólogas en muchos animales. En los vertebrados las agrupaciones de genes homeóticos se denominan complejos HOX, frente a las de *Drosophila* que se denominan HOM-C (complejo de genes homeóticos). En el hombre se conocen 39 genes HOX que se agrupan en 4 complejos (HOX-A al HOX-D) cada uno localizado en un cromosoma diferente. Estos genes se dividen en 13 grupos denominados parálogos que comparten características estructurales y funcionales con genes HOM-C (12,14).

Los principales datos de la importancia de los genes HOX en el proceso de diferenciación de los precursores hematopoyéticos, el cual se encuentra bloqueado en las leucemias, así como de la relación entre estos genes y la mayoría de los protooncogenes que son factores de transcripción y dan lugar a genes de fusión en las LAs, son los enumerados a continuación:

1. La expresión de los genes HOX en los progenitores hematopoyéticos es específica de la línea y el estadio del desarrollo de la célula progenitora. Al menos 22 de los 39 genes HOX se expresan en las diferentes subpoblaciones de células CD34+ de la médula ósea humana. En las células madre más primitivas se ha encontrado una elevada expresión de los genes de las regiones 3' de los complejos A y B. Estos genes son posteriormente inhibidos y pasan a expresarse genes más próximos al extremo 5', a medida que las células progenitoras se diferencian (12).

2. Se han identificado en los vertebrados genes relacionados con dos reguladores positivos de HOM-C. Uno es el gen de *Drosophila brahma* y el otro es *trithorax* (*trx*), la función de ambos se relaciona con la estructura de la cromatina. El homólogo en mamíferos del gen *trithorax* es el gen *MLL* que está implicado en múltiples genes de fusión tanto en LAM como en LAL (12,14).

3. El gen de *Drosophila extradenticle* (*exd*), que contiene una secuencia "homeobox", actúa como cofactor de HOM-C. Los homólogos de este gen en mamíferos se conocen como PBX. El gen PBX1 humano forma complejos con un determinado tipo de proteínas HOX. PBX1 aparece reordenado con el gen E2A dando lugar al gen de fusión E2A/PBX1 en LAL, que mantiene la capacidad de interactuar con las proteínas HOX.

4. El gen HOXA9 se ha demostrado que forma un gen de fusión con el gen de la nucleoporina NUP98 en casos de LAM con t(7;11)(p15;p15) (12).

5. El gen HOX11 aparece reordenado con el RCT* en la t(10;14)(q24;q11) y con el RCT en la t(7;10)(q35;q24) en casos de LAL-T.

6. El ácido retinoico a través de sus receptores nucleares (RARs) produce importantes efectos sobre la expresión de los genes HOX durante la embriogénesis. Este hecho ha llevado a plantear la hipótesis de que el

gen de fusión PML/RAR, formado por el gen del receptor del ácido retinoico a en la leucemia aguda promielocítica, altera el patrón normal de expresión de los genes HOX.

7. El complejo de unión al ADN CBF (*core binding factor*) está formado por las proteínas codificadas por los genes AML1 (CBFA2) y CBFβ. Ambos participan en varios genes de fusión presentes en LA, los principales son AML1/ETO, TEL/AML1 y CBFβ/MYH11. AML1 es homólogo del gen de *Drosophila* RUNT que interviene en el patrón de expresión de HOM-C. Se ha planteado la hipótesis de que las proteínas quiméricas relacionadas con RUNT podrían interferir en la función de establecer el correcto patrón de expresión de los genes HOX durante la hematopoyesis, que realizaría el complejo CBF en condiciones normales.

La homología entre la función y la estructura de los complejos HOM-C y HOX, así como entre diversos genes de fusión hallados en LAs humanas y genes de *Drosophila* que intervienen en la regulación de los genes HOM-C, ha llevado a esbozar un modelo según el cual la mayoría de las oncoproteínas de fusión que son factores de transcripción intervendrían en la leucemogénesis alterando la regulación de los genes HOX (Figura 1).

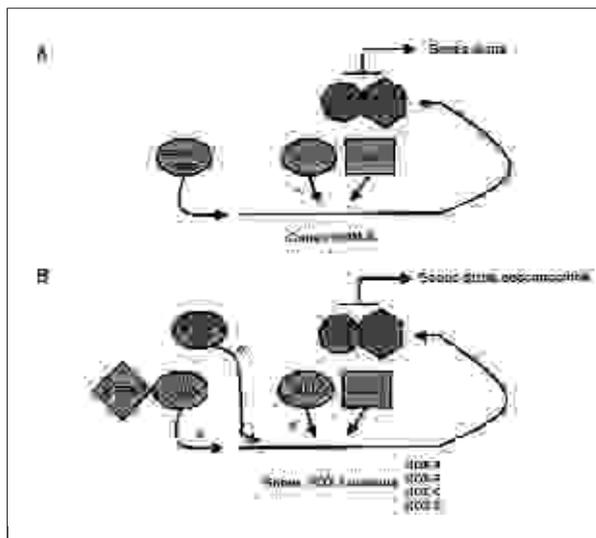


Fig. 1. Modelo basado en las vías de acción de los genes homeóticos que integra a los principales factores de transcripción oncogénicos que intervienen en la leucemogénesis. (A) Los estudios de la embriogénesis de *Drosophila* han establecido que la organización de los segmentos del cuerpo de esta mosca depende de la regulación de la expresión de los genes homeóticos agrupados en el complejo HOM-C. Los genes de "la regla de los pares" (*pair rule*) y *gap* inician la expresión de genes HOM-C específicos. La expresión continuada de los genes HOM-C durante el desarrollo de *Drosophila* depende de dos grupos de factores de transcripción: *trithorax* (*trx-G*), como regulador positivo, y *Polycomb* (*Pc-G*), opuesto al anterior. Los productos de diferentes genes HOM-C forman complejos con otros factores de transcripción, como *extradenticle* (*exd*), que modulan la especificidad de sus genes diana. (B) Los genes HOX, equivalentes a los HOM-C en los vertebrados, también determinan el patrón corporal durante la embriogénesis. La mayoría de los genes HOX intervienen en la regulación de la hematopoyesis. El gen *MLL* es homólogo de *trx* y *PBX1* lo es de *exd*. Los genes *MLL* y *PBX1* están reordenados en determinados pacientes con LA (12).

Gen MLL

La investigación sobre la zona de ruptura en la banda 11q23 ha dado como fruto el clonaje y la caracterización de un gen que se ha denominado MLL (*mixed lineage leukemia*), ALL1 o gen *trithorax* humano (Htrx1 o HTRX) (15,16-18). Este gen está implicado en la gran mayoría de los reordenamientos que afectan a dicha banda, si bien se han descrito casos excepcionales de translocaciones en las que no se reordena, como en la t(11;17)(q23;q21) (15). Al mismo tiempo, se ha comunicado que la mayoría de las deleciones de 11q23 y de las inversiones, inv(11)(p13;q23), de las LALs carecen de reordenamientos de MLL (19).

En la descripción inicial del gen se detectaron 21 exones (16), en la actualidad se conocen 36-37 exones con una longitud que varía desde 65 pb en el menor a 4249 en el mayor (20,21). Los puntos donde se produce la ruptura de MLL se acumulan, casi en su totalidad, en una región de 8.3 kb limitada por secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción *Bam*H 1. Este fragmento se denomina bcr (*breakpoint cluster region*) y se extiende entre los exones 5 y 11 de la nomenclatura inicial o de la parte 3 del exón 8 a la 5' del 14 en la revisada (16,21) (Figuras 2 y 3A). La región bcr contiene 8 secuencias Alu (repeticiones cortas dispersas por el

genoma que favorecen las recombinaciones) y 7 zonas con gran homología con la secuencia consenso de reconocimiento de la topoisomerasa II (15 22).

La proteína producto del gen MLL contiene tres regiones homólogas a secuencias de la proteína codificada por el gen de *Drosophila trithorax*. Estas secuencias incluyen dos regiones ricas en cisteína con 4 y 2 dominios como dedos de zinc, respectivamente, y la tercera es el extremo carboxilo de ambas proteínas. Ambas proteínas tienen, además, similar tamaño (15) (Figura 2). Previamente se ha citado el papel del gen *trithorax* en la regulación de HOM-C (Figura 1). Además, el producto de MLL tiene otros dos tipos de regiones que pueden estar, directa o indirectamente, relacionadas con el control de la transcripción. Uno es similar a la *AT hook* del grupo de proteínas de alta movilidad-I. Existen tres dominios de MLL con cierta homología con la secuencia consenso de los *AT hooks* (Figura 2) (17). Los *AT hooks* son dominios de unión al ADN capaces de unirse a regiones ricas en A y T del surco menor de la doble hélice del ADN (23) que no activan directamente la transcripción, pero facilitan la acción de otros factores. La otra zona que puede estar relacionada con el control de la transcripción es una región rica en cisteína homóloga de la metiltransferasa de ADN de doble hélice de mamífero, la cual favorece la producción de cambios



Fig. 2. Representación esquemática de la proteína codificada por el gen MLL. Se indican los tres dominios con homología con los motivos de unión al ADN conocidos como *AT hooks* o garfios de adenina-timina; las dos regiones de dedos de zinc homólogas de la proteína *trithorax* de *Drosophila*; ADN MTasa, corresponde al motivo homólogo de la metiltransferasa de ADN de doble hélice de mamífero; *trx* señala la región homóloga de la proteína *trithorax* del extremo carboxilo. En la parte inferior se muestra la zona codificada por la región de acumulación de los puntos de corte o bcr.

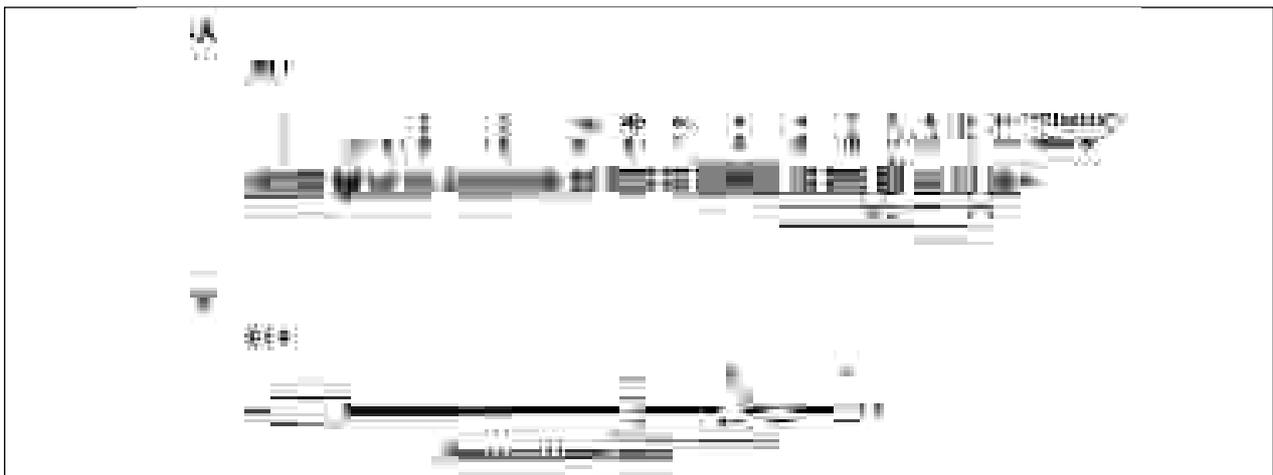


Fig. 3. (A) Representación esquemática de los primeros exones del gen MLL. Inmediatamente sobre los cuadrados representativos de los exones se muestra la numeración "nueva" y sobre ésta se indica la numeración inicial, o "clásica", revisada. Bajo los exones correspondientes se señala la región de acumulación de los puntos de corte o breakpoint cluster region (bcr). (B) Representación parcial esquemática del gen AF4 en la que se muestra su región de acumulación de los puntos de corte o breakpoint cluster region entre los exones 3 y 6.

conformacionales en el ADN que facilitan la acción de otros reguladores. El dominio del extremo carboxilo activa la transcripción y el del extremo amino es represor (15,18).

—Reordenamientos del gen MLL:

Hasta el momento se han caracterizado al menos 12 genes que se reordenan con MLL (de las, al menos, 35 posibles parejas) y duplicaciones de este gen (15,18, 24,25). En las translocaciones recíprocas se forman, al menos en principio, dos genes quiméricos localizados cada uno en un cromosoma derivado (der) originado por el reordenamiento. En las translocaciones que afectan al gen MLL existen evidencias citogenéticas y moleculares que indican que el der(11) es el que codifica el transcrito leucemógeno (por ejemplo, cuando sólo uno de los derivados está presente casi siempre es el der(11) y en las translocaciones complejas es el que conserva la orientación correcta) (26). El der(11) contiene un gen de fusión formado en la parte 5 por MLL y en 3 por su pareja correspondiente. La parte 5' de MLL retiene el AT *hook* y de ella se pierden los dedos de zinc (figura 2). La porción 3' (telomérica) de MLL se encuentra deletada en un 20-30% de los reordenamientos de MLL (13).

La mayoría de las parejas de reordenamiento de MLL carecen de semejanzas estructurales (con excepciones como AF9 y ENL, AF10 y AF17, y AFX con AF6q21), por lo que probablemente no actúan modulando la transcripción, en cambio existen datos que apoyan la posibilidad de que aporten dominios de dimerización (como la presencia de cremalleras de leucina en AF17 y AF10 o que la duplicación de MLL de lugar a una proteína que sería equivalente a un dímero del extremo amino de la proteína codificada por MLL) (18).

La frecuencia de los reordenamientos de MLL aún debe seguir siendo investigada con métodos moleculares. Se han observado frecuentes casos con reordenamiento de MLL en los que no se había detectado alteración de 11q23 en el cariotipo (27-32). La detección con métodos citogenéticos de algunas translocaciones como la t(6;11)(q27;q23) (33) y la (11;19) (q23;p13.3) es difícil y la de las duplicaciones de 11q23 casi imposible, aunque pueden ser sospechadas en casos de trisomías del cromosoma 11. En la actualidad se considera que un 5-10% de los casos de LA presentan translocaciones en las que interviene el gen MLL (34). El 70-80% de los niños menores de un año (9, 27, 35, 36) y hasta un 10% de los adultos y niños mayores de dicha edad con LAL tienen reordenado MLL (37,38). En la LAM aparece reordenado en el 23-30% de las M4/M5 (18,39,40) y hasta en un 20% de las M1 (30). Su frecuencia es mayor en los pacientes pediátricos con LAM que en los adultos, alcanzando un 20% en aquellos (50-70% en los menores de 1 año) (37). En las LAs secundarias de los pacientes tratados previamente con inhibidores de la topoisomerasa II (como las antraciclinas y las epipodofilotoxinas (41)) las anormalidades de 11q23 pueden alcanzar el 80% de los casos, muchos de los cuales presentan reordenamientos de MLL (42,43), al mismo tiempo que existen casos con reordenamiento molecular sin alteración citogenética de 11q23 (44).

En las LAs *de novo* la mayoría de los puntos de ruptura (74%) se localizan en la zona 5' de bcr donde se localizan 5 de las 8 secuencias Alu, mientras que en las secundarias (75%) y en los niños menores de 1 año se suelen producir en la parte 3' donde se encuentran 6 de las secuencias de reconocimiento de la topoisomerasa II, incluida la de mayor identidad con la secuencia consenso, y una región de unión al esqueleto nuclear (*scaffold attachment region* o SAR) de alta afinidad (18, 45, 46). También se han descrito roturas sin reordenamiento del gen MLL en la secuencia de reconocimiento de la topoisomerasa II (pseudorreordenamiento) (47-50).

—Influencia de los reordenamientos de MLL, detectados mediante *Southern blot*, en el pronóstico de los pacientes con LA:

Respecto al pronóstico de los pacientes con reordenamiento de MLL, sólo ha sido claramente establecido en los niños con LAL menores de un año analizados con *Southern blot*, en los cuales es muy desfavorable, aún empleando diferentes protocolos de quimioterapia y con independencia de otros factores a los que se asocia, como la hiperleucocitosis (18,27,36,51). De estos casos, los no reordenados parecen conformar una subpoblación de buen pronóstico (27,28). En los pacientes pediátricos mayores de un año con LAL y reordenamiento de 11q23 se ha descrito también un pronóstico adverso (52), incluso excluyendo los que tienen t(4;11) (53). Se ha descrito que los numerosos casos de LAL en los que la citogenética señala la existencia de delección de 11q23 o inv(11)(p13q23) carecen de reordenamiento de MLL y tienen buen pronóstico (19).

En los pacientes con LAM M4 y M5 algunos estudios no han encontrado diferencias evolutivas entre los casos con y sin reordenamiento (39,40). No obstante, también se ha comunicado que los adultos con LAM con reordenamientos de MLL o translocaciones balanceadas de 11q23 tienen mejor pronóstico que los casos con alteraciones no balanceadas de 11q23, pero peor que el de los pacientes con cariotipo normal y sin reordenamiento de MLL (54).

—Genes de fusión más frecuentes en los que participa MLL:

1. *MLL/AF4*: Los genes implicados en la t(4;11) (q21;q23) han sido clonados, identificándose el gen MLL y a su pareja, el gen AF4 (también conocido como FEL o MLLT2), localizado en la banda 4q21. AF4 codifica una proteína rica en prolina y serina que contiene dos secuencias de localización nuclear. La ruptura de AF4 se produce a lo largo de una zona de 38 kb localizada entre los exones 3 y 6 (de los al menos 21 que forman el gen) (55) (Figura 3B). Mediante RT-PCR en un único paso no se ha podido detectar el transcrito quimérico del der(11), MLL/AF4, en todos los casos portadores de t(4;11)(q21;q23). En cambio, mediante *nested* RT-PCR se ha podido detectar este gen en todos los casos con t(4;11)(q21;q23) (32, 56). Sin embargo, aplicando *nested* RT-PCR el gen AF4/MLL del der(4) aparece en sólo el 84% de los casos, aunque presenten dos bandas de reordenamiento por *Southern blot* (56). En algunas t(4;11) anormales, como (q13;q23) y (q35;q14-22), existe reordenamiento de MLL sin detectarse MLL/AF4 (28).

El gen *MLL/AF4* aparece en casos de LAL. Se han descrito 9 tipos de transcritos híbridos de *MLL/AF4* con unión de la secuencia de los exones 6, 7 u 8 de *MLL* (denominación clásica) (16) con la de los exones 4, 5 o 6 de *AF4*, según la localización de la ruptura de los genes (que se han localizado en los intrones 3, 4 o más infrecuentemente, 5) y el mecanismo de corte y empalme (Figura 4) (55-57). En algunos pacientes se puede detectar más un tipo de transcrito (57).

Recientemente, se ha descrito un elevado porcentaje de casos de LAL sin $t(4;11)(q21;q23)$, en los que se ha detectado *MLL/AF4* con *nested* RT-PCR y no con RT-PCR en un paso, algunos de los cuales presentaron reordenamiento de *MLL* en el *Southern blot*. En estos pacientes las características clínicas y la evolución fueron similares a las de los casos negativos para los transcritos de fusión *MLL/AF4*, *E2A/PBX1* y *BCR/ABL*. Frente a los que presentan $t(4;11)$ y reordenamiento de *MLL*, que tienen mayor frecuencia de organomegalias e hiperleucocitosis y muy mala evolución (32). Estos autores también han encontrado *MLL/AF4* en hígado y MO fetal y en un lactante normal, con *nested* RT-PCR, ante un cariotipo y un *Southern blot* normales (32).

Se han realizado estudios en los que el seguimiento de *MLL/AF4* con *nested* RTPCR ha demostrado utilidad, ya que los pacientes que estaban en remisión completa con PCR positiva recayeron, mientras que los pacientes mantenidamente negativos permanecieron en RC durante el seguimiento (57).

2. *MLL/AF6*: La $t(6;11)(q27;q23)$ genera el gen de fusión *MLL/AF6* (Figura 5) (58). El gen *AF6* codifica una proteína citoplásmica que interacciona con Ras (59). La $t(6;11)(q27;q23)$ se ha detectado mayoritariamente en casos de LAM, principalmente M4 y M5, si bien se ha citado en casos de LAL-T y en un lactante con LAL de precursores B. Los pacientes portadores de la $t(6;11)$ con LAM parecen tener mal pronóstico (33). Sin embargo, aún deben realizarse amplios estudios mediante PCR para evaluar adecuadamente la frecuencia y el papel en el pronóstico de las LAs del gen híbrido *MLL/AF6*.

3. *MLL/AF9*: La $t(9;11)(p22;q23)$ produce la fusión de *MLL* con el gen *AF9* (también llamado *MLLT3* y *LTG9*). Se han descrito tres puntos de unión de *AF9* con los exones 6, 7 u 8 de *MLL* (Figura 6) (30, 60). El gen *AF9*, al igual que *AF4*, codifica una proteína rica en prolina y serina que contiene una secuencia de localiza-

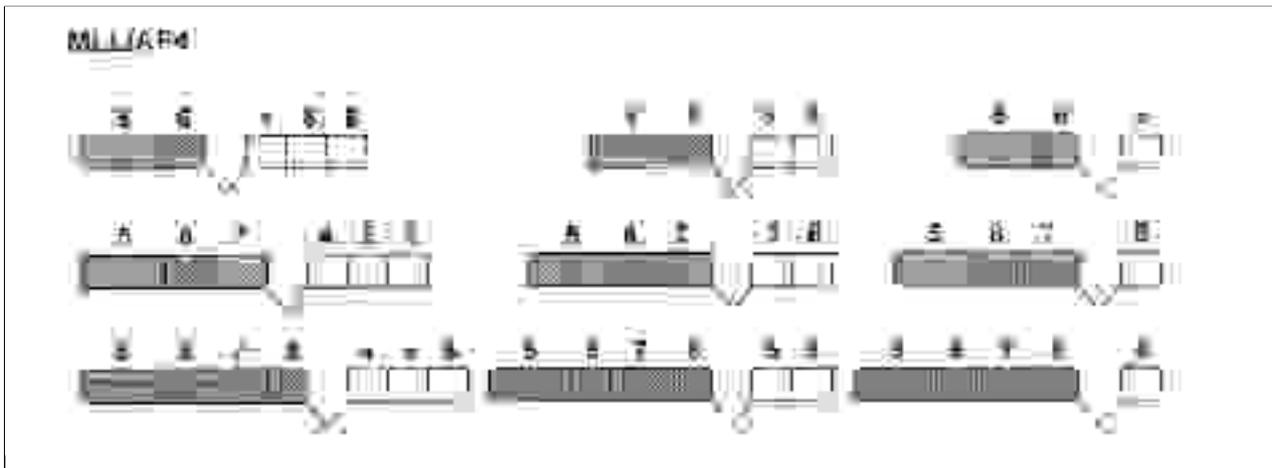


Fig. 4. Esquema de los distintos transcritos de fusión derivados del gen *MLL/AF4* según la localización de los puntos de ruptura en ambos genes y el mecanismo de corte y empalme alternativo.

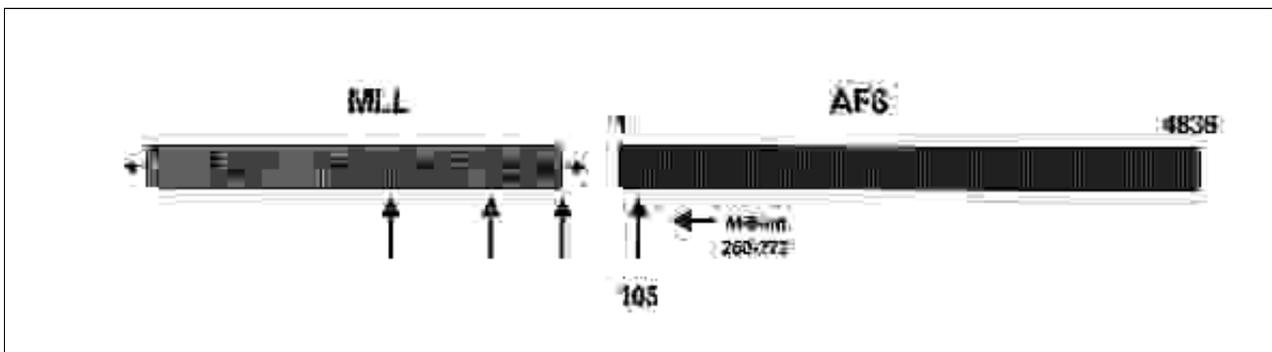


Fig. 5. Esquema del ADNc obtenido a partir del ARNm del gen *AF6*, que se reordena con *MLL* en un gen de fusión derivado de la $t(6;11)$. Por medio flechas verticales se reflejan los puntos de fusión entre *AF6* y *MLL*. La numeración de los nucleótidos se inicia en el primero que interviene en la codificación de proteína y se termina en el último codificante, según Prasad et al (93). Se muestra además la localización del oligonucleótido *AF6-int* utilizado en este trabajo para amplificar el gen *MLL/AF6*. Ex: exón.

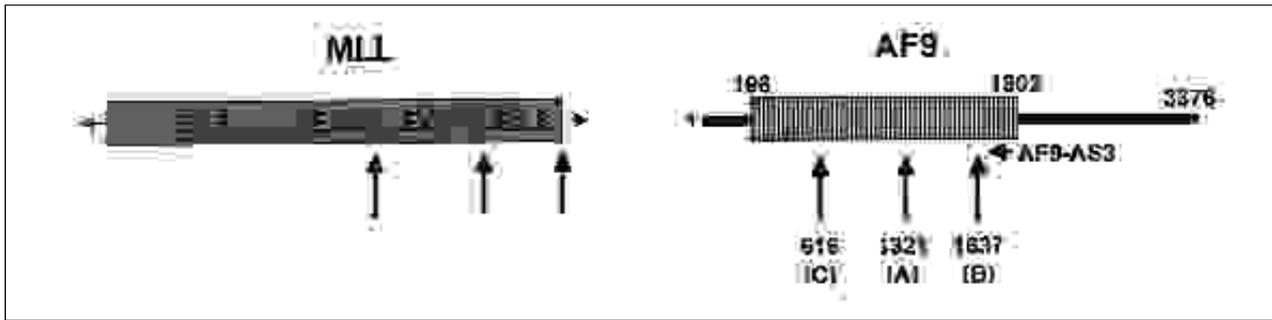


Fig. 6. Representación de parte del ADNc de MLL y del ADNc de AF9. Mediante flechas verticales se muestran los posibles puntos de fusión de MLL (tras los exones 6, 7 u 8) y de AF9. Bajo la flecha correspondiente se indica el nucleótido donde se localizan los puntos de ruptura A, B y C de AF9, según Poirel et al (67). También se señala la localización del oligonucleótido AF9-AS3 (flecha horizontal) utilizado para amplificar el gen MLL/AF9 en este trabajo. Ex: exón.

ción nuclear (61) La t(9;11) se ha detectado fundamentalmente en casos de LAM, especialmente monocítica (15, 62)

4. *MLL/ENL*: El gen ENL (*eleven-nineteen leukemia*), MLLT1 o LTG codifica una proteína rica en serina y prolina de localización nuclear que puede actuar activando la transcripción mediante un dominio homólogo a una zona de AF9 (63).

La t(11;19)(q23;p13.3) determina la formación del gen de fusión MLL/ENL. Se han detectado ARNm quiméricos producidos por la fusión de los exones 6, 7 u 8 de MLL con dos porciones distintas de ENL (Figura 7) (64). El reordenamiento MLL/ENL ha sido detectado mediante RT-PCR en casos con t(11;19) diagnosticados de LAM y LAL (incluidos lactantes) de línea B y T (65,66).

5. *MLL/ELL*: A partir de la t(11;19)(q23;p13.1) se ha

clonado el gen de fusión MLL/ELL (Figura 7). El gen ELL (*eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene*) codifica una proteína altamente básica, rica en lisina (67). El reordenamiento MLL/ELL se ha detectado por RT-PCR en casos de LAM (65).

Si bien ENL y ELL son los dos genes procedentes de la banda 9p13 que más frecuentemente se unen a MLL, se ha descrito un tercer gen, el ENN (68).

6. *Duplicación de MLL*: La duplicación parcial del gen MLL ha sido encontrada en el 91% de los casos de LAM con triplicación del cromosoma 11 (69), además de casos de LAM con cariotipo normal (aproximadamente en el 11%), en los que se detectado con RT-PCR en un paso y se ha relacionado con un mal pronóstico (70). Se han descrito pacientes con duplicación de MLL no detectable mediante *Southern blot* usando una sonda de la zona bcr (69),.

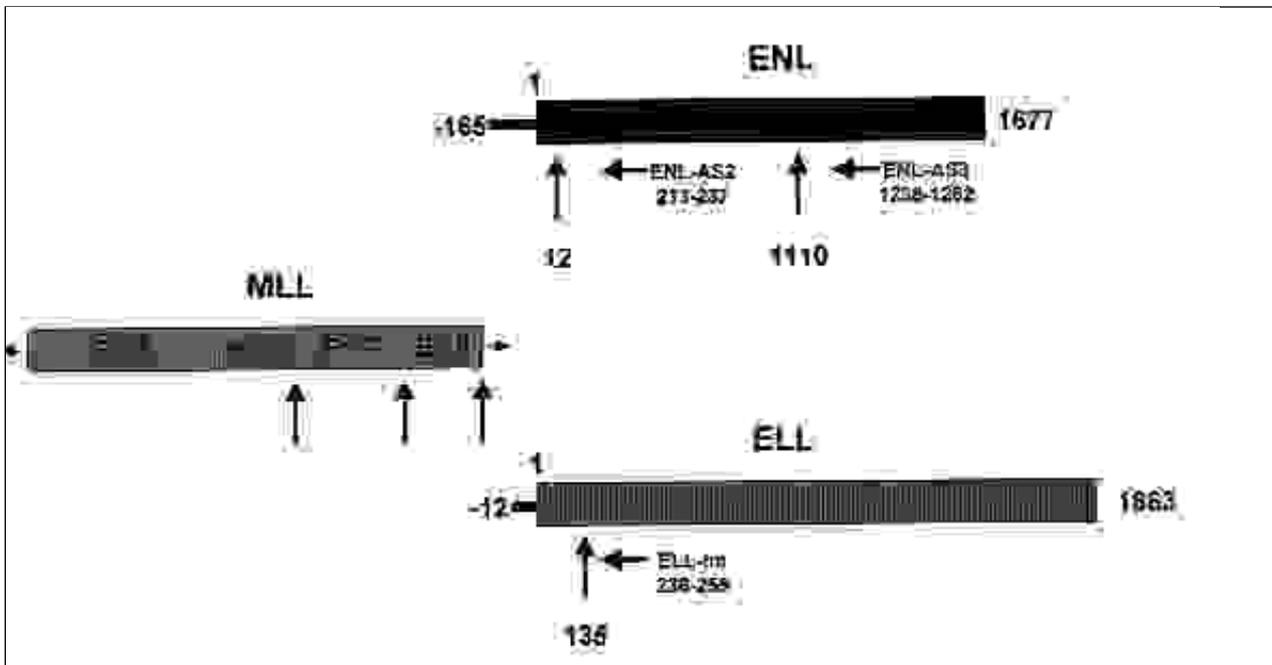


Fig. 7. Esquema de los ADNcs obtenidos a partir de los ARNm de los genes ENL y ELL que se reordenan con MLL en los genes de fusión derivados de la t(11;19). Por medio flechas verticales se reflejan los posibles puntos de fusión de ambos genes con MLL. La numeración de los nucleótidos se inicia en el primero que interviene en la codificación de proteína y se termina en el último codificante (98,101). Se muestra además la localización de los oligonucleótidos ENL-AS2 y ENL-AS3 utilizados en este trabajo para amplificar el gen MLL/ENL y la del cebador ELL-int empleado para amplificar MLL/ELL. Ex: exón.

Se ha demostrado que la duplicación se produce en un único alelo (71). En la mayoría de los casos se duplica del exón 2 al 6 u 8 (69, 70).

Recientemente, se ha descrito la presencia de duplicaciones de MLL en un 16-100% de la población normal mediante *nested* RT-PCR, aunque con un paso de PCR y con *Southern blot* fueron negativos. Algunos de estos últimos casos parecen tener uniones de exones no halladas en LAM y en algunos no se mantiene el marco de lectura (*open reading frame*), a diferencia de los detectados en LA, que codifican una proteína de fusión (72, 73).

E2A/PBX1

Ciertas zonas del ADN que tienen función reguladora se conocen como *E box* (en honor de su descubridor Ephrussi). La *E box* llamada E2 es importante para la transcripción del gen la cadena ligera de las inmunoglobulinas. La proteína E12 se une específicamente a la secuencia de E2 y no a otras *E box*. Las proteínas E47 y E25 tienen gran homología con E12. Estas tres proteínas son factores de transcripción que contienen un dominio hélice-bucle-hélice y están codificadas por un mismo gen denominado E2A. Las proteínas de E2A intervienen, formando heterodímeros con otras proteínas con dominios hélice-bucle-hélice, en la regulación de la expresión de distintos genes en diversos tejidos, pero los homodímeros de E2A sólo se han encontrado en linfocitos de línea B. La inactivación de E2A en rato-

nes determina el bloqueo de la maduración de los progenitores de los linfocitos B en un estadio precoz.

Poco después del descubrimiento del gen E2A, se determinó su localización en la banda 19p13.3, en la zona de ruptura de la t(1;19)(q23;p13). Posteriormente, se descubrió que esta translocación, tanto en su variante balanceada como en la no balanceada, da lugar a la fusión de E2A con un gen localizado en el cromosoma 1, previamente desconocido, que se denominó PRL y que actualmente se conoce como PBX1. La citada fusión produce la formación del gen E2A/PBX1 en el der(19) que se transcribe en ARNm. En cambio, el recíproco PBX1/E2A del der(1) no produce proteína, ya que E2A no se transcribe en las células linfoides.

Ya se ha citado previamente que las proteínas PBX (PBX1, PBX2 y PBX3) tienen una gran homología en toda su secuencia con la proteína de *Drosophila extradenticle*. La proteína E2A/PBX1 pierde el extremo carboxilo de E2A, que incluye la región hélice-bucle-hélice, que es sustituido por la porción de PBX1 que contiene el homeodominio (Figura 8). Esta proteína quimérica se une a las zonas del ADN que reconoce la proteína PBX1, pero tiene propiedades de regulación de la transcripción diferentes. Las proteínas PBX y E2A/PBX1 se unen a ciertas proteínas HOX con las que actúan cooperativamente. La mínima zona de PBX1 necesaria para la oncogénesis es, precisamente, la que interacciona con las proteínas HOX. Al parecer, el efecto de E2A/PBX1 es, fundamentalmente, el bloqueo de la diferenciación, y para producir el fenotipo transformado son necesarias otras alteraciones genéticas (74).

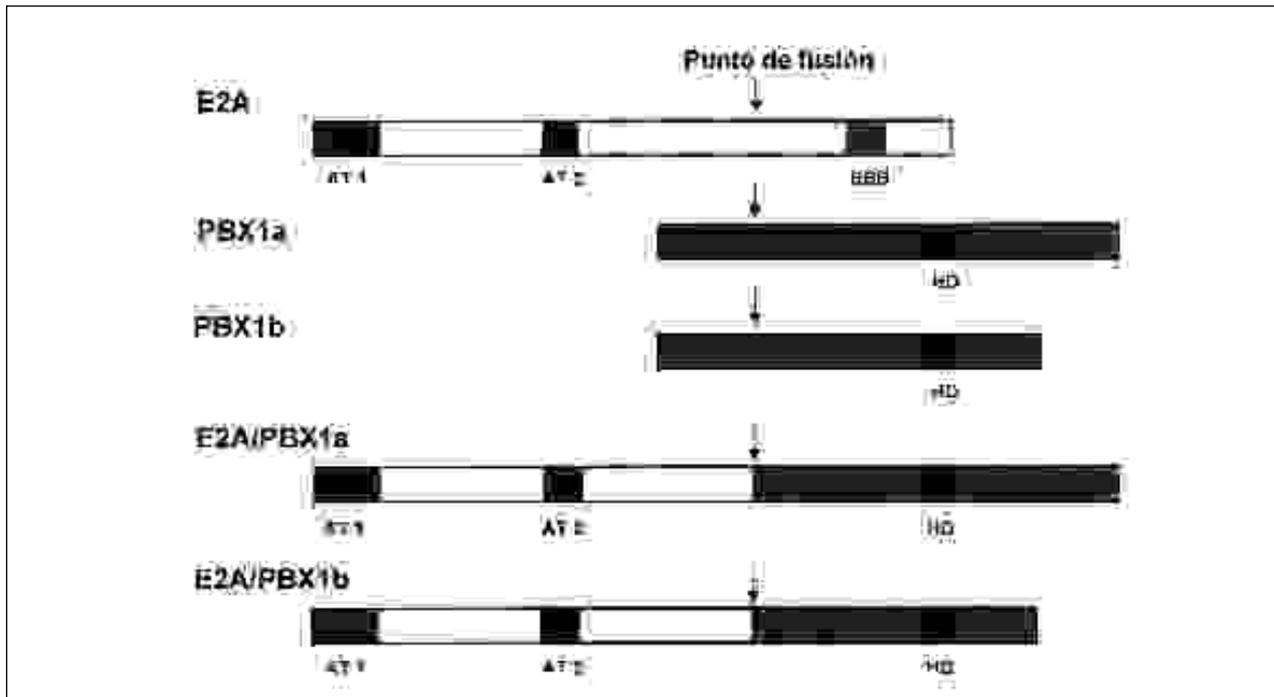


Fig. 8. Esquema de la estructura de las proteínas E2A, PBX1 y E2A/PBX1. El punto en el que se produce la fusión entre las proteínas E2A y PBX1 se señala con una flecha. Las proteínas PBX1a y PBX1b (así como E2A/PBX1a y E2A/PBX1b) se diferencian sólo en su extremo carboxilo y su origen está un mecanismo alternativo de corte y empalme. Abreviaturas: AT1 y AT2, dominios activadores de la transcripción 1 y 2, respectivamente; HBH, dominio hélice-bucle-hélice; HD, homeodominio.

Si bien, se ha observado que E2A/PBX1 induce tanto proliferación, como apoptosis (75).

La ruptura del gen E2A se produce en un intrón de aproximadamente 3.5 kb que se localiza entre los exones 13 y 14. Por su parte, el gen PBX1 parece que también queda roto en un único intrón, ya que repetidamente se detecta la misma porción de este gen en el ARNm de fusión. Además, se han descrito casos con 27 nucleótidos más entre las secuencias de E2A y de PBX1 en el ARN de fusión y un caso con un tipo de fusión diferente del de los demás (76).

El ARNm de E2A/PBX1 se ha detectado en más del 95% de las LALs con t(1;19) (77, 78). Según los datos obtenidos hasta el momento, la gran mayoría de las LALs con t(1;19) poseen el gen E2A/PBX1, son positivas para las Clg y tienen un inmunofenotipo particular con una elevada expresión de CD19, CD10 y CD9, una ausencia completa de CD34 y al menos una carencia parcial de CD20 (78). Mientras que en una pequeña minoría de casos citogenéticamente idénticos a los anteriores, al parecer con mejor pronóstico, son negativas las Clg, carecen de E2A/PBX1 y no presentan el referido inmunofenotipo (79). No obstante, estos marcadores de superficie aparecen en el 8% de las LALs de precursores B, incluyendo casos sin t(1;19) con E2A/PBX1 y otros sin este gen de fusión (78). Y, a su vez, existen casos de LAL con t(1;19) que expresan el ARNm de E2A/PBX1 y en los que son negativas las Clg (74, 80). Todo ello hace que sea más útil el estudio molecular que el fenotipo en los casos con t(1;19). Además, se ha detectado el ARN de E2A/PBX1 en algún caso de LAM (80). El estudio de RT-PCR de E2A/PBX1 ha permitido detectar su ARNm quimérico en casos sin t(1;19) (77-79, 81), hasta el punto de postularse que entre un 25 y un 50% de los casos con E2A/PBX1 no se detecta la t(1;19) (74).

En 74 pacientes con LAL y t(1;19) se ha realizado un estudio de enfermedad mínima residual (con un prolongado seguimiento) mediante el análisis del ARN de E2A/PBX1 con *nested* RT-PCR al final de la fase de consolidación del tratamiento, que ha concluido que la detección de dicho ARN quimérico en este momento no predice la evolución de los pacientes. Los estudios anteriores, realizados sobre un escaso número de pacientes, tampoco han podido establecer una relación entre la positividad de la PCR durante el tratamiento y la evolución de los pacientes (76, 82),

Complejo del core binding factor (CBF)

Tres de los más frecuentes genes de fusión de las LAs afectan distintos componentes del CBF. El CBF es un heterodímero, formado por las subunidades CBF β y CBF α , que se une al ADN en la secuencia o core TGT/cGGT. Existen al menos 3 subunidades, las cuales tienen homología con el gen RUNT de *Drosophila*. La proteína CBF β está codificada por el gen AML1, también llamado CBFA2, y la CBF α por el gen CBF β . La subunidad CBF α se une al ADN directamente, en cambio la β aumenta la afinidad de CBF modificando su configuración, pero no se une al ADN directamente (Figura 9). El dominio RUNT de la subunidad α es el responsable tanto de la unión al ADN, como de la interacción con la subunidad β .

El complejo CBF regula la expresión de una gran variedad de proteínas que se expresan en las células hematopoyéticas como la interleucina 3, el factor estimulante de colonias granulomonocíticas (GM-CSF), el receptor del factor estimulante de colonias monocíticas (M-CSF), el RCT, la mieloperoxidasa, CD3, HoxB2 y la elastasa de los neutrófilos (6,83,84).

TEL/AML1

El gen TEL (*translocation ets-like leukemia*) o ETV6 fue identificado tras ser clonada la región implicada en la t(5;12)(q33;p13) que se observa en algunas leucemias mielomonocíticas crónicas. Posteriormente, se caracterizó la t(12;21)(p13;q22) que, como se ha indicado, se halla excepcionalmente en la LAL, y se observó que en esta translocación se produce la unión de TEL con AML1 (85,86). TEL es un miembro de la familia de factores de transcripción llamada ETS. El factor de transcripción que codifica contiene un dominio en el extremo amino de dimerización y transactivación, a continuación un dominio hélice-bucle-hélice y en el extremo carboxilo un dominio de unión al ADN. En el híbrido TEL/AML1, los dos dominios citados en primer lugar quedan unidos a la proteína CBF β casi completa, incluyendo la zona de homología con RUNT y el dominio de transactivación de su extremo carboxilo (Figura 10C) (85, 87). Se ha

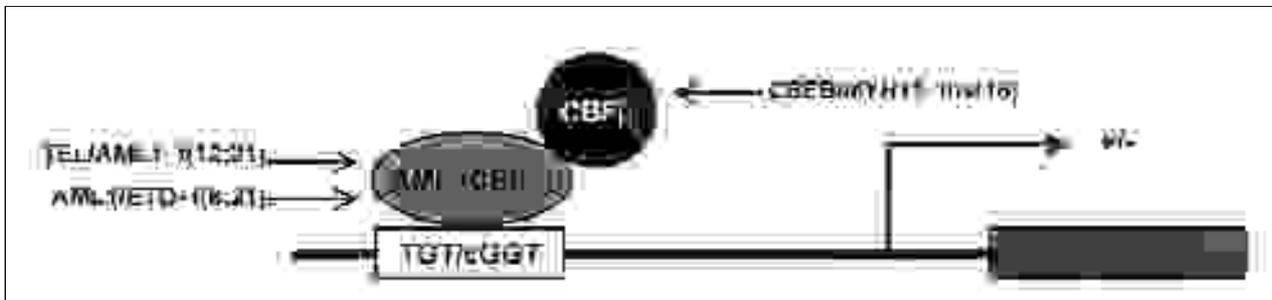


Fig. 9. El heterodímero normal CBF (core binding factor) está formado por la subunidad β (CBF β) y la subunidad α (CBF α o AML1), a través de esta última se une al ADN en la secuencia core (TGT/cGGT) y regula la expresión de diversos genes. Este complejo es la diana de tres frecuentes fusiones génicas en leucemias agudas, la subunidad que afecta cada una de ellas se muestra en la figura.

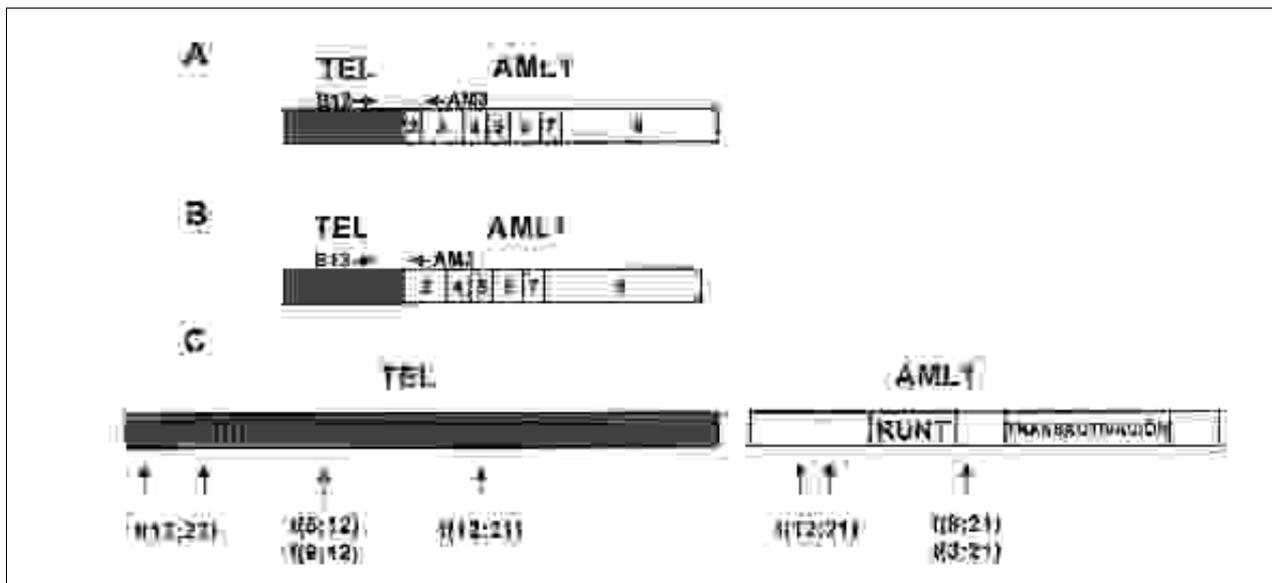


Fig. 10. Representación esquemática de los dos tipos de transcritos fundamentales del gen de fusión TEL/AML1, en los que el exón 5 de TEL queda unido al exón 2 (A) o al exón 3 (B) de AML1. Se muestra la posición de los cebadores B12 y AM3 que se han utilizado para la amplificación de TEL/AML1 en este trabajo. (C) Esquema de la estructura de las proteínas TEL y AML1, en el que se señalan los dominios hélice-bucle-hélice (HBH) y de unión al ADN (ETS) de TEL y los dominios de homología con la proteína RUNT de *Drosophila* y de transactivación de AML1, respectivamente. Las flechas verticales debajo de las proteínas indican los puntos de fusión que se originan por las distintas translocaciones que afectan a los genes que las codifican.

demostrado que la proteína de TEL/AML1 forma homodímeros y heterodímeros con la proteína TEL normal, gracias a la porción de TEL presente en la quimera (118).

El uso de técnicas de FISH y RT-PCR ha permitido detectar el gen híbrido TEL/AML1 o su ARNm, respectivamente, en el 10-29% de los casos de LAL de edad pediátrica (88-96). Sin embargo, en los pacientes adultos con LAL se ha observado en aproximadamente el 3% de los casos (88,90,97,98) y en pacientes menores de un año o con síndrome de Down parece ser infrecuente (99,110). Solamente en un 45% de los casos con TEL/AML1 se detecta el recíproco AML1/TEL (88). También se ha observado que la mayoría (87,5%) de los casos con TEL/AML1 presentan el otro alelo de TEL deletado (90,101), al parecer este es un fenómeno secundario (101) que no afecta al pronóstico de los pacientes (94). TEL/AML1 se detecta en casos de LAL de precursores B, en los que alcanza, dentro de la edad pediátrica, un 12-36% (89-91, 93,101,102). La máxima frecuencia de TEL/AML1 es entre los 2 y 7 años (88,90,93,102), no se observa en casos portadores de los reordenamientos BCR/ABL, E2A/PBX1, ni MLL/AF4 u otras translocaciones que afecten al gen MLL (90,91, 93) no suelen tener hiperleucocitosis, ni hiperdiploidía (91,93), frecuentemente poseen algún marcador mielóide (CD13 y/o CD33) asociado a los linfoides B y son con frecuencia CD10 positivos (90,93,94,103).

Se ha considerado que los niños portadores de TEL/AML1 tienen un pronóstico bueno o incluso excelente (118,123,134-136). Sin embargo, en la actualidad, este hecho se encuentra en discusión (92,94-96,107).

La amplificación del ADNc de TEL/AML1 permite detectar dos productos de PCR fundamentales (89), uno mayor que deriva de la unión del nucleótido 1033, extremo 5' del exón 5, de TEL con el exón 2 de AML1 (Figura

10A) y otro menor en el que el citado punto de TEL se une al exón 3 de AML1 (Figura 10B) (90). El transcrito mayor se suele acompañar de la coamplificación del menor con intensidad inferior a la del primero (96). En estos casos se produce la eliminación del exón 2 de AML1 (39 pb) por el mecanismo de corte y empalme alternativo (96).

Los estudios que intentan valorar la utilidad de la detección del ARNm de TEL/AML1 como indicador de la existencia de EMR aún son pocos, se han realizado sobre escasos pacientes y con seguimiento durante un breve periodo de tiempo. No obstante, existen algunos datos que parecen indicar que los enfermos que permanecen en remisión completa de forma prolongada mantienen la PCR negativa, mientras que en los que recaen se hace positiva previamente (108,109).

AML1/ETO

En la inmensa mayoría de los casos de LAM con t(8;21) la ruptura del cromosoma 21q22 se produce en el intrón del gen AML1 o CBFA2 que se localiza inmediatamente después del exón que codifica el dominio RUNT. El der(8) resultante de esta translocación pasa a codificar una proteína de fusión que incluye la porción del extremo amino de CBF 2, incluyendo el dominio RUNT, y que conserva, por tanto, la capacidad de unirse al ADN y de formar dímeros con CBF (Figura 10C). La porción del extremo carboxilo de AML1, que incluye el dominio de transactivación, queda sustituida por la secuencia casi completa de la proteína codificada por el gen ETO (*eight-twenty-one*) que se piensa que es un factor de transcripción con dos dedos de zinc. El gen ETO (también llamado MTG8 y CDR) procede del cromoso-

ma 8q22 (83). La proteína quimérica CBF 2/ETO se cree que actúa por un mecanismo dominante negativo.

El ARNm de AML1/ETO puede ser detectado en la casi totalidad de las LAMs portadoras de t(8;21)(q22;q22) cuando son diagnosticadas (83,110), si bien se ha descrito un caso de LAM tras un síndrome mielodisplásico con t(8;21)(q22;q22) en el que el gen AML1 no estaba afectado (111). También se ha objetivado el ARNm quimérico de AML1/ETO en casos en los que no se ha apreciado una t(8;21) por técnicas citogenéticas clásicas (110,112-114). El análisis cariotípico permite demostrar la t(8;21) en aproximadamente el 7-8% de los pacientes adultos con LAM y por RT-PCR se estima que se podría detectar el ARNm de AML1/ETO en un porcentaje, aún no claramente determinado, que podría ser superior al citado para la t(8;21) en un 5-10% (110, 112).

El análisis del ARNm de AML1/ETO por RT-PCR ha permitido detectarlo en pacientes que se hallaban en RC desde periodos de tiempo muy prologados, con una hematopoyesis policlonal y probablemente curados de su LA, tras ser tratados con quimioterapia convencional, trasplante autólogo o alogénico de médula ósea (83,113,115,116). Se ha demostrado que la presencia de AML1/ETO en estos pacientes se debe a la persistencia residual de precursores hematopoyéticos multipotentes del mismo origen clonal que los blastos leucémicos presentes en el momento del diagnóstico (115). El desarrollo de diferentes metodologías de PCR cuantitativa para AML1/ETO ha permitido observar que un incremento en el número de copias de AML1/ETO podría preceder a la recaída de algunos de los escasos pacientes que se han analizado (117,119).

CBF/MYH11

Los estudios de genética molecular han demostrado que la inv(16) y la t(16;16) determinan la formación de un gen de fusión en el que participan el gen CBF, que se localiza normalmente en el brazo largo del cromosoma 16 (16q22), y el gen MYH11 que está en el brazo corto de dicho cromosoma (16p13). CBF codifica la subunidad del CBF, y MYH11 la cadena pesada de la miosina del músculo liso. El gen de fusión originado que parece tener importancia en la patogénesis de la leucemia es CBF/MYH11, mientras que el potencial recíproco MYH11/CBF, no se forma en todos los casos con inv(16), por delección de las secuencias del extremo 5' de MYH11, y además, sus características biológicas hacen que sea poco probable su implicación de forma importante en la leucemogénesis (30). En algunos casos portadores de del(16)(q22) también se ha demostrado la presencia del ARNm de fusión de CBF/MYH11, si bien estos casos pueden no ser auténticas delecciones (84,114).

Se conocen al menos 11 tipos de transcritos de fusión distintos derivados de CBF/MYH11 (84,120,121). De estos transcritos híbridos existen 8 variantes según los puntos de fusión entre CBF y MYH11 que se clasifican mediante letras de la A a la H, de los cuales el más frecuente es el tipo A (Figura 11) (84), los demás se deben a inserciones o pérdidas de secuencia (120,121).

Se ha detectado el ARNm de CBF/MYH11 en pacientes sin alteraciones evidentes del cariotipo a nivel

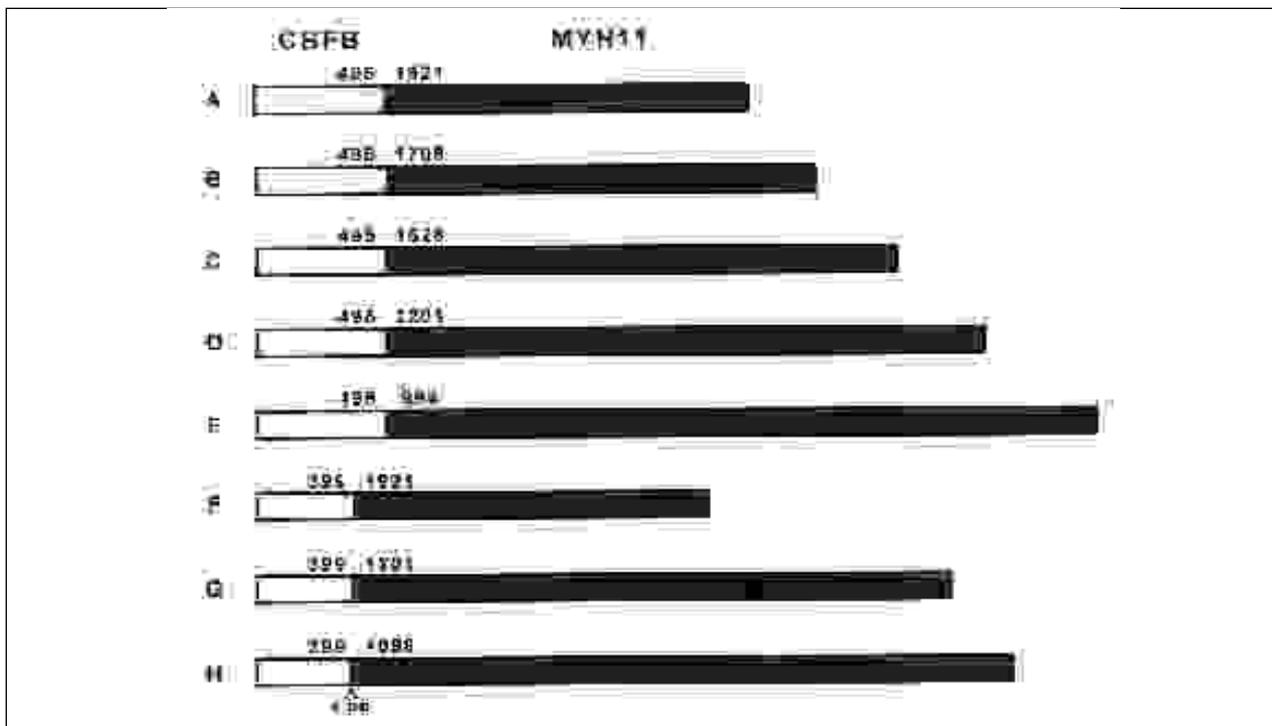


Figura 11. Esquema de la clasificación los transcritos híbridos del gen de fusión CBF/MYH11 según los puntos de unión originados. Los números corresponden al nucleótido de CBF y al de MYH11, a la izquierda y derecha respectivamente, que se encuentra en el punto de fusión. El triángulo indica la posición de una inserción de 4 pb de origen desconocido que mantiene el marco de lectura de MYH11 (30).

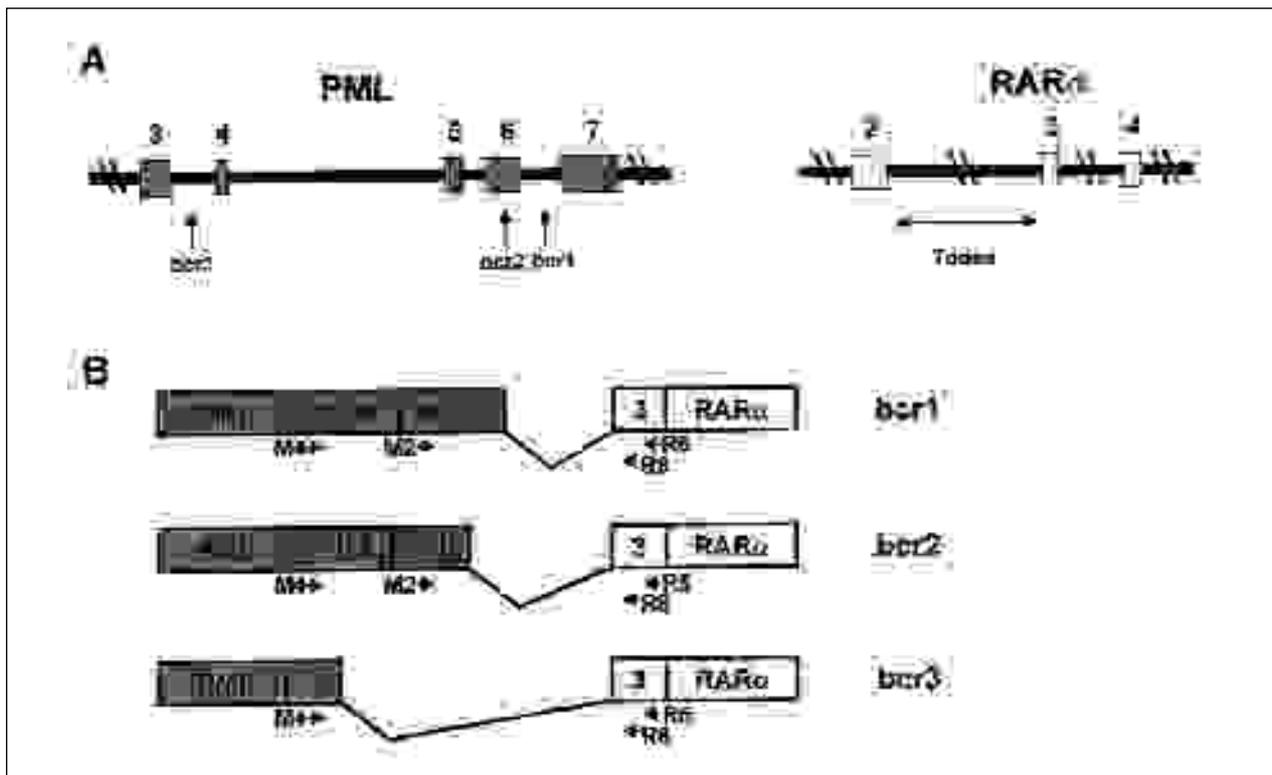


Fig. 12. (A) Representación esquemática de los genes PML y RAR α en la que aparecen las regiones de acumulación de puntos de corte (bcr) de ambos genes. En el gen PML existen tres regiones: bcr3 que se localiza en el intrón 3, bcr2 situada en el exón 6 y bcr1 que está en el intrón 6. Todos los puntos de corte en RAR α se producen en el intrón 2. (B) Esquema de los ARNm quiméricos resultantes según se produzca la ruptura en bcr1 (transcrito largo), bcr2 (transcrito variable) o bcr3 (transcrito corto). Se indica la localización de los oligonucleótidos que se han empleado en este trabajo para la amplificación de PML/RAR α .

del cromosoma 16 (114,122-124). Esto supone que el ARNm de CBF β /MYH11 podría llegar a detectarse mediante RT-PCR en aproximadamente un 10% de las LAMs, mientras que la inv(16) se podría evidenciar en aproximadamente el 6% (123).

PML/RAR α

Virtualmente en el 100% de los casos con morfología típica de LAP se puede detectar mediante RT-PCR o FISH el reordenamiento PML/RAR α . El gen PML (nombre derivado de promielocito), inicialmente denominado myl, se localiza en la zona de ruptura del cromosoma 15 producida en la t(15;17)(q22;q21). El gen afectado por esta translocación en el cromosoma 17 codifica el receptor del ácido retinóico (125). El gen de fusión PML/RAR α también se ha detectado en otras translocaciones variantes que afectan a la banda 17q21 y a otro cromosoma diferente del 15: t(1;17), t(8;17), t(14;17), así como en casos con translocaciones complejas como la t(1;15;17) (126,127).

De manera infrecuente se han observado reordenamientos del gen RAR α con otros genes. Esto ocurre en la t(11;17) en la que RAR α se une a un gen denominado PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger*) que codifica una proteína con dedos de zinc. En los casos portadores

de la t(11;17) las células leucémicas presentan características morfológicas intermedias entre una LAM-M2 y una LAM-M3. Estos casos, al contrario que las LAM-M3 con t(15;17) y/o reordenamiento PML/RAR α , no responden al tratamiento con ácido todo-trans retinoico (ATRA, del inglés *all-trans retinoic acid*) (128). En un caso se ha descrito la t(5;17), que produce la unión del gen NPM con RAR α (129). También se ha descrito en un paciente el reordenamiento de RAR α con el gen NuMA que se localiza en el cromosoma 11 (130). En otro caso, morfológicamente clasificado como LAM-M2, se ha descrito una t(15;17)(q24.3;q21.1), sin reordenamiento PML/RAR α y resistente al tratamiento con ATRA (131).

—Estructura y función de los genes PML y RAR normales:

Los retinoides ejercen su acción a través receptores nucleares que han sido clasificados en dos clases principales: los receptores del ácido retinóico (RAR) y los receptores de retinoides X (RXR). Ambos tipos incluyen tres miembros que se denominan α , β y γ . RAR α está formado por 6 dominios (A-F). Los dominios A/B tienen funciones de activación de la transcripción, el C contiene dos dedos de zinc, el D es un dominio de dimerización y el E de localización nuclear.

El gen PML está formado por 9 exones. Por el mecanismo de corte y empalme del transcrito primario se

pueden formar, al menos, 13 variantes de la proteína PML. La región del extremo amino contiene un dominio de transactivación, un tipo de dedo de zinc denominado RING, una región en hélice y un dominio responsable de homo o heterodimerización. El extremo carboxilo es una región rica en serina y prolina que contiene un lugar de fosforilación, este extremo varía en distintas isoformas originadas por el mecanismo de corte y empalme. PML se localiza en el núcleo con un patrón de inmunofluorescencia en grandes manchas (131,132).

—Gen de fusión PML/RAR :

La t(15;17) da lugar al gen PML/RAR en el der(15q+) y al gen recíproco RAR /PML en el der(17q). El gen RAR /PML sólo se expresa en un 70-80% de las LAPs con t(15;17) (132,134,135). En cambio, el ARNm PML/RAR se detecta mediante RT-PCR en casi el 100% de ellas y en casos de LAP sin evidencia citogenética de t(15;17) (114,132,134,136). El gen PML/RAR da lugar a la proteína PML/RAR y a una proteína PML aberrante en la que el extremo amino de PML ha sido sustituido por 10 aminoácidos de RAR y que se origina por el mecanismo de corte y empalme (137).

La ruptura del cromosoma 17q se produce siempre en el intrón 2 de RAR (137). En cambio, los puntos de ruptura en 15q se producen fundamentalmente en tres localizaciones de PML denominadas, respectivamente, bcr1, que está situada en el intrón 6; bcr2, en el exón 6; y bcr3, ubicada en el intrón 3 (Figura 12A) (137). La variante más frecuente es la formada por la ruptura en la región bcr1 (conocida como el transcrito largo), la cual está presente en el 55-60% de los casos (132,138). La forma originada por la ruptura en bcr3 (el transcrito corto) se detecta en el 35-40% de los casos (132,137-139). El transcrito producido por la ruptura en bcr2 (llamado V o variable) se describe en aproximadamente el 8% de los casos (Figura 12B) (132,138,140). Se han descrito de manera excepcional otros puntos de corte, como en el exón 5 de PML (132). La relación existente entre la presencia de los distintos transcritos y el pronóstico de los enfermos es discutida. Se ha observado una sensibilidad al ATRA *in vitro* disminuida en algunas variantes de bcr2 (140), y una peor evolución de los pacientes portadores del transcrito corto de PML/RAR (134,141). No obstante, recientemente, se ha observado en un numeroso grupo de pacientes con LAP una asociación entre la presencia del transcrito corto y recuentos leucocitarios, porcentaje de blastos más promielocitos en SP, número absoluto de blastos más promielocitos en SP y porcentaje de LAM-M3V superiores a los de los casos portadores de la variante larga; y, sin embargo, no se objetivaron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes en los que se obtuvo RC, ni en la supervivencia libre de enfermedad (138).

—Tratamiento con ATRA:

Los RARs se unen a diversos retinoides. El ATRA se une con gran afinidad a los RARs y con muy baja afinidad a los RXRs, al contrario que otras formas de ácido retinóico que se unen a ambos con una afinidad similar

(125). Se ha demostrado que la proteína PML/RAR disminuye en respuesta al ATRA (142).

Los resultados obtenidos mediante el tratamiento con quimioterapia convencional en la LAP mostraron una elevada sensibilidad a las antraciclinas, lográndose unos porcentajes de RC superiores a los de otras LAMs (125). El fallo para lograr la RC se debía, más que a la resistencia a la quimioterapia, a la mortalidad producida por los trastornos de la coagulación presentes en estos pacientes (125,143). Estas alteraciones de la coagulación se producen por mecanismos complejos que incluyen una actividad procoagulante, fibrinólisis, proteólisis no específica y liberación de citoquinas. El ATRA, sin producir hipoplasia, determina una diferenciación de lo promielocitos leucémicos, un aumento del porcentaje de RC, un aumento en la supervivencia libre de enfermedad y una resolución de la coagulopatía. Este último efecto se logra reduciendo la actividad procoagulante, mientras que la actividad fibrinolítica no cambia o mejora y la proteolítica no se modifica; además, si bien el ATRA aumenta la producción de citoquinas, actúa protegiendo el endotelio frente a estos mediadores (143). No obstante, el ATRA no es útil en los casos PML/RAR negativos (128,131,136,138). El efecto indeseable más importante que origina es el llamado síndrome del ATRA que produce fiebre, dificultad respiratoria (*distrés*), infiltrados pulmonares, derrame pleuropericárdico, hipotensión, edema, a veces fallo renal, y puede estar precedido de leucocitosis. Este síndrome puede causar la muerte por hipoxemia y fallo multiorgánico, aunque puede responder al tratamiento precoz con esteroides. Además, casi todos los pacientes tratados únicamente con ATRA recaen pocos meses después de alcanzar la RC (144).

La recaída extramedular, y concretamente en el sistema nervioso central (SNC), de la LAP que se consideraba un raro fenómeno antes del tratamiento con ATRA de esta enfermedad. No obstante, desde la introducción de este tratamiento la incidencia parece estar incrementándose (145-150). Se ha postulado que ello es debido al aumento en la expresión de moléculas de adhesión en los promielocitos leucémicos y en la secreción de citoquinas, como resultado de la terapia con ATRA (147,151,152).

Además de la forma oral de ATRA habitualmente empleada, existen formulaciones liposomales que se pueden administrar por vía intravenosa y conservan la capacidad de inducir diferenciación en las células leucémicas (153).

—Mecanismo de acción del gen PML/RAR :

En modelos experimentales PML/RAR inhibe la apoptosis y la diferenciación. En todas las proteínas PML/RAR originadas se conservan los dominios de dedos de zinc RING y de dimerización de PML, y los de unión al ADN y al ácido retinóico de RAR. Estudios con formas mutantes de PML/RAR han indicado que la integridad de los dominios de dimerización de PML y de unión al ADN de RAR es crucial para el bloqueo de la diferenciación. Se ha postulado que, dado que PML/RAR puede formar homo o heterodímeros con PML o RXR, la proteína quimérica PML/RAR podría

actuar secuestrando los RXRs impidiendo la formación de los heterodímeros funcionales RAR/RXR, sin embargo existen evidencias experimentales que señalan que el secuestro de RXR no contribuye de manera significativa a la actividad de PML/RARQ (154). El patrón normal de inmunofluorescencia de PML en la LAP cambia a un patrón citoplasmático y/o en micropartículas en las que, aparentemente, se localizan PML/RAR y PML. Sin embargo, la heterodimerización con PML tampoco parece ser crucial en la actividad de bloqueo de la diferenciación de PML/RAR (154). El cambio en el patrón de inmunofluorescencia se correlaciona con la positividad de PML/RAR en la RT-PCR, por lo que se ha planteado su uso en el diagnóstico de la LAP (132,133). No obstante, esta técnica puede no ser informativa en casos en los que las células estén destruidas en la muestra objeto del estudio (132) o en los que la zona de unión del anticuerpo no forme parte del der(15) y no se exprese el der(17) (RAR/PML) (159). Recientemente se ha postulado un mecanismo para la inhibición de la transcripción y la diferenciación por parte de la proteína PML/RAR consistente su interacción con unas moléculas conocidas como co-represores nucleares e histona deacetilasa. PML/RAR se uniría al ADN y formaría complejos con dichas moléculas, a través de RAR, para inhibir la transcripción de determinados genes. El ATRA puede interaccionar con secuencias de RAR y separar el complejo PML/RAR-co-represor-histona deacetilasa. La proteína PLZF también tiene un sitio de unión al co-represor, pero resistente al ATRA, lo cual podría explicar la ausencia de respuesta al ATRA de los pacientes portadores del gen PLZF/RAR (155,156).

—Estudio de la enfermedad mínima residual:

Lo Coco et al en 1992 obtuvieron resultados indicativos de que la detección mediante *heminested* RT-PCR del ARNm híbrido PML/RAR un mes después de alcanzar la RC no se correlacionaba con la recaída, mientras que resultados posteriores positivos o repetidamente negativos se correlacionaban con la recaída o el mantenimiento de la RC, respectivamente (157). Otros estudios obtuvieron resultados similares (141,158,159). Posteriormente, el grupo italiano GIMEMA desarrolló un protocolo terapéutico que denominaron AIDA para el tratamiento de la LAP en el que se realizó un seguimiento molecular de los pacientes. En este protocolo se administra una inducción con ATRA e idarubicina simultáneamente y, tras lograr la RC, tres bloques de consolidación (160). El éxito logrado les llevó a aplicar este protocolo sobre un elevado número de pacientes, cuyo diagnóstico debe ser confirmado mediante la presencia de t(15;17) y/o ARNm de PML/RAR, y a incluir en él que los pacientes con RT-PCR positiva para PML/RAR deban tratarse con trasplante alogénico de médula ósea (TMO), si es posible, mientras que en los negativos se administran aleatoriamente distintos tipos de tratamiento de mantenimiento o ninguno. Con este tratamiento se ha observado que un 95% de los pacientes alcanzaron la RC tras la inducción, en un 60% de ellos se obtuvo la remisión molecular, mientras que un 40% permanecieron con PCR positiva sin aparente

influencia en su evolución posterior. Después de la consolidación el PML/RAR fue negativo en un 98%. No obstante, aunque la positividad de la PCR en este momento parece ser un buen predictor de la recaída, la negatividad no es una garantía de cura, ya que algunos pacientes recaen posteriormente (165). Este grupo también ha observado que los pacientes con LAP en segunda RC hematológica sometidos a trasplante autólogo de médula ósea (TAMO), que presentaban positiva la PCR inmediatamente pretrasplante, recaen tras el TAMO; en cambio, la gran mayoría de los que tienen PCR negativa se mantienen en RC por periodos prolongados (161). La sensibilidad, medida por dilución, con la que se han realizado los estudios de PML/RAR mediante RT-PCR permite detectar una célula leucémica entre 10⁴ (dilución entre 10⁴ y 10⁵) (141,158,159,162,163). Muy recientemente, se ha desarrollado un método que aumenta dicha sensibilidad hasta 2x10⁶, mediante el cual se ha detectado el ARNm de PML/RAR en pacientes con RC prolongada y cuya PCR aplicando métodos menos sensibles era negativa. El significado de la presencia de este ARN de fusión en cantidad tan baja es desconocido, ya que podría ser debido a células leucémicas residuales sin capacidad de reproducir la enfermedad (163).

Transducción de señales

BCR/ABL

—Estructura de los genes de fusión BCR/ABL y de sus transcritos, correlación con el fenotipo de la leucemia:

La translocación t(9;22)(q34;q11) da lugar a dos genes híbridos, el gen BCR/ABL en el cromosoma 22q, o cromosoma Filadelfia (Ph), y el ABL/BCR en el 9q+. El gen BCR/ABL se detecta en más del 95% de los pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC), en aproximadamente un 3 a 5% de los casos de LAL de la infancia y en alrededor de un tercio de los pacientes adultos con LAL (si bien, su frecuencia aumenta con la edad de los pacientes), así como en casos ocasionales de LAM (7,164-168). Se han descrito casos de LAL BCR/ABL-positivos en los que no se ha detectado el cromosoma Ph, en algunos de ellos por ser insuficientes las metafases obtenidas para realizar el estudio (167, 169), pero otros casos con estudios citogenéticos adecuados han sido igualmente Ph-negativos (167,168).

Todos los genes de fusión BCR/ABL contienen una porción 5' derivada de parte de la secuencia de BCR y una porción 3' que incluye casi todo el gen Abl, excepto sus primeros codones. El punto de ruptura del cromosoma 9 se produce en un segmento de más de 300 kb en el extremo 5' gen Abl: o bien antes (5) del primer exón alternativo Ib, o entre los exones Ib y Ia, o bien después (3') del exón Ia (Figura 13A). En la inmensa mayoría de los pacientes con LMC, en aproximadamente un tercio de los casos con LAL del adulto BCR/ABL-positiva y en raros casos infantiles, el punto de corte del cromosoma 22 se produce una región de 5,8 kb llamada M-bcr

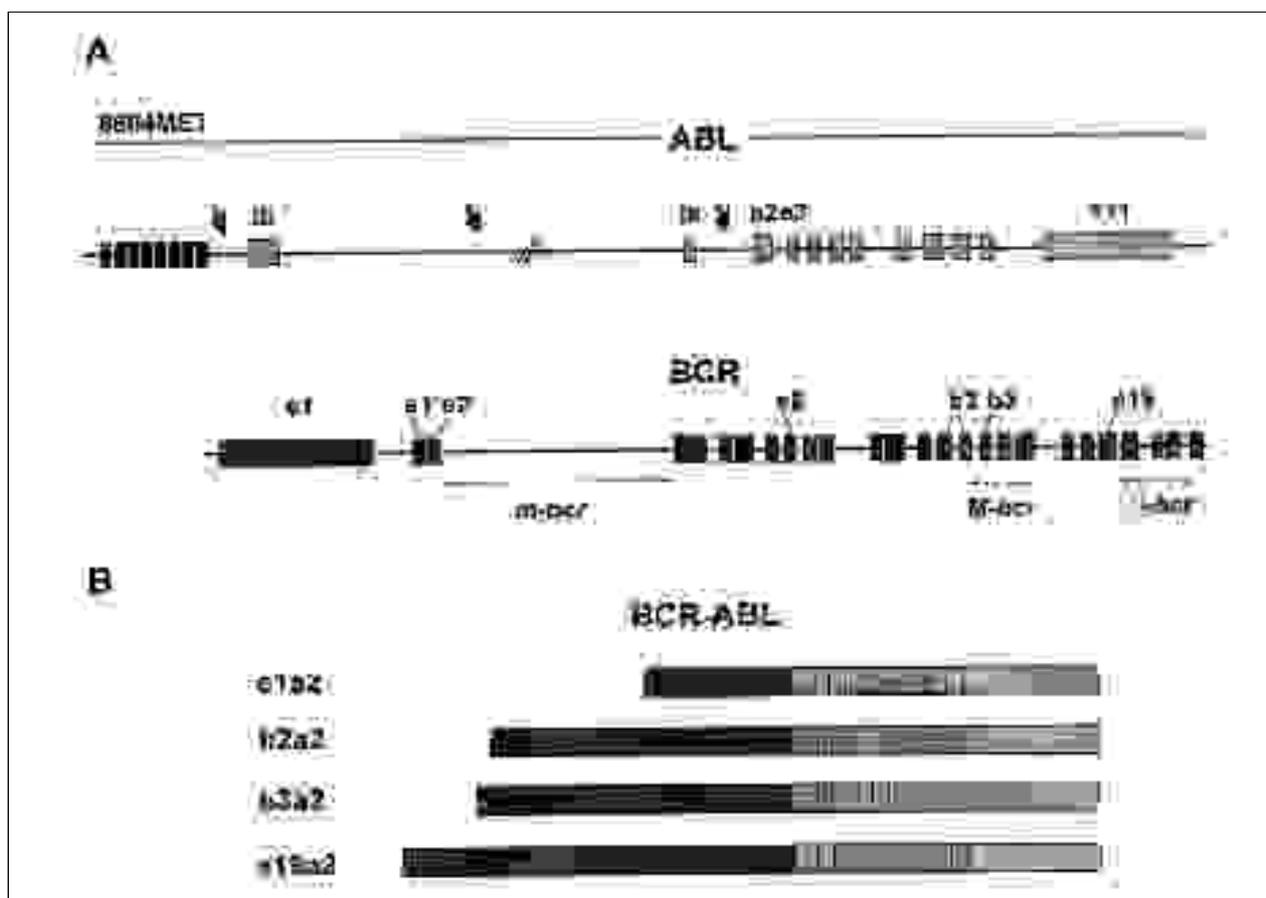


Fig. 13. (A) Esquema de los genes Abl y BCR, en el que también se incluye el gen 8604Met que se localiza "corriente arriba" de Abl. Los exones se representan como rectángulos y los intrones como barras. Los puntos de ruptura del gen Abl en la t(9;22) se simbolizan mediante flechas inclinadas. Las regiones de acumulación de los puntos de corte (bcr) del gen BCR se señalan mediante barras entre flechas. (B) Estructura de los tipos de ARNm formados según la localización de la ruptura en el gen BCR.

(*major breakpoint cluster region* o región mayor de agrupación de los puntos de corte) que contiene 5 exones conocidos como b1 a b5 y que corresponden a los exones 12 al 16 del gen BCR (Figura 13A). Con independencia de la localización del punto de corte en Abl, el procesamiento del transcrito primario da lugar, habitualmente, a dos tipos de ARNm. En un ARNm el exón 2 de M-bcr queda unido al exón 2 de AbI (b2a2) y en el otro el exón 3 de M-bcr se une al exón 2 de AbI (b3a2) (Figura 13B). Los dos ARNMs quiméricos resultantes codifican una proteína de 210 kD (p210) con sólo 25 aminoácidos de diferencia (164). En los otros dos tercios de los pacientes de LAL BCR/ABL-positiva del adulto y en la gran mayoría de los niños, junto con casos excepcionales de LMC y LAM, la ruptura de BCR se produce en un intrón de 54.4 Kb situado entre los dos exones alternativos e2' y e2, esta zona se conoce como región menor bcr o m-bcr (Figura 13A). En estos casos los exones e1' y e2' son eliminados por el mecanismo de corte y empalme, dando lugar al transcrito e1a2 (Figura 13B). Este ARNm se traduce en una proteína de 190 kD (p190) (164). La mayoría de los pacientes de LMC y LAL con puntos de ruptura en la región M-BCR coexpresan los ARNMs correspondientes a p210 y p190, si bien este último en menor cantidad. Ello es probable-

mente debido al mecanismo de corte y empalme alternativo (170,171). Existe una tercera región de ruptura en el gen BCR conocida como μ -bcr, entre los exones e19 y e20 (Figura 13A), que se ha descrito en casos de leucemia neutrofílica crónica y de LMC (172,173). En estos casos se produce la proteína de 230 kD (p230) (164).

La presencia del reordenamiento BCR/ABL se asocia a la LAL de precursores B, si bien se ha detectado en aislados casos de LAL-T (165-167,174,175).

Mediante métodos de RT-PCR anidada de gran sensibilidad se ha detectado ARNm de BCR/ABL de tipo p210 en la sangre periférica de un 30% de la población normal (11,176) y el tipo p190 en un 69% (176). Este fenómeno puede ser explicado sin que signifique la presencia de una leucemia incipiente, porque el gen de fusión se origine en una célula diferenciada incapaz de dar lugar a una leucemia y/o por la necesidad de más de una alteración para originar el proceso neoplásico, al menos en la LMC existen datos que van a favor de esta posibilidad (177), así como por la acción del sistema inmune de los individuos normales sobre estas células.

—Función del proto-oncogén c-Abl:

El proto-oncogén c-Abl se localiza en el cromosoma 9. Este gen codifica una proteína que forma parte de las

quinasas de tirosina no recetoras, que son enzimas que fosforilan substratos en residuos de tirosina, pero que no tienen función de receptor en la membrana celular. Esta proteína se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma en células de diversos tejidos (178).

La porción del extremo amino de c-Abl es similar al proto-oncogén c-Src que es la versión celular del oncogén v-Src del virus del sarcoma de Rous, al igual que c-Abl es la forma celular del oncogén v-Abl del virus de la leucemia murina de Abelson que causa leucemia B en ratones (4). Los proto-oncogenes c-Abl y c-Src poseen dominios similares denominados SH3 y SH2 (*Src homology region 3 y 2*) (Figura 14). Estos dominios son sitios de interacción con proteínas. En el caso de SH3 son proteínas que contienen secuencias específicas ricas en prolina, pertenecen a este grupo moléculas como Sos que convierte proteínas G (como Ras, Rho, Rac) de su forma inactiva unida a GDP a su forma activa unida a GTP. La región SH2 interacciona con proteínas con fosfotirosina como Shc, Crkl, Nck, Bp-1 y Grb2 que tienen dominios SH3 y SH2 y actúan como adaptadores que permiten la formación de complejos que ponen en contacto enzimas con substratos específicos.

En el extremo carboxilo c-Abl tiene un dominio de interacción con F-actina, por lo que interviene en la fisiología del citoesqueleto. Además, en este extremo tiene una secuencia que permite la localización nuclear y un dominio de unión al ADN (Figura 14). Posiblemente la función nuclear de c-Abl se relaciona con la regulación del ciclo celular (179).

—Estructura de BCR normal y patológico:

El gen BCR se localiza en el cromosoma 22. La proteína BCR posee en el extremo amino un dominio de dimerización, un lugar de unión de Grb2 y un dominio rico en fosfo-serina/treonina de unión a SH2, los cuales pasan a formar parte de la proteína quimérica p190 y son esenciales y suficientes para la activación de la quinasa de tirosina de Abl (Figura 14). A continuación, hacia el extremo amino, posee un dominio con homología con el proto-oncogén Dbl que codifica un factor intercambiador de GDP-GTP para el polipéptido semejante a Ras CDC42Hs. Este último dominio está incluido, junto con los anteriores, en la proteína p210 (Figura 14). Finalmente, en el extremo amino BCR presenta un dominio responsable de su función de proteína activadora de GTPasa (GAP) para p21^{rac}. Dos tercios de este dominio están presentes en la proteína p230 (Figura 14) (164,178).

—Acción de los genes de fusión BCR/ABL:

Todas las variantes oncogénicas de Abl presentan un elevado incremento de la actividad quinasa de tirosina en comparación con el gen Abl normal (178). La activación constitutiva de esta quinasa induce la fosforilación en tirosina de diversos substratos, incluyendo la autofosforilación de BCR/ABL, y la formación de complejos con proteínas adaptadoras. Esto da lugar a la activación de múltiples vías de transmisión de señales que incluyen la vía de Ras (178,180) y de fosfatidil inositol 3'-quinasa (PI3-K) (178,181,182). BCR/ABL también activa la vía de c-Myc y las proteínas STATs (*signal*

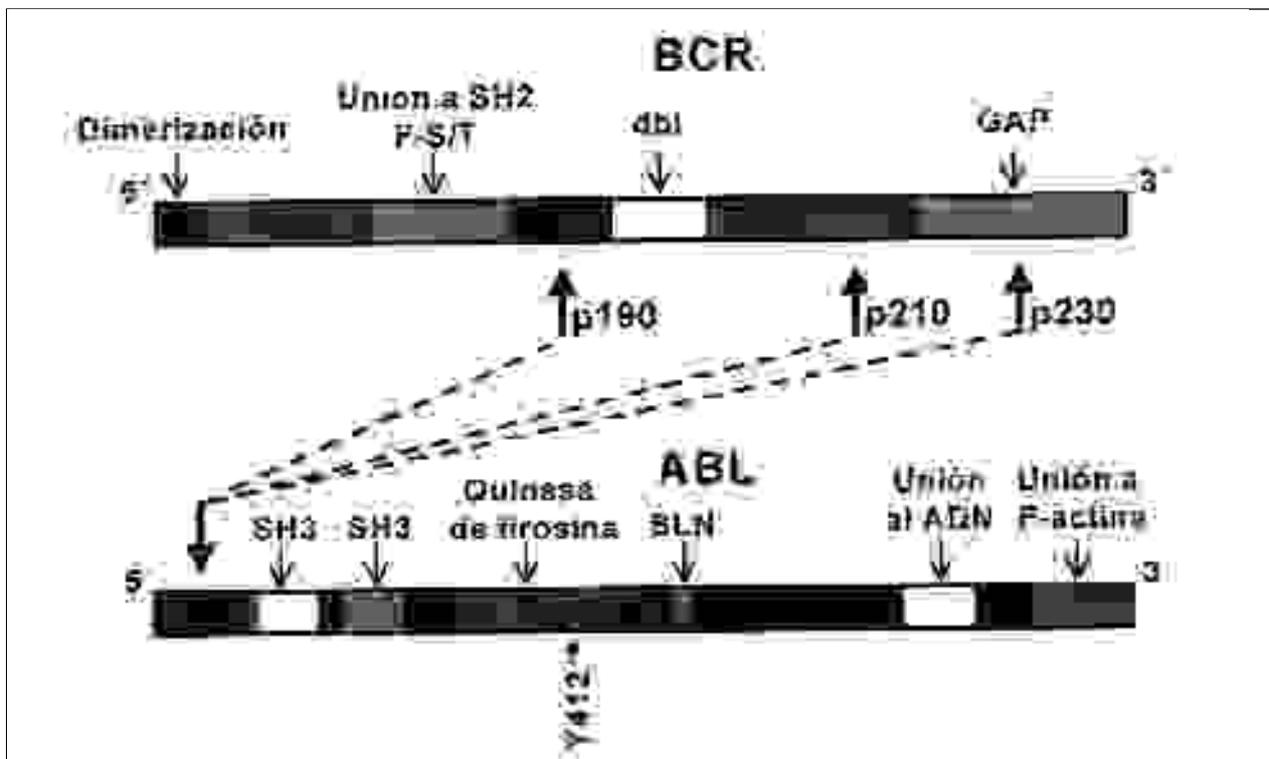


Fig. 14. Esquema de las proteínas BCR y Abl en el que se indican sus dominios funcionales. Abreviaturas: F-S/T, dominio rico en fosfo serina/treonina de unión a SH2; dbl, dominio homólogo al proto-oncogén Dbl; GAP, dominio activador de GTPasa; SLN, señal de localización nuclear. Y412 es el principal sitio de autofosforilación del dominio quinasa de tirosina de Abl. Se indican los puntos de fusión de ambas proteínas que dan lugar a las proteínas quiméricas BCR/ABL p190, p210 y p230, respectivamente.

transducers and activators of transcription). Estas actividades determinan proliferación celular (Figura 15). Además, BCR/ABL podría actuar como un gen antiapoptótico, inhibidor de la muerte celular programada (183), a través de la inducción de la expresión del gen Bcl-2 (204). BCR/ABL también altera las propiedades de adhesión celular, posiblemente por la interacción con proteínas de adhesión focal y con actina (178) (Figura 15). BCR/ABL se localiza sólo en el citoplasma, por lo que otro posible mecanismo que de lugar a su acción oncogénica puede ser la pérdida de la función nuclear normal de AbI como gen supresor de tumor (179).

—Importancia clínica de BCR/ABL: Pronóstico y enfermedad mínima residual:

La presencia del transcrito híbrido BCR/ABL en los pacientes diagnosticados de LAL se considera de muy mal pronóstico. Tras el tratamiento de inducción el porcentaje de pacientes que alcanzan la RC es similar entre los BCR/ABL positivos y negativos, pero en los primeros la duración de la remisión, y por lo tanto la supervivencia, es significativamente más corta (184).

Respecto al estudio de EMR, todavía no se conoce con

exactitud si la persistencia del ARNm de BCR/ABL durante y tras el tratamiento conlleva siempre la recaída hematológica. Se han realizado estudios en los cuales todos los pacientes que en RC hematológica mantuvieron la positividad molecular y aquellos en los que reapareció el ARNm de BCR/ABL recayeron en breve plazo (185-188). Sin embargo, también se han descrito pacientes en RC prolongada persistentemente BCR/ABL positivos (189).

GENES SUPRESORES DE TUMOR O ANTI-ONCOGENES

EL CICLO CELULAR

El ciclo celular en los organismos eucariotas se puede dividir en cuatro fases (4):

1. Fase intermedia G1: En ella se determina si la célula va a entrar en el ciclo de división. La orden para proliferar se produce al pasar el denominado punto de restricción (R), después del cual la entrada en el ciclo es irreversible. Las células que no entran en el ciclo de división pasan a ser quiescentes o en fase G0.

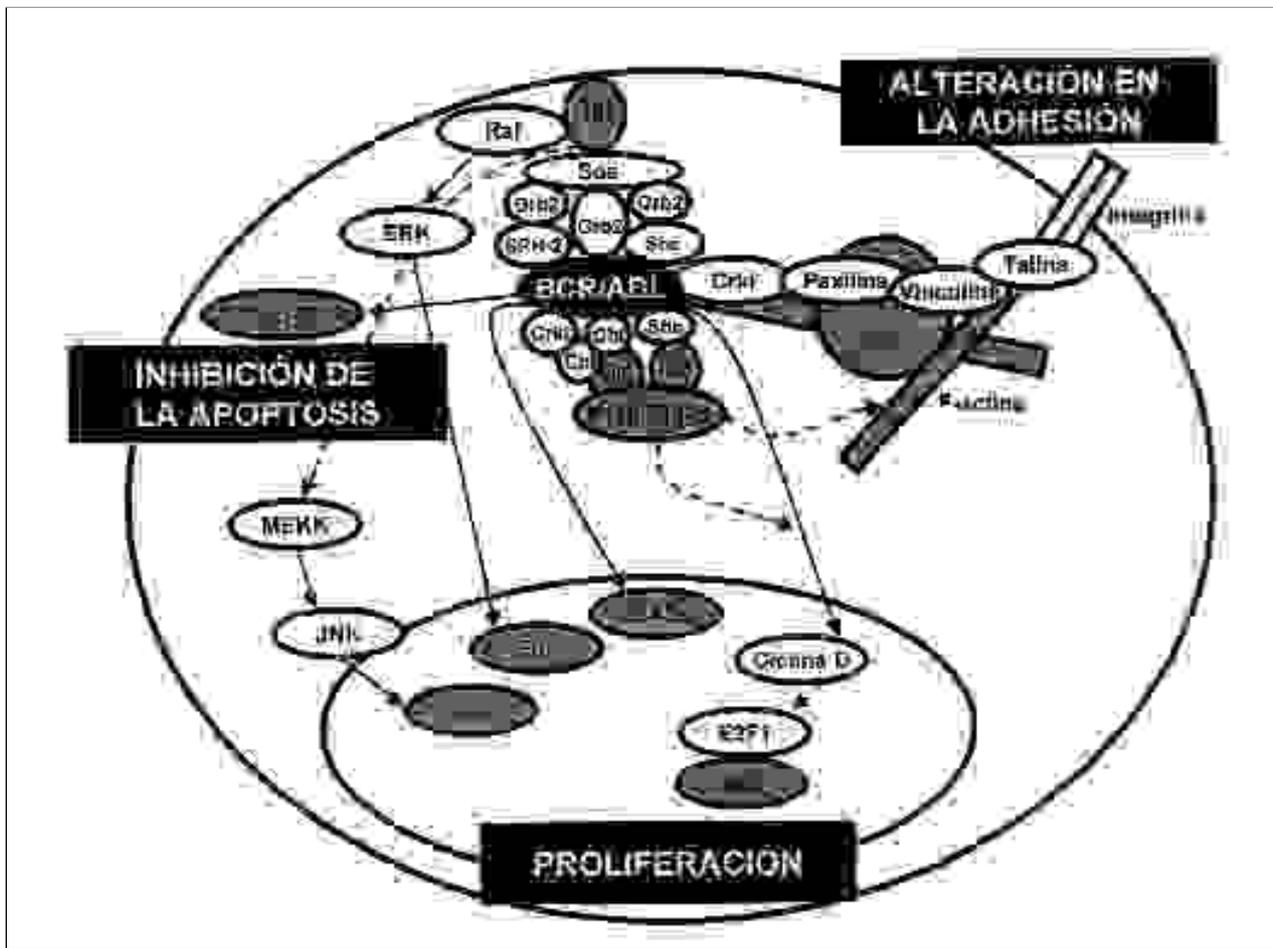


Fig. 15. Representación de las principales señales intracelulares asociadas a BCR/ABL que incluyen la activación de las vías de Ras, fosfatidil inositol 3'quinasa (PI3K) y Myc. Las líneas discontinuas señalan las vías hipotéticas. Además BCR/ABL inhibe la apoptosis y altera la adhesión celular. Abreviaturas: ERK, "quinasa regulada por señales extracelulares"; MEKK, quinasa de MEK; JNK, quinasa N-terminal de Jun; Sos, proteína Son-of-sevenless, STATs, "transductores de señales y activadores de la transcripción"; FAK, "quinasa de adhesión focal". Modificado de Gotoh et al (204).

2. Fase de síntesis (S): En la cual se lleva a cabo la síntesis del ADN.

3. Fase intermedia G2: Las células se preparan para la entrada en mitosis.

4. Fase de mitosis (M): Los cromosomas se distribuyen entre las células hijas.

Este ciclo está regulado por quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La activación secuencial de CDKs y la subsiguiente fosforilación de sus sustratos estimula la progresión del ciclo celular. Los complejos formados por la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y las ciclinas de tipo D controlan el paso de la fase G1 a la fase S fosforilando la proteína del retinoblastoma (p105Rb). La proteína del retinoblastoma secuestra factores de transcripción que son necesarios para la transición de la fase G1 a la S, pero su fosforilación por las CDKs inhibe este efecto, dando lugar a la progresión hacia la fase S del ciclo celular (190).

p16/p19/p15

El gen p16, también conocido como CDKN2, MTS1, INK4A o CDK41, se encuentra localizado en el cromosoma 9p21. Este gen codifica una proteína de 16 kD inhibidora de la CDK4 y CDK6, lo cual bloquea la fosforilación de la proteína del retinoblastoma y detiene el ciclo celular y la proliferación (191). El locus del gen p16, mediante un primer exón alternativo y un marco de lectura diferente, codifica, además, la proteína p19^{ARF} (192-194). Junto al gen p16 se localiza un gen denominado p15, MTS2 o INK4B con el que comparte un elevado grado de homología (90% en el exón 2) (Figura 16). La proteína que codifica el gen p15 (de 15 kD) también inhibe CDK4 y CDK6.

Los dos alelos del gen p16 se encuentran deletionados frecuentemente en líneas celulares de cáncer humano. En las líneas celulares de LA, la delección homocigota

de este gen puede aparecer en el 38% (195). También se ha encontrado delección homocigota de p16 en la gran mayoría de los casos de LAL con anomalías de 9p21 (196), si bien frecuentemente los casos de LA con delección homocigota de p16 y/o p15 carecen de alteraciones visibles de 9p21 (195-198).

La delección homocigota de p16 se detecta en aproximadamente el 25% de los casos de LAL (195,198,199), en la mayoría de los casos va acompañada de delección de p15. No obstante, existen algunos casos en los que sólo existe delección de p16 y otros más infrecuentes con delección de p15 exclusivamente (197, 198, 200-202). En la LAL de precursores B la delección homocigota de p16 oscila entre el 8 y el 20% de los casos (52,198, 203-209) y la de p15 entre el 3 y el 6%. En la LAL de línea T la delección homocigota de p16 aparece en el 20-80% de los pacientes (52, 200, 203-206, 208) y la de p15 del 15 al 67% (203, 205, 208). En las crisis blásticas linfoblásticas de LMC se ha detectado la delección homocigota de p16 en el 50% de los casos. Sin embargo, en las LAMs las delecciones homocigotas de p16 y p15 se han observado en escasos pacientes (hasta un 2-7% (197,198), aunque en algunas series no se ha detectado en ningún paciente) (204,206). Se ha descrito la delección homocigota de p16 en algunos casos de LAM asociada a reordenamiento de MLL (210).

A diferencia de lo que ocurre en otros genes supresores de tumor, las mutaciones puntuales, pequeñas delecciones e inserciones, de p16 y p15, en las LAs son muy infrecuentes (196,199-201, 204-206, 210)

Se ha descrito un caso en el que el gen p16 quedó inactivado por la translocación t(9;14)(p21-22;q11) (211), pero la detección de reordenamientos de p16 y/o p15 es infrecuente (212).

La metilación de islas CpG (agrupaciones de citosinas y guaninas) en la región 5' del gen p16 y del gen p15 produce su inactivación. A diferencia de la delección, la hipermetilación es selectiva y suele estar limita-

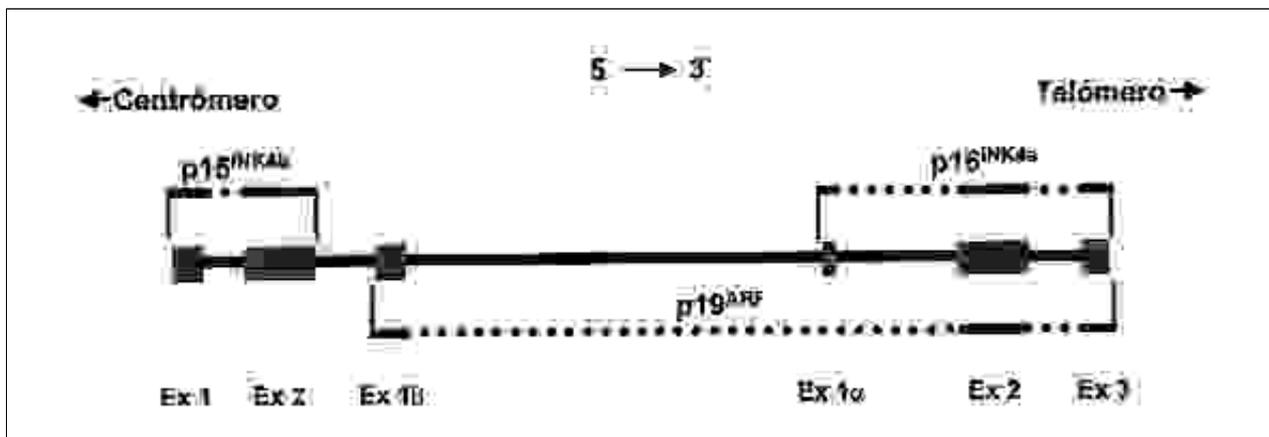


Fig. 16. Mapa de la zona de la banda cromosómica 9p21 que contiene el locus INK4a y el gen INK4b (p15). Los rectángulos sim-bolizan los exones (Ex), los segmentos sobre estos indican que se transcriben en el ARNm que codifica la proteína cuyo nombre figura sobre ellos, las líneas de puntos entre los segmentos indican zonas de ADN no transcritas. El locus INK4a codifica tanto la proteína p16^{INK4a}, como la proteína p19^{ARF}. Los ARNms de cada una de estas proteínas tienen un primer exón específico. El transcrito que contiene la secuencia del exón 1α codifica p16^{INK4a}. En cambio, el ARNm que codifica p19^{ARF} contiene el exón 1β y carece del exón 1α, pasando al exón 2, que es común a ambos transcritos, con un marco de lectura diferente al anterior ARNm. El gen INK4b (p15) se localiza físicamente muy próximo al locus INK4a con el que comparte una elevada homología entre los exones 2 de ambos.

da al gen p16 o al p15. Se ha detectado la metilación del gen de p15 en el 88% de las LAMs de los adultos y en el 67% de las de los niños, así como en el 48% de las LAL de precursores B (202) y en el 38% de las LAL de línea T (212). Sin embargo, la hipermetilación de p16 es infrecuente en las LAs (202,212).

Estos hechos, junto con el desarrollo de tumores espontáneos a temprana edad en ratones con delección de p16/p19 (213), han apoyado la idea de que p16 y p15 son genes supresores de tumor. En concreto, estos antioncogenes forman parte de aquellos que se buscaban en el locus 9p21-22, que, como se ha citado, es una región frecuentemente delecionada en LALs y en otros tumores. No obstante, hasta en un 29% de los casos en los que se detecta pérdida de heterocigosidad (LOH o *loss of heterozygosity*) del 9p, los genes de p16 y p15 están sin delecionarse y sin mutaciones puntuales, por lo que no se puede excluir la existencia de otro antioncogén en esta región (201, 214).

La influencia de la delección-inactivación de p16 o p15 en el pronóstico de los pacientes con LA es discutida. Algunos estudios han mostrado una peor evolución de los pacientes con delección homocigota de p16 que la de los casos sin delección homocigota de este gen (201, 206, 209). Sin embargo, en otros trabajos no se ha observado esta diferencia en la evolución de los pacientes con delección homocigota de p16 (52, 205).

Recientemente se ha demostrado que la delección de p16 y la hipermetilación del promotor del gen p15 aparecen en algunos pacientes únicamente en la recaída, indicando que la pérdida de la función de las proteínas codificadas por estos genes puede relacionarse con la progresión de la enfermedad en determinados casos de LA (215).

p53

Las mutaciones del gen de p53 son infrecuentes en las leucemias agudas humanas. Entre los pacientes pediátricos con LAL se han detectado en un 2% (216) y entre los casos de LAM en un 5-10% (6). Estos datos indican que las mutaciones de este gen juegan un papel menos importante en la oncogénesis de las leucemias agudas que en la de los tumores sólidos y los linfomas.

TABLA I

CORRESPONDENCIA ENTRE LAS ALTERACIONES CITOGENÉTICAS Y MOLECULARES MÁS FRECUENTES	
<i>Alteraciones citogenéticas</i>	<i>Alteraciones moleculares</i>
t(4;11)(q21;q23)	MLL/AF4
t(9;11)(p22;q23)	MLL/AF9
t(9;11)(p27;q23)	MLL/AF6
t(11;19)(p23;p13,3)	MLL/ENL
t(11;19)(p23;p13,1)	MLL/ELL
+11	Duplicación de ML
t(1;19)(p23;p13)	E2A/PBX1
t(12;21)(p23;q22)	TEL/AML1
t(8;21)(p22;q22)	AML1/ETO
inv(16)(p13;q22),t(16;16)(p13;q22), del(16)(q22)	CBFB/MYH11
t(15;17)(q22;q21)	PML/RAR
t(9;22)(q34;q11)	BCR/ABL
del(9)(p21)	Delección p16 y/o p15

BIBLIOGRAFÍA

- Bain BJ. Leukaemia diagnosis. A guide to the FAB classification. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1990.
- Besses C, Woessner S, Sans-Sabrafen J. Introducción al estudio de las leucemias agudas. Clínica y clasificación. Descripción de las distintas variedades. Formas especiales. Blastosis medular asintomática. En: Sans-Sabrafen J, Besses C, Castillo R, Florensa L, Pardo P, Vives JL, Woessner S. Hematología clínica. 3ª ed. Barcelona: Mosby/Doyma Libros, 1994; 303-319.
- Scheinberg DA, Golde DW. Las leucemias. En: Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL, editores. Harrison. Principios de Medicina Interna. 13ª ed. Madrid: Interamericana-McGraw-Hill, 1994; 2030-2042.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart WM. Introducción al análisis genético. 5ª ed. Madrid: McGraw-Hill-Interamericana, 1997.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. Science 1991; 254: 1138-1145.
- Mauvieux L, Delabesse E, Macintyre E. Molecular genetics of acute leukemias. Rev Clin Exp Hematol 1997; 2: 3-26.
- Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: Methodologic advances and clinical significance. Blood 1995; 85: 1416-1434.
- González FA, Villegas A, Ferro MT, San Román C, Sáez I, López M, del Potro E, Álvarez A, Martínez R, Díaz-Mediavilla J, Espinós D. Utilidad del reordenamiento bcr/abl en el diagnóstico y la evolución de la leucemia mieloide crónica. Med Clin (Barc) 1993; 101: 521-524.
- Hunger SP, Cleary ML. What significance should we attribute to detection of MLL fusion transcripts?. Blood 1998; 92: 709-711.
- Anguita E, Villegas A, Díaz-Mediavilla J, González FA, del Potro E, Espinós D. Detection of bcr/abl mRNA in a case of chronic myelogenous leukemia in long-term remission: CML or sensitivity of detection. Haematologica 1998; 83: 744-747.
- Biernaux C, Loos M, Sels A, Huez G, Stryckmans P. Detection of major bcr/abl gene expression at very low level in blood cells of some healthy individuals. Blood 1995; 86: 3118-3122.
- Look T. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. Science 1997; 278: 1059-1064.
- Morata G. Homeotic genes in Drosophila. Curr Opin Genet Dev 1993; 3: 606-614.
- Krumlauf R. Hox genes in vertebrate development. Cell 1994; 8: 191-201.
- Bernard OA, Berger R. Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations. Genes Chromosom Cancer 1995; 13: 75-85.
- Gu Y, Nakamura T, Alder H, Prasad R, Canaani O, Cimino G, Croce CM, Canaani E. The t(4;11) chromosome translocation of human acute leukemias fuses the ALL-1 gene, related to Drosophila trithorax to the AF-4 gene. Cell 1992; 71: 701-708.
- Tkachuk DC, Kohler S, Cleary ML. Involvement of a homolog of Drosophila trithorax by 11q23 chromosomal translocations in acute leukemias. Cell 1992; 71: 691-700.
- Cimino G, Rapanotti MC, Sprovieri T, Elia L. ALL1 gene alterations in acute leukemia: biological and clinical aspects. Haematologica 1998; 83: 350-357.

19. Raimondi SC, Frestedt JL, Pui CH, Downing JR, Head DR, Kersey JH, Behm FG. Acute lymphoblastic leukemias with deletion of 11q23 or novel inversion (11)(p13q23) lack MLL gene rearrangement and have favorable clinical features. *Blood* 1995; 86: 1881-1886.
20. Rasio D, Schichman SA, Negrini M, Canaani E, Croce CM. Complete exon structure of the ALL1 gene. *Cancer Res* 1996; 56: 1766-1769.
21. Nilson I, Löchner k, Siegler G, Greil J, Beck JD, Fey GH, Marschalek R. Exon/intron structure of the human ALL-1 (MLL) gene involved in translocations to chromosomal region 11q23 and acute leukaemias. *Br J Haematol* 1996; 93: 966-972.
22. Strissel Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, Zeleznik-Le N, Rowley JD. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute myeloid leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment region and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 1996; 87:1912-1922.
23. Reeves R, Nissen MS. The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure. *J Biol Chem* 1990; 265: 8573-8582.
24. Thirman MJ, Gill HJ, Burnett RC, Mbangkollo D, McCabe NR, Kobayashi H, Ziemins-van der Poel S, Kaneko Y, Morgan R, Sandberg AA, Chaganti RSK, Larson RA, Le Beau MM, Diaz MO, Rowley JD. Rearrangement of the MLL gene in acute lymphoblastic and acute myeloid leukemias with 11q23 chromosomal translocations. *N Engl J Med* 1993; 329: 909-914.
25. Harrison CJ, Cuneo A, Clark R, Johansson B, Lafage-Pochitaloff M, Mugneret F, Moorman AV, Secker-Walker LM. Ten novel 11q23 chromosomal partner sites. *Leukemia* 1998; 12: 811-822.
26. Johansson B, Moorman AV, Secker-Walker LM. Derivative chromosomes of 11q23-translocations in hematologic malignancies. *Leukemia* 1998; 12: 828-833.
27. Chen CS, Sorensen PHB, Domer PH, Reaman GH, Korsmeyer SJ, Heerema NA, Hammond GD, Kersey JH. Molecular rearrangements on chromosome 11q23 predominate in infant acute lymphoblastic leukemia and are associated with specific biologic variables and poor outcome. *Blood* 1993; 81: 2386-2393.
28. Hilden JM, Frestedt JL, Moore RO, Heerema NA, Arthur DC, Reaman GH, Kersey JH. Molecular analysis of infant acute lymphoblastic leukemia: MLL gene rearrangement and reverse transcriptase-polymerase chain reaction for t(4;11)(q21;q23). *Blood* 1995; 86: 3876-3882.
29. Kwong YL, Liang R, Chan V, Chan TK. Molecular rearrangement of the MLL gene in adult acute myeloid leukemia without cytogenetic evidence of 11q23 aberration. *Cancer Genet Cytogenet* 1996; 86: 13-17.
30. Poirel H, Rack K, Delabesse E, Radford-Weiss I, Troussard X, Debert C, Leboeuf D, Bastard C, Picard F, Veil-Buzyn A, Flandrin G, Bernard O, Macintyre E. Incidence and characterization of MLL gene (11q23) rearrangements in acute myeloid leukemia M1 and M5. *Blood* 1996; 87: 2496-2505.
31. Anguita E, González FA, López J, Contra T, Villegas A. The importance of molecular screening of 11q23 abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukemia. Has the t(11;19)(q23;p13) a higher prevalence than that revealed by conventional cytogenetic techniques?. *Med Ped Oncol* 1998; 30: 313-314.
32. Uckun FM, Herman-Hatten K, Crotty ML, Senses MG, Sather HN, Tuel-Ahlgren L, Sarquis MB, Bostrom B, Nachman JB, Steinherz PG, Gaynon PS, Heerema N. Clinical significance of MLL-AF4 fusion transcript expression in the absence of a cytogenetically detectable t(4;11)(q21;q23) chromosomal translocation. *Blood* 1998; 92: 810-821.
33. Martineau M, Berger R, Lillington DM, Moorman AV, Secker-Walker LM. The t(6;11)(q27;q23) translocation in acute leukemia: a laboratory and clinical study of 30 cases. *Leukemia* 1998; 12: 788-791.
34. Schichman SA, Canaani E, Croce CM. Self-fusion of the ALL1 gene. *JAMA* 1995; 273: 571-576.
35. Cimino G, Lo Coco F, Biondi A, Elia L, Luciano A, Croce CM, Masera G, Mandelli F, Canaani E. ALL-1 gene at chromosome 11q23 is consistently altered in acute leukemia of early infancy. *Blood* 1993; 82: 544-546.
36. Rubnitz JE, Link MP, Shuster JJ, Carroll AJ, Hakami N, Frankel LS, Pullen DJ, Cleary ML. Frequency and prognostic significance of HTRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1994; 84: 570-573.
37. Martínez-Climent JA. Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia* 1997; 11: 1999-2021.
38. Faderl S, Kantarjian HM, Talpaz M, Estrov Z. Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 91: 3995-4019.
39. Bower M, Parry P, Carter M, Lillington DM, Amess J, Lister TA, Evans G, Young BD. Prevalence and clinical correlations of MLL gene rearrangements in AML-M4/5. *Blood* 1994; 84: 3776-3780.
40. Cimino G, Rapanotti MC, Elia L, Biondi A, Fizzotti M, Testi AM, Tosti S, Croce CM, Canaani E, Mandelli F, Lo Coco F. ALL1 gene rearrangements in acute myeloid leukemia: association with M4-M5. French-American-British Classification subtypes and young age. *Cancer Res* 1995; 55: 1625-1628.
41. Winick NJ, McKenna RW, Shuster JJ, Schneider NR, Borowitz MJ, Bowman WP, Jacaruso D, Kamen BA, Buchanan GR. Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* 1993; 11: 209-217.
42. Super HJG, McCabe NR, Thirman MJ, Larson RA, Le Beau MM, Pedersen-Bjergaard J, Philip P, Díaz MO, Rowley JD. Rearrangements of the MLL gene in therapy-related acute myeloid leukemia in patients previously treated with agents targeting DNA-topoisomerase II. *Blood* 1993; 82: 3705-3711.
43. Ohshima A, Miura I, Chubachi A, Hashimoto K, Nimura T, Utsumi S, Takahashi N, Hayashi Y, Seto M, Ueda R, Miura AB. 11q23 aberration is an additional chromosomal change in de novo leukemia after treatment with etoposide and mitoxantrone. *Am J Hematol* 1996; 53: 264-266.
44. Felix CA, Hosler MR, Winick NJ, Masterson M, Wilson AE, Lange BJ. ALL-1 rearrangements in DNA topoisomerase II inhibitor-related leukemia in children. *Blood* 1995; 85: 3250-3256.
45. Strissel Broeker PL, Super HG, Thirman MJ, Pomykala H, Yonebayashi Y, Tanabe S, Zeleznik-Le N, Rowley JD. Distribution of 11q23 breakpoints within the MLL breakpoint cluster region in de novo acute leukemia and in treatment-related acute myeloid leukemia: correlation with scaffold attachment regions and topoisomerase II consensus binding sites. *Blood* 1996; 87: 1912-1922.
46. Greaves MF. Aetiology of acute leukaemia. *Lancet* 1997; 349: 344-349.
47. Aplan PD, Chervinsky DS, Stanulla M, Burhans WC. Site-specific DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region induced by topoisomerase II inhibitors. *Blood* 1996; 87: 2649-2658.
48. Macintyre E, Bourquelot P, Leboeuf D. MLL cleavage occurs in approximately 5% of de novo acute myeloid leukemia, including in patients analyzed before treatment induction. *Blood* 1997; 89: 2224-2226.
49. Stanulla M, Wang J, Chervinsky DS, Thandla S, Aplan PD. DNA cleavage within the MLL breakpoint cluster region is a specific event which occurs as part of higher-order chromatin fragmentation during the initial stages of apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17: 4070-4079.
50. Stanulla M, Schünemann HJ, Thandla S, Brecher ML, Aplan PD. Pseudo-rearrangement of the MLL gene at chromosome 11q23: a cautionary note on genotype analysis of leukaemia patients. *Mol Pathol* 1998; 51: 85-89.
51. Pui CH, Behm FG, Downing JR, Hancock ML, Shurleff SA, Ribeiro RC, Head DR, Mahmoud HH, Sandlund JT, Furman WL, Roberts WM, Crist WM, Raimondi SC. 11q23/MLL rearrangement confers a poor prognosis in infants with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 1994; 12: 909-915.
52. Rubnitz JE, Behm FG, Pui CH, Evans WE, Relling MV, Raimondi SC, Harrison PL, Sandlund JT, Ribeiro RC, Grosveld G,

- Downing JR. Genetic studies of childhood acute lymphoblastic leukemia with emphasis on p16, MLL, and ETV6 gene abnormalities: results of St Jude Total Therapy Study XII. *Leukemia* 1997; 11: 1201-1206.
53. Behm FG, Raimondi SC, Frestedt JL, Liu Q, Crist WM, Downing JR, Rivera GK, Kersey JH, Pui CH. Rearrangement of the MLL gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood* 1996; 87: 2870-2877.
 54. Archimbaud E, Charrin C, Magaud JP, Campos L, Thomas X, Fièrè D, Rimokh R. Clinical and biological characteristics of adult de novo and secondary acute myeloid leukemia with balanced 11q23 chromosomal anomaly or MLL gene rearrangement compared to cases with unbalanced 11q23 anomaly: confirmation of the existence of different entities with 11q23 breakpoint. *Leukemia* 1998; 12: 25-33.
 55. Nilson I, Reichel M, Ennas MG, Greim R, Knörr C, Siegler G, Greil J, Fey GH, Marschalek R. Exon/intron structure of the human AF-4 gene, a member of the AF-4/LAF-4/FMR-2 gene family coding for a nuclear protein with structural alterations in acute leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 98: 157-169.
 56. Downing JR, Head DR, Raimondi SC, Carroll AJ, Curcio-Brint AM, Motroni TA, Hulshof MG, Pullen DJ, Domer PH. The der(11)-encoded MLL/AF4 fusion transcript is consistently detected in t(4;11)(q21;q23)-containing acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1994; 83: 330-335.
 57. Cimino G, Elia L, Rivolta A, Rapanotti MC, Rossi V, Alimena G, Annino L, Canaani E, Lo Coco F, Biondi A. Clinical relevance of residual disease monitoring by polymerase chain reaction in patients with ALL-1/AF-4 positive-acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 92: 659-664.
 58. Prasad R, Gu Y, Alder H, Nakamura T, Canaani O, Saito H, Huebner K, Gale RP, Nowell PC, Kuriyam K, Miyazaki Y, Croce CM, Canaani E. Cloning of the ALL-1 fusion partner, the AF-6 gene, involved in acute myeloid leukemias with the t(6;11) chromosome translocation. *Cancer Res* 1993; 53: 5624-5628.
 59. Kuriyama M, Harada N, Kuroda S, Yamamoto T, Nakafuku M, Iwamatsu A, Yamamoto D, Prasad R, Croce C, Canaani E, Kaibuchi K. Identification of AF-6 and Canoe as putative targets for Ras. *J Biol Chem* 1996; 271: 607-610.
 60. Yamamoto K, Seto M, Iida S, Komatsu H, Kamada N, Kojima S, Kodaera Y, Nakazawa S, Saito H, Takahashi T, Ueda R. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction detects heterogeneous chimeric mRNAs in leukemias with 11q23 abnormalities. *Blood* 1994; 83: 2912-2921.
 61. Iida S, Seto M, Yamamoto K, Komatsu H, Tojo A, Asano S, Kamada N, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. MLLT3 gene on 9p22 involved in t(9;11) leukemia encodes a serine/proline rich protein homologous to MLLT1 on 19p13. *Oncogene* 1993; 8: 3085-3092.
 62. Mrózek K, Heinonen K, Lawrence D, Carroll AJ, Koduru PRK, Rao KW, Strout MP, Hutchison RE, Moore JO, Mayer RJ, Schiffer CA, Bloomfield C. Adult patients with de novo acute myeloid leukemia and t(9;11)(p22;q23) have a superior outcome to patients with other translocations involving band 11q23: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood* 1997; 90: 4532-4538.
 63. Rubnitz JE, Morrissey J, Savage PA, Cleary ML. ENL, the gene fused with HRX in t(11;19) leukemias, encodes a nuclear protein with transcriptional activation potential in lymphoid and myeloid cells. *Blood* 1994; 84: 1747-1752.
 64. Yamamoto K, Seto M, Komatsu H, Iida S, Akao Y, Kojima S, Kodaera Y, Nakazawa S, Ariyoshi Y, Takahashi T, Ueda R. Two distinct portions of LTG19/ENL at 19p13 are involved in t(11;19) leukemia. *Oncogene* 1993; 8: 2617-2625.
 65. Rubnitz JE, Behm FG, Curcio-Brint AM, Pinheiro VRP, Carroll AJ, Raimondi SC, Shurleff SA, Downing JR. Molecular analysis of t(11;19) breakpoints in childhood acute leukemias. *Blood* 1996; 87: 4804-4808.
 66. Ida K, Taki T, Bessho F, Kobayashi M, Taira F, Hanada R, Yamamoto K, Okimoto Y, Seto M, Ueda R, Hayashi Y. Detection of chimeric mRNAs by reverse transcriptase-polymerase chain reaction for diagnosis and monitoring of acute leukemias with 11q23 abnormalities. *Med Pediatr Oncol* 1997; 28: 325-332.
 67. Thirman MJ, Levitan DA, Kobayashi H, Simon MC, Rowley JD. Cloning of ELL, a gene that fuses to MLL in a t(11;19)(q23;p13.1) in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 12110-12114.
 68. So CW, Caldas C, Liu MM, Chen SJ, Huang QH, Gu LJ, Sham MH, Wiedemann LM, Chan LC. EEN encodes for a member of a new family of proteins containing an Src homology 3 domain and is the third gene located on chromosome 19p13 that fuses to MLL in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 2563-2568.
 69. Caligiuri MA, Strout MP, Schichman SA, Mrózek K, Arthur DC, Herzing GP, Baer MR, Schiffer CA, Heinonen K, Knuutila S, Nousiainen T, Ruutu T, Block AW, Schulman P, Pedersen-Bjergaard J, Croce CM, Bloomfield CD. Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11. *Cancer Res* 1996; 56: 1418-1425.
 70. Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, Knuutila S, Mrózek K, Oberkircher AR, Marcucci G, de la Chapelle A, Elonen E, Block AW, Rao N, Herzing GP, Powell BL, Ruutu T, Schiffer CA, Bloomfield CD. Rearrangement of ALL1 (MLL) in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Cancer Res* 1998; 58: 55-59.
 71. Caligiuri MA, Strout MP, Oberkircher AR, Yu F, de la Chapelle A, Bloomfield CD. The partial tandem duplication of ALL1 in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics or trisomy 11 is restricted to one chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 3899-3902.
 72. Marcucci G, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Detection of unique ALL1 (MLL) fusion transcripts in normal human bone marrow and blood: distinct origin of normal versus leukemia ALL1 fusion transcripts. *Cancer Res* 1998; 58: 790-793.
 73. Schnittger S, Wörmann B, Hiddemann W, Griesinger F. Partial tandem duplications of the MLL gene are detectable in peripheral blood and bone marrow of nearly all healthy donors. *Blood* 1998; 92: 1728-1734.
 74. Hunger SP. Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: Clinical features and molecular pathogenesis. *Blood* 1996; 87: 1211-1224.
 75. Dederá DA, Waller EK, LeBrun DP, Sen-Majumdar A, Stevens ME, Barsh GS, Cleary ML. Chimeric homeobox gene E2A-PBX1 induces proliferation, apoptosis, and malignant lymphomas in transgenic mice. *Cell* 1993; 74: 833-843.
 76. Privitera E, Rivolta A, Ronchetti D, Mosna G, Giudici G, Biondi A. Reverse transcriptase/polymerase chain reaction follow-up and minimal residual disease detection in t(1;19)-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 92: 653-658.
 77. Hunger SP, Galili N, Carroll AJ, Crist WM, Link MP, Cleary ML. The t(1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1991; 77: 687-693.
 78. Borowitz MJ, Hunger SP, Carroll AJ, Shuster JJ, Pullen DJ, Steuber CP, Cleary ML. Predictability of the t(1;19)(q23;p13) from surface antigen phenotype: implications for screening cases of childhood acute lymphoblastic leukemia for molecular analysis: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1993; 82: 1086-1091.
 79. Privitera E, Kamps MP, Hayashi Y, Inaba T, Shapiro LH, Raimondi SC, Behm F, Hendershot L, Carroll AJ, Baltimore D, Look AT. Different molecular consequences of the 1;19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992; 79: 1781-1788.
 80. Troussard X, Rimokh R, Valensi F, Leboeuf D, Fenneteau O, Guitard AM, Manel AM, Schillinger F, Leglise C, Brizard A, Gardais J, Lessard M, Flandrin G, Macyntire E. Heterogeneity of t(1;19)(q23;p13) acute leukaemias. *Br J Haematol* 1995; 89: 516-526.
 81. Anguita E, González FA, Contra T, Martín N, Valverde F, Villegas A. Utilidad de un "screening" molecular en las leucemias linfoblásticas pediátricas. *Sangre* 1998; 43: 7-11.
 82. Hunger SP, Fall MZ, Camitta BM, Carroll AJ, Link MP, Lauer SJ, Mahoney DH, Pullen DJ, Shuster JJ, Steuber CP, Cleary ML. E2A-PBX1 chimeric transcript status at end of consolida-

- tion is not predictive of treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemias with a t(1;19)(q23;p13): a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1998; 91: 1021-1028.
83. Nucifora G, Rowley JD. AML1 and the 8;21 and 3;21 translocations in acute and chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 86: 1-14.
 84. Liu PP, Hajra A, Wijmenga C, Collins FS. Molecular pathogenesis of the chromosome 16 inversion in the M4Eo subtype of acute myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2289-2302.
 85. Golub TR, Barker GF, Bohlander SK, Hiebert SW, Ward DC, Bray-Ward P, Morgan E, Raimondi SC, Rowley JD, Gilliland DG. Fusion of the TEL gene on 12p13 to the AML1 gene on 21q22 in acute lymphoblastic leukemia *Proc Natl Acad USA* 1995; 92: 4917-4921.
 86. Romana SP, Mauchauffé M, Le Coniat M, Chumakov I, Le Paslier D, Berger R, Bernard OA. The t(12;21) of acute lymphoblastic leukemia results in a tel-AML1 gene fusion. *Blood* 1995; 85: 3662-3670.
 87. Lo Coco F, Piseigna S, Diverio D. The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias. *Haematologica* 1997; 82: 364-370.
 88. McLean TW, Ringold S, Neuberg D, Stegmaier K, Tantravahi R, Ritz J, Koeffler HP, Takeuchi S, Janssen JWG, Seriu T, Bartram CR, Sallan SE, Gilliland DG, Golub TR. TEL/AML1 dimerizes and is associated with a favorable outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 88: 4252-4258.
 89. Romana SP, Poirel H, Leconiat M, Flexor MA, Mauchauffé M, Jonveaux P, Macintyre EA, Berger R, Bernard OA. High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 4263-4269.
 90. Cayuela JM, Baruchel A, Orange C, Madani A, Auclerc MF, Daniel MT, Schaison G, Sigaux F. TEL-AML1 fusion RNA as a new target to detect minimal residual disease in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 88: 302-308.
 91. Kobayashi H, Satake N, Maseki N, Sakashita A, Kaneko Y. The der(21)t(12;21) chromosome is always formed in a 12;21 translocation associated with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 94: 105-111.
 92. Chambost H, Michel G, Thuret I, Toiron Y, Brunet C, Capodano AM, Sainty D, Maraninchi D, Gabert J. TEL/AML1 transcript in childhood acute lymphoblastic leukemia: a new candidate for minimal residual disease study rather than a new prognosis factor?. *Br J Haematol* 1996; 93 suppl 2: 55-56.
 93. Borkhardt A, Cazzaniga G, Viehmann S, Valsecchi MG, Ludwig WD, Burci L, Mangioni S, Schrappe M, Riehm H, Lampert F, Basso G, Maserà G, Harbott J, Biondi A. Incidence and clinical relevance of TEL/AML1 fusion genes in children with acute lymphoblastic leukemia enrolled in the German and Italian multicenter therapy trials. *Blood* 1997; 90: 571-577.
 94. Lanza C, Volpe G, Basso G, Gottardi E, Barisone E, Spinelli M, Ricotti E, Cilli V, Perfetto F, Madon E, Saglio G. Outcome and lineage involvement in t(12;21) childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 97: 460-462.
 95. Harbott J, Viehmann S, Borkhardt A, Henze G, Lampert F. Incidence of TEL/AML1 fusion gene analyzed consecutively in children with acute lymphoblastic leukemia in relapse. *Blood* 1997; 90: 4933-4937.
 96. Seeger K, Adams HP, Buchwald D, Beyermann B, Kremens B, Niemeyer C, Ritter J, Schwabe D, Harms D, Schrappe M, Henze G. TEL-AML1 fusion transcript in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 91: 1716-1722.
 97. Aguiar RCT, Sohal J, van Rhee F, Carapeti M, Franklin IM, Goldstone AH, Goldman JM, Cross NCP. TEL-AML1 fusion in acute lymphoblastic leukaemia of adults. *Br J Haematol* 1996; 95: 673-677.
 98. Kwong YL, Wong KF. Low frequency of TEL/AML1 in adult acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 98: 137-138.
 99. Maloney KW, Rubnitz JE, Cleary ML, Frankel LS, Hakami N, Link MP, Pullen DJ, Hunger SP. Lack of ETV6 (TEL) gene rearrangements or p16INK4A/p15INK4B homozygous gene deletions in infant acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 979-983.
 100. Lanza C, Volpe G, Basso G, Gottardi E, Perfetto F, Cilli V, Spinelli M, Ricotti E, Guerrasio A, Madon E, Saglio G. The common TEL/AML1 rearrangement does not represent a frequent event in acute lymphoblastic leukaemia occurring in children with Down syndrome. *Leukemia* 1997; 11: 820-821.
 101. Raynaud S, Cavé H, Baens M, Bastard C, Cacheux V, Grosgeorge J, Guidal-Giroux C, Guo C, Vilmer E, Marynen P, Grandchamp B. The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the other TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 2891-2899.
 102. Baruchel A, Cayuela JM, Ballerini P, Landman-Parker J, Cezard V, Firat H, Haddad E, Auclerc MF, Valensi F, Cayre YE, Macintyre EA, Sigaux F. The majority of myeloid-antigen-positive (My+) childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemias express TEL-AML1 fusion transcripts. *Br J Haematol* 1997; 99: 101-106.
 103. Anguita E, González FA, López J, Villegas A. TEL/AML1 transcript and p16 gene deletion in a patient with childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1997; 99: 240-241.
 104. Shurtleff SA, Buijs A, Behm FG, Rubnitz JE, Raimondi SC, Hancock ML, Chan GC-F, Pui CH, Grosveld G, Downing JR. TEL/AML1 fusion resulting from a cryptic t(12;21) is the most common lesion in pediatric ALL and defines a subgroup of patients with excellent prognosis. *Leukemia* 1995; 9: 1985-1989.
 105. Rubnitz J, Shuster JJ, Land VJ, Link MP, Pullen DJ, Camitta BM, Pui CH, Downing JR, Behm FG. Case-control study suggests a favorable impact of TEL rearrangement in patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia treated with antimetabolite-based therapy: a Pediatric Oncology Group study. *Blood* 1997; 89: 1143-1146.
 106. Rubnitz J, Downing JR, Pui CH, Shurtleff SA, Raimondi SC, Evans WE, Head DR, Crist WM, Rivera GK, Hancock ML, Boyett JM, Buijs A, Grosveld G, Behm FG. TEL gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: a new genetic marker with prognostic significance. *J Clin Oncol* 1997; 15: 1150-1157.
 107. Loh ML, Silverman LB, Young ML, Neuberg D, Golub TR, Sallan SE, Gilliland DG. Incidence of TEL/AML1 fusion in children with relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1998; 92: 4792-4797.
 108. Lanza C, Volpe G, Basso G, Gottardi E, Barisone E, Perfetto F, Madon E, Saglio G. Reappearance of the TEL/AML1 transcript during molecular follow up of t(12;21) ALL is predictive of clinical relapse. *Blood* 1996; 88 suppl 1: 72a.
 109. Satake N, Kobayashi H, Tsunematsu Y, Kawasaki H, Horikoshi Y, Koizumi S, Kaneko Y. Minimal residual disease with TEL-AML1 fusion transcript in childhood acute lymphoblastic leukaemia with t(12;21). *Br J Haematol* 1997; 97: 607-611.
 110. Mitterbauer M, Kusec R, Schwarzwinger I, Haas OA, Lechner K, Jaeger U. Comparison of karyotype analysis and RT-PCR for AML1/ETO in 204 unselected patients with AML. *Ann Hematol* 1998; 76: 139-143.
 111. Kawano S, Miyanishi S, Shimizu K, Tanaka K, Okumura A, Ohki M, Kamada N, Ohno YI. Genetic analysis of 8;21 chromosomal translocation without AML1 gene involvement in MDS-AML. *Br J Haematol* 1997; 99: 632-640.
 112. Langabeer SE, Walker H, Rogers JR, Burnett AK, Wheatley K, Swirsky D, Goldstone AH, Linch DC. Incidence of AML1/ETO fusion transcripts in patients entered into the MRC AML trials. *Br J Haematol* 1997; 99: 925-928.
 113. Guerrasio A, Rosso C, Martinelli G, Lo Coco F, Pampinella M, Santoro A, Lanza C, Allione B, Resegotti L, Saglio G. Polyclonal haemopoieses associated with long-term persistence of the AML1-ETO transcript in patients with FAB M2 acute myeloid leukaemia in continuous clinical remission. *Br J Haematol* 1995; 90: 364-368.
 114. Krauter J, Peter W, Pascheberg U, Heinze B, Bergmann L, Hoelzer D, Lübbert M, Schlimok G, Arnold R, Kirchner H, Port M, Ganser A, Heil G. Detection of karyotypic aberrations in acute myeloblastic leukaemia: a prospective comparison between PCR/FISH and standard cytogenetics in 140 patients with de novo AML. *Br J Haematol* 1998; 103: 72-78.
 115. Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, Takenaka K, Mizuno S, Gondo H, Okamura T, Dohy H, Niho Y. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with

- t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood* 1996; 87: 4789-4796.
116. Jurlander J, Caligiuri MA, Ruutu T, Baer MR, Strout MP, Oberkircher AR, Hoffmann L, Ball ED, Frei-Lahr DA, Christiansen NP, Block AW, Knuttila S, Herzing GP, Bloomfield CD. Persistence of the AML1/ETO fusion transcript in patients treated with allogeneic bone marrow transplantation for t(8;21) leukemia. *Blood* 1996; 88: 2183-2191.
 117. Muto A, Mori S, Matsushita H, Awaya N, Ueno H, Takayama N, Okamoto SI, Kizaki M, Ikeda Y. Serial quantification of minimal residual disease of t(8;21) acute myelogenous leukaemia with RT-competitive PCR assay. *Br J Haematol* 1996; 95: 85-94.
 118. Tobal K, Yin JAL. Monitoring of minimal residual disease by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for AML1-MTG8 transcripts in AML-M2 with t(8;21). *Blood* 1996; 88: 3704-3709.
 119. Marcucci G, Livak KJ, Bi W, Strout MP, Bloomfield CD, Caligiuri MA. Detection of minimal residual disease in patients with AML1/ETO-associated acute myeloid leukemia using a novel quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay. *Leukemia* 1998; 12: 1482-1489.
 120. Novak M, Laczika K, Mitterbauer M, Purtscher B, Schneider-Petrovic A, Lechner K, Jaeger U, Haas OA. Novel CBF -MYH11 fusion transcripts and alternative splicing in acute myeloid leukemia with inversion of chromosome 16. *Blood* 1995; 86: 2449-2453.
 121. Costello R, Sainty D, Lecine P, Cusenier A, Mozziconacci MJ, Arnoulet C, Maraninchi D, Gastaut JA, Imbert J, Lafage-Pochitaloff M, Gabert J. Detection of CBF /MYH11 fusion transcripts in acute myeloid leukemia: heterogeneity of cytological and molecular characteristics. *Leukemia* 1997; 11: 644-650.
 122. Poirel H, Radford-Weiss I, Rack K, Troussard X, Veil A, Valensi F, Picard F, Guesnu M, Leboeuf D, Melle J, Dreyfus F, Flandrin G, Macintyre E. Detection of the chromosome 16 CBF -MYH11 fusion transcript in myelomonocytic leukemias. *Blood* 1995; 85: 1313-1322.
 123. Langabeer SE, Walker H, Gale RE, Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Linch DC. Frequency of CBF /MYH11 fusion transcripts in patients entered into the UK MCR AML trials. *Br J Haematol* 1997; 96: 736-739.
 124. Ritter M, Thiede C, Schäkel U, Schmidt M, Alpen B, Pascheberg U, Mohr B, Ehninger G, Neubauer A. Underestimation of inversion (16) in acute myeloid leukaemia using standard cytogenetics as compared with polymerase chain reaction: results of a prospective investigation. *Br J Haematol* 1997; 98: 969-972.
 125. Grignani F, Fagioli M, Alcalay M, Longo L, Pandolfi PP, Donati E, Biondi A, Lo Coco F, Grignani F, Pelicci PG. Acute promyelocytic leukemia: from genetics to treatment. *Blood* 1994; 83: 10-25.
 126. Eclache V, Benzacken B, Le Roux G, Casassus P, Chomienne C. PML/RAR rearrangement in acute promyelocytic leukaemia with t(1;17) elucidated using fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 1997; 98: 440-443.
 127. Diverio D, Lo Coco F. Molecular genetics of acute promyelocytic leukemia. *Rev Clin Exp Hematol* 1997; 2: 45-58.
 128. Licht JD, Chomienne C, Goy A, Chen A, Scott AA, Head DR, Michaux JL, Wu Y, DeBasio A, Miller WH, Zelenetz AD, Willman CL, Chen Z, Chen SJ, Zelent A, Macintyre E, Veil A, Cortes J, Kantarjian H, Waxman S. Clinical and molecular characterization of a rare syndrome of acute promyelocytic leukemia associated with translocation (11;17). *Blood* 1995; 85: 1083-1094.
 129. Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. The t(5;17) variant of acute promyelocytic leukemia expresses a nucleophosmin-retinoic acid receptor fusion. *Blood* 1996; 87: 882-886.
 130. Lo Coco F, Nervi C, Avvisati G, Mandelli F. Acute promyelocytic leukemia: a curable disease. *Leukemia* 1998; 12: 1866-1880.
 131. Di Bona E, Montaldi A, Guercini N, Rossi V, Luciano A, Biondi A, Rodeghiero F. A (15;17) translocation not associated with acute promyelocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1996; 95: 706-709.
 132. Grimwade D, Howe K, Langabeer S, Davies L, Oliver F, Walker H, Swirsky D, Wheatley K, Goldstone A, Burnett A, Solomon E. Establishing the presence of the t(15;17) in suspected acute promyelocytic leukaemia: cytogenetic, molecular and PML immunofluorescence assessment of patients entered into the M.R.C. ATRA trial. *Br J Haematol* 1996; 94: 557-573.
 133. O'Connor SJM, Forsyth PD, Dalal S, Evans PA, Short MA, Shiach C, Jack AS, Morgan GJ. The rapid diagnosis of acute promyelocytic leukaemia using PML (5E10) monoclonal antibody. *Br J Haematol* 1997; 99: 597-604.
 134. Borrow J, Goddard AD, Gibbons B, Katz F, Swirsky D, Fiorettoni T, Dube I, Winfield DA, Kingston J, Hagemeyer A, Rees JKH, Lister TA, Solomon E. Diagnosis of acute promyelocytic leukaemia by RT-PCR: detection of PML-RARA and RARA-PML fusion transcripts. *Br J Haematol* 1992; 82: 529-540.
 135. Alcalay M, Zangrilli D, Fagioli M, Pandolfi PP, Mencarelli A, Lo Coco F, Biondi A, Grignani F, Pelicci PG. Expression pattern of the RAR -PML fusion gene in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 4840-4844.
 136. Miller WH, Kakizuka A, Frankel SR, Warrell RP, DeBlasio A, Levine K, Evans R, Dmitrovsky E. Reverse transcription polymerase chain reaction for the rearranged retinoic acid receptor clarifies diagnosis and detects minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 2694-2698.
 137. Pandolfi PP, Alcalay M, Fagioli M, Zangrilli D, Mencarelli A, Diverio D, Biondi A, Lo Coco F, Rambaldi A, Grignani F, Rochette-Egly C, Gaube MP, Chambon P, Pelicci PG. Genomic variability and alternative splicing generate multiple PML/RAR transcripts that encode aberrant PML proteins and PML/RAR isoforms in acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J* 1992; 11: 1397-1407.
 138. Gallagher RE, Willman CL, Slack JL, Andersen JW, Li YP, Viswanatha D, Bloomfield CD, Appelbaum FR, Schiffer CA, Tallman MS, Wiernik PH. Association of PML-RAR fusion mRNA type with pretreatment hematologic characteristics but not treatment outcome in acute promyelocytic leukemia: an Intergroup molecular study. *Blood* 1997; 90: 1656-1663.
 139. Mandelli F, Diverio D, Avvisati G, Luciano A, Barbui T, Bernasconi C, Broccia G, Cerri R, Falda M, Fioritoni G, Leoni F, Liso V, Petti MC, Rodeghiero F, Saglio G, Vegna ML, Visani G, Jehn U, Willemze R, Muus P, Pelicci PG, Biondi A, Lo Coco F. Molecular remission in PML/RAR -positive promyelocytic leukemia by combined all-trans retinoic acid and idarubicin (AIDA) therapy. *Blood* 1997; 90: 1014-1021.
 140. Gallagher RE, Li YP, Rao S, Paietta E, Andersen J, Etkind P, Bennett JM, Tallman MS, Wiernik PH. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases with PML-RAR break/fusion sites in PML exon 6: identification of a subgroup with decreased in vitro responsiveness to all-trans retinoic acid. *Blood* 1995; 86: 1540-1547.
 141. Huang W, Sun GL, Li XS, Cao Q, Lu Y, Jang GS, Zhang FQ, Chai JR, Wang Z, Waxman S, Chen Z, Chen SJ. Acute promyelocytic leukemia: clinical relevance of two major PML-RAR isoforms and detection of minimal residual disease by retrotranscriptase/polymerase chain reaction to predict relapse. *Blood* 1993; 82: 1264-1269.
 142. Raelson JV, Nervi C, Rosenauer A, Benedetti L, Monczak Y, Pearson M, Pelicci PG, Miller WH. The PML/RAR oncoprotein is a direct molecular target of retinoic acid in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 1996; 88: 2826-2832.
 143. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. The impact of all-trans-retinoic acid coagulopathy of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1998; 91: 3093-3102.
 144. Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, Castaigne S, Fenaux P. All-trans-retinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 2643-2653.
 145. Weiss MA, Warrell RP. Two cases of extramedullary acute promyelocytic leukemia. *Cancer* 1994; 74: 1882-1886.
 146. Wiernik PH, De Bellis R, Muxi P, Dutcher JP. Extramedullary acute promyelocytic leukemia. *Cancer* 1996; 78: 2510-2514.
 147. Evans G, Grimwade D, Prentice HG, Simpson N. Central nervous system relapse in acute promyelocytic leukaemia in patients treated with all-trans retinoic acid. *Br J Haematol* 1997; 98: 437-439.

148. Currie J, Chee YL, Culligan DJ. Central nervous system relapse in acute promyelocytic leukaemia treated with ATRA. *Br J Haematol* 1997; 99: 469.
149. Martino B, Vincelli I, Marino A, Comis M, Ronco F, Nobile F. Meningeal relapse in a patient with acute promyelocytic leukaemia treated with all-trans retinoic acid. *Br J Haematol* 1998; 100: 606-607.
150. Molero T, Valencia JM, Gómez-Casares MT. Central nervous system (CNS) infiltration in a case of promyelocytic leukemia. *Haematologica* 1997; 82: 637.
151. Di Noto R, Schiavone ME, Ferrara F, Manzo C, Lo pardo C, Del Vecchio L. All-trans retinoic acid promotes a differential regulation of adhesion molecules on acute myeloid leukaemia blast cells. *Br J Haematol* 1994; 88: 247-255.
152. Di Noto R, Schiavone ME, Lo pardo C, Ferrara F, Manzo C, Vacca C, Del Vecchio L. Differential regulation of GPI-linked molecules on leukaemic promyelocytes treated in vitro with all-trans retinoic acid. *Br J Haematol* 1996; 93: 392-393.
153. Drach J, López-Borestein G, McQueen T, Andreff M, Mehta K. Induction of differentiation in myeloid leukemia cell lines and acute promyelocytic leukemia cells by liposomal all-trans-retinoic acid. *Cancer Res* 1993; 53: 2100-2104.
154. Grignani F, Testa U, Rogaia D, Ferrucci PF, Samoggia P, Pinto A, Aldinucci D, Gelmetti V, Fagioli M, Alcalay M, Seeler J, Grignani F, Nicoletti L, Peschle C, Pelicci PG. Effects on differentiation by the promyelocytic leukemia PML/RAR protein depend on the fusion of the PML protein dimerization and RAR DNA binding domains. *EMBO J* 1996; 15: 4949-4958.
155. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 811-814.
156. Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Fusion proteins of the retinoic acid receptor- recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998; 391: 815-818.
157. Lo Coco F, Diverio D, Pandolfi PP, Biondi A, Rosi V, Avvisati G, Rambaldi A, Arcese W, Petti MC, Meloni G, Mandelli F, Grignani F, Maser G, Barbui T, Pelicci PG. Molecular evaluation of residual disease as a predictor of relapse in acute promyelocytic leukemia. *Lancet* 1992; 340:1437-1438.
158. Miller WH, Levine K, DeBlasio A, Frankel SR, Dmitrovsky E, Warrell RP. Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR- fusion mRNA. *Blood* 1993; 82: 1689-1694.
159. Diverio D, Pandolfi PP, Biondi A, Avvisati G, Petti MC, Mandelli F, Pelicci PG, Lo Coco F. Absence of reverse transcription-polymerase chain reaction detectable residual disease in patients with acute promyelocytic leukemia in long-term remission. *Blood* 1993; 82: 3556-3559.
160. Avvisati G, Lo Coco F, Diverio D, Falda D, Ferrara F, Lazzarino M, Russo D, Petti MC, Mandelli F. AIDA (all-trans retinoic acid + idarubicin) in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: a Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) pilot study. *Blood* 1996; 88: 1390-1398.
161. Meloni G, Diverio D, Vignetti M, Avvisati G, Capria S, Petti MC, Mandelli F, Lo Coco F. Autologous bone marrow transplantation for acute promyelocytic leukemia in second remission: prognostic relevance of pretransplant minimal residual disease assesment by reverse-transcription polymerase chain reaction of the PML/RAR fusion gene. *Blood* 1997; 90: 1321-1325.
162. Biondi A, Rambaldi A, Pandolfi PP, Rossi V, Giudici G, Alcalay M, Lo Coco F, Diverio D, Pogliani EM, Lanzi EM, Mandelli F, Maser G, Barbui T, Pelicci PG. Molecular monitoring of the myl/retinoic acid receptor- fusion gene in acute promyelocytic leukemia by polymerase chain reaction. *Blood* 1992; 80: 492-497.
163. Tobal K, Yin L. RT-PCR method with increased sensitivity shows persistence of PML/RARA fusion transcripts in patients in long-term remission of APL. *Leukemia* 1998; 12: 1349-1354.
164. Melo JV. Diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88: 2375-2384.
165. Maurer J, Janssen JWG, Thiel E, van Denderen J, Ludwig WD, Aydemir U, Heinze B, Fonatsch C, Harbott J, Reiter A, Riehm H, Hoelzer D, Bartram CR. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukaemia by the polymerase chain reaction. *Lancet* 1991; 337: 1055-1058.
166. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Lo Coco F, Frontani M, Annino L, Mandelli F. Detection of Ph1-positive acute lymphoblastic leukaemia by PCR. *Lancet* 1991; 338: 958.
167. Westbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, Wurster-Hill DH, Sobol RE, Schiffer C, Bloomfield CD. Clinical significance of the BCR/ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study (8762). *Blood* 1992; 80: 2983-2990.
168. Preudhomme C, Fenaux P, Lai JL, Lelpelet P, Sartiaux C, Collyn-d'Hooghe M, Zanddecki M, Cosson A, Jouet JP, Kercckaert JP. Philadelphia negative, BCR/ABL positive adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) in 2 of 39 patients with combined cytogenetic and molecular analysis. *Leukemia* 1993; 7: 1054-1057.
169. Kantarjian H, Talpaz M, Estey E, Ku S, Kurzrock R. What is the contribution of molecular studies to the diagnosis of BCR-ABL-positive disease in adult acute leukemia?. *Am J Med* 1994; 96: 133-138.
170. Saglio G, Pane F, Gottardi E, Frigeri F, Buonaiuto MR, Guerrasio A, De Micheli D, Parziale A, Fornaci MN, Martinelli G, Salvatore F. Consistent amounts of acute leukemia-associated P190BCR/ABL transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood* 1996; 87: 1075-1080.
171. van Rhee F, Hochhaus A, Lin F, Melo JV, Goldman JM, Cross NCP. p190 BCR/ABL mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood* 1996; 87: 5213-5217.
172. Pane F, Frigeri F, Sindona M, Luciano L, Ferrara F, Cimino R, Meloni G, Saglio G, Salvatore F, Rotoli B. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR/ABL with C3/A2 junction). *Blood* 1996; 88: 2410-2414.
173. Wilson G, Frost L, Goodeve A, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. BCR-ABL transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical myeloid leukemia. *Blood* 1997; 89: 3064.
174. Simões BP, Scaffo MHS, Falcão RP. Lack of BCR/ABL rearrangement in acute and chronic T cell leukemias. *Leukemia* 1997; 11: 1595-1596.
175. Fabbiano F, Santoro A, Felice R, Catania P, Cannella S, Majolino I. bcr/abl rearrangement in adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 1998; 83: 856-857.
176. Bose S, Deininger M, Gora-Tybor J, Goldman JM, Melo JV. The presence of typical and atypical BCR-ABL fusion genes in leukocytes of normal individuals: biologic significance and implications for assessment of minimal residual disease. *Blood* 1998; 92: 3362-3367.
177. Vickers M. Estimation of the number of mutations necessary to cause chronic myeloid leukaemia from epidemiological data. *Br J Haematol* 1996; 94: 1-4.
178. Gotoh A, Broxmeyer HE. The function of BCR/ABL and related proto-oncogenes. *Curr Opin Hematol* 1997; 4: 3-11.
179. Guerrasio A, Saglio G. Molecular insights on chronic myeloid leukemia and in other Ph positive human leukemias. *Rev Clin Exp Hematol* 1997; 2: 59-75.
180. Skorski T, Kanakaraj P, Ku DH, Nieborowska-Skorska M, Canaani E, Zon G, Perussia B, Calabretta B. Negative regulation of p210GAP GTPase promoting activity by p210bcr/abl: implication for RAS-dependent Philadelphia chromosome positive cell growth. *J Exp Med* 1994; 179: 1855-1865.
181. Skorski T, Kanakaraj P, Nieborowska-Skorska M, Ratajczak MZ, Wen SC, Zon G, Gewirtz AM, Perussia B, Calabretta B. Phosphatidylinositol-3 kinase activity is regulated by BCR/ABL and is required for the growth of Philadelphia chromosome-positive cells. *Blood* 1995; 86: 726-736.
182. Jain SK, Susa M, Keeler ML, Carlesso N, Druker B, Varticovski L. PI 3-kinase activation in BCR/abl-transformed hematopoietic cells does not require interaction of p85. SH2 domains with p210 BCR/abl. *Blood* 1996; 88: 1542-1550.
183. Evans CA, Owen-Lynch PJ, Whetton AD, Dive C. Activation of the Abelson tyrosine kinase activity is associated with sup-

- pression of apoptosis in hemopoietic cells. *Cancer Res* 1993; 53: 1735-1738.
184. Hoelzer D. Therapy and prognostic factors in adult acute lymphoblastic leukaemia. *Baillière's Clin Haemat* 1994; 7: 299-320.
 185. Mitterbauer G, Födinger M, Scherrer R, Knöbl P, Jäger U, Laczika K, Schwarzwinger I, Gaiger A, Geissler K, Greinix H, Kalhs P, Linkesch W, Lechner K, Mannhalter C. PCR-monitoring of minimal residual leukaemia after conventional chemotherapy and bone marrow transplantation in BCR-ABL-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 89: 937-941.
 186. Miyamura K, Tanimoto M, Morishima Y, Horibe K, Yamamoto K, Akatsuka M, Kodera Y, Kojima S, Matsuyama K, Hirabayashi N, Yazaki M, Imai K, Onozawa Y, Kanamaru A, Mizutani S, Saito H. Detection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction: possible eradication of minimal residual disease by marrow transplantation. *Blood* 1992; 79:1366-1370.
 187. Radich J, Gehly G, Lee A, Avery R, Bryant E, Edmands S, Gooley T, Kessler P, Kirk J, Ladne P, Thomas ED, Appelbaum FR. Detection of bcr-abl transcripts in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia after marrow transplantation. *Blood* 1997; 89: 2602-2609.
 188. Preudhomme C, Henic N, Cazin B, Lai JL, Bertheas MF, Vanrumbeke M, Lemoine F, Jouet JP, Deconninck E, Nelken B, Cosson A, Fenaux P. Good correlation between RT-PCR analysis and relapse in Philadelphia (Ph1)-positive acute lymphoblastic leukemia (ALL). *Leukemia* 1997; 11: 294-298.
 189. Annino L, Ferrari A, Meloni G, Arciese W, Buffolino S, Lamanda M, Sprovieri T, De Cuià R, Lo Coco F, Mandelli F. RT-PCR monitoring and treatment outcome in BCR/ABL-positive acute lymphoblastic leukemia: persistence of PCR positivity in some long-term survivors. *Blood* 1997; 90 suppl 1:183a.
 190. Sherr CJ. G1 phase progression: cyclin on cue. *Cell* 1994; 79: 551-555.
 191. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK34. *Nature* 1993; 366: 704-707.
 192. Quelle D, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995; 83: 993-1000.
 193. Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro GI, Edwards CD, Rollins BJ, Sidransky D. A novel p16INK4A transcript. *Cancer Res* 1995; 55: 2995-2997.
 194. Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavtigian SV, Katcher H, Parry D, Peters G, Kamb A. Complex structure and regulation of the P16 (MTS1) locus. *Cancer Res* 1995; 55: 2988-2994.
 195. Ogawa S, Hirano N, Sato N, Takahashi T, Hangaishi A, Tanaka K, Kurokawa M, Tanaka T, Mitani K, Yazaki Y, Hirai H. Homozygous loss of the cyclin-dependent kinase 4-inhibitor (p16) gene in human leukemias. *Blood* 1994; 84: 2431-2435.
 196. Okuda T, Shutterff SA, Valentine MB, Raimondi SC, Head DR, Behm F, Curcio-Brint AM, Liu Q, Pui CH, Sherr CJ, Beach D, Look AT, Downing JR. Frequent deletion of p16INK4a/MTS1 and p15INK4b/MTS2 in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85: 2321-2330.
 197. Sill H, Goldman JM, Cross NCP. Homozygous deletions of the p16 tumor-suppressor gene are associated with lymphoid transformation of chronic myeloid leukemia. *Blood* 1995; 85: 2013-2016.
 198. Haidar MA, Cao XB, Manshoury T, Chan LL, Glassman A, Kantarjian HM, Keating MJ, Beran MS, Albitar M. p16INK4A and p15INK4B gene deletions in primary leukemias. *Blood* 1995; 86: 311-315.
 199. Rasool O, Heyman M, Borgonovo Brandt L, Liu Y, Grandér D, Söderhäll S, Einhorn S. p15ink4B and p16ink4 gene inactivation in acute lymphocytic leukemia. *Blood* 1995; 85: 3431-3436.
 200. Ohnishi H, Kawamura M, Ida K, Sheng XM, Hanada R, Nobori T, Yamamori S, Hayashi Y. Homozygous deletions of p16/MTS1 gene are frequent but mutations are infrequent in childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 86: 1269-1275.
 201. Heyman M, Rasool O, Borgonovo Brandt L, Liu Y, Grandér D, Söderhäll S, Gustavsson G, Einhorn S. Prognostic importance of p15ink4B and p16ink4 gene inactivation in childhood acute lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1996; 14: 1512-1520.
 202. Herman JG, Civin CI, Issa JJP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997; 57: 837-841.
 203. Hebert J, Cayuela JM, Berkeley J, Sigaux F. Candidate tumor-suppressor genes MTS1 (p16INK4A) and MTS2 (p15INK4B) display frequent homozygous deletions in primary cells from T- but not from B-cell lineage lymphoblastic leukemias. *Blood* 1994; 84: 4038-4044.
 204. Quesnel B, Preudhomme C, Philippe N, Vanrumbeke M, Dervite I, Lai JL, Bauters F, Wattel E, Fenaux P. p16 gene homozygous deletions in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1995; 85: 657-663.
 205. Takeuchi S, Bartram CR, Seriu T, Miller CW, Tobler A, Jansen JW, Reiter A, Ludwig WD, Zimmermann M, Schwaller J, Lee E, Miyoshi I, Koeffler HP. Analysis of a family of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15/MTS2/INK4B, p16/MTS1/INK4A, and p18 genes in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Blood* 1995; 86: 755-760.
 206. Fizzotti M, Cimino G, Pisegna S, Alimena G, Quarterone C, Mandelli F, Pelicci PG, Lo Coco F. Detection of homozygous deletions of the cyclin-dependent kinase 4 inhibitor (p16) gene in acute lymphoblastic leukemia and association with adverse prognostic features. *Blood* 1995; 85: 2685-2690.
 207. Stranks G, Height SE, Mitchell P, Jadayel D, Yuille MAR, De Lord C, Clutterbuck RD, Treleaven JG, Powles RL, Nacheva E, Oscier DG, Karpas A, Lenoir GM, Smith SD, Millar JL, Catovsky D, Dyer MJS. Deletions and rearrangement of CDKN2 in lymphoid malignancy. *Blood* 1995; 85: 893-901.
 208. Cayuela JM, Hebert J, Sigaux F. Homozygous MTS1 (p16INK4A) deletion in primary tumor cells of 163 leukemic patients. *Blood* 1995; 85: 854.
 209. Kees UR, Burton PR, Lü C, Baker DL. Homozygous deletion of the p16/MTS1 gene in pediatric acute lymphoblastic leukemia is associated with unfavorable clinical outcome. *Blood* 1997; 89: 4161-4166.
 210. Ohnishi H, Guo SX, Ida K, Taki T, Naritaka S, Besso F, Yanagisawa M, Hanada R, Eguchi M, Kamada N, Kita K, Yamamori S, Hayashi Y. Alterations of p16 and p15 genes in acute leukemia with MLL gene rearrangements and their correlation with clinical features. *Leukemia* 1997; 11: 2120-2124.
 211. Duro D, Bernard O, Della Valle V, Leblanc T, Berger R, Larsen CJ. Inactivation of the p16INK4A/MTS1 gene by a chromosome translocation t(9;14)(p21-22;q11) in an acute lymphoblastic leukemia of B-cell type. *Cancer Res* 1996; 56: 848-854.
 212. Batova A, Diccianni MB, Yu JC, Nobori T, Link MP, Pullen J, Yu AL. Frequent and selective methylation of p15 and deletion of both p15 and p16 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1997; 57: 832-836.
 213. Serrano M, Lee HW, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996; 85: 27-37.
 214. Takeuchi S, Bartram CR, Wada M, Reiter A, Hatta Y, Seriu T, Lee E, Miller CW, Miyoshi I, Koeffler HP. Allelotype analysis of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 1995; 55: 5377-5382.
 215. Maloney KW, McGavran L, Odom LF, Hunger SP. Acquisition of p16INK4A and p15INK4B gene abnormalities between initial diagnosis and relapse in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1999; 93: 2380-2385.
 216. Wada M, Bartram CR, Nakamura H, Hachiya M, Chen DL, Borenstein J, Miller CW, Ludwig L, Hansen-Hagge TE, Ludwig WD, Reiter A, Mizoguchi H, Koeffler HP. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood* 1993; 82: 3163-3169.

Alteraciones moleculares en el adenocarcinoma de páncreas exocrino

V.M. BARBERÁ*, N. MALATS**, M. PORTA**, F. REAL***, A. CARRATO*’****

*Laboratorio de Oncología Molecular. Centro de Biología Molecular y Celular. Universidad Miguel Hernández. Elche. **Unidad de Epidemiología, Grupo de Investigación de Epidemiología Clínica del Cáncer. Institut Municipal d' Investigació Mèdica, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. ***Unidad de Biología Celular y Molecular. Institut Municipal d' Investigació Mèdica, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona. ****Servicio de Oncología Médica. Hospital General Universitario de Elche. Elche.

El carcinoma de páncreas es la cuarta causa de mortalidad por cáncer en los países occidentales (1). La mayoría de los tumores pancreáticos se originan en el componente exocrino y más del 90% se clasifican histológicamente como “adenocarcinomas ductales” (2). A este tipo de tumor haremos referencia en esta revisión, excepto cuando se especifique de otra manera.

Es una de las neoplasias en las que menos avances se han producido, con respecto a la prevención, diagnóstico y tratamiento, en los últimos 30 años. En la mayoría de los pacientes se diagnostica en estadios avanzados debido a la ausencia de síntomas específicos, hasta que ocurre la obstrucción o invasión de estructuras cercanas, como el árbol biliar, causando ictericia, o el duodeno cursando con náuseas y vómitos, que son manifestaciones tardías de la enfermedad (3). Actualmente no se dispone de un tratamiento eficaz, pues en la mayoría de los casos la resección quirúrgica del tumor no es factible y, por otra parte, es un tumor bastante quimio y radiorresistente. La supervivencia global, a los 5 años, del adenocarcinoma de páncreas (ACP) es inferior al 1% y la mediana de supervivencia tras el diagnóstico es de 6 meses.

Estudios epidemiológicos evidencian que el consumo de tabaco es el único factor claramente implicado, con un riesgo de 2,5. Otros factores, como la pancreatitis crónica o el consumo de alcohol, son motivo de controversia (4).

El mejor conocimiento de los mecanismos moleculares que conducen al ACP, tales como la activación o amplificación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores, puede contribuir al desarrollo de programas de prevención, a un diagnóstico más precoz y a mejoras en su tratamiento.

I. ALTERACIONES GENÉTICAS SOMÁTICAS

En este apartado se incluyen las alteraciones que ocurren en una célula somática y sólo afectan a su descendencia, permaneciendo libres de ellas el resto de las células de dicho organismo (Tabla I). Uno de los problemas importantes que encontramos al llevar a cabo estudios moleculares en el ACP, particularmente cuando se utilizan técnicas para detectar alteraciones genéticas, es la abundante reacción desmoplásica e inflamatoria que acompaña a las células tumorales y que dificulta su detección. El uso de técnicas como el enriquecimiento celular en xenoinjertos (células tumorales humanas creciendo en ratones atímicos) o la utilización de cultivos de líneas celulares, podría solucionar el problema de la contaminación con células normales. Así se obtiene una población tumoral pura, aunque se ha visto que durante la adaptación al cultivo o la diseminación en el ratón atímico, de tumores de páncreas, se producen procesos de selección y nuevas mutaciones (5). Esta metodología puede influir en la estimación de la frecuencia de mutaciones, como por ejemplo deleciones homocigóticas, por lo que debe ser considerada cuando se evalúan los datos de la literatura.

K-ras

Este proto-oncogén codifica una proteína de membrana de 21.000 Da. con actividad guanosín trifosfatasa que participa en la transducción de señales inducidas por factores de crecimiento (6). Desde que en 1988 Almoguera y cols. descubrieron que más del 90% de los casos de ACP presentaban mutaciones en el codon 12

TABLA I
PERFIL GENÉTICO DEL ADENOCARCINOMA DE PÁNCREAS

<i>Gen</i>	<i>Locus</i>	<i>Alteración</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Referencias</i>
K-ras	12p13	Mutación puntual	55-100%	7-15
p53	17p13	Mutación puntual	31-70%	10, 25, 26-32
p16 ^{CDKN2A}	9p21	Delec. Homocigótica	3-48%	39-42
		Delec. Hemic. (LOH)	50-85%	
		Mutaciones puntuales Metilación	16-38% 16%	
DPC4	18q21.1	Delec. homocigótica. LOH	30% 90%	50
FHIT	3p14.2	LOH Pérdida de expresión	64% 38%	55, 57
RB1	13q14	Delección	< 10%	59-61
BRCA2	13q12-13	LOH Mutación nonsense	0-27%	63, 64

del gen *K-ras* (7), se han publicado más de 60 artículos analizando la prevalencia y/o el espectro de mutaciones en el oncogén *K-ras* en diversas series de tumores del páncreas exocrino.

La mayoría de los trabajos publicados describen una prevalencia que oscila entre un 55 y un 100% (7-15), pudiendo considerarse que un 70% es el número global de ACPs que presentan mutaciones en el codón 12 de *K-ras*. La limitación más importante de estos estudios es el número de casos analizados, pues únicamente en 5 de ellos se superan los 50 casos (8,12-15).

Las mutaciones en el oncogén *K-ras* son un acontecimiento precoz en la progresión tumoral, que unido a su alta prevalencia, sugiere un papel importante para este gen en el desarrollo del cáncer de páncreas.

En una baja proporción de casos (aproximadamente el 5%) se han detectado múltiples mutaciones, en *K-ras*, en el mismo tumor o en diversas lesiones preneoplásicas de un mismo paciente (8,15). Se ha propuesto que, al igual que ocurre en cáncer colorrectal, podrían coexistir múltiples mutaciones en lesiones preneoplásicas y que durante la progresión tumoral ocurra un proceso de selección clonal (16). Un estudio en 82 xenoinjertos de ACP describe que los ACP con fenotipo de errores de replicación del ADN (RER⁺) no presentan mutaciones en *K-ras*, si bien estos resultados no han sido reproducidos de forma independiente (17). En España se ha llevado a cabo un estudio de epidemiología molecular del cáncer de páncreas. Se recogieron muestras biológicas (tumor fresco, parafinado, sangre, orina, cabellos, uñas) y los datos clínicos y epidemiológicos de 185 pacientes con ACP. El análisis de los datos objetivó una prevalencia del 75% de mutaciones en el gen *K-ras* en los 121 casos de los que se dispuso de tejido tumoral así como una relación directa entre el consumo de café y la proporción de tumores con mutaciones en *K-ras* (18), así como con la exposición a organoclorados (19).

P53.

El gen supresor de tumores p53 está alterado en el 50% de los tumores humanos (20,21). La región cromosómica 17p13, locus de p53, registra una alta frecuencia de pérdidas alélicas en los tumores. La proteína p53 activa la transcripción de genes cuyos productos regulan negativamente la progresión de la fase G1 a la fase S del ciclo celular. En caso de daño en el ADN, actúa mediante una proteína llamada p21^{WAF/CIP1}. Si no se puede reparar el daño genético, p53 puede inducir muerte celular programada o apoptosis, activando la transcripción de genes proapoptóticos, como por ejemplo *BAX*.

La proteína p53 también comprueba el correcto funcionamiento, en la fase G2 del ciclo celular, de la maquinaria responsable de la correcta segregación del material genético durante la mitosis.

La proteína p53 forma tetrámeros. Las mutaciones en p53 dan lugar a pérdida de función, es decir, incapacidad de unirse al ADN. Pero las formas de p53 mutadas normalmente no pierden la capacidad de formar tetrámeros con proteínas p53 normales, *wild type* o salvaje, dando complejos no funcionales; de esta forma la proteína mutada inhibe la actividad de la proteína normal. Por lo que se dice que p53 tiene un carácter dominante negativo y por tanto se comporta como un oncogén (20).

Las principales alteraciones que ocurren en p53 son deleciones (pérdidas de heterocigosidad) y mutaciones puntuales, especialmente en los exones 5-9 (21). Los métodos para la detección de estas mutaciones se basan en la amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR y el posterior estudio de los productos mediante el análisis de polimorfismos conformacionales de cadena sencilla (SSCP, *Single Strand Conformational Polymorphism*), electroforesis en geles de gradientes desnaturizantes (DGGE, *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*) y secuenciación directa. La vida media de la proteína p53 normal es de aproximadamente 30 minutos. Las formas mutadas tienen una vida media

mucho más larga, de aproximadamente 24 horas. Esto produce un aumento en los niveles de p53 (20) que puede ser detectado por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ).

La utilización de técnicas de IHQ para la detección de mutaciones en p53 tiene ventajas, como el ser una metodología ampliamente implantada y automatizada que genera una buena reproducibilidad de los resultados. Sin embargo, se pueden inducir errores de interpretación, como puede ser la presencia de falsos negativos en el caso de delección de ambos alelos del gen o mutaciones puntuales que no estabilicen lo suficiente la proteína como para permitir su detección. Asimismo, la interacción con algunas proteínas víricas puede inducir una rápida degradación de p53, como ocurre con la proteína E6 del virus del papiloma humano. También podríamos encontrarnos con la situación opuesta, cuando la proteína p53 salvaje es inducida en respuesta a ciertas condiciones, especialmente daño genotóxico, que podría ser detectada por IHQ. Otra situación en la que se podría detectar p53 por IHQ en ausencia de mutaciones en su secuencia, sería por la estabilización producida por proteínas víricas, como el antígeno grande del virus SV40. En este caso, p53 es inactivo a pesar de no tener mutaciones (22,23).

Aunque son pocos los estudios que han comparado las diversas técnicas de detección de mutaciones en la misma serie de tumores, se han descrito discrepancias entre los resultados obtenidos por IHQ y la presencia de mutaciones somáticas, como la ausencia de mutaciones descrita por Kennedy y cols. en hepatoblastomas y hepatocarcinomas, con p53 positiva por IHQ, en niños (24). O el estudio de Scarpa y cols. que encuentran mutaciones en el ACP, por SSCP y secuenciación directa en 14 de 34 casos, y sólo 9 de estos 14 casos presentaban acumulación de p53 por IHQ, mientras que en 12 casos que no presentaban mutaciones en su secuencia, se detectaba p53 por IHQ (25). Un trabajo más reciente, expone la discordancia entre los resultados obtenidos por IHQ y mediante el análisis de ADN en todos los exones codificantes de p53, y propone la necesidad de utilizar ambas técnicas para caracterizar todas las mutaciones del gen p53, en los ACPs (26).

La frecuencia de mutaciones en el gen p53 descritas en el ACP que oscila entre el 31 y el 70%, corresponden mayoritariamente a mutaciones puntuales que dan lugar a la sustitución de un aminoácido, seguida por deleciones o inserciones en la secuencia codificante que ocasionan cambios en la pauta de lectura en la traducción (10,25,26-32). La mayor prevalencia de mutaciones se da en los codones 175, 248 y 273 (31).

Las mutaciones más frecuentes son transiciones (sustitución de una purina por otra o una pirimidina por otra) (70%), y en la mitad de los casos ocurren en el dinucleótido CpG. Este tipo de mutaciones puntuales se cree que ocurre de forma espontánea por desaminación de una base de metilcitosina.

Se ha descrito que la mayoría de las microdeleciones (1-2 bp) suceden en las regiones de homopolímeros de purinas o pirimidinas de este gen (31). Es una alteración poco frecuente en otros tumores y que podría aportar

información sobre los mutágenos endógenos y/o ambientales implicados en la génesis del ACP.

Hoshi y cols. han descrito que la variedad de los tumores mucinosos intraductales, de mejor pronóstico, no se asocia a mutaciones en p53, pero sí presenta mutaciones en el gen K-ras (33). En otro estudio, Weyrer y cols. han descrito una asociación de mutaciones en p53 con un fenotipo metastásico, posiblemente adquirido durante la progresión (34).

P16 (CDKN2a/INK4a)

El gen *CDKN2a* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) también conocido como *INK4a* (*Inhibitor Kinase 4a*) codifica una proteína, p16, que forma parte de una familia de inhibidores de los complejos proteicos ciclina-CDK.

p16 fue identificado y clonado por su interacción con *CDK4* (35), y se demostró que es un inhibidor específico de *CDK4* y *CDK6* (quinasa relacionada con *CDK4*). La proteína p16 bloquea la fosforilación dependiente de ciclina D del producto proteico del gen retinoblastoma (*Rb*). De esta forma, se detiene el ciclo celular en la fase G1 (36).

El gen *CDKN2a* fue aislado independientemente por dos grupos como un gen supresor de tumores en la región 9p21 (37,38). La existencia de un gen supresor de tumores en esa región se había sospechado por su alto índice de pérdidas alélicas en neoplasias humanas y por su implicación en el melanoma hereditario. Se han descrito tres mecanismos predominantes de inactivación genética de p16: deleciones homocigóticas que eliminan ambos alelos del gen, delección de un alelo (pérdida de heterocigosidad) y mutación intragénica del alelo restante, y delección de un alelo y silenciamiento transcripcional por metilación del promotor del alelo restante. No hay que olvidar que las alteraciones en los genes supresores de tumores tienen un carácter recesivo y se deben inactivar ambos alelos para eliminar totalmente el efecto supresor tumoral.

La inactivación de p16 ocurre en muchos tipos de tumores con un amplio rango de frecuencias. En el caso del ACP, un estudio reporta que prácticamente en todos los casos (98%) se inactiva *CDKN2A* (39). En las diferentes series de ACP analizadas, la inactivación por deleciones homocigóticas ocurre entre un 3%-48% de los casos, las deleciones hemicigóticas (pérdida de heterocigosidad) entre 50-85%, mutaciones puntuales en 16-38% y metilación del promotor en 16% de los casos (39-42). En otra serie, de 62 ACP, en el 41,9% de los casos no se detectaba p16 por IHQ y la pérdida de expresión se asociaba, de forma estadísticamente significativa, únicamente con el grado histológico (43).

Moskaluk y cols. analizaron 10 lesiones intraductales preneoplásicas, para detectar mutaciones en p16 y K-ras. Los resultados sugirieron que las mutaciones en p16 afectaban a un subgrupo que también presentaba mutaciones en *K-ras* y que podían identificar precursores de alto riesgo de progresión a malignidad invasiva. Sin embargo, el bajo número de casos incluidos en este estudio requiere cautela en la interpretación de estos resultados (44).

En el locus *INK4a* ocurre un hecho singular, que consiste en la presencia de dos genes superpuestos, cada uno regulado por su propio promotor (36). Los dos transcritos que generan estos promotores comparten los exones 2 y 3, pero en diferentes pautas de lectura, y presentan el primer exón diferente, el exón 1 en *p16^{CDKN2A/INK4a}* y el exón 1 en *p14^{ARF}* (*Alternative Reading Frame*) en humanos (45) y *p19^{ARF}* en el ratón (46) (Fig. 1).

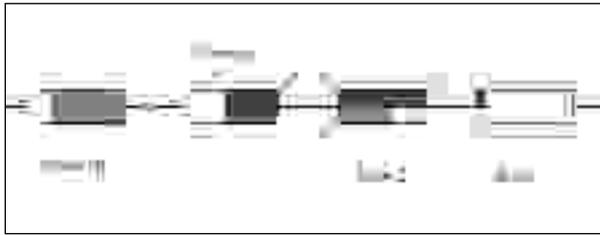


Fig. 1. Arquitectura del locus *CDKN2A*. Los exones están representados por rectángulos y las zonas coloreadas corresponden a los dominios codificantes. La secuencias que codifican para *p16^{INK4a}* están en gris oscuro y las de *p14^{ARF}* en gris claro. Modificado de Scott F.J. et al. (45)

Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas son completamente diferentes. En el ratón, la expresión ectópica de *p19^{ARF}* induce la parada del ciclo celular en cultivo de fibroblastos (46). *p19^{ARF}* ejerce su acción biológica en la ruta de *p53* interaccionando directamente con *MDM2* y evitando de esta forma la degradación de *p53*. (47,48). Scott y cols. describieron la proteína codificada por el transcrito beta de *CDKN2A/INK4a* humano, *p14^{ARF}*, que presenta sólo el 50% de identidad en su secuencia con la homóloga de ratón, pero también con capacidad de inducir parada en el ciclo celular mediante la ruta de *p53* (45).

Las mutaciones intragénicas que afectan a las secuencias de *p16* y *p19*, eliminan selectivamente la actividad inhibitoria del ciclo celular de *p16*, pero no la de *p19*, sugiriendo que el blanco de dichas mutaciones es *p16ⁱⁿ*. Sin embargo, deleciones homocigóticas del locus *ARF-INK4a* eliminan selectivamente las rutas *INK4a*-ciclina, *D/CDK4-Rb* y *ARF-MDM2-p53*, (Fig 2). Este mecanismo de inactivación es muy frecuente en dicho locus.

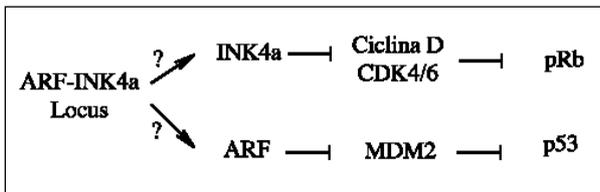


Fig. 2. Comparación de las rutas en cuya regulación participan las proteínas codificadas por el locus *ARF-INK4a*. La regulación de *ARF* e *INK4a* todavía es desconocida. Modificada de Zhang et al. (48).

DPC4 (Smad4)

DPC4 (*Deleted in Pancreatic Carcinoma, locus 4*) es un gen supresor tumoral identificado en la región cromosómica 18q21.1. Esta región presenta pérdidas alélicas en el 90% de los ACPs y deleciones homocigóticas en el 30% de los casos (50). *DPC4* es un gen que presenta un 85% de similitud con *MAD* (*Mothers Against Decapentaplegic*) en *Drosophila* y con los genes *SMA* de *C. elegans*. Derynck y cols. propusieron una nomenclatura para los productos de los genes *MAD* en humanos. Su propuesta fue concretamente utilizar una combinación de ambos genes homólogos, *SMA* y *MAD*, con lo que *DPC4* sería designado como *SMAD4* (51). Se piensa que las pérdidas en el cromosoma 18q son una alteración genética temprana en la carcinogénesis ductal pancreática (52).

SMAD4 juega un papel clave en la transducción de señales, desde la membrana celular al núcleo, de los miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (*TGF-β*). Shioda y cols. presentan resultados que demuestran la actividad transcripcional mediada por heterooligomerización de *SMAD4* con otras proteínas de la familia *SMAD* (53).

FHIT

El gen *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*) está localizado en 3p14; región cromosómica en la que se ha descrito un punto frágil, el *FRA3B* (3p14.2), del que se dice que es el más activo del genoma humano. Un punto frágil es una región cromosómica en la que se producen roturas cuando las células son expuestas a ciertas condiciones, como el tratamiento con afidocolina, un inhibidor específico de ADN polimerasas, en el caso de *FRA3B*, y cuyo efecto se ve potenciado por el inhibidor de topoisomerasa I, camptotecina, por lo que se piensa que la incompleta replicación del ADN puede ser la causa de la manifestación de este punto frágil (54).

Se han descrito pérdidas de heterocigosidad en 16 de 25 (64%) tumores de páncreas en marcadores polimórficos de 3p14.2, y únicamente en 2 de 25 (8%) tumores en marcadores de 3p exteriores a la región *FRA3B* (55). Los genes próximos a estos loci, como *FHIT* para *FRA3B*, pueden mutar y contribuir a la progresión neoplásica, debido a la inestabilidad genómica que ocurre durante el desarrollo tumoral.

La proteína *FHIT* ha sido clasificada como dinucleósido 5',5'''-*p1,p3*-trifosfato (*AP₃A*) hidrolasa, y participa en el metabolismo de los dinucleótidos. En un estudio con 14 líneas celulares de cáncer de páncreas, el 70% presentaron alteraciones en el ARN mensajero y el 66% también presentaron deleciones homocigóticas en los exones 3, 4 y 5 a nivel del ADN genómico (56). La complejidad del gen, que comprende 10 pequeños exones distribuidos en un locus genómico de aproximadamente 1 Mb, dificulta su estudio en tumores primarios de páncreas. No obstante, recientemente se ha publicado un estudio con 21 ACP y 19 líneas celulares, en el que en 8 de los 21 ACPs se detecta la proteína *FHIT* por IHQ y

TABLA II

RESUMEN DE LAS ABERRACIONES CROMOSÓMICAS EN ACP DETECTADAS UTILIZANDO DIFERENTES TÉCNICAS

TÉCNICA	CARIOTIPO	REFERENCIAS	
	pérdidas	ganancias	
Citogenética convencional	6, 9, 12, 13, 15, 17, 18, 21, Y, 1p, 3p, 6q, 8q, 9p, 15q, 17p, 18q, 19p, 20p.	2, 7, 8, 11, 12, 17, 20, 1q, 3q, 5p, 6p, 7q, 8q, 11q, 12p, 17q, 19q, 20p.	74-80
Análisis de microsatélites	7p, 10p, 11q, 12q, 17p, 18q.		59, 73
Hibridación genómica comparativa (CGH)		1p32-p34, 6q24, 7q22, 12p13, 22.	120

Kimura y cols. describieron mediante análisis de microsatélites e hibridación *in situ* fluorescente (FISH), dos regiones del cromosoma 12q, 12q21 y 12 q22-q23.1, que se delecionaban con mucha frecuencia en tumores y líneas celulares tumorales de ACP. Estas regiones son, por tanto, candidatas a contener nuevos genes supresores de tumores (73).

El perfil citogenético de esta neoplasia se caracteriza por múltiples cambios numéricos y estructurales. Varios estudios, utilizando técnicas de citogenética, han proporcionado información adicional sobre regiones cromosómicas que pueden estar implicadas en el desarrollo del ACP y cuyos resultados están resumidos en la tabla II (74-80).

En algunos de estos cromosomas, frecuentemente afectados, se han identificado genes importantes implicados en la transformación neoplásica, como en 17p13 donde se localiza p53, en 9p21 donde está CDKN2A, en 18q21 donde están DPC4/SMAD4 y DCC, en 13q12 donde está BRCA2, y en otros se ha supuesto la existencia de genes supresores, como por ejemplo en el cromosoma 6 (81).

En otros trabajos se valora la utilidad diagnóstica y pronóstica de técnicas como FISH y CGH en muestras de ACP (52,82,83).

OTRAS ALTERACIONES GENÉTICAS SOMÁTICAS

En este apartado se muestran algunas alteraciones genéticas de las que se ha aportado algún indicio sobre su implicación, pero cuyo papel en el desarrollo del ACP todavía no se ha caracterizado totalmente.

Algunos estudios describen entre un 10 y un 20% de amplificaciones de la región cromosómica 19q13.1, donde se encuentra el gen *AKT2*, en líneas celulares y tumores pancreáticos humanos (84-86). *AKT2* es un homólogo humano del oncogén *v-akt*, y codifica una proteína serina-treonina quinasa que participa en el control de la proliferación celular. Cheng y cols. lograron reducir la tumorigenicidad y la invasividad de dos lí-

as celulares tumorales de páncreas que presentaban sobreexpresión de *AKT2*, transfectando el ARN antisentido de este gen en xenoinjertos en ratones atímicos (86).

Otro gen localizado en 19q13.1 que también se encuentra amplificado y su producto génico sobreexpresado, es OZF. Codifica para una proteína de localización nuclear, con dedos de zinc, que sugiere que está implicada en la regulación de la expresión génica. Un aumento del número de copias del gen se ha detectado en 3 de 12 líneas celulares y en 2 de 12 ACPs. Los análisis de IHQ muestran que la expresión de la proteína OZF está restringida a las células tumorales (87).

Wallrapp y cols. en un estudio mediante hibridación genómica comparativa en ACP, detectaron amplificación en el cromosoma 6q. Mediante técnicas de Southern blot y captura de exones (exon trapping) se determinó que *c-myb*, que se encuentra en dicha región, estaba amplificado en el 10% de los ACPs y en la línea celular PC2. El oncogén *c-myb* también estaba sobreexpresado en otros casos que no presentaban amplificación génica, sugiriendo que éste es sólo uno de los mecanismos que conducen a la sobreexpresión. Las alteraciones genéticas en *c-myb* se encontraron principalmente en tumores de grado más avanzado, indicando una posible correlación con la progresión tumoral y un fenotipo más agresivo (88).

La pérdida de la actividad telomerasa en la mayoría de las células de los tejidos adultos es la responsable de la pérdida de la capacidad de estabilizar sus telómeros. Se ha visto que la mayoría de tumores de diferentes tipos que se han analizado, muestran actividad telomerasa. Significa que este acontecimiento es necesario para la inmortalización de las células neoplásicas. Un estudio describe que el 95 % de los ACPs (41/43) presentan actividad telomerasa detectable. Sin embargo, no se observó dicha actividad en ninguno de los 11 tumores pancreáticos benignos analizados y sólo en 1 de 3 pancreatitis. El hecho de que 8/8 extensiones de células de los ductos pancreáticos de pacientes con ACP presenten actividad telomerasa frente a 0/4 en lesiones benignas, sugiere que la actividad telomerasa puede ser utilizada para el diagnóstico diferencial entre el ACP y las lesiones benignas del páncreas (89).

Existe un estudio que describe la sobreexpresión nuclear de ciclina D1 en el 68,4% de los casos de ACP. La ciclina D1 es el producto proteico del proto-oncogén *BCL1/PRAD1*, localizado en el cromosoma 11q13, que funciona como una subunidad reguladora de CDKs en el ciclo celular. También se reporta que la acumulación de ciclina D1 se correlaciona significativamente con un mal pronóstico (90,91).

II. ALTERACIONES EPIGENÉTICAS

Son aquellas alteraciones que afectan a la expresión de los genes implicados en la transformación neoplásica y en la progresión tumoral, y que son el resultado de cambios en la regulación de la expresión génica, probablemente en ausencia de cambios en la secuencia del ADN.

METILACIÓN

Es un mecanismo implicado en el control de la expresión de los genes, que consiste en la adición de grupos metilo (CH₃) a las bases nitrogenadas del ADN en las regiones reguladoras (promotores), provocando la inhibición de la transcripción de estos genes.

Estas modificaciones por metilación de las bases no son consideradas mutaciones ya que no causan cambios en la secuencia de ADN, aunque sí tienen consecuencias funcionales similares a las mutaciones, por lo que se denominan cambios epigenéticos. Actualmente, todavía no conocemos bien el papel de la metilación del ADN en la carcinogénesis. La hipometilación del ADN provoca una expresión génica anormalmente elevada, pues induce la expresión de genes que no estaban siendo expresados. Este fenómeno puede jugar un papel en la carcinogénesis induciendo, por ejemplo, la expresión de oncogenes. La hipermetilación, por el contrario, puede silenciar genes que se están expresando constitucionalmente, y puede tener un papel oncogénico obvio cuando el gen afectado es un supresor de tumores. La hipermetilación, funcionalmente, tiene el mismo efecto que las mutaciones inactivadoras o la delección de un alelo. En tumores humanos, se ha descrito metilación en los promotores de genes supresores. En el ACP, el caso más llamativo es el de p16^{CDKN2A/INK4a} en el que la metilación de islas CpG en su promotor constituye un mecanismo de inactivación representativo (39).

FACTORES DE CRECIMIENTO

Bajo este nombre genérico se agrupa una serie de agentes, generalmente proteínas presentes en el suero, que intervienen en la regulación de la proliferación celular. La mayoría de los factores de crecimiento conocidos son mitógenos y activan la división celular. Pero los hay que la inhiben, como los factores inhibidores. Los factores de crecimiento también intervienen en la diferenciación celular, la movilidad, la adhesividad, etc. Pueden ser producidos por las células tumorales que, a diferencia de las normales, también son capaces de proliferar, independientemente de ellos.

En los ACPs y en la pancreatitis crónica, se sobreexpresan de forma conjunta el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus ligandos: el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento transformante alfa (TGF α), potencialmente implicados en la progresión del ACP mediante mecanismos autocrinos/paracrinos (92-94).

El receptor para el factor de crecimiento HER2/neu (*erbB-2*), es un proto-oncogén que codifica una glicoproteína transmembrana de 185,000 Da, con actividad tirosina quinasa intrínseca. En el ACP se ha descrito la sobreexpresión de HER2/neu en ausencia de amplificación génica en un 20-69% de los casos (95-98).

El gen *erbB-3* codifica para una proteína transmembrana relacionada con el EGF y *erbB-2*. Se expresa en

las células ductales del páncreas normal, y en el 47% de los ACP se sobreexpresa, asociándose con estadios avanzados y menor supervivencia (99).

El HGF (*Hepatocyte Growth Factor*) es un potente mitógeno para las células normales del páncreas exocrino (100). En el ACP, el HGF también conocido como *scatter factor* o factor de dispersión, pues es capaz de inducir disociación celular y movilidad, se expresa principalmente en las células del estroma, mientras que su receptor, Met, es sobreexpresado en las células tumorales (101). El HGF también induce motilidad celular in vitro, mediante la activación del sistema proteolítico u-PA/uPAR (urokinase-type Plasminogen Activator) y la formación de plasmina, una proteasa de amplio espectro de acción (101).

Diversos miembros de la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), FGF-1, -2, -5 y -7 también son producidos en exceso en el ACP, así como sus receptores y algunas de sus isoformas, como la isoforma III_c del FGFR-1 y el receptor para el factor de crecimiento de queratinocitos, que es una isoforma del FGFR-2 (102).

Otros factores de crecimiento y sus receptores también implicados en el ACP, son el receptor del factor de crecimiento del tipo insulina I (103), el receptor tipo II del TGF β y las tres isoformas del TGF β (104).

PROTEASAS ASOCIADAS A CÁNCER DE PÁNCREAS

Un paso esencial en los procesos de invasión y metástasis consiste en la degradación de la matriz extracelular (ME) adyacente, inducida por las células epiteliales malignas. Uno de los principales componentes de la membrana basal es el colágeno tipo IV, con el que se ensamblan otros componentes de la matriz como las lamininas, los proteoglicanos, etc. La pérdida de la integridad de la membrana basal en los tumores se asocia a un mayor potencial metastásico y por lo tanto a un peor pronóstico. En el ACP se ha observado ausencia o discontinuidad del colágeno tipo IV y de proteoglicanos, que sugiere un papel importante de las metaloproteasas (MMP, *Matrix metalloproteinases*) en la adquisición del fenotipo maligno (105).

Las MMP constituyen una familia de enzimas proteolíticas que tienen en común la degradación de un componente de la ME, que contienen un ión de zinc y que son secretadas inactivas como proenzimas que son activadas por la acción de otras proteasas. Las MMP son inhibidas específicamente por inhibidores tisulares de MMP. La actividad de las MMP sobre la ME depende del fino equilibrio entre los enzimas y sus inhibidores (105).

El activador tisular del plasminógeno (t-PA) y el activador tipo uroquinasa del plasminógeno (u-PA) convierten el plasminógeno en plasmina, forma activa, que a su vez actúa como un activador de muchas pro-MMP. Se ha detectado por IHQ expresión de t-PA en 16/17 ACP, mientras que está ausente en el páncreas normal y en la pancreatitis asociada a tumores. En este estudio también se describe una asociación significativa (p=0,04) entre la

expresión de t-PA y las mutaciones en el codón 12 de K-ras. Estos datos sugieren que la activación de t-PA puede ser un fenómeno asociado específicamente a la transformación y adquisición de un fenotipo invasivo (106).

III. CÁNCER DE PÁNCREAS HEREDITARIO

El cáncer de páncreas hereditario (CPH) comprende el 3-10% de todos los ACPs (107). Parte de los CPH están asociados a síndromes genéticos definidos, que pueden ser específicos de órgano, como la pancreatitis hereditaria, o síndromes asociados al desarrollo de tumores en múltiples localizaciones aparte del páncreas, como el FAMMM, HNPCC, el síndrome de Peutz-Jeghers o la ataxia telangiectasia.

FAMMM

El síndrome familiar de múltiples melanomas y lesiones pigmentadas atípicas (FAMMM, *Familial Atypical Mole-Malignant Melanoma*) presenta un patrón de herencia autosómico dominante y predispone a múltiples melanomas malignos. Se ha descrito que mutaciones en el gen p16^{CDKN2A/INK4a} en la línea germinal de pacientes con FAMMM. Predispone con un factor de riesgo de 13 al desarrollo de ACP (108, 109). Esto representa una clara evidencia del papel directo que juegan las alteraciones en p16 en el desarrollo del CPH.

HNPCC

El cáncer colorrectal hereditario no polipoide (HNPCC) es un síndrome heredado de forma autosómica dominante que predispone al cáncer de colon. Los genes responsables de este síndrome están ubicados en los cromosomas 2p y 3p. Mutaciones en estos genes incrementan el riesgo de desarrollar cánceres de mama, endometrio, ovario y páncreas. El HNPCC está asociado a errores en la replicación del ADN (65).

ATAXIA TELANGIECTASIA

Es un síndrome de carácter autosómico recesivo, cuyo gen responsable, ATM

(*Mutated in Ataxia Telangiectasia*), reside en el cromosoma 11q (22-23). Las alteraciones que afectan a este gen provocan deficiencia en la reparación del ADN, y por consiguiente, una predisposición a acumular daño genético. Heredar un alelo mutado de este gen predispone a diversos cánceres, además del ACP, como leucemias, cáncer de mama y cáncer gástrico.

SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHER'S

Es una alteración que se hereda de forma autosómica dominante y cuyo gen responsable, STK1, ha sido

recientemente localizado en 19p (110,111). Este síndrome predispone al desarrollo de tumores del tracto gastrointestinal. Giardiello y cols. en un estudio con 31 pacientes, con un seguimiento de 13 años, describe que 15 (48%) desarrollaron algún cáncer gastrointestinal, y que 4 de ellos eran ACP (112).

PANCREATITIS HEREDITARIA

Es una alteración de carácter autosómico dominante, relacionada con un gen que está localizado en la región cromosómica 7q35 (113). Los tumores asociados a este desorden ocurren en edades tardías y con una distribución similar a los ACPs esporádicos (107).

También se han reportado ACPs familiares no asociados a síndromes genéticos específicos. Se han descrito familias en las que tres generaciones se han visto afectadas por ACP. Lynch y cols. han revisado exhaustivamente estos *clusters* familiares, que muestran una edad de presentación comparable a la de los ACP esporádicos (114).

Otro aspecto de interés es la asociación entre ACP y cáncer de mama y ovario en misma familia. Tulinius y cols. determinaron un riesgo relativo de 1,66 de padecer ACP en familiares masculinos de primer grado de pacientes con cáncer de mama (115). Kerber y Slattery estimaron que un 4,8% de los cánceres de ovario se asociaban con una historia familiar de ACP (116). En estos casos podría haber una implicación del gen BRCA2 (117).

IV. ALTERACIONES GENÉTICAS EN LESIONES PRECURSORAS DEL ACP

El hallazgo de mutaciones en K-ras en 19 de 79 lesiones hiperplásicas, en 12 de 38 pacientes sin enfermedad en el páncreas (118), junto con los resultados obtenidos por Lüttges y cols. que encuentran mutaciones en K-ras en todos los tipos de lesiones pancreáticas y en el epitelio normal, sugiere que las células ductales pancreáticas son muy susceptibles a sufrir mutaciones en K-ras. Quizás sea debido a factores locales, pero también puede que sean necesarios eventos mutacionales adicionales para la progresión en la tumorigénesis pancreática. Las lesiones ductales que presentan mayor frecuencia de mutaciones son las de tipo celular con diferenciación mucinosa, lo cual parece conferir a estas mutaciones un papel promotor de este efecto (119).

V. PERSPECTIVAS

A pesar de que el conocimiento de las alteraciones genéticas del ACP ha aumentado rápidamente en los últimos años, todavía no estamos en condiciones de aplicar la información obtenida para mejorar el pronóstico de estos pacientes.

El conocimiento de las características biológicas del ACP nos permitirá el desarrollo de nuevas estrategias

terapéuticas que en combinación con las actuales (cirugía, radioterapia, quimioterapia), mejoren el pronóstico, actualmente tan nefasto, de esta neoplasia. Pueden ser terapias biológicas que utilicen como diana estas alteraciones, como por ejemplo, el empleo de inhibidores del enzima farnesil-transferasa, para bloquear el efecto de K-ras activado, o el tratamiento con anticuerpos anti-HER2/neu, o técnicas de transferencia génica con moléculas de ADN o ARN antisentido dirigidas a bloquear la acción de determinados oncogenes.

En este último caso, la introducción de una construcción antisentido del gen K-ras mediante transfección con liposomas, muestra resultados prometedores tanto *in vitro* como *in vivo* en esta neoplasia (121).

La prevención primaria y secundaria son también de vital importancia, particularmente en grupos de alto riesgo. En el ACP, se ha propuesto recientemente la utilización de técnicas como FISH, para el diagnóstico precoz, empleando sondas dirigidas contra alteraciones cromosómicas específicas (52,83).

El desarrollo de nuevas tecnologías, como la microdissección con láser *Laser Capture Microdissection*, que permite aislar poblaciones celulares puras por pequeñas que éstas sean, puede solventar el problema de la contaminación por células normales, un problema importante en el estudio molecular de esta neoplasia.

Asimismo, el desarrollo de metodologías más automatizadas nos permitirá lograr una mayor reproductibilidad de los resultados y una mejora en la calidad de la información procedente de los análisis moleculares.

ABREVIATURAS

ACP, adenocarcinoma de páncreas;
 AP-PCR (arbitrarily primed polymerase chain reaction), reacción en cadena de la polimerasa utilizando cebadores arbitrarios;
 ATM (mutated in ataxia telangiectasia), mutado en ataxia telangiectasia;
 CDK (cyclin dependent kinase), quinasa dependiente de ciclina;
 CDKN2A (cyclin dependent kinase inhibitor 2^a), inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2 A;
 CGH (comparative genomic hybridization), hibridación genómica comparativa;

DGGE (denaturing gel gradient electrophoresis), electroforesis en geles de gradiente desnaturizantes;

DPC4 (deleted in pancreatic cancer 4), eliminado en cáncer de páncreas 4;

EGF (epidermal growth factor), factor de crecimiento epidérmico;

FAMMM (familial atypical mole and multiple melanoma), síndrome familiar de lesiones pigmentadas atípicas y múltiples melanomas;

FGF (fibroblast growth factor), factor de crecimiento fibroblástico;

FGFR (fibroblast growth factor receptor), receptor del factor de crecimiento fibroblástico;

FHIT (fragile histidine triad);

FISH (fluorescent in situ hybridization), hibridación *in situ* fluorescente;

HGF (Hepatocyte growth factor), factor de crecimiento de hepatocitos;

HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer), cáncer colorrectal hereditario no polipoide;

INK4a (inhibitor kinase 4 a), inhibidor de quinasa 4 a;

IHQ, inmunohistoquímica;

LOH (loss of heterozygosity), pérdida de heterocigosidad;

MAD (mothers against decapentaplegic);

ME, matriz extracelular;

MMP (matrix metalloproteinases); metaloproteinasas de la matriz;

PCR (polymerase chain reaction), reacción en cadena de la polimerasa;

RB1, retinoblastoma 1;

RFLP (restriction fragment length polymorphisms), polimorfismos por fragmentos de restricción de longitud variable.

SSCP (single strand conformation polymorphisms), polimorfismos conformacionales de cadena sencilla;

TGF (Transforming growth factor), factor de crecimiento transformante;

tPA (tissue Plasminogen Activator), activador tisular del plasminógeno;

uPA (urokinase type Plasminogen activator), activador del plasminógeno del tipo uroquinasa;

uPAR (urokinase type Plasminogen activator Receptor), receptor del plasminógeno de tipo uroquinasa;

VNTR (variable number of tandem repeats), número variable de repeticiones en tándem.

BIBLIOGRAFÍA

- Boring CC, Squires TS, Tong T and Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 1994, 44: 7-26.
- Klöppel G. Pancreatic, non-endocrine tumors. En Klöppel G, Heitz P U, eds. *Pancreatic pathology*. Edinburg . Churchill Livingstone, 1984.
- Lillemoe KD. Current management of pancreatic carcinoma. *Ann surg* 1995, 221 (2): 133-148.
- Weiderpass E, Partanen T, Kaaks R, et al. Occurrence, trends and environment etiology of pancreatic cancer. *Scand J Work Environ Health* 1998, 24 (3): 165-174.
- Reyes G, Villanueva A, García C, et al. Orthotopic xenografts of human pancreatic carcinomas acquire genetic aberrations during dissemination in nude mice. *Cancer Res* 1996, 56: 5713-5719.
- Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987, 56: 779-827.
- Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988, 53: 549-554.
- Malats N, Porta M, Corominas J M, et al. Ki-ras mutations in exocrine pancreatic cancer: association with clinico-pathological characteristics and with tobacco and alcohol consumption. PANK-ras I Project Investigators. *Int J Cancer* 1997, 70 (6): 661-667.

9. Smit VT, Boot AJ, Smits AM, et al. K-ras codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988, 16: 7773-7782.
10. Berrozpe G, Schaeffer J, Peinado MA, et al. Comparative analysis of mutations in the p53 and K-ras genes in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 1994, 58: 185-191.
11. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 1993, 143: 545-554.
12. Grünwald K, Lyons J, Frohlich A, et al. High frequency of Ki-ras codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 1989, 43:1037-1041.
13. Scarpa A, Capelli P, Villanueva A, et al. Pancreatic cancer in Europe: Ki-ras mutation pattern shows geographical differences. *Int J Cancer* 1994, 57: 167-171.
14. Finkelstein SD, Przygodzki R, Pricolo VE, et al. K-ras-2 topographic genotyping of pancreatic adenocarcinoma. *Arch Surg* 1994, 129: 367-372.
15. Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, et al. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994, 54: 3568-3573.
16. Shibata D, Schaeffer J, Li Z H, et al. Genetic heterogeneity of the c-K-ras locus in colorectal adenomas but not in adenocarcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1993, 85: 1058-1063.
17. Goggins M, Offerhaus J A, Hilgers W, et al. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. *Am J Pathol* 1998, 152: 1501-1507.
18. Porta M, Malats N, Guarner L, et al, for the PANKRAS II Study Group. Association between coffee drinking and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. *J Epidemiol Community Health* 1999 (in press).
19. Porta M, Malats N, Rifá J, et al, for the PANKRAS II Study Group. Serum organochlorine levels and K-ras mutations in exocrine pancreatic cancer. Enviado 1999.
20. Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev* 1990, 1: 1-8.
21. Greenblatt M, Bennett W, Holstein M, Hards C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994, 54: 4855-4878.
22. Battifora H. P53 immunohistochemistry: A word of caution. *Human Pathol* 1994, 25: 435-437.
23. Hall PA, Lane DP. P53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? - revisited! *J Pathol* 1994, 172: 1-4.
24. Kennedy SM, McGeogh C, Jaffe R, et al. Overexpression of the oncoprotein p53 in primary hepatic tumors of childhood does not correlate with gene mutations. *Hum Pathol* 1994, 25:438-442.
25. Scarpa A, Capelli P, Mukai K, et al. Pancreatic adenocarcinomas frequently show p53 gene mutations. *Am J Pathol* 1993, 142: 1534-1543.
26. Rall ChJ, Yan YX, Graeme-Cook F, et al. Ki-ras and p53 mutations in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 1996, 12 (1): 10-17.
27. Barton CM, Staddon SL, Huahes CM, et al. Abnormalities of the p53 tumour suppressor gene in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 1991, 64: 1076-1082.
28. Ruggeri B, Zhang SY, Caamano J, et al. Human pancreatic carcinomas and cell lines reveal frequent and multiple alteration in the Rb-1 tumor-suppressor genes. *Oncogene* 1992, 7: 1503-1511.
29. Kalthoff H., Schmiegel W, Roeder C, et al. P53 and K-RAS alterations in pancreatic epithelial cell lesions. *Oncogene* 1993, 8:289-298.
30. Boschman CR, Stryker S, Reddy JK, Rao MS. Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. *Am J Pathol* 1994, 145: 1291-1295.
31. Redston MS, Caldas C, Seymour AB, et al. P53 mutations in pancreatic carcinoma and evidence of common involvement of homopolymer tracts in DNA microdeletions. *Cancer Res* 1994, 54: 3025-3033.
32. Li Y, Bhuiyan M, Vaitkevicius VK, Sarkar FH. Molecular analysis of the p53 gene in pancreatic adenocarcinoma. *Diagn Mol Pathol* 1998, 7(1): 4-9.
33. Hoshi T, Imai M, Ogawa K, et al. Frequent K-ras mutations and absence of p53 mutations in mucin-producing tumors of the pancreas. *J Surg Oncol* 1994, 55:84-91.
34. Weyrer K, Feichtinger H, Haun M, et al. P53, Ki-ras, and DNA ploidy in human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Lab Invest* 1996, 74: 279-289.
35. Serrano M, Hannon CJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993, 366: 704-707.
36. Serrano M. The tumor suppressor protein p16INK4a. *Exp Cell Res* 1997, 237: 7-13.
37. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994, 264: 436-440.
38. Nobori T, Miura K, Wu DJ, et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994, 368: 753-756.
39. Schutte M, Hruban RH, Geradts J, et al. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1997, 57: 3126-3130.
40. Caldas C, Hahn SA, da Costa LT, et al. Frequent somatic mutations and homozygous deletions of the p16 (MTS1) gene in pancreatic adenocarcinoma. *Nat Genet* 1994, 8: 27-32.
41. Bartsch D, Shevlin DW, Tung WS, et al. Frequent mutations of CDKN2 in primary pancreatic adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1995, 14(3): 189-195.
42. Huang L, Goodrow TL, Zhang SY, et al. Deletion and mutation analyses of the p16/MTS-1 tumor suppressor gene in human ductal pancreatic cancer reveals a higher frequency of abnormalities in tumor-derived cell lines than in primary ductal adenocarcinomas. *Cancer Res* 1996, 56: 1137-1141.
43. Hu YX, Watanabe H, Ohtsubo K, et al. Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997, 3 (9): 1473-1477.
44. Moskaluk Ch A, Hruban R H, Kern S E. P16 and K-ras gene mutations in the intraductal precursors of human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1997, 57: 2140-2143.
45. Stott F J, Bates S, James M C, et al. The alternative product from the human CDKN2a locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998, 17: 5001-5014.
46. Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, Sherr CJ. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 1995, 83: 993-1000.
47. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois N J, et al. The INK4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 1998, 92: 713-723.
48. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998, 92: 725-734.
49. Quelle DE, Cheng N, Ashmun RA, Sherr CJ. Cancer-associated mutations at the INK4a locus cancel cell cycle arrest by p16 (INK4a) but not by the alternative reading frame protein p19 (ARF). *Proc Nat Acad Sci* 1997, 94: 669-673.
50. Hahn SA, Schutte M, Shamsul Hoque AT, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 1996, 271: 350-354.
51. Derynck R, Gelbart WN, Harland RM, et al. Nomenclature: vertebrate mediators of TGF-beta family signals. (Letter) *Cell* 1996, 87: 173.
52. Fukushima S, Furukawa T, Satoh K, et al. Loss of chromosome 18q is an early event in pancreatic ductal tumorigenesis. *Cancer Res* 1998, 58: 4222-4226.
53. Shioda T, Lechleider RJ, Dunwoodie SL, et al. Transcriptional activating activity of Smad4: roles of SMAD hetero-oligomerization and enhancement by an associating transactivator. *Proc Nat Acad Sci* 1998, 95: 9785-9790.
54. Sutherland GR, Baker E, Richards RI. Fragile sites still breaking. *Trends Genet* 1998, 14 (12): 501-506.

55. Shridhar R, Shridhar V, Wang X, et al. Frequent breakpoints in the 3p14.2 fragile site, FRA3B, in pancreatic tumors. *Cancer Res* 1996, 56: 4347-4350.
56. Simon B, Bartsch D, Barth P, et al. Frequent abnormalities of the putative tumor suppressor gene FHIT at 3p14.2 in pancreatic carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1998, 58: 1583-1587.
57. Sorio C, Baron A, Orlandini S, et al. The FHIT gene is expressed in pancreatic ductular cells and is altered in pancreatic cancers. *Cancer Res* 1999, 59 (6): 1308-1314.
58. Graña X, Reddy EP. Cell cycle control in mammalian cells: role of cyclins, cyclin-dependent kinases (CDKs), growth suppressor genes and cyclin-dependent kinase inhibitors. *Oncogene* 1995, 11:211-219.
59. Seymour AB, Hruban RH, Redston M, et al. Allelotype of pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 1994, 54: 2761-2764.
60. Barton CM, McKie AB, Hogg B, et al. Abnormalities of the RB1 and DCC tumor suppressor genes: uncommon in pancreatic adenocarcinoma. *Mol Carcinog* 1995, 13: 61-69.
61. Huang L, Lang D, Geradts J, et al. Molecular and immunohistochemical analyses of RB1 and cyclin D1 in human ductal pancreatic carcinomas and cell lines. *Mol Carcinog* 1996, 15: 85-95.
62. Schutte M, da Costa LT, Hahn SA, et al. Identification by representational differential analysis of a homozygous deletion in pancreatic carcinoma that lies within the BRCA2 region. *Proc Nat Acad Sci* 1995, 92: 5950-5954.
63. Goggins M, Schutte M, Lu J, et al. Germline BRCA2 gene mutations in patients with apparently sporadic pancreatic carcinomas. *Cancer Res* 1996, 56: 5360-5364.
64. Katagiri T, Nakamura Y, Miki Y. Mutations in the BRCA2 gene in hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 1996, 56: 4575-4577.
65. Prolla TA. DNA mismatch repair and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 1998, 10: 311-316.
66. Han HJ, Yanagisawa YK, Kato Y. Genetic instability in pancreatic cancer and poorly differentiated type of gastric cancer. *Cancer Res* 1993, 53: 5087-5089.
67. Brentnall T, Chen R, Lee J, et al. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis. *Cancer Res* 1995, 55: 4264-4267.
68. Weger AR, Falkmer UG, Schwab G, et al. Nuclear DNA distribution pattern of the parenchymal cells in adenocarcinomas of the pancreas and in chronic pancreatitis. *Gastroenterology* 1990, 99: 237-242.
69. Porschen R, Remy U, Bevers G, et al. Prognostic significance of DNA ploidy in adenocarcinoma of the pancreas. A flow cytometric study of paraffin-embedded specimens. *Cancer* 1993, 71 (12): 3846-3850.
70. Arribas R, Risques RA, Gonzalez-Garcia I, et al. Tracking recurrent quantitative genomic alterations in colorectal cancer: allelic losses in chromosome 4 correlate with tumor aggressiveness. *Lab Invest* 1999, 79 (2): 111-122.
71. Wilkens L, Tchinda J, Burkhardt D, et al. Analysis of hematologic diseases using conventional karyotyping, fluorescence in situ hybridization (FISH), and comparative genomic hybridization (CGH). *Hum Pathol* 1998, 29 (8): 833-839.
72. Johansson B, Bardi G, Pandis N, et al. Karyotypic pattern of pancreatic adenocarcinomas correlates with survival and tumor grade. *Int J Cancer* 1994, 58: 8-13.
73. Kimura M, Furukawa T, Abe T, et al. Identification of two common regions of allelic loss in chromosome arm 12q in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1998, 58: 2456-2460.
74. Bardi G, Johansson B, Pandis N. Karyotypic abnormalities in tumours of the pancreas. *Br J Cancer* 1993, 67: 1106-1112.
75. Johansson B, Bardi G, Heim S. Nonrandom chromosomal rearrangements in pancreatic carcinomas. *Cancer* 1992, 69: 1674-1681.
76. Griffin CA, Hruban R, Long PP. Chromosome abnormalities in pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1994, 9: 93-100.
77. Griffin CA, Hruban RH, Morsberger LA, et al. Consistent chromosome abnormalities in adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Res* 1995, 55: 2394-2399.
78. Fukushige S, Waldman F M, Kimura M, et al. Frequent gain of copy number on the long arm of chromosome 20 in human pancreatic adenocarcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 19: 161-169.
79. Mahlamäki EH, Höglund M, Gorunova L, et al. Comparative genomic hybridization reveals frequent gains of 20q, 8q, 11q, 12p, and 17q, and losses of 18q, 9p, and 15q in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 1997, 20: 383-391.
80. Gorunova L, Höglund M, Andren-Sandberg A, et al. Cytogenetic analysis of pancreatic carcinoma: intratumor heterogeneity and nonrandom pattern of chromosome aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* 1998, 23 (2): 81-99.
81. Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, et al. The expression of tumorigenicity in human melanoma cell lines in controlled by the introduction of human chromosome 6. *Science (Washington DC)* 1990, 247:568-571.
82. Volkan Adsay N, Dergham S, Koppitch F, et al. Utility of fluorescence in situ hybridization in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 1999, 2: 111-116.
83. van Dekken H, Rosenberg C, Krijtenburg PJ, Alers JC. Interphase cytogenetics and comparative genomic hybridization of human epithelial cancers and precursor lesions. *Histochem Cell Biol* 1997, 108 (4-5): 419-430.
84. Curtis LJ, Li Y, Gerbault-Seureau M, et al. Amplification of DNA sequences from chromosomes 19q13.1 in human pancreatic cell lines. *Genomics* 1998, 53 (1): 42-55.
85. Miwa W, Yasuda J, Murakami Y, et al. Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-13.2 including the AKT2 locus in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1996, 225: 968-974.
86. Cheng J Q, Ruggery B, Klein W N, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cancer cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Nat Acad Sci* 1996, 93: 3636-3641.
87. Ferbus D, Flechon A, Muleris M, et al. Amplification and overexpression of OZF, a gene encoding a zinc finger protein, in human pancreatic carcinomas. *Int J Cancer* 1999, 80: 369-372.
88. Wallrapp C, Müller-Pillasch F, Solinas-Toldo S, et al. Characterization of a high copy number amplification at 6q24 in pancreatic cancer identifies c-myc as a candidate oncogene. *Cancer Res* 1997, 57: 3135-3139.
89. Hiyama E, Kodama T, Shinbara K, et al. Telomerase activity is detected in pancreatic cancer but not in benign tumors. *Cancer Res* 1997, 57: 326-331.
90. Gansauge S, Gansauge F, Ramadani M, et al. Overexpression of cyclin D1 in human pancreatic carcinoma is associated with poor prognosis. *Cancer Res* 1997, 57: 1634-1637.
91. Hall M, Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin dependent kinases, and cdk inhibitors in human cancer. *Adv Cancer Res* 1996;68:67-108.
92. Lemoine NR, Hughes CM, Barton CM, et al. The epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1992, 166 (1): 7-12.
93. Barton CM, Hall PA, Hughes CM, et al. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1991, 163 (2): 111-116.
94. Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, et al. Cripto, a member of the epidermal growth factor family is over-expressed in human pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Int J Cancer* 1994, 56: 668-674.
95. Hall PA, Hughes CM, Staddon SL, et al. The c-erbB2 proto-oncogene in human pancreatic cancer. *J Pathol* 1990, 161 (3): 195-200.
96. Yamanaka Y, Friess EH, Kobrin MS, et al. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. *Hum Pathol* 1993, 24:1127-1134.
97. Day J, Digiuseppe J, Yeo Ch, et al. Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms. *Hum Pathol* 1996, 27: 119-124.
98. Dugan M, Dergham S, Kucway R, et al. HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma: relation to tumor differentiation and survival. *Pancreas* 1997, 14: 229-236.
99. Friess H, Yamanaka Y, Kobrin M.S, et al. Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. *Clin Cancer Res* 1995, 1 (11): 1413-1420.
100. Vilá M R, Nakamura T, Real F X. Hepatocyte growth factor is a potent mitogen for normal human pancreas cells in vitro. *Lab*

- Invest 1995, 73: 409-418.
101. Paciucci R, Vilá M R, Adell T, et al. Activation of the urokinase Plasminogen Activator/urokinase Plasminogen Activator Receptor system and redistribution of E-Cadherin are associated with hepatocyte growth factor-induced motility of pancreas tumor cells overexpressing Met. *Am J Pathol* 1998, 153: 201-212.
 102. Kornmann M, Beger HG, Korc M. Role of Fibroblast growth factors and their receptors in pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Pancreas* 1998, 17 (2): 169-175.
 103. Bergmann U, Funatomi H, Yokoyama M, et al. Insulin-like Growth Factor I overexpression in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine roles. *Cancer Res* 1995, 55: 2007-2011.
 104. Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology* 1993, 105:1846-1856.
 105. Bramhall SR. The Matrix Metalloproteinases and their inhibitors in pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 1997, 21 (1): 1-12.
 106. Paciucci R, Torà M, Díaz VM, Real FX. The plasminogen activator system in pancreas cancer: role of t-PA in the invasive potential in vitro. *Oncogene* 1998, 16 (5): 625-633.
 107. Mangray S, King T. Molecular pathobiology of pancreatic adenocarcinoma. *Front Biosci* 1998, 3: 1148-1160.
 108. Goldstein A, Fraser M, Struwing J, et al. Increased risk of pancreatic cancer in melanoma prone kindreds with p16INK4a mutations. *N Engl J Med* 1995, 333: 970-974.
 109. Whelan A, Bartsch D, Goodfellow P. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1995, 333: 975-977.
 110. Hemminki A, Tomlinson I, Markie D, et al. Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. *Nat Genet* 1997, 15(1): 87-90.
 111. Jenne DE, Reimann H, Nezu J, et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet* 1998, 18 (1): 38-43.
 112. Giardiello F, Welsh S, Hamilton S, et al. Increased risk of cancer in the Peutz-Jeghers syndrome. *N Engl J Med* 1987, 316: 1511-1514.
 113. Whitcomb D, Preston R, Aston C H, et al. A gene for hereditary pancreatitis maps to chromosome 7q35. *Gastroenterology* 1996, 110: 1975-1980.
 114. Lynch HT, Smyrk T, Kern SE, et al. Familial pancreatic cancer: a review. *Semin Oncol* 1996, 23 (2): 251-275.
 115. Tulinius H, Olafsdottir GH, Sigvaldason GH, et al. Neoplastic diseases in families of breast cancer patients. *J Med Genet* 1994, 31: 618-621.
 116. Kerber R, Slatery M. The impact of family history on ovarian cancer risk. *Arch Intern Med* 1995, 155: 905-912.
 117. Schubert EL, Lee MK, Mefford HC, et al. BRCA2 in American families with four or more cases of breast or ovarian cancer: recurrent and novel mutations, variable expression, penetrance, and the possibility of families whose cancer is not attributable to BRCA1 or BRCA2. *Am J Hum Genet* 1997, 60 (5): 1013-1020.
 118. Tada M, Ohashi M, Shiratori Y, et al. Analysis of K-ras gene mutations in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 1996, 110: 227-231.
 119. Lütgges J, Schelehe B, Menke MA, et al. The K-ras mutation pattern in pancreatic ductal adenocarcinoma usually is identical to that in associated normal, hyperplastic, and metaplastic ductal epithelium. *Cancer* 1999;85:1703-1710.
 120. Knuutila S, Bjorkqvist AM, Autio K, et al. DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomics hybridization studies. *Am J Pathol* 1998, 152 (5): 1107-1123.
 121. Aoki K, Yoshida T, Sugimura T, Terada M. Liposome-mediated in vivo gene transfer of antisense K-ras construct inhibits pancreatic tumors dissemination in the murine peritoneal cavity. *Cancer Res* 1995, 55: 3810-3816.