

Alteraciones genéticas en las neoplasias hematológicas de origen linfóide: implicaciones en la práctica clínica

Genetic alterations in hematological neoplasias of lymphoid origin: implications for clinical practice

J.L. Vizmanos, X. Agirre, M.J. Calasanz, M. García, F.J. Novo

RESUMEN

La mejora de las técnicas de citogenética convencional, el desarrollo de la citogenética molecular y la aplicación de técnicas de biología molecular al análisis genético ha conducido a una verdadera revolución en el conocimiento de los procesos implicados en el desarrollo y progresión de las neoplasias linfoides. De esta manera, se han caracterizado gran parte de las alteraciones presentes en las células malignas estableciendo cuáles son los genes implicados en el proceso transformativo. Esto tiene importantes consecuencias en el manejo clínico de este tipo de enfermedades y permite un diagnóstico más exacto a través de una sistematización de las distintas entidades basada en sus características biológicas. Por otra parte, la introducción de nuevas técnicas de análisis, como la PCR en tiempo real, posibilitará la monitorización cuantitativa de la enfermedad permitiendo valorar la respuesta a los distintos tratamientos y estableciendo valores predictivos de recaídas. En el futuro, todo este conocimiento permitirá el establecimiento de terapias genotipo-específicas y el desarrollo de nuevos fármacos dirigidos a la alteración causante del proceso maligno y con menores efectos colaterales indeseables.

Palabras clave: Leucemias. Linfomas. Neoplasias.

ABSTRACT

The improvement of the conventional cytogenetic techniques, the development of molecular cytogenetics and the application of techniques of molecular biology to genetic analysis have led to an authentic revolution in the knowledge of the processes implied in the development and progression of lymphoid neoplasias. In this way, a great part of the alterations present in malign cells have been characterised, and the genes involved in the transformative process have been established. This has important consequences for the clinical handling of this type of disease and makes possible a more exact diagnosis through a systematisation of the different entities based on their biological characteristics. On the other hand, the introduction of new techniques of analysis, such as real time PCR, will make it possible to monitor the disease quantitatively, making it possible to evaluate response to the different treatments and to establish predictive values for relapses. In the future, all of this knowledge will make it possible to establish genotype-specific therapies and to develop new medicines aimed at the alteration responsible for the malignant process and with less undesired collateral effects.

Key words: Leukaemias. Lymphomas. Neoplasias.

ANALES Sis San Navarra 2000; 23 (3): 451-465.

Departamento de Genética. Facultad de Ciencias. Universidad de Navarra. Pamplona

Aceptado para su publicación el 6 de septiembre de 2000.

Correspondencia

José Luis Vizmanos Pérez
Departamento de Genética
Facultad de Ciencias
Universidad de Navarra
C/ Irunlarrea, s/n
31080 Pamplona
Fax 948 425649
E-mail: jlvizmanos@unav.es

INTRODUCCIÓN

Las neoplasias hematológicas son procesos malignos que afectan a los diversos tipos celulares implicados en el sistema hematopoyético. Dentro de ellas, las neoplasias linfoides afectan a los distintos tipos celulares y grados madurativos que conforman la línea linfoide tanto B como T. Este tipo de enfermedades es, por tanto, un grupo muy heterogéneo que sólo tiene en común el origen del tipo celular transformado. Dentro de ellas, clásicamente, se han diferenciado de manera arbitraria las leucemias de los linfomas señalando a las leucemias como aquellas neoplasias que afectan a la médula ósea con expresión periférica y a los linfomas como aquellas neoplasias que permanecen localizadas en los ganglios linfáticos u otros tejidos linfoides y que carecen, al menos de manera inicial, de comportamiento leucémico. En el caso de las leucemias, asimismo, se han diferenciado los procesos agudos de los crónicos en base a las características citológicas de las células proliferantes (inmaduras y atípicas en el primer caso y más diferenciadas en el segundo). De esta forma, las neoplasias linfoides se clasificarían en leucemias y linfomas, dividiéndose las primeras en leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y síndromes linfoproliferativos crónicos (SLP) y los segundos en linfomas Hodgkin (LH) y no-Hodgkin (LNH). Actualmente este modelo de clasificación, ambiguo y con grupos muy heterogéneos, está sometido, como veremos más adelante, a una intensa revisión.

LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN LAS NEOPLASIAS LINFOIDES

Los procesos neoplásicos son el resultado de la expansión de poblaciones celulares clonales capaces de proliferar de manera indefinida y de escapar al control defensivo del hospedador. Para llevar a cabo esta transformación, las células han debido sufrir una serie de lesiones genéticas que tienen como consecuencia la desregulación de las vías de control del ciclo celular. La caracterización de este tipo de lesiones está permitiendo un considerable avance en la comprensión de los mecanismos que conducen a esta transformación, con reper-

cusiones importantes tanto en su diagnóstico y pronóstico como en su tratamiento y seguimiento. Estas lesiones son fundamentalmente de dos tipos: activación de proto-oncogenes (que promoverán la proliferación celular) e inactivación de genes supresores de tumores (cuya pérdida de función lleva a la pérdida de control de la proliferación)¹. Ambos tipos de lesiones pueden surgir por diferentes mecanismos: reordenaciones de material genético, mutaciones puntuales y/o pérdidas de todo o gran parte del gen. Es importante tener en cuenta que ninguna alteración genética aparece en todos los casos de una determinada neoplasia (a no ser que se clasifique precisamente por poseer esa alteración) y que rara vez una alteración es exclusiva de una entidad determinada, aunque pueda existir una cierta asociación.

Las neoplasias linfoides presentan unos procesos oncogénicos muy similares al resto pero además, y como característica especial, están sujetas a errores en los procesos de recombinación V-(D)-J de los *loci IG* para la formación de las inmunoglobulinas y en los *loci TCR (T-Cell Receptor)* para la formación de los receptores de células T². Esta recombinación es un tipo de inestabilidad genómica fisiológica que, como veremos más adelante, permite estudiar la clonalidad, definir el linaje celular afectado, su estadio madurativo³ y la monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR)⁴.

Las alteraciones genéticas pueden ser observables a nivel citogenético o no. En el primero de los casos implicaría una afectación de segmentos cromosómicos grandes y en el segundo de ellos deberían recurrirse a técnicas de biología molecular para ponerlas de manifiesto. Estas técnicas han sido capaces también de identificar el sustrato molecular de gran parte de las anomalías citogenéticas permitiendo la caracterización de nuevos genes implicados en el proceso transformativo.

Las reordenaciones cromosómicas observadas presentan consecuencias de dos tipos: cualitativas y cuantitativas. Las primeras son debidas a la formación de un gen de fusión híbrido con segmentos pertenecientes a dos genes diferentes (Fig. 1)

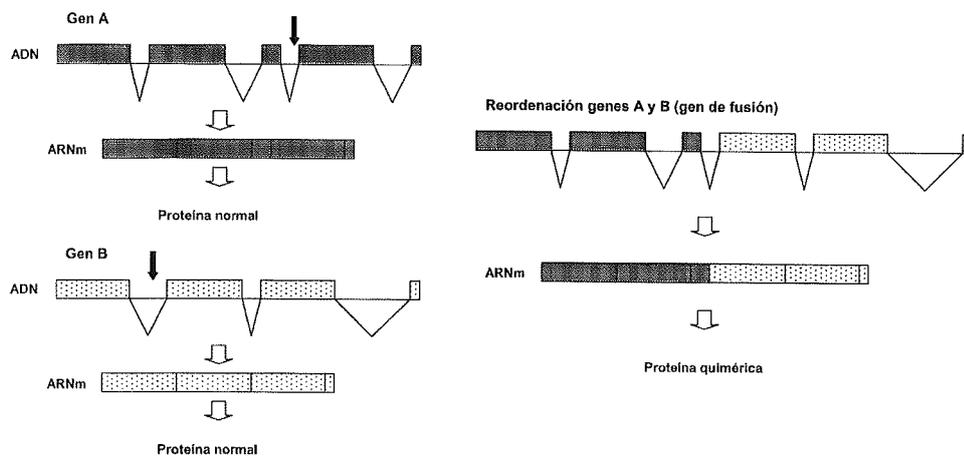


Figura 1. Mecanismo de formación de un gen de fusión y la posterior expresión de una proteína quimérica como consecuencia de una translocación cromosómica.

que, dependiendo de los dominios que conserve de cada uno, podría mantener propiedades de ambos. Así, este nuevo gen dará lugar a una proteína quimérica con posibles propiedades oncogénicas o a la pérdida de su función reguladora. Son ejemplos de este mecanismo las proteínas formadas por la $t(9;22)(q34;q11)$, que genera un gen híbrido *BCR/ABL* presente en el 5 y 20 % de las LLA infantiles y de adulto respectivamente, y por la $t(12;21)(p13;q22)$ que genera un gen híbrido *TEL/AML1* y que se encuentra en aproximadamente la cuarta parte de las LLA infantiles⁵. En la tabla 1 se muestran otros ejemplos.

Las consecuencias cuantitativas hacen referencia a los procesos de activación génica en los que un gen de presumible actividad oncogénica se pone bajo el control de los promotores de ciertos *loci*, dando como resultado un cambio importante en su nivel de expresión. En este tipo de neoplasias suelen estar involucrados los promotores de los *loci IG/TCR* (muy activos en los tipos celulares afectados) que llevan a cabo un proceso de reordenación fisiológica. Ésta, a pesar de no ser oncogénica *per se*, podría contribuir a las alteraciones genéticas causantes de la

transformación maligna ya que requiere la rotura física y posterior reparación del ADN⁶. En las neoplasias de linaje B las translocaciones asociadas a los genes *IG* afectan fundamentalmente al *locus IGH* (cadena pesada) en 14q32 y más rara vez a los *loci IGκ* e *IGλ* (cadenas ligeras) situados en 2p12 y 22q11 respectivamente. En la mayoría de las translocaciones de interés diagnóstico en los LNH de células B está involucrado el *locus IGH* (Tabla 1) y un ejemplo sería la $t(14;18)(q32;q21)$ que sitúa al oncogén *BCL2* bajo el control de expresión del *locus IGH*, encontrada en 70-85 % de los Linfomas Foliculares de células B. Por el contrario, este tipo de alteración es infrecuente en las LLA de células B quedando restringida a la $t(8;14)(q24;q32)$ *c-MYC/IGH* y a la $t(5;14)(q31;q32)$ *IL3/IGH*. En las neoplasias de linaje T este tipo de translocación afecta al *locus TCRα/δ* en 14q11 y más rara vez a los *loci TCRβ* (en 7q35) y *TCRγ* (en 7p15) (Tabla 1)⁴. Estas alteraciones son más frecuentes en las LLA de células T que en las de células B, ya que representan la mayor parte de las alteraciones caracterizadas molecularmente. Sin embargo no está claro si estas diferencias son debidas a la orientación de los análisis o a los mecanismos oncogénicos reales.

Tabla 1. Ejemplo de traslocaciones cromosómicas recurrentes y los genes implicados observadas en algunas neoplasias de origen linfoide.

Enfermedad	Genes implicados		Translocación
LLA-B	<i>BCR</i>	<i>ABL</i>	t(9;22)(q34;q11)
	<i>c-MYC</i>	<i>IGH</i>	t(8;14)(q24;q32)
	<i>E2A</i>	<i>PBX1</i>	t(1;19)(q23;p13)
	<i>E2A</i>	<i>HLF</i>	t(17;19)(q22;p13)
	<i>IL3</i>	<i>IGH</i>	t(5;14)(q31;q32)
	<i>MLL</i>	<i>AFIP</i>	t(1;11)(p32;q23)
	<i>MLL</i>	<i>AF4</i>	t(4;11)(q21;q23)
	<i>MLL</i>	<i>AF9</i>	t(9;11)(p22;q23)
	<i>MLL</i>	<i>ENL</i>	t(11;19)(q23;p13)
	<i>TEL</i>	<i>AML1</i>	t(12;21)(p13;q22)
LLA-T	<i>c-MYC</i>	<i>TCRα/δ</i>	t(8;14)(q24;q11)
	<i>HOX11</i>	<i>TCRα/δ</i>	t(10;14)(q24;q11)
	<i>LMO1</i>	<i>TCRα/δ</i>	t(11;14)(p15;q11)
	<i>LMO2</i>	<i>TCRα/δ</i>	t(11;14)(p13;q11)
	<i>SIL</i>	<i>TAL1</i>	Normal 1p32
	<i>TAL1</i>	<i>TCRa/d</i>	t(1;14)(p32;q11)
	<i>TCL7</i>	<i>TCRα/δ</i>	inv(14)(q11;q32)
LNH/leucemias maduras	<i>BCL1</i>	<i>IGH</i>	t(11;14)(q13;q32)
	<i>BCL2</i>	<i>IGH</i>	t(14;18)(q32;q21)
	<i>BCL3</i>	<i>IGH</i>	t(14;19)(q32;q13)
	<i>BCL6</i>	<i>IGH</i>	t(3;14)(q27;q32)
	<i>c-MYC</i>	<i>IGH</i>	t(8;14)(q24;q32)
	<i>NPM</i>	<i>ALK</i>	t(2;5)(p23;q35)
	<i>PAX5</i>	<i>IGH</i>	t(9;14)(p13;q32)
	<i>TCL1</i>	<i>TCRα/δ</i>	inv(14)(q11;q32)
			t(14;14)(q11;q32)
MM	<i>FGFR3</i>	<i>IGH</i>	t(4;14)(p16;q32)
	<i>MUM1/IRF4</i>	<i>IGH</i>	t(6;14)(p25;q32)
	<i>c-MAF</i>	<i>IGH</i>	t(14;16)(q32;q23)
	<i>CCND1</i>	<i>IGH</i>	t(11;14)(q13;q32)
	<i>c-MYC</i>	<i>IGH</i>	t(8;14)(q24;q32)
	<i>MUM2</i>	<i>IGH</i>	t(1;14)(q21;q32)
	<i>MUM3</i>	<i>IGH</i>	t(1;14)(q21;q32)

LLA-B: Leucemia Linfoblástica Aguda de tipo B; LLA-T: Leucemia Linfoblástica Aguda de tipo T; LNH: Linfoma no-Hodgkin; MM: Mieloma Múltiple.

El análisis citogenético también pone de manifiesto otro tipo de alteraciones cromosómicas como hiperdiploidías, hipodiploidías, deleciones de ciertos segmentos cromosómicos, isocromosomas (cromosomas con ambos brazos iguales), trisomías, duplicaciones y cromosomas denominados marcadores (de origen desconocido). Algunas de estas alteraciones presentan cierta significación clínica y aparecen en pacientes de mayor edad, o con neoplasias secundarias e indican progresión de la enfermedad (Tabla 2). Ninguna de ellas, a pesar de que son sucesos no aleatorios, se ha mostrado específicamente implicada en la leuquemogénesis aunque algunas pare-

cen implicadas en la pérdida de función de genes supresores tumorales que pueden conducir a la progresión de la neoplasia¹.

Además de las alteraciones cromosómicas descritas, en su mayor parte detectables en el cariotipo, se han descrito alteraciones en genes supresores tumorales sólo detectables mediante técnicas de análisis molecular. Éstas pueden tener importancia tanto en el origen del proceso neoplásico como en su progresión. Así se han descrito alteraciones en genes implicados en dos vías reguladoras de la transición G₁/S del ciclo: la vía *p53* y la vía *Rb*. En la primera, además del gen *TP53* están implicados los genes *P21* (también llamado

Tabla 2. Ejemplo de alteraciones genéticas observadas en los Linfomas no-Hodgkin (LNH) con significación clínica.

LNH de bajo grado	
t(14;18)	pronóstico favorable
t(14;18),+7	transformación a alto grado
t(14;18),+7,1p32-36, del (6q21-25)	menor supervivencia post-tratamiento
17p	menor supervivencia post-tratamiento
t(8;14)	igual supervivencia que otros LNH de bajo grado
t(9;14)	rasgos plasmocitoides, progresión clínica e histológica
mutaciones en TP53	predictivo de transformación
LNH de grados intermedio y alto	
Cariotipo complejo*	menor supervivencia post-tratamiento
1q21-23,+5,+6,+18	menor supervivencia post-tratamiento
17p	menor supervivencia post-tratamiento
t(8;14)	igual supervivencia que otros LNH de grado intermedio
t(14;18)	probable historia de bajo grado, período de remisión menor
t(2;5)	fenotipo T, menor edad, afectación piel, mayor supervivencia
+3,dup(3p)	pronóstico favorable

*con más de 4 alteraciones cromosómicas.

WAF1, *CIP1* o *CDKN1A*), *P27* (*KIP1*, *CDKN1B* o *CDKN4*) y *P57* (*KIP2* o *CDKN1C*). En la segunda de las vías, además del *RB* se encuentran implicados los genes *P16* (*INK4A* o *CDKN2A*), *P15* (*INK4B* o *CDKN2B*), *P18* (*INK4C* o *CDKN2C*) y *P19* (*INK4D* o *CDKN2D*).

En la primera vía el gen más importante es el *TP53*, situado en 17p13, cuya pérdida de función se ha observado en el 50% de los tumores sólidos. En las neoplasias hematológicas en general, las alteraciones que se han observado son mutaciones y/o pérdidas de alelos (generalmente mutación de uno de los alelos y pérdida del otro). Su incidencia varía de 2 a 50% en las distintas entidades y aumenta hasta 30-40% en las recaídas y en la progresión tumoral⁶⁷. Estas diferencias con los tumores sólidos en algunas de estas patologías pueden deberse tanto a la escasa sensibilidad de las técnicas utilizadas para el análisis, dado el tipo de muestra utilizada, como al estudio de sólo ciertas partes del gen. En cuanto a los genes *P21*, *P27* y *P57*, distintos estudios, tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas, han demostrado que las alteraciones en ellos son muy poco frecuentes⁸⁻¹⁰.

En cuanto a la vía *Rb*, se han encontrado deleciones homocigóticas del gen *RB* en el 5% de las leucemias y linfomas de células T de adultos¹¹ y una pérdida de la expresión de este gen en más de la mitad de las LLA¹² y en la cuarta parte de las LLC tanto en muestras al diagnóstico como en muestras de estadios más avanzados, lo que sugiere una asociación con el desarrollo de la neoplasia más que con su progresión¹¹. En cuanto al resto de los genes de esta vía, varios estudios han demostrado que las alteraciones de *P15* y *P16* son frecuentes en estas neoplasias y, por el contrario, las alteraciones en *P18* y *P19* son muy raras^{13,14}. La mayor frecuencia de alteraciones (pérdida de la expresión y deleciones hemi- y homocigóticas) de *P16* se ha observado en las LLA, siendo más frecuentes en las de tipo T que en las de tipo B. También se han encontrado mutaciones, aunque en muy baja proporción¹⁵ e inactivación por metilación de su promotor con una incidencia, de nuevo, muy variable en las distintas patologías (de 4 a 75%)¹⁴. La situación de *P15* en la misma región cromosómica que *P16* (9p21), hace que las deleciones de ambos genes a menudo se encuentren asociadas y presenten una frecuencia similar en las LLA

tanto T como B¹⁰. En el resto de entidades la frecuencia de estas alteraciones es menor y en la mayor parte de los casos se encuentran asociadas a las formas más agresivas. También se ha encontrado metilación de su promotor, como en *P16*, en casi la mitad de las LLA y linfomas de Burkitt analizados, y en menor proporción en el resto de patologías^{14,16}.

Otro gen supresor tumoral que se ha encontrado alterado en linfomas y leucemias de origen linfoide es *ATM*, localizado en el cromosoma 11q22-23. En LLC de tipo B se ha observado una disminución de la expresión de *ATM* en la tercera parte de los casos estudiados. Por otro lado en más de la mitad de los pacientes con Leucemia Prolinfocítica de células T se ha encontrado una pérdida de heterocigosidad^{17,18}. Un estudio realizado en doce pacientes con Linfoma de Células del Manto (LCM) ha encontrado en nueve de ellos ambos alelos *ATM* inactivados¹⁹. Estos resultados indican que este gen puede ser importante en el desarrollo de este tipo de neoplasias.

TÉCNICAS DE ANÁLISIS GENÉTICO

A continuación se describirán de manera somera las diversas técnicas de análisis citogenético y de biología molecular utilizadas para poner de manifiesto las distintas alteraciones. Lógicamente cada una presenta sus ventajas e inconvenientes y debe ser aplicada de manera adecuada y protocolizada en orden a obtener la mayor información posible para el adecuado manejo clínico de la enfermedad.

El análisis citogenético

El cariotipo de bandas G. Es la herramienta más utilizada de las que dispone la citogenética convencional. Este análisis permite la identificación de cada uno de los cromosomas por su patrón de bandas característico tras su tratamiento con tripsina y tinción con Giemsa poniendo de manifiesto cualquier tipo de alteración cromosómica, tanto numérica como estructural, en las metafases de las células neoplásicas²⁰. Sin embargo, requiere la obtención de células en mitosis y en el caso de algunas de estas neoplasias las

células tumorales presentan un índice mitótico escaso. Además su sensibilidad es limitada (se requiere la observación de las metafases una por una) y la resolución es baja (haciendo que alteraciones submicroscópicas pasen desapercibidas).

La citogenética molecular. Estas técnicas se basan en la hibridación de una sonda de ADN monocatenario (marcada con un compuesto fluorescente) sobre su secuencia complementaria en el genoma, bien en la metafase o en el núcleo en interfase. La más importante de todas ellas y de la que derivan las demás es la *Hibridación In Situ Fluorescente* o FISH (*Fluorescence In Situ Hybridisation*)²¹. La citogenética molecular puede poner de manifiesto cromosomas completos o secuencias específicas de ADN presentes en una o varias copias. Para ello se pueden utilizar sondas de ADN centroméricas (marcan únicamente los centrómeros), de *pintado* cromosómico (marcan todo un cromosoma) o de secuencias únicas (marcan regiones cromosómicas muy concretas). Frente al cariotipo convencional, el FISH realizado en interfases celulares presenta una mayor sensibilidad (ya que permite el análisis de grandes poblaciones celulares) y elimina la necesidad de obtención de metafases (eliminando la selección que pueda realizarse en el cultivo celular) pero, al igual que los análisis basados en la biología molecular, detecta únicamente la alteración específica que buscamos y no nos suministra información sobre otras alteraciones presentes en el genoma. Por todo ello esta técnica es un complemento adecuado en todas las situaciones en las que no ha sido posible realizar un cariotipo por disponer de metafases de poca calidad o no haberlas obtenido, o bien cuando éste ha resultado muy complejo y hay varios cromosomas con alteraciones tan complejas que incluso el citogenetista más experimentado es incapaz de resolver.

Para intentar solucionar la falta de información global del FISH se han desarrollado a partir de los años 90 dos nuevas técnicas de análisis, la *Hibridación Genómica Comparada* o CGH (*Comparative Genomic Hybridisation*)²² y el *Cariotipo Espectral* o SKY (*Spectral KarYotyping*)²³. La primera de ellas emplea todo el ADN del

tumor (es un método de análisis global) y no analiza metafases de éste (obviando la necesidad de células en crecimiento). Esta técnica se basa en la hibridación competitiva sobre cromosomas normales de dos ADNs (tumoral y normal) mezclados en cantidades equimolares y marcados con distintos fluorocromos (verde y rojo respectivamente) y será capaz de poner de manifiesto ganancias y pérdidas de regiones cromosómicas pero no de detectar reordenaciones o translocaciones equilibradas; sin embargo abre un futuro muy esperanzador en la búsqueda y caracterización de nuevos oncogenes (en zonas donde se detecten ganancias recurrentes) y genes supresores tumorales (en zonas donde se detecten pérdidas recurrentes) implicados en estos síndromes. Actualmente, la utilización del FISH y la CGH están bastante restringidas a los SLP crónicos, ya que en éstos el índice mitótico de las células tumorales es generalmente muy bajo.

La técnica de SKY es la consecuencia del desarrollo de nuevos fluorocromos y sistemas de análisis de imagen con el objetivo de caracterizar la mayor cantidad de alteraciones posibles en uno o muy pocos pasos. Esta técnica sólo se utiliza, de momento, como investigación debido a su elevado coste y se basa en marcar el ADN de cada cromosoma con uno o varios fluorocromos de manera que el espectro de emisión de cada uno de ellos sea único y diferenciable de los demás. El SKY requiere obtener metafases tumorales, pero permite observar cada cromosoma de un color. Por ello, es de gran utilidad en el caso de alteraciones complejas en las que se desconoce el origen del material reordenado, puesto que permite determinarlas de manera inequívoca.

El análisis molecular

La identificación y caracterización molecular de los genes implicados en las translocaciones cromosómicas recurrentes ha permitido la utilización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) para su análisis. Esta técnica se basa en la amplificación enzimática de manera exponencial

del segmento de ADN de interés hasta niveles que puedan ser detectados. La PCR analiza la alteración de manera directa lo que, como en el FISH, implica una importante especificidad y sensibilidad y es particularmente útil en los casos en los que los datos histológicos, inmunofenotípicos o citogenéticos no son concluyentes y, sobre todo, en la determinación de la EMR. Esta técnica se puede aplicar para determinar la clonalidad de la neoplasia (por medio de las reordenaciones de los *loci IG* o *TCR*), la translocación cromosómica asociada (mediante la amplificación específica del gen de fusión resultante), o para determinar posibles alteraciones en oncogenes o genes supresores tumorales. Las dos primeras determinaciones son las que generalmente se aplican en la rutina clínica y son útiles tanto en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad como en su monitorización o seguimiento. En la mayor parte de los casos el análisis de mutaciones en oncogenes y supresores tumorales permanece en el campo de la investigación encaminada al conocimiento de los procesos implicados en la leuquemogénesis con vistas al desarrollo de futuros tratamientos por lo que, salvo raras excepciones, no se han incorporado a los análisis de rutina.

Los análisis de clonalidad

Debido a que el proceso de transformación maligna es consecuencia de la expansión clonal de una única célula progenitora, cualquier característica que nos permita identificar esa célula estará presente en todas las que deriven de ella permitiendo así el seguimiento de esta población celular. En el caso de las células linfoides esta característica es la secuencia específica que presenta cada una de ellas en los *loci IG* y *TCR* (ambos implicados en el desarrollo de los procesos inmunitarios) una vez reordenados. Durante el proceso de maduración linfoide, los *loci IG/TCR* llevan a cabo un proceso fisiológico de recombinación y mutación que dará lugar a secuencias de ADN específicas para cada célula (Fig. 2). Este proceso es similar en las cadenas pesadas (H) y ligeras (L) de los genes *IG* y en las cuatro cadenas de los genes *TCR* (α , β , γ , δ). La confi-

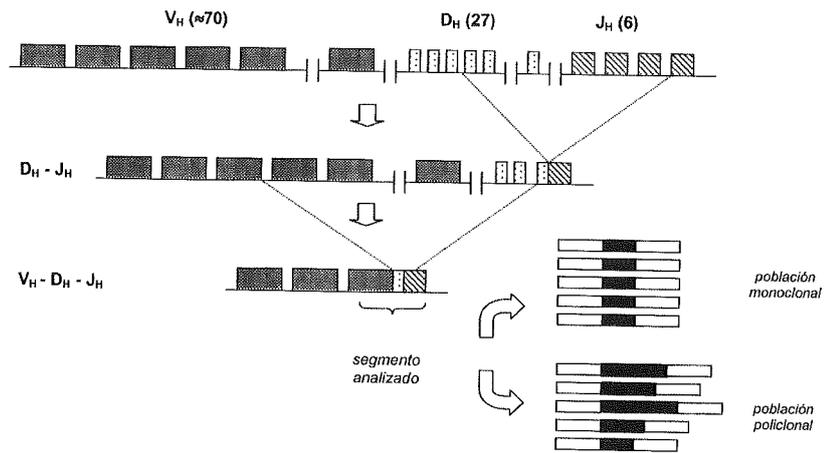


Figura 2. Ejemplo de la reordenación fisiológica de los diferentes segmentos del locus IGH, siendo V las regiones variables, D de diversidad, y J las regiones de unión. Entre paréntesis se muestra el número de segmentos de cada tipo existentes en ese locus. Esta recombinación, junto a otros mecanismos como la mutación somática de las regiones de empalme (no mostrada), es la base de la diversidad inmunológica dadas las múltiples combinaciones a las que se pueden dar lugar. Como consecuencia de estos procesos la secuencia de ADN formada será única de una población celular y tras el análisis molecular del segmento reordenado se podrá determinar si ésta tiene un origen mono o policlonal.

guración germinal incluiría varias regiones variables (V) distintas y varias regiones de diversidad (D, sólo aplicables en el caso de los loci *IGH*, *TCRβ* y *TCRδ*), de unión (J) y constantes (C)³. Durante el proceso de maduración, una región V se unirá a una D y a una J (Fig. 2) produciéndose, además, fenómenos de mutación somática en las zonas de unión de estos segmentos. Esto da lugar a multitud de combinaciones posibles (base de la diversidad inmunológica), formando secuencias de ADN específicas de cada célula linfóide (una especie de *huella* identificativa) (Fig. 2). De esta manera, y dado que el proceso tumoral refleja una expansión clonal a partir de una célula progenitora, todas las células tumorales presentarán la misma secuencia a este nivel. Según este esquema, una población linfóide policlonal estaría caracterizada por una población heterogénea en cuanto a sus secuencias V-(D)-J en estos loci y una población monoclonal (a veces, pero no siempre, asociada a un proceso maligno) estaría caracterizada por una homogenei-

dad manifestada en la existencia de una secuencia predominante (Fig. 2).

El conocimiento de la secuencia de ADN del segmento reordenado también puede dar información acerca del linaje y estado madurativo del clon maligno, lo que puede ser de utilidad en la clasificación de la patología. Esto es debido a que, por un lado, el locus *IGH* estaría reordenado de manera clonal en prácticamente todas las neoplasias de células B y los loci *TCR* en las neoplasias de células T (el caso inverso es infrecuente, salvo en las neoplasias linfoblásticas inmaduras de células precursoras en las que pueden observarse reordenaciones del otro linaje) y, por otro lado, este proceso es jerárquico en los distintos loci *IG/TCR*²⁴.

Por todo ello, el proceso fisiológico de reordenaciones *IG/TCR* que, en sí mismo, no constituye una anomalía genética, puede ser explotado para la caracterización molecular de este tipo de neoplasias. Desde el punto de vista práctico en la mayoría de las neoplasias linfoides no es

necesario realizar este análisis, ya que tanto la morfología como el inmunofenotipo suelen ser suficientes para establecer un diagnóstico. Sin embargo, puede ser de enorme utilidad en la determinación y monitorización de la EMR, aspecto que se discute más adelante.

El análisis de los reordenamientos cromosómicos

En este caso, el material de partida puede ser ADN tumoral o ARN (total o mensajero) tras su paso a ADN complementario. La utilización de ARN está indicada en aquellas translocaciones en las que están involucrados puntos de rotura dispersos en los genes implicados, lo que hace muy complicado el análisis a partir de ADN genómico, pero que presentan consecuencias similares a nivel de ARN mensajero.

Dada la relativa sencillez de los análisis mediante PCR y la poca muestra requerida, éste ha desplazado en la mayor parte de los casos al *Southern-blot* de ADN digerido con enzimas de restricción y posterior hibridación con sondas específicas, ya que éste último es un proceso más laborioso y requiere una gran cantidad de muestra. Así, el *Southern-blot* ha pasado a utilizarse, casi de manera exclusiva, en el análisis de genes muy promiscuos (que se reordenan con un variado número de otros genes) o en el caso en el que los puntos de rotura se encuentren muy dispersos²⁴. Sin embargo, en estos casos también esta siendo desplazado por el FISH.

Las principales ventajas de PCR (alta sensibilidad y especificidad) y de sus distintas variantes se convierten simultáneamente en sus principales defectos ya que la alta sensibilidad puede llevar a la determinación de alteraciones que se encuentran en una proporción tan baja que realmente no tengan significado patogénico, y la especificidad hace que únicamente seamos capaces de detectar la alteración que busquemos, no suministrando más información. Además, la mayor parte de los análisis mediante PCR son cualitativos, indicando sólo ausencia o presencia de la alteración, y en la monitorización de la respuesta al tratamiento o de la EMR es importante la cuantificación de ésta^{4,25}.

Para ello se han utilizado varios sistemas²⁶ que, junto a la aplicación de marcajes fluorescentes, están produciendo una auténtica revolución en este campo. El sistema más importante por su sencillez y posibilidad de estandarización (aunque de elevado coste) es el seguimiento de la amplificación mediante PCR en tiempo real (*real-time PCR*)²⁷ en el cual se detecta el producto específico a medida que se produce, de manera que la comparación de su nivel de amplificación con los estándares adecuados suministra una medida cuantitativa del grado de afectación.

Otros análisis a nivel molecular

El análisis de mutaciones de genes supresores tumorales y oncogenes permanece en el campo de la investigación (dada la complejidad y coste de su implantación en la rutina diagnóstica) con el objeto de conocer la posible implicación patogénica de estas alteraciones. La aplicación de nuevos sistemas robotizados de gran capacidad de análisis, con indudables ventajas en cuanto a controles de calidad y estandarización de los protocolos mejorará la reproducibilidad de los ensayos y, permitirá la comparación de resultados entre laboratorios facilitando la realización de grandes estudios prospectivos²⁸. Así, sistemas como los *chips* o *microarrays* de ADN, que permiten el análisis simultáneo de un gran número de genes y de sus niveles de expresión en una misma muestra, suministrarán una información de indudable valor para el establecimiento de terapias más adaptadas a la alteración molecular de cada tipo tumoral (terapias genotipo-específicas)²⁹.

IMPLICACIONES DEL ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL DIAGNÓSTICO Y CLASIFICACIÓN DE LAS NEOPLASIAS DE ORIGEN LINFOIDE

Las neoplasias de origen linfóide forman un grupo de entidades extremadamente heterogéneo y durante muchos años han sido clasificadas teniendo en cuenta únicamente criterios morfológicos y citoquímicos, tal y como propuso el grupo cooperativo Franco-Americano-Británico (FAB) en 1976^{30,31}. Este grupo clasifi-

có las neoplasias linfoides en LLA, Síndromes Linfoproliferativos Crónicos (SLP) y Linfomas (Hodgkin y no-Hodgkin). En 1994 el Grupo Internacional para el Estudio de los Linfomas propuso la clasificación REAL (*Revised European-American classification of Lymphoid neoplasms*) basada en una combinación de los datos morfológicos, inmunofenotípicos, genéticos y clínicos, variando entre las distintas entidades la importancia relativa de cada uno de ellos³². Los principios de la clasificación REAL han tenido un gran impacto al considerar que el diagnóstico debe realizarse desde una aproximación múltiple y que, a pesar de que en algunos casos pueden ser suficientes los datos de morfología, la exactitud del diagnóstico se ve aumentada considerablemente cuando se tienen en cuenta los datos inmunofenotípicos y genéticos. Actualmente, y bajo los auspicios de la OMS, se propone una clasificación basada en los principios establecidos en la clasificación REAL. Basándose en su experiencia, se han propuesto varios cambios que hacen referencia a variaciones en la nomenclatura y subdividiendo categorías demasiado heterogéneas. De esta forma, se reconocerían tres grandes categorías: neoplasias de células B, neoplasias de células T/NK (o agresoras naturales) y la enfermedad de Hodgkin. Las neoplasias de células B y T se clasificarían en linfoblásticas o de células precursoras y periféricas o de células maduras y dentro de ellas la subdivisión se realizaría teniendo en cuenta su presentación clínica principal³³. Es importante destacar que en la clasificación propuesta figuran como factores determinantes de subtipo con valor pronóstico en las neoplasias linfoblásticas de precursores B, la $t(9;22)(q34;q11)$ *BCR/ABL*, las reordenaciones con implicación de 11q23 (principalmente del gen *MLL*), la $t(1;19)(q32;p13)$ *E2A/PBX1* y la $t(12;21)(p12;q22)$ *TEL/AML1*; y el establecimiento como importante factor diagnóstico en el linfoma/leucemia de Burkitt de la $t(8;14)(q24;q32)$ y de sus variantes o de las reordenaciones de *c-MYC*.

Esta clasificación es de especial utilidad en una entidad tan heterogénea como la LLA. La clasificación FAB únicamente establecía los tipos morfológicos LLA-1,

LLA-2 y LLA-3, pero la nueva clasificación se basa en las características morfológicas, citoquímicas, inmunofenotípicas y en el grado de maduración y diferenciación de las series celulares B y T y quizá en mayor medida que en el resto de las leucemias, la decisión terapéutica en la LLA viene dada por la determinación inmunofenotípica del linaje afectado, la determinación de la ploidía por medio de la citometría de flujo y la determinación citogenética o molecular de la anomalía cromosómica recurrente²⁸.

Por otra parte, en el caso de las LLC de células B los análisis moleculares realizados del estadio madurativo de las reordenaciones de los *loci IG* sugieren la existencia de al menos dos grupos con pronósticos distintos³⁴. En un subgrupo las células leucémicas muestran deleciones cromosómicas en 13q14 y contienen mutaciones somáticas en la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, congruentes con un fenotipo de célula B de memoria y sugiriendo que estas células ya habrían pasado a través del centro germinal. Estos pacientes presentan un pronóstico mejor que las LLC en las que estos genes no están mutados y que muestran generalmente trisomía del cromosoma 12.

EL ANÁLISIS GENÉTICO Y LA ENFERMEDAD MÍNIMA RESIDUAL (EMR)

La EMR puede ser definida como "el más bajo nivel de enfermedad detectable por los métodos disponibles en pacientes en remisión clínica continuada". Su determinación es útil tanto para valorar la respuesta al tratamiento como para la prevención de recaídas ya que permite actuaciones terapéuticas rápidas³⁵.

Tradicionalmente la técnica utilizada para su detección ha sido el análisis de la morfología celular, definiendo en este caso la EMR como la presencia de 5% de células blásticas en la médula ósea. Esto puede reflejar la existencia de 10^{10} células leucémicas en el individuo³⁶. Esto ha hecho que en los últimos años se hayan desarrollado técnicas complementarias con sensibilidades muy superiores (de 100 a 10.000 veces

más) disponiéndose en la actualidad de otras tres: 1) la citometría de flujo, que permite detectar células con inmunofenotipo específico de leucemia; 2) la detección mediante PCR (y mediante FISH) de los genes de fusión consecuencia de translocaciones cromosómicas específicas presentes en las células neoplásicas; y 3) el análisis mediante PCR de las reordenaciones de los *loci IG/TCR*. Todas estas técnicas han cambiado tanto el concepto como el valor de esta determinación, ya que permiten la detección de una célula leucémica entre 10^4 a 10^6 células normales.

El caso de las LLA es uno de los más estudiados y en ella los análisis multivariantes han puesto de manifiesto que la presencia o ausencia de EMR es un factor pronóstico independiente. Como se ha señalado, en las neoplasias linfoides la determinación genética de la EMR se puede realizar a través de la determinación de translocaciones cromosómicas recurrentes o mediante el análisis de las reordenaciones *IG/TCR*. La primera es relativamente sencilla pero no es factible en los casos que no presenten este tipo de marcadores genéticos en el momento del diagnóstico. El segundo, basado en el origen clonal del proceso tumoral, permite el seguimiento del clon maligno de manera específica en la mayoría de los casos. Esta especificidad es la causante de la complejidad técnica y su elevado coste, ya que será indispensable el conocimiento exacto de la secuencia de ADN de la zona reordenada del clon maligno en el momento del diagnóstico para su detección en fases más avanzadas. Además, en la mayor parte de los casos existe un solo clon maligno y predominante, pero en otros casos hay varios y el seguimiento se deberá realizar utilizando sondas o cebadores específicos para cada una de ellos, minimizando la posibilidad de falsos negativos y estableciendo cuál de las poblaciones clonales es la causante de la posible resistencia al tratamiento y posterior recaída.

A pesar de estas dificultades, el problema principal de la aplicación de la PCR en la determinación de la EMR es que, como se ha señalado anteriormente, esta técnica sólo muestra la existencia de la alteración pero no su magnitud o la cantidad aproxi-

mada de células afectadas. Esta cuantificación es, sin embargo, de gran utilidad pronóstica³⁷. Por ello, los esfuerzos actuales se dirigen hacia la PCR con seguimiento en tiempo real, en la que la cinética de amplificación en las primeras fases permiten una cierta estimación cuantitativa. Como se ha señalado, esta tecnología está suponiendo una revolución en cuanto al tiempo invertido en el análisis y su estandarización³⁵, lo que permitiría la comparación de las diferentes series publicadas. Un ejemplo de ello es el protocolo para la detección de reordenaciones en los *loci IG/TCR* propuesto por Pongers-Willemsse y col como miembros de la Acción Concertada BIOMED-1 para la investigación de la EMR en LLA, en el que señala la posibilidad de monitorizar más de 90% de los pacientes combinando cuatro dianas moleculares distintas³⁸.

La importancia de la determinación cuantitativa de la EMR es manifiesta. Aproximadamente 50% de niños con LLA presentan EMR positiva mediante análisis cualitativos al final de la terapia de inducción, pero sólo el 45% de ellos sufrirán recaída. Sin embargo, los análisis semi o cuantitativos señalan que esta recaída se produce en pacientes con niveles entre 10^2 y 10^3 , mientras que con niveles menores de 10^4 éstas se producen en menor medida³⁹⁻⁴². Por otra parte, la remisión clínica continuada es mayor entre los pacientes con EMR negativa post-inducción, pero en este caso también se produce un pequeño número de recaídas. En general, la asociación entre una EMR negativa al final de la inducción y el mantenimiento de remisión clínica es mayor que la asociación entre EMR positiva y recaída. Varios estudios sugieren que el nivel de EMR es un importante indicador de riesgo de recaídas y han intentado establecer grupos en función de éste^{42,43}. En pacientes en edad adulta hay menos estudios y las series analizadas son menores^{44, 45}. En general, y con independencia de la edad del paciente, se observa un consistente y continuo descenso en el número de individuos con EMR detectable entre los 2 y 24 meses. Su persistencia más de 4-6 meses o su reaparición incluso a niveles de 10^4 estaría asociada a una recaída. Parece que la

reducción por debajo de los límites de detección por PCR (remisión molecular) a distintos tiempos durante 2 años sería el mejor indicador de remisión clínica continuada y parece también que este análisis es importante al final del tratamiento, ya que la presencia de EMR en este punto estaría asociada con un alto riesgo de recaída⁴⁵.

Todo ello lleva a concluir^{42,43} que la presencia molecular de EMR es un factor pronóstico importante e independiente de la edad. Su informatividad es mayor si el análisis es negativo (con un valor predictivo de remisión clínica de más de 82,5%), ya que la positividad tiene un valor predictivo de recaída inferior a 75%⁴⁵. Además, aunque la determinación molecular de EMR en un único momento pueda dar cierta información, es conveniente la realización de un mayor número de determinaciones en momentos preestablecidos para poder determinar de manera temprana la aparición de un clon de células proliferativas. En este sentido, parece conveniente realizar este análisis al menos inmediatamente después de la inducción, a los 3-5 meses y tras 6-9 meses de tratamiento⁴⁵.

IMPORTANCIA DE LAS ALTERACIONES GENÉTICAS EN EL TRATAMIENTO Y EN EL DESARROLLO DE NUEVAS APROXIMACIONES TERAPÉUTICAS

El conocimiento de los mecanismos moleculares que conducen a la transformación maligna en las neoplasias linfoides conduce, como ya se ha visto, a una mejora importante en el diagnóstico de las diferentes entidades y a la posibilidad de monitorización de los niveles residuales de enfermedad y de la respuesta al tratamiento aplicado. Actualmente parece claro que el conocimiento de la morfología, inmunofenotipo y genotipo de las células malignas son factores determinantes en la selección de los tratamientos. De esta manera, las leucemias agudas mieloides y linfoides requieren distintas aproximaciones terapéuticas, las LLA de células B y de células T deben ser tratadas de manera distinta a las LLA de precursores B para alcanzar tasas de curación equivalentes y, mientras los niños con LLA hiperdiploide o

con la t(12;21) responden bien a terapias basadas en antimetabolitos, los que presentan la t(9;22) no lo hacen de igual manera. Así, la toma en consideración de determinados factores en la elección del tratamiento lleva a la curación a más de 70% de los niños con LLA y también han mejorado las tasas de curación alcanzadas en el caso de los adultos²⁸. De la misma manera, la información obtenida de la monitorización molecular de los niveles de enfermedad residual en médula ósea o sangre periférica será de utilidad para determinar el grado de curación, la duración de los tratamientos o si son necesarios cambios en éstos.

Este conocimiento también prepara el camino para el desarrollo de terapias dirigidas al defecto genético causante de la proliferación anómala que presenten menores efectos secundarios, evitando tratamientos a menudo excesivos e ineficaces. En el caso de la t(15;17) asociada a la Leucemia Promielocítica Aguda o M3, la eficacia del ácido retinoico ha venido explicada de manera retrospectiva por el defecto molecular asociado a esta alteración, por lo que es de esperar que, una vez conocidas otras alteraciones moleculares y sus consecuencias, el desarrollo de nuevas drogas sea un hecho⁴⁶. Por ejemplo, ya se ha desarrollado un inhibidor específico (STI-571) de la actividad tirosín-quinasa BCR-ABL que está siendo probado en ensayos clínicos y cuyos resultados en animales han sido prometedores⁴⁷.

También en el caso de las neoplasias hematológicas son posibles las estrategias de terapia génica. En principio, dado que estas enfermedades son desórdenes genéticos, esta terapia sería una aproximación muy adecuada para su tratamiento ya que conduciría a la corrección de las anomalías presentes en las células malignas con unos efectos adversos mínimos. Sin embargo, en realidad, la ineficiencia de los actuales sistemas de vehiculización, su incapacidad de llegar específica y exclusivamente a las células malignas y la propia naturaleza diseminada de la mayor parte de estas neoplasias hacen que la "corrección génica" no sea viable por el momento. Actualmente está siendo probada en ensayos clínicos la transferencia de genes de

resistencia a ciertos fármacos en células madre hematopoyéticas como medida protectora frente a la quimioterapia aunque los resultados son escasos⁴⁸ y la transferencia de genes inmunoestimuladores con el fin de crear una respuesta inmune antitumoral. Otras posibilidades a desarrollar serán la liberación dirigida de proteínas citotóxicas, el desarrollo de inmunoterapias de adopción con células T modificadas genéticamente, terapias de inmunoestimulación mediante vacunas (en el caso de neoplasias de células B como los LNH y los mielomas, las regiones variables de las inmunoglobulinas de superficie de las células tumorales son antígenos tumorales específicos frente a los cuales se pueden producir vacunas individualizadas), o terapias basadas en oligonucleótidos antisentido (para disminuir la sobreexpresión de ciertos oncogenes como *BCL2*, *BCL-X*, *MDM2* y otros y promover la apoptosis)^{46,49}.

BIBLIOGRAFÍA

- LOOK AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 1997; 278: 1059-1064.
- WILLERFORD DM, SWAT W, ALT FW. Developmental regulation of V(D)J recombination and lymphocyte differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 1996; 6: 603-609.
- VANASSE GJ, CONCANNON P, WILLERFORD DN. Regulated genomic instability and neoplasia in the lymphoid lineage. *Blood* 1999; 12: 3997-4010.
- MACINTYRE EA, DELABESSE E. Molecular approaches to the diagnosis and evaluation of lymphoid malignancies. *Semin Hematol* 1999; 36: 373-389.
- RUBNITZ JF, PUI C-H, DOWNING JR. The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia* 1999; 13: 6-13.
- IMAMURA J, MIYOSHI I, KOEFFLER P. p53 in hematologic malignancies. *Blood* 1994; 8: 2412-2421.
- PREUDHOMME C, FENAUX P. The clinical significance of mutations of the P53 tumour suppressor gene in haematological malignancies. *Br J Haematol* 1997; 98: 502-511.
- VRHOVAC R, DELMER A, TANG R, MARIE JP, ZITTOUN R, AJCHENBAUM-CYMBALISTA F. Prognostic Significance of the Cell Cycle Inhibitor p27Kip1 in Chronic B-Cell Lymphocytic Leukemia. *Blood* 1998; 91: 4694-4700.
- PIETENPOL JA, BOHLANDER SK, SATO Y, PAPADOPOULOS N, LIU B, FRIEDMAN C et al. Assignment of the human p27Kip1 gene to 12p13 and its analysis in leukemias. *Cancer Res* 1995; 55: 1206-1210.
- RAGIONE FD, IOLASCON A. Inactivation of cyclin-dependent kinase inhibitor genes and development of human acute leukemias. *Leuk Lymphoma* 1997; 25: 23-35.
- HATTA Y, YAMADA Y, TOMONAGA M, KOEFLER HP. Extensive analysis of the retinoblastoma gene in adult cell leukemia/lymphoma (ATL). *Leukemia* 1997; 11: 984-989.
- STOCK W, TSAI T, GOLDEN C, RANKIN C, SHER D, SLOVAK ML et al. Cell cycle regulatory gene abnormalities are important determinants of leukemogenesis and disease biology in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2000; 95: 2364-2371.
- SIEBERT R, WILLERS CP, OPALKA B. Role of the cyclin-dependent kinase 4 and 6 inhibitor gene family p15, p16, p18 and p19 in leukemia and lymphoma. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 505-520.
- DREXLER HG. Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia-lymphoma cells. *Leukemia* 1998; 12: 845-859.
- HEYMAN M, EINHORN S. Inactivation of the p15INK4B and p16INK4 genes in hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma* 1996; 23: 235-245.
- WONG IHN, NG MHL, HUANG DP, LEE JCK. Aberrant p15 promoter methylation in adult and childhood acute leukemias of nearly all morphologic subtypes: potential prognostic implications. *Blood* 2000; 95: 1942-1949.
- MEYN SM. Ataxia-telangiectasia, cancer and the pathobiology of the ATM gene. *Clin Genet* 1999; 55: 289-304.
- STOPPA-LYONNET D, SOULIER J, LAUGÉ A, DASTOT H, GARAND R, SIGAUX F et al. Inactivation of the ATM gene in T-cell prolymphocytic leukemias. *Blood* 1998; 91: 3920-3926.
- SCHAFFNER C, IDLER I, STILGENBAUER S, DÖHNER H, LICHTER P. Mantle Cell Lymphoma is characterized by inactivation of the ATM gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 2773-2778.
- HARRISON CJ. The management of patients with leukemia: the role of cytogenetics in this molecular era. *Br J Haematol* 2000; 108: 19-30.

21. LE BEAU MM. One FISH, two FISH, red FISH, blue FISH. *Nat Genet* 1996; 12: 341-334.
22. KALLIONEMI OP, KALLIONEMI A, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F *et al*. Comparative genomic hibridisation - a rapid new method for detecting and mapping DNA amplifications in tumours. *Semin Cancer Biol* 1993; 4: 41-46.
23. SCHRÖK E, DU MANOIR S, VELDMAN T, SCHOEL B, WEINBERG J, FERGUSON-SMITH MA *et al*. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* 1996; 273: 494-497.
24. BAGG A, KALLAKURY BVS. Molecular Pathology of Leukemia and Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 1999; 112 (suppl 1): S76-S92.
25. MEDEIROS LJ, CARR J. Overview of the role of molecular methods in the diagnosis of malignant lymphomas. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1189-1207.
26. CROSS NCP. Quantitative PCR techniques and applications. *Br J Haematol* 1995; 89: 693-697.
27. WITTEWITZ CT, HERMANN MG, MOSS AA, RASMUSSEN RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplifications. *BioTechniques* 1997; 22: 130-138.
28. WILLMAN, CL. Acute Leukemias: a paradigm for the integration of new technologies in diagnosis and classification. *Mod Pathol* 1999; 12: 218-228.
29. GOING JJ, GUSTERSON BA. Molecular pathology and future developments. *Eur J Cancer* 1999; 35: 1895-1904.
30. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR *et al*. Proposals for the classification of the acute leukemias. *Br J Haematol* 1976; 33: 451-458.
31. BENNETT JM, CATOVSKY D, DANIEL MT, FLANDRIN G, GALTON DA, GRALNICK HR *et al*. The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol* 1981; 47: 553-561.
32. HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JKC, CLEARY ML *et al*. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 1994; 84: 1361-1392.
33. HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOILD J, FLANDRIN G, MULLER-HERMELINK K, VARDIMAN J *et al*. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Comitee Meeting - Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-3849.
34. HAMBLIN TJ, DAVIS Z, GARDINER A, OCIER DG, STEVENSON FK. Unmutated Ig VH genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocitic leukaemia. *Blood* 1999; 94: 1848-1854.
35. FORONI L, HARRISON CJ, HOFFBRAND AV, POTTER MN. Investigation of minimal residual disease in childhood and adult acute lymphoblastic leukemia by molecular analysis. *Br J Haematol* 1999; 105: 7-24.
36. RABBITS TH. Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 1994; 372: 143-149.
37. RADICH JP. Clinical applicability of the evaluation of minimal residual disease in acute leukemia. *Curr Opin Oncol* 2000; 12: 36-40.
38. PONGERS-WILLEMSE MJ, SERIU T, STOLZ F, D'ANIELLO E, GAMEIRO P, PISA P *et al*. Primers and protocols for standardized detection of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia using immunoglobulin and T cell receptor gene rearrangements and TAL 1 deletions as PCR targets. Report of the BIOMED-1 CONCERTED ACTION: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* 1999; 13: 110-118.
39. BRISCO MJ, CONDON J, HUGHES E, NEOH SH, SYKES PJ, SESHADRI R *et al*. Outcome prediction in childhood acute lymphoblastic leukemia by molecular quantification of residual disease at the end of induction. *Lancet* 1994; 343: 196-200.
40. CAVÉ H, GUIDAL C, ROHRICH P, DELFAU MH, BROYART A, LESCOEUR B *et al*. Prospective monitoring and quantification of residual blasts in childhood acute lymphoblastic leukemia by polymerase chain reaction study of the delta and gamma T-cell receptor genes. *Blood* 1994; 83: 1892-1902.
41. GRUHN B, HONGEN S, YI H, HANCOCK ML, RUBNITZ JE, NEALE GAM *et al*. Minimal residual disease after intensive induction therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia predicts outcome. *Leukemia* 1998; 12: 675-681.
42. VAN DONGEN JJ, SERIU T, PANZER-GRUMAYER ER, BIONDI A, PONGERS-WILLEMSE MJ, CORRAL L *et al*. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia in childhood. *Lancet* 1998; 352: 1731-1738.
43. CAVÉ H, VAN DER WERFF TEN BOSCH J, SUCIU S, GUIDAL C, WATERKEYN C, OTTEN J *et al*. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 1998; 339: 591-598.

44. BRISCO MJ, HUGHES E, NEOH SH, SYKES PJ, BRADSTOCK K, ENNO A et al. Relationship between minimal residual disease and outcome in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1996; 87: 5251-5256.
45. FORONI L, COYLE LA, PAPAIOANNOU M, YAXLEY JC, COLE SINCLAIR MF, CHIM JS et al. Molecular detection of minimal residual disease in adult and childhood acute lymphoblastic leukemia reveals differences in treatment response. *Leukemia* 1997; 11: 1732-1741.
46. FIELDING AK, AGER S, RUSSELL SJ. ABC of clinical haematology: the future of hematology, molecular biology, and gene therapy. *Br Med J* 1997; 314: 1396-1399.
47. STEWART AK, SCHUH AC. White cells 2: impact of understanding the molecular basis of haematological malignant disorders on clinical practice. *Lancet* 2000; 355: 1447-1453.
48. BRENNER MK, PINKEL D. Cure of leukemia. *Semin Hematol* 1999; 36 (Suppl 7): 73-83.
49. COTTER FE. Antisense therapy of hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1999; 36 (Suppl 6): 9-14.