

**POLIMORFISMOS GENETICOS DE LAS ENZIMAS METABOLICAS  
GSTT1, GSTM1 Y CYP2E1 EN UN GRUPO DE NIÑOS CON LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA Y SU RELACION CON LA ENFERMEDAD**

**GLORIA INES URIBE BOTERO**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE POSTGRADO BIOLOGIA  
2003**

**POLIMORFISMOS GENETICOS DE LAS ENZIMAS METABOLICAS  
GSTT1, GSTM1 Y CYP2E1 EN UN GRUPO DE NIÑOS CON LEUCEMIA  
LINFOIDE AGUDA Y SU RELACION CON LA ENFERMEDAD**

**GLORIA INES URIBE BOTERO**

**TRABAJO DE GRADO  
Presentado como requisito parcial  
Para optar por él titulo de**

**MAGISTER EN CIENCIAS BIOLOGIA**

**Director  
HELENA GROOT DE RESTREPO. MsC**

**Codirector  
MARIA MERCEDES TORRES CARVAJAL. MsC**

**Codirector Externo  
EDUARDO BELTRAN DUSSAN. M.D**

**UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
ESCUELA DE POSTGRADO BIOLOGIA  
2003**

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ANEXOS	
AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIA	
INTRODUCCIÓN	3
1. OBJETIVOS	6
1.1. OBJETIVO GENERAL	
1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	
2. MARCO TEORICO	7
2.1. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA (LLA)	
2.1.1. Definición	
2.1.2. Etiología y Patogénesis	8
2.1.2.1. Epidemiología	
2.1.2.2. Factores de Riesgo	9
2.1.3. Manifestaciones Clínicas	18
2.1.4. Diagnóstico	19
2.1.5. Inmunofenotipo	20
2.1.5.1. Coexpresión de Marcadores Mieloides en LLA	22
2.1.6. Alteraciones Cromosómicas y Genética Molecular	23
2.1.6.1. Linaje B	24
2.1.6.2. Linaje Células T	26
2.1.7. Factores Pronósticos	28
2.2. POLIMORFISMOS GENETICOS	32
2.2.1. La Familia del Citocromo P450 (CYP)	35
2.2.1.1. CYP2E1	36
2.2.2. Glutation – S – transferasa (GST)	37
2.2.2.1. Glutation – S – transferasa <i>theta</i> (GSTT1)	39
2.2.2.2. Glutation – S – transferasa Mu (GSTM1)	40
3. MATERIALES Y METODOS	42
3.1. POBLACION DE ESTUDIO	43

3.2. TOMA DE MUESTRA	45
3.3. EXTRACCION ADN	
3.4. GENOTIPIFICACION	46
3.5. ANALISIS ESTADÍSTICO	50
4. RESULTADOS	51
4.1. RESULTADOS METODOLOGICOS	51
4.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ENCUESTAS	54
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	69
6. CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS	99

## LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Resumen de los factores ambientales y hábitos de la población a estudio.	44
Tabla 2. Condiciones de amplificación para segmentos de GSTT1 y GSTTM1.	46
Tabla 3. Condiciones de amplificación para el segmento de la CYP2E1.	48
Tabla 4. Condiciones de digestión de la CYP2E1 por la Endonucleasa <i>Rsa I</i> .	49
Tabla 5. Productos de la Digestión de la CYP2E1 con la enzima <i>Rsa I</i> .	50
Tabla 6. Tabulación de los datos de la encuesta	54
Tabla 7. Características generales de la población de estudio	57
Tabla 8. Pruebas de Chi- Cuadrado y OR crudo de las características generales y ambientales de la población de estudio	59
Tabla 9. Sustancia más frecuentes a las que se expusieron los grupos a estudio	61
Tabla 10. Relación entre los polimorfismos genéticos de las enzimas GSTM1, GSTT1 y CYP2E1 en niños con leucemia linfocítica aguda y controles	62
Tabla 11. Genotipos Nulos en el grupo de Controles y en el grupo de Leucémicos	63
Tabla 12. Primer Modelo de Regresión Logística de los efectos principales de los factores de riesgo	64
Tabla 13. Segundo Modelo de Regresión Logística mostrando efectos e interacciones con respecto a la enfermedad	65

Tabla 14. Tercer modelo de Regresión Logística mostrando efectos e interacciones con la enfermedad	66
Tabla 15. Características Clínicas Y Hallazgos De Laboratorio De Los Pacientes Leucémicos	67

## LISTA DE CUADROS

	Pág
Cuadro 1. Asociación de Leucemia Linfoide Aguda con enfermedades Genéticas	16
Cuadro 2. Clasificación MIC para la Leucemia Linfoide Aguda de linaje B	21
Cuadro 3. Clasificación inmunofenotipo de Leucemias de células T según el grupo de Estudio de Pediatría Oncológica	21
Cuadro 4. Correlación del Inmunofenotipo con las Características clínicas	22
Cuadro 5. Criterio para el diagnóstico de la Leucemia Bifenotípica	23
Cuadro 6. Correlación entre inmunofenotipo y alteraciones genéticas	27
Cuadro 7. Factores Pronostico relacionados con la Leucemia Linfoide Aguda	31
Cuadro 8. Sustratos de la CYP2E1	37

## LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1. Modelo de dos Pasos “mínimo” para el desarrollo de LLA en niños.	16
Figura 2. Efecto de los polimorfismos de fase I y II en el metabolismo del benzo [a] pireno.	34
Figura 3. Efecto de la detoxificación de químicos endógenos y exógenos en el proceso carcinogénico.	34
Figura 4. Patrón de electroforesis Múltiplex para la amplificación de los fragmentos de la Glutathion –S-Transferasa GSTT1 y GSTM1 por PCR	52
Figura 5. Patrón de electroforesis Múltiplex para la amplificación de los fragmentos de la Glutathion –S-Transferasa GSTT1 y GSTM1 por PC	52
Figura 6. Patrón de electroforesis de la amplificación los productos de amplificación de la CYP2E1 por PCR.	52
Figura 7. Patrón de electroforesis de la digestión de la CYP2E1 con la enzima de restricción <i>Rsa I</i> por PCR.	53
Figura 8. Patrón de electroforesis de la digestión de la CYP2E1 con la enzima de restricción <i>Rsa I</i> por PCR.	53
Figura 9. . Clasificación de los biomarcadores que participan en la etiología del cáncer.	74



## LISTA DE ANEXOS

	Pág
Anexo 1. Consentimiento Informado	99
Anexo 2. Encuesta	100
Anexo 3. Protocolo de Extracción del ADN	102
Anexo 4. Protocolo para la amplificación enzimática para la Identificación de los Polimorfismos Genéticos de las enzimas GSTT1 Y GSTM1	103
Anexo 5. Protocolo de amplificación enzimática para la Identificación del polimorfismo genético de la enzima CYP2E1	107
Anexo 6. Digestión del fragmento de la CYP2E1 con la enzima <i>Rsa I</i>	109

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Doctora María Mercedes Torres por su invaluable orientación y colaboración en el desarrollo de este trabajo

A la Doctora Diana Marcela Rodríguez por su gran entusiasmo y colaboración con la recepción de las muestras.

A la Doctora Nelcy Rodríguez por su adecuada asesoría en el análisis estadístico.

A la Doctora Helena Groot de Restrepo por su constante apoyo para la conclusión de este trabajo.

Al Doctor Eduardo Beltrán por sus valiosos aportes y su incondicionalidad.

Al Comité de Investigaciones de la Facultad de Ciencias, por su ayuda económica para el desarrollo de este proyecto.

Al Hospital de La Misericordia, especialmente al Comité científico por la aprobación del proyecto y al personal del Laboratorio clínico por su colaboración en la obtención de las muestras.

A Angelina Tovar por su adecuada orientación en la organización del manuscrito.

Finalmente a todas las personas que me rodean y que de una u otra forma me colaboraron y apoyaron.

## **DEDICATORIA**

En Memoria de Alberto, por su legado.  
A mi hija Sofía y a mi madre Amparo con todo mi amor  
A los Pacientes, por su generosidad

## INTRODUCCION

La Leucemia Linfocítica Aguda es uno de los tipos de cáncer que con mayor frecuencia se diagnostica en el grupo pediátrico en el ámbito mundial, representando aproximadamente el 35% de las malignidades desarrolladas en los niños (Young J.L., et al, 1986). Las características clínicas, patológicas e inmunológicas han sido extensamente documentadas (Chaplin R., et al, 1989).

A pesar de la gran cantidad de investigaciones epidemiológicas realizadas para tratar de entender el proceso leucemógeno, y en este, particularmente al papel que juega la susceptibilidad genética heredada y su relación con los factores ambientales, todavía no se ha podido documentar claramente de manera reproducible, una asociación significativa entre estos dos factores (Greaves M.F., et al. 1988a). Se ha sugerido que los individuos que poseen una capacidad diferente para metabolizar sustancias carcinogénicas, presentarían un mayor riesgo de desarrollar cáncer. (Perera F.P., et al, 1996). Es así, entonces, como las variaciones genéticas de las enzimas capaces de metabolizar compuestos carcinógenos pueden jugar un papel relevante en determinar la susceptibilidad al cáncer. Los individuos que posean una actividad enzimática aumentada de una enzima involucrada en la activación de carcinógenos o deficiente en la detoxificación de dichas sustancias, estarían en mayor riesgo de padecer de cáncer. Por lo tanto es de gran interés, estudiar aquellos grupos o familias de genes que participan en estos procesos metabólicos como: las enzimas de fase I del citocromo p450 (CYPs) y las de fase II, las glutathion-S-transferasa (GSTs) (Krajnovic M., et al, 1999a).

Las enzimas del citocromo p450 (CYPs) constituyen una súper familia de enzimas que son muy importantes en el proceso de oxidorreducción de numerosos compuestos, algunos de ellos (pro)carcinógenos y citotóxicos (Nelson D.R., et al, 1996; Wrighton, S.A. & Stevens, J.C., 1992; Guengerich, F.P. & Shimada, T., 1991). Dentro de esta familia encontramos la enzima CYP2E1 que metaboliza sustancias de bajo peso molecular, algunas de ellas carcinogénicas como las nitrosaminas, el etanol, el benceno, el tetracloruro de carbono, el cloruro de vinilo y los acrilonitrilos entre otros (Guengerich & Kim, D.H., 1991).

La familia de las glutatión *S*-Transferasa (GSTs) es un grupo de enzimas dimericas detoxificantes, que catalizan una gran variedad de reacciones glutatión dependientes donde este conjuga con los compuestos electrofílicos reactivos o xenobioticos electrofílicos, para inactivarlos y facilitar su excreción del cuerpo (Mannervick B., Danielson N.H., 1988; Pickett, C.B. & Lu, A.Y., 1988; Armstrongs, R.N., 1997).

Cada una de estas subfamilias esta compuesta de diferentes miembros en los que se observan variaciones genéticas o polimorfismos genéticos. Por ejemplo, con respecto a la familia de las GST *mu*, el gen que codifica para la enzima GSTM1 puede exhibir un polimorfismo de delección o genotipo nulo que corresponde a la ausencia completa de la actividad enzimática (Seidegard J., et al. 1988; Mannervick B., Danielson NH., 1988). Se ha descrito un mecanismo similar para la subfamilia GST *theta* (Preamble S., et al, 1994a). Los carcinógenos ambientales como el benzo[a]pireno y otros hidrocarburos poliaromáticos son detoxificados atravez de este sistema (Perera F.P., et al, 1996; Ketterer B., 1988), como también los metabolitos reactivos de drogas como la doxorubicina y el etoposido (Tsuchida S., Sato K., 1992). Se han descrito diversos polimorfismos de estas enzimas inter o intra grupos étnicos (Cosma G., et al, 1993; Taioli G., et al. 1995; Rebbeck T.R., 1997), estableciendo dentro de estos mismos posibles grupos de alto riesgo para adquirir algún tipo de cáncer como: Cáncer de vejiga (Lin H.J., Han C.Y., et al, 1994), Tracto gastrointestinal (Setiawan V., et al, 2000), Seno (Zhong S. et al, 1993; Heizisouer K.J., et al, 1998), Cerviz (Warwick A. et al, 1994) Piel (Heagerty A. et al, 1993), Leucemia linfoide aguda en niños (Krajinovic M., et al, 1999) y Síndromes mielodisplásicos (Chen H., et al, 1996) entre otros.

Pero en todos los casos, la deficiencia de la actividad enzimática de GSTs más que su sobreexpresión, se ha asociado a un aumento en la frecuencia de malignidades, además de conferir la resistencia a algunas drogas utilizadas en quimioterapia para cáncer. (Tew K.D., 1994; Iyer L., Ratain M.J., 1998). A pesar de lo anterior, algunas investigaciones recientes muestran que algunos genotipos de la GSTs, que expresan una disminución en la actividad enzimática, contribuyen de manera positiva a la eficacia de la quimioterapia, reduciendo el potencial de detoxificación de las drogas y por consiguiente incrementando la efectividad de las drogas citotóxicas, llevando a los enfermos a una remisión mayor (Hall A.G., et al, 1994; Stanulla M., et al, 2000; Krajinovic M., et al, 2002). El objetivo principal de este trabajo fue el de establecer la frecuencia de los polimorfismos genéticos CYP2E1, GSTT1 y GSTM1 en un grupo de niños con y sin Leucemia Linfoide Aguda provenientes de diferentes regiones del país. De igual forma se analiza la relación entre el riesgo a la enfermedad y su interacción con algunos factores ambientales y hábitos.

Finalmente consideramos que un trabajo de este tipo es pionero en nuestro país teniendo en cuenta que aproximadamente la Leucemia Linfocítica Aguda corresponde al 33% del cáncer diagnosticado en la institución. Se han venido realizando algunos estudios similares en adultos en otros tipos de cáncer, mas no en leucemia y menos aun en el grupo pediátrico.

## **1. OBJETIVOS**

### **1.1. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la frecuencia de los Polimorfismos genéticos de las enzimas CYP2E1, GSTM1 Y GSTT1 en una población de niños con Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) y de un grupo de niños sin enfermedad hematológica maligna diagnosticados en el Hospital de la Misericordia en la ciudad de Bogotá. De igual forma establecer la asociación entre los polimorfismos genéticos de las enzimas ya mencionadas, la presencia de Leucemia Linfocítica Aguda y la interacción con algunos hábitos y condiciones ambientales.

### **1.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Determinar los polimorfismos genéticos para las enzimas Glutathion-S -Transferasa M1 y T1 en una población de niños diagnosticados con LLA entre enero 1982 a agosto de 2002 y compararla con un grupo de niños libres de enfermedad maligna.

Determinar el polimorfismo genético CYP2E1 del Citocromo p450 en la población de niños diagnosticados con LLA entre enero 1982 a agosto de 2002 y compararla con un grupo de niños libres de enfermedad maligna.

Estimar la frecuencia de los polimorfismos genéticos y Compararlas en los dos grupos de estudio.

Relacionar los diferentes polimorfismos en los dos grupos con la exposición a ciertos factores ambientales y hábitos para tratar de establecer si hay relación o no con el desarrollo de enfermedad maligna.

## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1. LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA**

#### 2.1.1. Definición

La leucemia Linfoide aguda (LLA) es una enfermedad neoplásica que se origina a partir de una mutación somática en una célula progenitora linfoide en alguno de sus estados de desarrollo. Las leucemias tienen unas características biológicas anormales muy definidas: (1) el origen monoclonal, (2) presentan mutaciones genéticas adquiridas (1-n), (3) hay inestabilidad genética con diversificación clonal, (4) se presenta des-regulación de las principales funciones de la célula como son la proliferación, diferenciación y muerte celular y finalmente (5) presentan ventajas en el crecimiento con predominancia de una clon, además de presentar la diseminación vascular y extravascular con compromiso a los tejidos normales (Greaves M.F., 2002).

La inmunotipificación en el momento del diagnóstico refleja el grado de diferenciación de la clon predominante (Pui C-H, 2001). El origen clonal de la LLA ha sido establecido en estudios citogenéticos con el Cromosoma X y la Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, a su vez que en análisis de fragmentos de restricción (Gale R.E. & Wainscoat J.S., 1993; Busque L., Gilliland D.G., 1993) y con estudios sobre los polimorfismos normales de los receptores para las inmunoglobulinas y receptores de células T (Griesser H., et al 1989). La tasa de división celular de las células leucémicas es menor que la de las células normales, pues su síntesis de ADN toma más tiempo, que las células hematopoyéticas normales (Saunders E.F., et al, 1967). Usualmente al momento del diagnóstico las células leucémicas no solo han reemplazado las células hematopoyéticas normales de la médula ósea, sino que en muchos casos se han diseminado extramedularmente.



### 2.1.2. Etiología y Patogénesis

La iniciación y la progresión de la LLA esta dirigida por una sucesión de mutaciones que difieren de acuerdo a los estados de desarrollo de la célula blástica afectada. Por esto, los subtipos específicos de LLA tienen diferentes orígenes genéticos asociados a los diferentes mecanismos etiológicos.

No se conoce el número preciso de mutaciones secuenciales requeridas para que se manifieste clínicamente una leucemia, pero el periodo de latencia corto que se observa en los niños seguido en algunos casos por la exposición a sustancias genotóxicas sugiere que deben ser pocas si se compara con algunos carcinomas del adulto que requieren que se acumulen muchas mutaciones para que se manifieste la enfermedad; sin embargo es muy posible que en las leucemias de los niños sea suficiente acumular dos mutaciones y excepcionalmente una para que se manifieste la enfermedad (Greaves M.F., 2002). Múltiples agentes ambientales, entre ellos las radiaciones ionizantes, la exposición a ciertos químicos, se han asociado claramente a la inducción de LLA en algunos niños. Sin embargo en la mayoría de los casos el factor etiológico no es muy claro y continua siendo un misterio. Por esta razón, el proceso leucemógeno establece la clara interacción entre múltiples factores genéticos y ambientales que deben ser confirmados en estudios de poblaciones y de epidemiología molecular que estén muy bien estructurados. (Pui C-H., 2001)

#### 2.1.2.1. Epidemiología

En los Estados Unidos la leucemia linfocítica aguda es una enfermedad que presenta una incidencia aproximadamente del 35% de todas las malignidades pediátricas (Young J.I., et al, 1986), correspondiendo al 76% de las leucemias diagnosticadas en este grupo de edad, ( hasta los 15 años)( Gurney J.G., et al, 1996).Se caracteriza por tener una incidencia en ciertos picos de edad, entre los dos y los cinco años, seguida de una disminución en las siguientes etapas del desarrollo (SEER, 1998). Este pico de edad esta ausente en algunos estudios realizados en países en vía de desarrollo, sugiriendo que los factores que se asocian con el proceso leucemógeno están asociados al de la industrialización (Pui C-H., 2001).

En cuanto a la incidencia geográfica de la LLA, existen diferencias importantes, pues se reporta un aumento evidente en las poblaciones del norte y occidente de Europa, Norteamérica y Oceanía en contraposición de lo observado en Oriente y África (Parkin D.M., et al,1997).Con respecto a la

incidencia del género en la enfermedad, es mayor en el sexo masculino que en el femenino. Se presentan diferentes distribuciones desde el punto de vista racial y geográfico, observándose un aumento de la tasa de la enfermedad en las poblaciones blancas de Norte América (especialmente en Hispanos de Los Ángeles), Australia, norte y occidente de Europa, mientras que en las poblaciones Afro-Americanas y Asiáticas el porcentaje es menor (Parkin D.M., et al, 1997). En los últimos años se ha reportado un aumento en la incidencia de casos de niños con LLA; en los Estados Unidos es de 2.7 a 3.3 casos por 1000.000 niños entre los 0 y 14 años (SEER, 1998). Estos cambios probablemente se deban a la manera como se ha logrado mejorar la especificidad en el diagnóstico de la enfermedad (Pui C-H., 1997).

#### 2.1.2.2 Factores de riesgo

Múltiples estudios sobre la posible causa de la LLA en los niños, han mostrado que agentes ambientales como las radiaciones, drogas, exposición a químicos y virus juegan un papel relevante en el desarrollo del cáncer (Schottenfeld D. & Fraumeni J.F. Jr, 1982).

La susceptibilidad a estos agentes puede estar incrementada en ciertos grupos con ciertas características demográficas o constitución genética (Mulvihill J.J., et al, 1977). A pesar de las limitaciones en el conocimiento de los factores que incrementan el riesgo de sufrir LLA, solo el 5% de los casos se atribuyen a la herencia, o a síndromes genéticos que involucran genes que afectan la estabilidad geonómica o de reparación del ADN (Greaves M.F., 1997).

De otra parte se ha establecido que la interacción de los diferentes polimorfismos genéticos heredados para ciertas enzimas involucradas en el metabolismo y la detoxificación de sustancias carcinogénicas (algunos de ellos asociados a la regulación adecuada de la respuesta inmune), pueden contribuir indirectamente a aumentar el riesgo de hacer enfermedad (Evans W.E., Relling M.V., 1999).

- Carcinógenos Ambientales
  - Radiaciones Ionizantes

Estudios realizados con supervivientes a bombas nucleares, trabajadores expuestos a radiaciones o pacientes irradiados por condiciones médicas, muestran que las radiaciones ionizantes inducen a cáncer en ciertas condiciones de exposición (Broice J.D., Fraumeni J.F. Jr, 1984; Kohn H.I., Fry R., 1984). La dosis de radiación es un determinante importante en el desarrollo

de la malignidad, pues en estudios realizados con modelos de laboratorio se ha demostrado que la relación entre la dosis y la enfermedad es lineal y sin umbral; al doblar la exposición a la dosis de radiación se dobla el riesgo al cáncer mientras que si se reduce disminuye el riesgo sin que este desaparezca (Comité on the biological effects of Ionizing Radiations,1980). Otras investigaciones han reportado que la exposición prenatal de aproximadamente 1 Rad de radiación con rayos X para diagnóstico, se asocia con el incremento del 50% de riesgo de hacer leucemia u otros cánceres pediátricos (Kohn H.I., Fry R.J., 1984), correlacionándose de una manera positiva con el número de exposiciones (Doll R., Wakeford R., 1997).

Estudios estadísticos y epidemiológicos han demostrado que la exposición a la radiación paterna, principalmente previo a la concepción, predispone a malignidades en la descendencia especialmente de tipo hematológico como la leucemia linfocítica aguda; se ha postulado que la radiación altera el ADN del gameto selectivamente (Greaves M.F., 1997;Doll R, et al, 1994; Brahams D, 1993; Draper G.J., et al, 1993).

- Radiaciones No Ionizantes

Durante la última década muchos estudios epidemiológicos han tratado de asociar la exposición a campos electromagnéticos y el desarrollo de cáncer. Sin embargo muchas controversias se han generado en esta área de la investigación ya que algunos estudios han podido demostrar una muy leve asociación, sin un claro mecanismo biológico de acción entre los campos electromagnéticos y el daño celular, pero otros grupos de investigación han cuestionando la metodología utilizada en estos trabajos (Diller L., Li F.P., 1998). Para muchos investigadores en trabajos este no es un factor que predisponga a de Leucemia Linfocítica Aguda en niños (Linet M.S., et al, 1997).Sin embargo recientemente el grupo de estudio de Cáncer en niños del Reino Unido en un paralelo con el de los Estados Unidos encontró a los campos electromagnéticos como un factor muy importante en la etiología de la leucemia (UK Childhood Cáncer Group Investigators (2000) UK Childhood Cáncer Group Investigators.(2000a).

- Drogas

Algunas drogas de uso clínico se han asociado con actividad carcinogénica en animales pero la mayoría de estas no se han podido relacionar claramente con el desarrollo de cáncer en los humanos (Schmahl D.,et al, 1977).Drogas como por ejemplo, los agentes alquilantes que son de elección para el tratamiento de cáncer en niños, pueden posteriormente desarrollar leucemia. Algunos ejemplos son la ciclofosfamida, el melphalan, la azatioprina y las nitroso ureas (Stolley

P.D., Hibberd P.L.,1982; Pui C-H., Behm F.G.,1989).También se han reportado casos de leucemias mieloides agudas secundarias a la exposición a las drogas antineoplásicas que son inhibidoras de la topoisomerasa II, como son los etopósidos, las epipodofilotoxinas así como las antraciclinas (Winick N.J., et al 1993; Hawkins M.M., et al, 1992; Pui C-H. , et al, 1991b).

Algunas otras drogas que no son antineoplásicas como es el caso de hormonas como los estrógenos, medicamentos de hierbas, algunos agentes radioactivos, antibióticos derivados de las quinolonas, resina de podofilina, metabolitos del benceno, dipironas y sustancias inmunosupresores se han asociado al desarrollo de malignidades (Boice J.D., Fraumeni J.F. Jr, 1984; Chilvers C., Mc Pherson K., et al, 1989; Greaves M.F.,1997; Alexander F., et al, 2001) ya que muchas de estas también son inhibidoras de la Topoisomerasa II, y por consiguiente consideradas potencialmente sustancias mutagénicas que pueden inducir leucemia aguda con el rearrreglo genético ALL1/MLL. Es importante mencionar las mujeres embarazadas expuestas a estas sustancias se les somete a un riesgo crítico para que sus hijos desarrollen leucemia en la infancia (Greaves M.F., 1997).

A partir de los estudios realizados con el Dietilestilbestrol (DES), un potente agente estrogénico no esteroide, se demostró que más o menos uno de cada 1000 casos con exposición transplacentaria de este medicamento durante los primeros meses de gestación, producía adenocarcinoma de vagina (Lanier A.P., Noller K.L., 1973). Se ha cuestionado la posibilidad de que otros medicamentos puedan actuar como carcinógenos transplacentarios (Diller L., Li F.P., 1998). El uso de agentes quimioterapéuticos que son antagonistas del ácido fólico durante el primer trimestre de gestación se ha asociado con aborto o anomalías congénitas (Sieber S., Adamson R., 1975), que posteriormente pueden desarrollar leucemia en niños.

- Exposiciones Ocupacionales

Por más de 25 años se ha tratado de relacionar la ocupación de los padres con la posibilidad de causar algunos tipos de cáncer en los niños, entre ellos la LLA. La mayoría de estos trabajos son estudios de casos y controles, donde algunos muestran inconsistencias o sesgos a falsos positivos (Terracini B., et al, 1983). Por esta razón el riesgo de que la progenie desarrolle leucemia, se ha tratado de evaluar en relación con los diferentes tiempos de exposición como la pre-concepción, y los periodos pre y post natales (Ji B.T., et al 1997; Shu X.O., et al, 1999a). Sin embargo, si se ha demostrado que la exposición en la niñez a ciertos compuestos carcinógenos, pueden generar en la edad adulta, algunas neoplasias (Li F.P., 1988). Se han realizado estudios tratando de asociar el efecto carcinogénico de algunos contaminantes del agua, aditivos de

alimentos, pesticidas, y otros componentes de la dieta como las nitrosaminas y las aflotoxinas, siendo algunos de ellos controversiales (Miller R.W., 1978; Schatzkin A., et al, 1989. Sarasua S, Savitz D.A., 1994).

- o Exposición A Pesticidas y Otros Químicos

Estudios muy controvertidos realizados en agricultores expuestos a pesticidas (para animales y plantas), reportan el aumento en el riesgo de adquirir una enfermedad maligna. (Blair A., Zahm S.H., 1995; Keller-Byrne J.E., et al, 1995;Zahm S.H, et al., 1997). A su vez se establecen variaciones importantes en los diferentes países, atribuyéndole esto a las diferentes maneras a las que se exponen los individuos por el manejo de estas sustancias (Avnon L., et al, 1998).

En niños específicamente, varios trabajos como el descrito por Infante-Rivard y colaboradores, donde se evalúa la exposición de la madre a estas sustancias en el periodo neonatal y el riesgo de desarrollar LLA asociado a ciertos polimorfismos genéticos de algunas enzimas que participan en la detoxificación de estas sustancias, encontrándose asociaciones estadísticamente significativas, entre ellas el benceno (Infante-Rivard C., et al, 1999; Greaves M.F., 2002a). Estudios más recientes muestran que la exposición de las madres a ciertos pesticidas como mosquiticidas (Baygon) presentan riesgo de que sus hijos desarrollen LLA ( Alexander F.E, et al, 2001).

Algunos trabajos también refieren la asociación de ciertos polimorfismos enzimáticos y sustancias utilizadas para la desinfección como los trihalometanos presentes en el agua (THMs) y su posible relación con LLA (Infante-Rivard C., et al, 2002).

- o Agentes Infecciosos

Ciertos virus han demostrado que inducen diversos tipos de cáncer en animales de experimentación, aunque no ha sido fácil demostrar lo mismo en los humanos (Henderson B.E., 1989). El periodo de latencia para la inducción del cáncer puede ser de años o hasta generaciones después de la inserción del genoma vírico en el ADN del huésped (Diller L., Li F.P., 1998) Algunos retrovirus por ejemplo el HTLV-I, se han asociado con algunas formas de leucemia, la leucemia/ linfoma de células T en adultos pero no en los niños (Schulz T.F, Neil J.C., 2002).

Algunos investigadores sugieren que especialmente la LLA diagnosticada entre los 2 y los 5 años resulta de alguna respuesta inmune anormal a ciertas infecciones comunes en los niños, pues se tiene la hipótesis de que el patrón y el tiempo de la infección coinciden con el desarrollo del

sistema inmune; además algunas características del estilo de vida de los países desarrollados como la higiene, la poca o ninguna alimentación con seno materno, la exposición de los niños pequeños a otros niños, podrían afectar el desarrollo del sistema inmune. Se plantea que la leucemia se origina de una mutación espontánea en el tejido linfóide durante el periodo fetal que se mantiene silenciosa hasta que se produce la exposición a un agente infeccioso u otro promotor que cause una respuesta inmune inadecuada para que se manifieste la enfermedad (Greaves M.F., 1997; Smith M.A., et al, 1998; Greaves M.F. Alexander F., 1993). Otros investigadores plantean que posiblemente estos niños no tuvieron ciertas infecciones comunes en los niños o que tenían un contacto social menor, o que probablemente fuesen prematuros y no recibieron ciertas vacunas particularmente la del *Haemophilus influenzae* (Auvinen A., et al, 2000).

- Cigarrillo, Alcohol, Dieta Y Otros Estilos De Vida

Con muy pocas excepciones, han sido poco estudiados ciertos factores de riesgo asociados con algunos estilos de vida que han jugado un papel limitado como agentes causales de leucemia en niños.

Fumar durante el periodo de la gestación se ha asociado a depresión respiratoria en el niño, bajo peso al nacer, infecciones de vías respiratorias durante la infancia, sin embargo algunos estudios no han sido muy conclusivos en demostrar su relación con el efecto carcinogénico (Miller R.W., 1976) y específicamente no se ha relacionado con el desarrollo de LLA en su progenie (Brondum J., et al 1999; Sasco A.J., Vainio H., 1999; Shuz J., et al, 1999). Sin embargo un estudio de casos y controles realizado en padres fumadores y niños con cáncer, demostró una amplia asociación entre los niños con cáncer y la exposición a través de la vía transplacentaria o la exposición pasiva en los primeros años de la niñez (John E.M., et al, 1991).

Estudios más recientes evidencian la asociación entre el hábito de fumar en los padres previo a la concepción y el desarrollo posterior de leucemia en los niños especialmente de tipo linfóide (Ji B.T., et al 1997; Sorahan T., et al, 1997; Shu X.O., et al, 1996). A pesar de lo antes mencionado hay evidencia en estudios de epidemiología molecular que indican que la exposición de los niños en el útero y en una edad temprana al humo del cigarrillo, los hace más vulnerables a alteraciones genéticas y moleculares que pueden incrementar el riesgo de desarrollar cáncer en la edad adulta (Perea F., 1997; Tang D., et al, 1999).

Con respecto a la dieta y su relación con el desarrollo de leucemia linfóide en la infancia, se ha demostrado que el consumo durante el embarazo de alimentos que contienen de inhibidores de

la Topoisomerasa II (genisteína que se encuentra en los granos de soya, quercetina que se encuentra en algunas frutas y verduras, catequinas que se encuentran en el vino, el té, la cocoa y la cafeína ) aumentan el riesgo (10 veces mayor) de hacer leucemia mieloide aguda mas que leucemia linfocitica aguda (Roos J.A., 1998;Roos J.A., et al, 1996). En un estudio reciente con experimentos tanto in-vitro como in-vivo se demostró que la Topoisomerasa II es un blanco importante de algunos bioflavonoides encontrados en la dieta. Los resultados de este trabajo mostraron evidencia epidemiológica de que el consumo materno de los bioflavonoides pueden inducir a traslocaciones cromosómicas del gen MLL en útero, potencial izándose la posibilidad de hacer leucemia en los niños (Alexander F.E., et al., 2001;Strick R.,et al 2000; Ross J.A., 2000).

La alimentación prolongada con leche materna mostró una reducción en el riesgo de hacer leucemia aguda tanto linfocitica como mieloide (Shu X.O., et al 1999a).

En un estudio realizado en la China se encontró que el uso de aceite de hígado de bacalao se asociaba con la reducción el riesgo de desarrollar leucemia linfocitica aguda en los niños (Shu X.O., et al, 1988).

Dos investigaciones realizadas en Estados Unidos demostraron que se aumentaba el riesgo de leucemias especialmente de origen mieloide en niños con el uso de alcohol durante el embarazo (Severon R.K., et al, 1993; Shu X.O., et al, 1996).

- Susceptibilidad Del Huésped
  - Alteraciones Genéticas

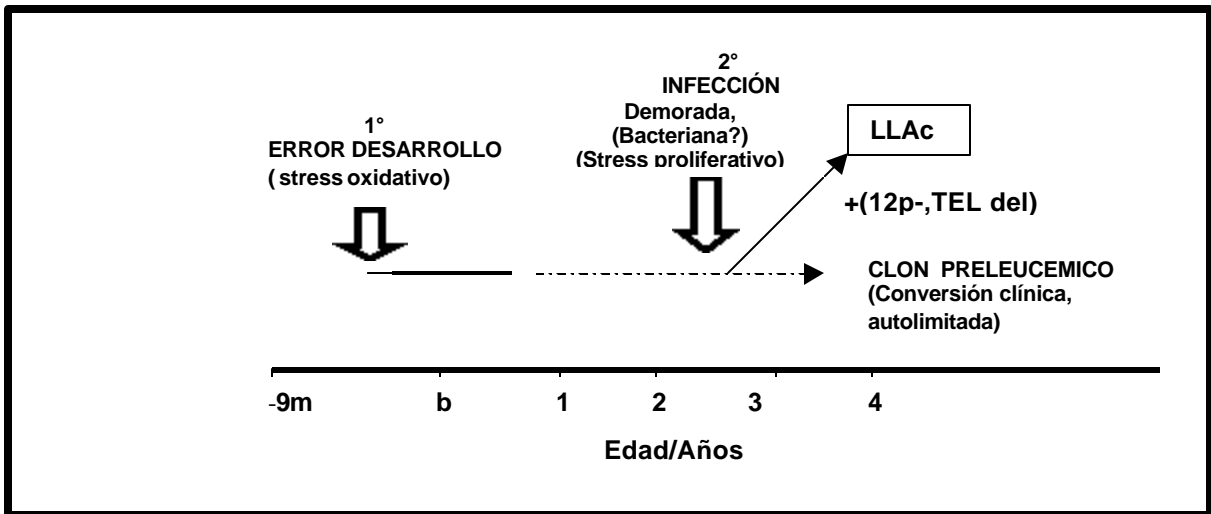
Desde el punto de vista epidemiológico se reporta evidencia clara sobre el papel relevante que los factores genéticos tienen en el origen de la leucemia en niños. En Estudios realizados en gemelos monocigóticos, (Wasserman R., et al, 1992; Ford A.M., et al, 1993; Ford A.M., et al, 1998; Wielmels J.L., et al, 1999) y en estudios retrospectivos en gotas de sangre usadas para estudios metabólicos (*Guthrie cards*) (Gale K.B., et al 1997; Wielmels J.L., et al 1999), se evidencio que la alteración genética que desencadenaba el proceso leucémico frecuentemente se originaba durante la hematopoyesis fetal en el útero, mostrando periodos de latencia entre 1 y 14 años después del nacimiento. La concordancia de la rata entre gemelos es del 5 al 10% lo que sugiere que se requiere uno o más eventos genéticos postnatales para complementar la alteración genética inicial y manifestar enfermedad. Aunque algunos datos moleculares sugieren que la presencia de leucemia en gemelos puede ser mas por el compartir de la circulación placentaria

mas que por la mutación genética heredada (Ford A.M., et al, 1993; Wielmes J.L., et al, 1999). Para algunos investigadores la conclusión de estos trabajos es que la mayoría sino todas las leucemias en los niños se originan de un evento mutagénico in útero. Basados en estos estudios, con la identificación de la traslocación cromosómica más frecuente en la leucemia linfocítica aguda común de los niños, que involucra los cromosomas 12 y el 21, generándose la fusión TEL(ETV6) AML1(CBF 2) (Romana S.P., et al, 1995), Greaves M., postulo un modelo de dos etapas o “mínimo” que se muestra en la Figura.1, para explicar la historia natural de la LLA común en los niños (Greaves M., 1999).

La leucemia linfocítica aguda que se manifiestan en el primer año de vida, presentan en el 80% de los casos la mutación correspondiente a la fusión de ALL1/MLL/HRX o ALL/AML,( Mastrangelo R., et al, 1986), y corresponde una entidad biológicamente diferente a la leucemia que se presenta después del año de vida pues la frecuencia de los rearrreglos del gen MLL en estas es apenas del 5%, lo que indica que esta leucemia se origina en el útero sugiriendo claramente que solo se requiere una exposición ambiental durante el periodo prenatal para la manifestación de la enfermedad ( Ford A.M., et al, 1993). Es así como otras alteraciones genéticas diferentes a la anteriormente mencionada necesitan de otras mutaciones post natales para desarrollar la enfermedad (Biondi A., et al, 2000). Los inhibidores de la Topoisomerasa II son los posibles implicados en la etiología de esta leucemia (Rooss J.A., 2000).

Las observaciones clínicas han identificado una susceptibilidad inusual de hacer cáncer en los niños que padecen ciertas enfermedades hereditarias, alteraciones cromosómicas o Síndromes constitucionales (Mulvihill J.J., et al, 1977; Li F.P., 1988). En la Cuadro.1 se mencionan los síndromes y enfermedades en las que ha sido confirmada su relación con el desarrollo de leucemia linfocítica aguda en niños. Algunas otras enfermedades se han asociado a desarrollar leucemia linfocítica , pero están basados en estudios de casos y controles que pudieran representar una coincidencia, como son por ejemplo el Síndrome de Diamond-Blackfan (Krishnan E, et al 1978), Trombocitopenia Amegacariocítica (Young N.S., Alter B.P.,1994), y Trisomías Cromosómicas de los cromosomas D y F (Mulvihill J.J., et al, 1977).





**Figura 1.** Modelo de dos Pasos “mínimo” para el desarrollo de LLA en niños. (Tomado de Greaves M., (1999) Molecular Genetics, natural history and demise of childhood leukemia. Eur J Can35:173-185)

ASOCIACIÓN RASGO GENETICO SIMPLE	ASOCIACIÓN CONSTITUCIONAL Y FAMILIAR
Síndrome de Bloom( German J., Passarge E., 1989)	Síndrome de Down( Rowley J.D., 2000.)
Ataxia Telangectasia( Hecht F., Hecht B.K. 1990).	LLA (gemelos idénticos < de 6 años) ( Mahmoud H.H., Ridge S.A., et al 1995; Ford A.M., Ridge S.A., et al, 1993)
Síndrome de Li- Fraumeni( Li F., Fraumeni J.F. Jr, et al, 1988)	
Agamaglobulinemia Congénita Ligada al X ( Filipovich A.H., Spector B.D., et al: 1980.)	
Anemia de Fanconi ( Swift M.,1971)	

**Cuadro 1.** Asociación de la LLA con Enfermedades Genéticas.

- o Factores Psicológicos y Emocionales

No es nuevo el concepto de que los factores psicológicos sean muy importantes en el desarrollo y curso del cáncer. Sin embargo el mecanismo por el cual estos factores participan en la progresión del cáncer es aun poco claro. La hipótesis principal mas aceptada es que los factores psicológicos traen consigo cambios hormonales que influyen en el sistema inmune que a su vez aumentan o disminuyen la posibilidad de generar un cáncer (Bovbjerg D.H., 1991). Esta teoría plantea que la

influencia del sistema inmune en la carcinogénesis esta muy relacionada particularmente a los casos donde algún agente infeccioso principalmente de tipo viral no es el promotor del cáncer (Garssen B., Goodkin K., 1999).

Se han descrito canales potenciales de comunicación que el Sistema Nervioso Central (SNC) usa para regular las actividades del sistema inmune. Estos son por ejemplo, la innervación directa de los órganos linfoides y las respuestas neuroendocrinas. Además se ha demostrado que los leucocitos y especialmente los linfocitos tienen receptores para una gran variedad de neurotransmisores, neuropeptidos y que gran parte de estos procesos inmunes son influenciados por ciertas hormonas. (Eriksen H.R., et al, 1999). La evidencia entonces de que el SNC regule ciertas actividades inmunes, establece que los factores psicológicos jueguen un papel impactante en los procesos inmunes, en donde en estudios clásicos se ha demostrado la alteración de la función inmune y los factores psicológicos de larga y corta duración. (Calabrese J.R., et al, 1987; Kiecolt-Glaser J.K., Glaser R., 1988).

Una función importante del sistema inmune es la de vigilar y eliminar células aberrantes inclusive las células cancerosas, induciendo una respuesta inmune citotóxica mediada por células T y la actividad de las células Natural Killer (NK).. La supresión del sistema inmune, incrementa la posibilidad de que las células malignas no sean detectadas, lo que se ha demostrado en diferentes estudios con personas inmunosuprimidas por drogas, observándose un aumento de algunas neoplasias como leucemias, linfomas y cáncer de piel entre otros (Nossal G., 1993).

El efecto de ciertos factores como algunos *Eventos de vida*, el manejo de los duelos, el soporte social, las emociones negativas, el papel de la represión o la no-expresión de las emociones negativas, algunos estados mentales, son apenas aspectos que se han estudiado como posibles iniciadores en la progresión del cáncer, obteniéndose información controvertida como lo demuestran algunos estudios. (Garssen B., Goodkin K., 1999; Cooper C.L., Wartson M., 1991). Sin embargo hay una serie de dificultades prácticas y metodológicas en evaluar el papel de estos factores incluyendo el posible efecto que tiene sobre las pruebas psicológicas antes del diagnóstico de enfermedad maligna y el impacto que se tiene en el momento del diagnóstico por sí solo; esto plantea la necesidad de tener en cuenta el significado de un evento para un individuo, no solamente la ocurrencia de este (Walker L.G., Eremin O., 1995).

Finalmente hay que enfatizar que hay otros posibles mecanismos que pueden mediar la influencia de los factores psicológicos diferentes a la vía Psico-neuro-inmunológica para el desarrollo de

algunos tipos de cáncer especialmente de tumores sólidos como son: la angiogénesis y la apoptosis( Redd W., et al. , 1991; Garssen B., Goodkin K., 1999).

- Polimorfismos Genéticos

Ciertos polimorfismos genéticos han sido relacionados con el riesgo de desarrollar leucemia, ya que codifican para múltiples enzimas que detoxifican carcinógenos o que participan en algunos mecanismos inmunes y otras funciones fisiológicas que pueden modificar el riesgo de hacer o no una leucemia, dependiendo de los factores de exposición. Dentro de los más relevantes en el grupo pediátrico, se encontró en algunas investigaciones que ciertos polimorfismos de la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa como la NQO1 que se encarga de detoxifica metabolitos del benceno y algunos flavonoides que contienen quinonas se asociaban a las LLA con la alteración molecular MLL, mas que en niños sanos o niños con LLA pero con otras alteraciones genéticas ( Wiemels J.L., et al, 1999).

Para la LLA común en niños se han encontrado algunos resultados preliminares de que esta pueda estar relacionada con ciertos alelos del HLA II y que variaciones heredadas en otros genes de la inmunidad que jueguen papel relevante en los procesos infecciosos probablemente jueguen su papel en la susceptibilidad a la enfermedad (Wiemels J.L., et al, 1999; Taylor G.M., et al.1998).Cierta relación se ha descrito con los polimorfismos genéticos heredados de la enzima Metiltetrahidrofolato reductasa (MTHFR) , muy importante en el metabolismo del ácido fólico y la leucemia común en niños y adultos (Wiemels J.L.,et al, 2001), lo que sugiere entonces que el consumo de folato por parte de las mujeres embarazadas constituye una modificación nutricional importante en el desarrollo de leucemia en niños (Thompson J.R., et al, 2001).

Ciertos polimorfismos de la Glutation –S Transferasa han sido asociados al desarrollo de LLA en niños. Estos serán revisados más afondo en el transcurso de este trabajo.

### 2.1.3. Manifestaciones clínicas

Las características clínicas de la LLA son variables. Los síntomas pueden presentarse de manera insidiosa o aguda. Usualmente estos reflejan el grado de infiltración medular y extramedular. Frecuentemente los pacientes presentan fiebre asociada a la neutropenia; fatiga y letárgica a consecuencia de la anemia; petequias y equimosis en piel y mucosas asociados a la trombocitopenia. Se presenta linfadenopatias, organomegalias, dolor óseo que incluye artralgias y muy común en los niños, la dificultad para caminar; todo esto asociado a la infiltración de ganglios linfáticos, hígado, bazo, huesos y periostio respectivamente o necrosis medular. El 8

% aproximadamente de los niños presentan masa mediastinal, compromiso del sistema nervioso central, infiltración testicular y alteraciones en la función urinaria. (Gaynon P.S., Siegel S., 2002; Pui C-H., Crist W.M., 1999).

#### 2.1.4. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en el estudio cuidadoso de la médula ósea para la identificación de las células blásticas, ya que aproximadamente el 16% de los pacientes no muestra células blásticas en sangre periférica. Además la morfología de los blastos de la periferia y de la médula ósea puede variar. Siempre se acompaña de la biopsia ósea y las improntas, que en algunos casos de fibrosis medular, se puede utilizar para el diagnóstico citológico (Pui C-H., 2001).

Para el diagnóstico se requiere la identificación al microscopio de las células blásticas en la médula ósea utilizando la clasificación morfológica, la más utilizada comúnmente es la propuesta por el grupo Cooperativo Francés-Británico-Americano (FAB), el cual clasifica las Leucemias Linfoides Agudas en L1, L2 y L3 según sus características morfológicas. La L1 presenta blastos homogéneos, pequeños sin nucleolos y se presenta en el 85% de los casos en los niños. Los blastos L2 en general son grandes, mostrando variaciones en el tamaño, con nucleolos prominentes y abundante citoplasma. Los blastos L3 son los más característicos, pues muestran una basofilia citoplasmática intensa y una vacuolización prominente, (Bennett J.M., et al 1981). Los estudios de las células basados en la coloración de Romanowsky no son suficientes en algunos casos para diferenciar los blastos linfoides de los mieloides, por esta razón los estudios complementarios de la histoquímica y la inmunotipificación, permiten discriminar entre los dos tipos de leucemia.

La identificación de la Mieloperoxidasa (MPO), el Sudan Negro (SB) y las Esterasas no Específicas, como la Alfa naftil Acetato Esterasa y la Alfa Naftil Butirato Esterasa son positivas en las Leucemias Mieloides. Las leucemias Linfoides son positivas en un 70% para el Ácido Peryódico de Schiff (PAS) y un 70% de los casos de las leucemias de origen T son Fosfatasa ácida (AF) positivas (Berg S.L., et al, 2000). Hoy por hoy la inmunotipificación de las células leucémicas es parte esencial para el diagnóstico, ya que estas no tienen características morfológicas y histoquímicas específicas, mientras que por esta metodología se logra diagnosticar el 99% de las leucemias (Pui C-H., Evans W.E., 1998). Más adelante se profundizará sobre esta clasificación.

En los últimos años, la caracterización genética de las leucemias, tanto de las alteraciones citogenéticas como las anormalidades moleculares, se han convertido en un mecanismo indispensable para la obtención de información biológica que es sumamente importante; pues en el 70% de los casos de leucemias en los niños se pueden agrupar en diferentes categorías para que de acuerdo a esta información se dé un tratamiento que probablemente mejore el pronóstico de la enfermedad (Martínez –Clement J.A., 1997). En algunos países en vías de desarrollo como el nuestro, por cuestiones de costo es difícil de realizar en todos los casos los estudios citogenéticos y moleculares, manejándose básicamente las clasificaciones morfológicas e inmunológicas.

#### 2.1.5. Inmunotipificación

La identificación de las células leucémicas a través del estudio de la inmunotipificación que se inicio en los años setenta es mucho más precisa y adecuada que la clasificación morfológica desde el punto de vista biológico.

La clasificación inmunológica de la leucemia se basa en la expresión de una serie de antígenos específicos de linaje, en donde se refleja la secuencia de maduración normal de las células.

Las células de linaje B inician su maduración con por la expresión de marcadores como HLA-DR, TDT y antígenos como el CD19, CD22, CD79a. Posteriormente la identificación del CD10 seguido por la aparición de las cadenas pesadas y livianas y finalmente la aparición de inmunoglobulinas de superficie (SmIg). Usualmente la expresión del CD34 es en las células pre-pre B, y en las comunes pero no en las pre B o de células B maduras (Jennings C.D.& Foon K.A., 1997). Las leucemias de linaje B expresan CD19 y CD22. En el Cuadro. 2 se resumen los principales marcadores de las leucemias de origen B.

Las células de linaje T expresan en su membrana CD3 y CD7 a diferencia de las anteriores (Janossy G., et al, 1989). En el Cuadro. 3 se resumen los principales marcadores de estas células. Sin embargo no hay una clasificación uniforme, pues varios grupos han establecido guías para la evaluación y definición de los diferentes subtipos inmunológicos (Bene M.D., et al 1995).

Las características clínicas de los niños con LLA varían en los diferentes inmunofenotipos. Referimos los resultados de la correlación del inmunofenotipo con las características clínicas del

German multicentre trial ALL-BFM 86 en el Cuadro. 4 (Reiter A., et al, 1994; Reiter A., et al, 1992). Con la excepción de la LLA de células B, el valor de la inmunotipificación como un factor pronostico del tratamiento es todavía controvertido (PuiC-H, et al, 1993a). Las leucemias pre-preB CALLA negativo representan el 5% de los casos de LLA y se ha considerado de mal pronóstico (Reiter A., et al, 1994; Vannier J.P., et al, 1989) Antígenos como el CD34 se expresan en un porcentaje importante en los niños con LLA de precursores de células B y también de leucemias agudas de células T confiriéndoles en algunos estudios, una característica de buen pronóstico (Pui C-H. , et al, 1993b). La expresión de los antígenos CD45 y CD71 muestran que no tienen ningún significado en el pronóstico de la leucemia (Behm F.G., et al, 1992; Koehler M., et al, 1993).

Usualmente todas las categorías son positivas para HLA-DR y CD19.	
Precursor B temprano o pre preB	TdT+, CD10-, CYlg-, Smlg-
Común	TdT+,CD10+, Cylg-, Smlg-
Pre B	TdT-,CD10+, Cylg+, Smlg-
B	TdT-,CD10+ o -, Cylg+ o -, Smlg+

**Cuadro 2.** Clasificación MIC para la Leucemia Linfocítica Aguda de linaje B. (First MIC Cooperative Study Group (1986) Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemias.)

USUALMENTE POSITIVOS PARA CD7, CD2, Y CD5. ALGUNAS VECES CD38 O CD71	
Timocito Temprano	CD1-, mCD3-, CD4-, CD8-CD2-
Timocito intermedio o común	CD1+, mCD3-, CD4 y CD8 +o-
Timocito Maduro	CD1-, mCD3+( Usualmente CD4 o CD8 positivo)

**Cuadro 3.** Clasificación inmunofenotipo de Leucemias de células T según el grupo de Estudio de Pediatría Oncológica (Crist W.M., et al 1988.)

	PREPREB CD10-	PREPREB CD 10+	PRE B	B	PRET T
N° Pacientes	52	635	456	39	124
Sexo(% Masculino)	38.5	52.8	50.0	84.6	75.0
Años					
<1(%)	32.7	0.8	5.8	2.6	0.8
1<10(%)	50.0	82.4	80.1	64.1	62.1
≥ 10(%)	17.3	16.9	14.1	33.3	37.1
G. Blancos					
Media x 10 <sup>9</sup> /L	37.9	33.0	41.5	77.0	86.5
≤20x10 <sup>9</sup> /L(%)	37.7	75.1	52.6	69.2	22.6
>50x 10 <sup>9</sup> /L(%)	44.2	10.7	20.5	5.1	56.5
Plaquetas≤100x10 <sup>9</sup> /l(%)	76.9	74.5	80.8	56.4	55.6
Hemoglobina≤ 8g/dL(%)	57.7	39.7	59.6	20.5	15.3
Esplenomegalia(%)	50.0	33.7	45.5	28.2	57.2
Hepatomegalia(%)	55.8	45.7	48.1	35.9	61.3
Masa Mediastinal(%)	0.0	0.0	0.6	0.0	71.8
Linfadenopatias(%)	34.6	35.6	41.0	53.8	78.2
SNC(%)	9.6	1.4	1.3	0.0	10.5

**Cuadro 4.**Correlación del Inmunofenotipo con las Características clínicas (German Multicentre trial ALL-BFM 86. Reiter A., et al, 1994; Reiter A., et al, 1992).

#### 2.1.5.1. Co-expresión de marcadores mieloides en la leucemia linfocítica aguda

En algunos casos no muy frecuentes, las células leucémicas pueden expresar tanto marcadores de linaje linfocítico como mieloides simultáneamente. Esto se puede originar a partir de una transformación maligna de una célula que tiene capacidad para diferenciarse en cualquiera de los dos linajes, lo que es conocido con el término de promiscuidad de linaje (Perentesis J., et al, 1983; Stass S., et al 1984; Greaves M.F., et al, 1986). En el caso de las leucemias de origen B la expresión de uno o más marcadores mieloides es de aproximadamente el 4% a más del 20% de las leucemias, dependiendo de los criterios que se tengan en cuenta; los marcadores que comúnmente se coexpresan son CD34, CD33, CD15 y CD13 (Ludwig W.D., et al, 1993; Mirro J., et al, 1985; Wiersma S.R., et al, 1991). Muchos investigadores observaron que las leucemias con marcadores mieloides positivos(My+) se presentaban en los niños que tenían usualmente células

pre-preB CD10- (Fink R.M., et al, 1993; Cantu-Rajoldi A., et al, 1991), además de comportarse como un factor de mal pronóstico (Wiersma S.R., et al, 1991; Fink R.M., et al, 1993). Sin embargo otros autores no creen que esto sea cierto (Reiter A., et al, 1992; Pui C-H., et al, 1991c).

Es importante aclarar que para el diagnóstico de la leucemia bifenotípica se deben cumplir unos criterios ya establecidos mediante un puntaje, el cual se ilustra en el Cuadro.5 (Mirro J., Kitchingman G.R., 1989). Los casos que no cumplen con estos criterios serán clasificados como Leucemia Linfocítica o Mieloide Aguda con co- expresión de marcadores mieloides o linfocíticos.

Si el score es >2 en dos o más linajes, la leucemia se clasifica como bifenotípica

PUNTAJE	LINAJE B	LINAJE T	MIELOIDE
2	cCD22 CD79a	cCD3	Mieloperoxidasa(Cualquier método)
1	CD10 CD19	CD2 CD5	CD13 CD33
0.5	TdT	TdT CD7	CD11b/11c CD14 CD15

**Cuadro 5.** Criterio para el diagnóstico de la Leucemia Bifenotípica (Mirro J., Kitchingman G.R., 1989)

#### 2.1.6. Anormalidades cromosómicas y citogenética molecular

Las células leucémicas pueden portar una variedad de alteraciones cromosómicas visibles que incluyen desde anormalidades numéricas como hiperdiploidias, hipodiploidias y aneuploidias, trisomias, así como pseudodiploidias con cambios estructurales como deleciones, traslocaciones, inversiones, duplicaciones y traslocaciones recíprocas. Se tiene claro que entre el 70 y 75% de los casos de LLA en niños se le encuentran alteraciones cromosómicas (Harbott J., et al, 1993; Van der Plas D.C., et al, 1992; Bloomfield C.D., et al, 1989), y fue demostrado en 1981 por la Tercera reunión de trabajo internacional en cromosomas en Leucemia que el cariotipo es un factor pronóstico independiente muy importante en la LLA (The Third Internacional Workshop on Chromosomes in Leukemia, 1981). Posteriormente algunos trabajos reportaron que la importancia pronóstica del cariotipo se podía eliminar con una quimioterapia apropiada (Secker-Walker L.M., et



al, 1989; Fletcher J.A., et al, 1989) aunque algunas traslocaciones como t(9;22) y t(4;11) seguían siendo muy importantes con un marcador pronóstico pobre de la enfermedad.

Con las técnicas actuales y el conocimiento de la biología molecular de la leucemia, se ha dado un cambio radical al análisis del cariotipo. Pues las técnicas de Hibridación in situ con Florescencia (FISH) han permitido que cada cromosoma pueda ser identificado y en él, las alteraciones presentes, que con las técnicas corrientes sería imposible visualizar.

Es así pues que con las técnicas actuales se puede demostrar que entre el 70-90% de los casos de LLA tienen una anormalidad citogenética. Algunas anormalidades como 6q- y 9p- se asocian con linaje de células B o T mientras que otras alteraciones se asocian específicamente con un inmunofenotipo específico. Así traslocaciones que involucran los genes que codifican para las cadenas pesadas o livianas de las inmunoglobulinas generalmente son de linaje B. Mientras que las que involucran los genes TCR o receptores de células T son de linaje de células T (Bain B., 1999). A continuación se describen las alteraciones cromosómicas y moleculares más frecuentes y relevantes en los niños correlacionados con los hallazgos del inmunofenotipo y se resumen en el Cuadro. 6.

#### 2.1.6.1. Linaje B

- LLA Común Con Alta Hiperdiploidia:

Constituye la forma más común de LLA en los niños en los países industrializados. En esta categoría se encuentra que las células leucémicas tienen más de 50 cromosomas, pero menos de 66 cromosomas el cual es un hallazgo considerado de buen pronóstico, mientras que los de “baja” hiperdiploidia (entre 47-50 cromosomas) tienen características diferentes incluyendo mal pronóstico (Chessels J.M., et al, 1997). El mecanismo molecular de esta categoría no se conoce. Con las técnicas de FISH se observa con frecuencia cromosomas supernumerarios como el cromosoma X, 4,6,8,10,14,16,18,20,21.(Moorman A.V., et al, 1996).

- Pre preB t(12;21)(p13;q22)/ Fusion TEL-AML1

Es uno de los subtipos más comunes en los niños, Pues se observa en el 10-30% de los casos de LLA en niños (Raimondi S.C., et al, 1997; Raynaud S., et al, 1996; Borkhardt A., et al, 1997). Afecta a niños preferiblemente entre los 2 y los 9 años, donde su diagnóstico citológico suele ser L1 y usualmente tienen una tasa de remisión y supervivencia muy alta (Mc Lean T.W., et al, 1996).

Esta traslocación es difícil de detectar por las técnicas convencionales de la citogenética puesto que es usualmente críptica, y las porciones de los cromosomas que están comprometidos son muy pequeñas y de bandas muy similares, por lo que se puede confundir con del (12) (p12) (Bain B., 1999). El mecanismo leucemogeno molecular es la fusión de estos dos genes codificadores para factores de transcripción, el TEL/ETV6 de la familia de ETS en 12p13 y el AML1 que también ha sido llamado CBFA en el cromosoma 21q22 (Mc Lean T.W., et al, 1996). Hoy se sabe que ambos genes están involucrados independientemente en otras mutaciones (Rubnitz J.E., et al, 1999).

- Pre B t(1;19)(q23;p13)/ Fusión E2A-PBX

En este grupo se ubican entre el 2-5% de las leucemias en niños (Chessels J.M., et al, 1997). El mecanismo molecular de esta leucemia consiste en la fusión del gen PBX1 del 1q23 con una parte del gen activador de la transcripción, el E2A en 19p13, para formar un gen híbrido denominado E2A-PBX1, que codifica para un factor de transcripción aberrante (Hunger S.P., et al, 1991). Una variante de esta traslocación es la t(17;19)(q23;p13) en donde se fusiona E2A con HLF (hepatic leukemia factor), el cual codifica para un factor de transcripción anormal (Inaba T., et al, 1992).

- LLA COMUN / t(9;22)(q34;q11)/ Fusión BCR-ABL

La leucemia con esta traslocación se conoce como LLA Cromosoma Filadelfia positivo, ya que involucra el cromosoma 22, característico de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC). Esta traslocación citogeneticamente no se diferencia de la presente en la LMC, pero desde el punto de vista molecular si puede ser diferente. Un cuarto de los casos de LLA Filadelfia positivo presenta una ruptura en la región mayor M-BCR, que es la presente en la LMC. Mientras que las tres cuartas partes restantes presentan la ruptura en la región menor (m-BCR) lo que es muy raro en la LMC (Bain B., 1999). El mecanismo leucemogeno es la fusión de parte del oncogen ABL del cromosoma 9 con parte del gen BCR en el cromosoma 22 designado BCR-ABL., que codifica para una proteína quimérica que tiene actividad tirosin -quinasa aberrante, lo cual genera una señalización celular anormal (Chan L.C., et al, 1987).

- Pre- preB /t(4;11)(q21;q23)/ Fusión MLL-AF4

Se han descrito aproximadamente 30 traslocaciones que involucran el 11q23 y que se asocian al 5% aproximadamente de todas las leucemias (Young B.D., 1992). Entre las malignidades hematológicas pediátricas es una de las más importantes, pues está presente en el 60-80% de los casos de leucemia en los niños; también se ha relacionado con leucemia

mieloide aguda, leucemias bifenotípicas y síndromes mielodisplásicos (Rubnitz J.E., et al, 1994) al igual que en leucemias secundarias o asociadas a quimioterapia (Felix C.A., 1998). Las traslocaciones más frecuentes son las t(4;11)(q21;q23) asociada a leucemia linfocítica aguda, siendo esta una de las más importantes en el grupo pediátrico, mientras que la traslocación t(9;11)(p12;q23) se asocia a leucemias mieloides agudas (Johansson B., et al, 1998; Swansbury G.J., et al, 1998).

La traslocación t(4;11) se relaciona estrechamente con leucemias de precursores temprano de células B (Behm F.G., et al, 1996). Este tipo de leucemia ocurre en todas las edades pero principalmente en las leucemias congénitas y en niños muy pequeños especialmente en el primer año de vida (Johansson B., et al, 1998). Además de expresar los marcadores de células B un gran número de casos co-expresan algunos marcadores mieloides como CD15, CD65 y CD33 (Pui C-H., et al, 1991a). El mecanismo molecular es la formación de un gen de fusión, el MLL-AF4, donde se incorpora parte del gen MLL (*myeloid-lymphoid leukaemia* o *ALL1*, *HTX* y *HRX*) en 11q23 y parte del AF4 en 4q21.

Hay otras leucemias, algunas de ellas linfocíticas asociadas a la fusión del MLL con otros genes de otros cromosomas como por ejemplo el 1, 6, 9, 10, 12, 19,20 y X (Bernard O.A. & Berger R., 1995).

- LLA de Células B/ t(8;14)(q24;q32) o t(8;22)(q24;q11) o t(2;8)(p12;q24)/ Desregulación del gen MYC

No es muy frecuente en el grupo pediátrico. Básicamente el mecanismo molecular de estas traslocaciones es la desregulación de c-MYC, gen que codifica para un factor de transcripción y que se yuxtaponen al gen de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas, o al gen de las cadenas livianas sea  $\kappa$  o  $\lambda$ . (Ihle J.N., 1996; Meydan N., et al, 1996). Esta yuxtaposición del gen *myc* con otros genes conlleva a la sobre- expresión del RNA MYC y de su proteína, resultando en un fenotipo leucémico (Golub T.R., Gilliland D.G., 1998).

#### 2.1.6.2. Linaje células T

La relación entre la patogénesis molecular y este fenotipo es muy compleja. Las mismas alteraciones citogenéticas y moleculares pueden encontrarse en otros fenotipos. Sin embargo en la mayoría de los casos este tipo de leucemia presenta rearrreglos que involucran los locus de los genes de los receptores  $\alpha$  y  $\delta$  (TCR  $\alpha$ ) de las Células T en 14q11-13 y de receptores  $\beta$  TCR  $\beta$  en el cromosoma 7q32-36 (Bain B.J, 1999).

- Linaje T/ t(11;14)(q24;q11)/desregulación de HOX11

Esta categoría corresponde al 5% de las leucemias de linaje T en niños (Chessels J.M., et al, 1997). El mecanismo leucemógeno en esta tras locación es debido a una desregulación del gen del factor de transcripción HOX11, como consecuencia de la proximidad al locus TCR  $\delta$  ( Dube I.D., et al, 1991; Hatano M., et al, 1991). Un mecanismo similar ocurre en la leucemia de células T con t(7;10)(q35;q24) donde la desregulación se detecta cuando el HOX11 se desregula por la proximidad del gen TCR  $\beta$  (Bain B.J., 1999).

- Linaje T/ Desregulación de TAL/ Delecion de TAL

Es el tipo mas frecuente en niños y adolescentes (Delabesse E., et al, 1997). La anomalía genética es una pequeña delección en el cromosoma 1 que solo es detectada por técnicas moleculares, causando una fusión de algunas secuencias de algunos genes de factores de transcripción encontrados en el cromosoma 1, como el TAL 1. Este también puede ser desregulado por traslocaciones pero es menos frecuente (Bain B.J., 1999).

FENOTIPO INMUNOLOGICO	ANORMALIDAD CROMOSOMICA	GEN RELACIONADO
<b>CELULAS B</b>		
B(slg+)	t(8;14)(q24;q32)	MYC-IGH
	t(2;8)(p12;q24)	IGK-MYC/PVT
	t(8;22)(q24;q11)	MYC/PVT-IGL
Pre-B(clg+)	t (1;19)(q23;p113)	PBX1-E2A
Pre-preB (clg-)	t(17;19)(q22;p13)	HLF-E2A
PreB (clg+).	T(9;22)(q34;q11)	ABL-BCR
	T(4;11)(q21;q23)	AF4-MLL
Pre preB (clg -)	T(12;21)(p12;q22)	TEL-AML1
	t(11;19)(q23;p13)	MLL-ENL
	Hiperdiploidia >50	
	Hiperdiploidia 47-50	
	Hipodiploidia	
<b>CELULAS T</b>		
	14q11(TCRA)	
	T(1;14)(p32;q11)	TAL1-TCRA
	t (10;14)(q24;q11)	HOXC11-TCRA

**Cuadro 6.** Correlación entre inmunofenotipo y alteraciones genéticas.

### 2.1.7. Factores pronóstico

Una gran variedad de características clínicas y de laboratorio son muy evidentes al diagnóstico y han sido consideradas como factores pronóstico de la enfermedad, prediciendo la remisión de los pacientes tratados (Bleyer W.A., et al, 1986). Estos factores pueden ser clasificados de acuerdo a su origen: relacionados al enfermo, relacionados a la enfermedad y relacionados con el tratamiento. Algunos de estos aspectos se resumen en el Cuadro. 7. (Donadieu J., et al, 1998). El reconocimiento de estos factores es el producto de múltiples y extraordinarios avances en diferentes disciplinas como en la inmunología, en la biología celular, citogenética, genética molecular, farmacología, estudio de procesos infecciosos, estadística, procesos clínicos y terapéuticos para el cáncer (Felix C.A., et al, 2000).

En el estudio dirigido por Donadieu se encontró que los factores pronósticos como la edad, el género, el recuento de glóbulos blancos y el cariotipo eran significativos en varios estudios multivariados, sin embargo tanto individualmente como colectivamente tienen un valor pronóstico bajo; por ejemplo: 1.1% género, 2.0% para la edad, 3.5% para el recuento de glóbulos blancos, y 1.6% para el cariotipo. Esta baja predicción refleja la poca frecuencia de los factores altamente desfavorables y el relativo alto número de pacientes con características favorables que mueren. (Donadieu J., et al, 1998). Además se concluyó en otros estudios que definitivamente estos factores no operan independientemente (Reaman G.H., et al, 1999), lo que significa que hay que considerar las interrelaciones entre los diferentes factores pronóstico.

Por ejemplo la edad es un factor pronóstico porque la mayoría de los niños de menos de un año o mayores de 9 años no tienen la LLA común y es considerado de mal pronóstico. Los niños menores de un año tienen aun peor pronóstico porque aquí la enfermedad tiene unas características biológicas únicas, que además explican la pobre respuesta a la terapia (Reaman G., et al, 1985). Mientras que los niños diagnosticados entre los 1 y los 9 años con un recuento menor de leucocitos de  $50.000 \times 10^9/L$  concomitante con un inmunofenotipo de células B es considerada de bajo riesgo (Smith M., et al, 1996) mas no en la leucemia de las de células T (Pui C-H., 2001).

Se ha demostrado en la mayoría de los estudios de LLA que el Recuento de Glóbulos Blancos (RGB) inicial es un factor de riesgo muy importante. El pronóstico es inversamente proporcional al recuento de leucocitos (es lineal y continuo). Los pacientes con un recuento mayor de  $50.000 \times 10^9/L$  tienen un mal pronóstico (Mastrangelo R., et al, 1986).

En cuanto al género, las niñas tienen un mejor pronóstico. Tampoco se tiene una explicación clara del porque el género masculino es desfavorable en la mayoría de estudios exceptuando los estudios del Children Cancer Group después de los 80's (Donadieu J., et al, 1998; Pui C-H. , Evans W.E., 1998; Nachman J.B., et al, 1998; Shuster J.J., et al, 1998; Chessells J.M., et al 1995). Aunque se le atribuye parcialmente a que es más frecuente las leucemias de células T en los niños (Pui C-H. , Boyett J.M., et al, 1999.), y además el impacto que tiene la recaída testicular sobre estos (Hammond D., et al, 1986).

Muchos estudios han mostrado que la raza es un factor pronóstico importante en la enfermedad (Smith M., et al, 1999). En una cohorte estudiada por el Children's Cancer Group, realizado por el Dr. Bhatia y colaboradores se observó un comportamiento de la enfermedad de los niños y de los adolescentes de acuerdo a la raza de la siguiente manera: la supervivencia a 5 años en 167 niños asiáticos era del 89%, en 6.703 caucásicos era del 84%, del 78% para 1.071 niños hispanos y el 74% para los afro americanos ( $p < 0.001$ ) (Bhatia S., et al, 1999).

Sin embargo en algunos estudios realizados en el Hospital St. Jude no observaron significación estadística sugiriendo que con un tratamiento más intensivo desaparece la asociación (Pui C-H., et al, 1995). Sin embargo diferencias significativas persisten en varios análisis multivariados, donde al ajustar con la edad y el recuento inicial de glóbulos blancos hay un riesgo mayor de recaer en los niños de raza negra (Pollock B.H., et al, 2000). Además estas no se han correlacionado con un estatus socioeconómico o educacional específico. (Felix C.A., et al, 2000).

La infiltración tumoral es evaluada indirectamente al establecer el grado de Hepato-esplenomegalia, linfadenopatías y presencia de masa mediastinal; la presencia o ausencia de estas, esta relacionada con factores pronóstico. En algunos estudios de análisis multivariados se ha visto que la presencia de megalias esta relacionada con el recuento inicial de leucocitos y define grupos de riesgo (Berg S.L., et al, 2000).

El inmunofenotipo se correlaciona también con el pronóstico (Foon K., Todd R.I., 1986). Pacientes con LLA de células maduras tanto de origen B y T tiene un pronóstico peor que los pacientes con inmunofenotipo de células B inmaduras. El inmunofenotipo de las células T se relaciona con el recuento inicial de leucocitos, además de que puede influenciar de alguna manera el tratamiento utilizado (Kalwinsky D., et al, 1985). La Coexpresión de marcadores mieloides se ha asociado a mal pronóstico sin embargo es controversial (Pui C-H. , et al, 1993a). También hay relación entre la clasificación morfológica y el pronóstico de la enfermedad. El subtipo L3, que corresponde a células B, es considerado el de más mal pronóstico; el subtipo L2 en algunos estudios también es considerado de mal pronóstico, mientras que el subtipo L1 es de buen pronóstico (Lilleyman J., et al, 1986).

Abundantes alteraciones citogenéticas y moleculares se registran en la LLA en los niños. La citogenética juega un papel relevante en los factores pronóstico. Esta puede modificar el riesgo de hacer una recaída (Chessells J.M., et al 1997; Treworthy R., et al, 1992; Pui C-H. , et al, 1990b).La hiperdiploidía, especialmente entre 51 y 63 cromosomas (entre estos la trisomía del cromosoma 10) se asocia a un buen pronóstico de la enfermedad (Heerena N.A., et al, 2000). Pseudodiploidía e hipodiploidía, (menos de 45 cromosomas), en cambio son consideradas de mal pronóstico (Heerema N.A., et al, 1999).Aproximadamente la mitad de los niños tienen la traslocación t(4;11) lo que establece que es una entidad clínica y molecular desfavorable, además con excepción de t(9;22) y t(1;19), los estudios moleculares de las otras traslocaciones descritas no tienen una explicación clara sobre su valor en el pronóstico de la enfermedad. Tampoco está claro como es que la t(12;21)(TEL/AML1) confiere un buen pronóstico (Felix C.A., et al, 2000).

Después de los 10 años de edad, la frecuencia del cromosoma (Ph+) se incrementa, lo que es poco favorable en el pronóstico (Arico M., et al, 2000).Hay que mencionar que los métodos moleculares como la Hibridación in situ por fluorescencia( FISH) y las técnicas de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT- PCR), han permitido aumentar la capacidad de diagnóstico de las alteraciones genéticas más que las técnicas de la citogenética clásica como por ejemplo: t(4;11) y MLL-AF4, t(9;22) y BCR ABL y t(1;19) y E2A PBX sumándose la identificación de estas a los factores de riesgo (Ritterbach J., et al 1998; Gaynon P.S., et al, 1997).

En los niños la presencia de la disminución de las inmunoglobulinas séricas, especialmente la Ig M se ha asociado a un mal pronóstico (Leiken S., et al, 1981).

El bajo valor predictivo de los factores de riesgo convencionales como la edad, RGB, género y cariotipo han hecho que se piense en establecer nuevas categorías para el pronóstico. Algunos investigadores consideran que el único factor pronóstico, es el tratamiento, pues sin tratamiento la enfermedad es fatal, y administrando el tratamiento correcto a cada paciente no lo es (Pincel D., 1996).De esta forma los únicos factores pronósticos que pueden ser modificados son los relacionados con el tratamiento.

Es así como en algunos estudios recientes, la respuesta temprana al tratamiento es el factor pronóstico más importante (Gaynon P.S., et al, 1997). Grupos cooperativos de estudio de la LLA, como en el grupo de estudio de Berlín-Frankfurt-Munster (BFM) consideran que la reducción del recuento de blastos (menos de 1000 /mL) en sangre periférica en los primeros 7 días de administrada la prednisona y una dosis de methotrexate intratecal, es un factor pronóstico más importante inclusive que la presencia de t(4;11) y t(9;22)(Scharappe M., et al, 1998; Dordelmann M., et al, 1999).

Otras variables que pueden predecir la respuesta al tratamiento es la variabilidad heredada o adquirida para la disponibilidad y metabolismo de las drogas, así como la dieta complementaria y el uso de medicamentos alternativos (Felix C.A., et al, 2000).

RELACION- HUESPED	RELACION-ENFERMEDAD	RELACION-TRATAMIENTO
Edad	Recuento blancos	Protocolo
Genero	SNC	Respuesta temprana al tratamiento
Raza	Masa mediastinal	Blastos en Sangre periférica
S. Down	Esplenomegalia	Enfermedad residual mínima
Inmunodeficiencia	Hepatomegalia	Respuesta a prednisona
Nutrición	Infiltración testicular	
Farmacogenética	Hemoglobina mayor10gr/dL	
Polimorfismos GSTs	Adenopatías visibles	
Farmacogenómica	Morfología FAB	
	Linaje células T	
	Linaje de células T inmaduras	
	Linaje células B	
	CD10 positivo	
	Coexpresión antígenos mieloides	
	Cariotipo	
	Hiperdiploidía	
	Hipodiploidia	
	t(9;22)	
	t(4;11)	
	+4, +10	
	del 9p	
	13(q12-14)	
	15(q13-15)	
	+10,+17, +18	
	Otras t(11q23)	
	t(1;19), balanceada	
	TEL/AML1	
	MLL	
	DHL	
	Disminución Ig M sérica	

**Cuadro 7.** Factores Pronóstico relacionados con la Leucemia Linfoide Aguda



## 2.2. POLIMORFISMOS GENETICOS

Las enzimas que participan en la biotransformación de sustancias químicas juegan un papel relevante en el metabolismo de los xenobióticos que pueden ser activados o desactivados en el organismo. Dentro de los seres humanos se observa una variabilidad inter-individual en los niveles de actividad de estas enzimas de biotransformación (Boobis A.R., 1992; Mulder G.J., 1995; Boobis A.R., 1996).

El metabolismo de los químicos ambientales está regulado por un gran grupo de genes. La mayoría de los químicos son convertidos inicialmente en metabolitos electrofílicos reactivos por medio de enzimas oxidativas especialmente las del grupo del citocromo p450 (Guengerich F.P., Shimada T., 1998). Estos tóxicos ambientales como se describe son eliminados del organismo a través de un proceso de biotransformación que los elimina del cuerpo después de una transformación metabólica mediada por las enzimas de fase I las del citocromo p450 (CYPs) que catalizan reacciones de hidroxilación, reducción y oxidación de xenobióticos a sustancias más activas y en muchos casos estos metabolitos pueden ser altamente reactivos y adherirse a la molécula de ADN generando aductos que participan en los procesos carcinogénicos.

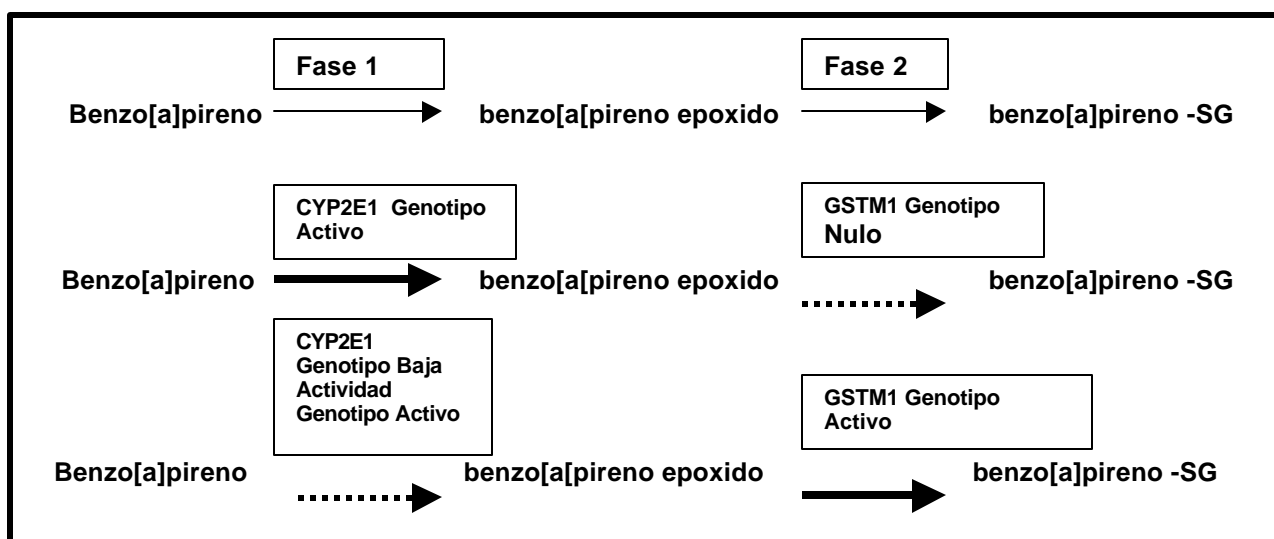
Por lo tanto se genera un segundo paso metabólico donde las enzimas de fase II especialmente las transferasas como las Glutathion S-transferasas (GSTs), Las acetiltransferasas y las UDP-glucuroniltransferasas, a través de reacciones de conjugación como glucoronización, acetilación y metilación convierten estos metabolitos a formas oxidadas de xenobióticos o no reactivas que son hidrosolubles y que de esta manera son eliminadas del organismo. (Hirvonen A., 1997). Es así como la acción de las enzimas de fase I y fase II son necesarias para determinar el efecto biológico final de la exposición a los xenobióticos (Salama A., et al, 1999), llevando finalmente a la conclusión del papel crítico de la expresión coordinada de los genes que codifican para estas enzimas.

Por consiguiente existe una variación interindividual de las enzimas envueltas en este proceso de biotransformación de xenobióticos que lógicamente está relacionada con diferentes polimorfismos genéticos (Raunio H., et al, 1995) y que por consiguiente se ha relacionado algunos polimorfismos genéticos que participan en el desarrollo de algunas enfermedades inducidas por problemas ambientales (Anwar W.A, et al, 1996; El-Zein R.A., Conforti-Froes N., 1997; El-Zein R.A., et al 1997). Un ejemplo de esta interacción se observa en la Figura. 2 donde la interacción de las diferentes enzimas con variaciones genéticas en ambas fases modulan el proceso de manera

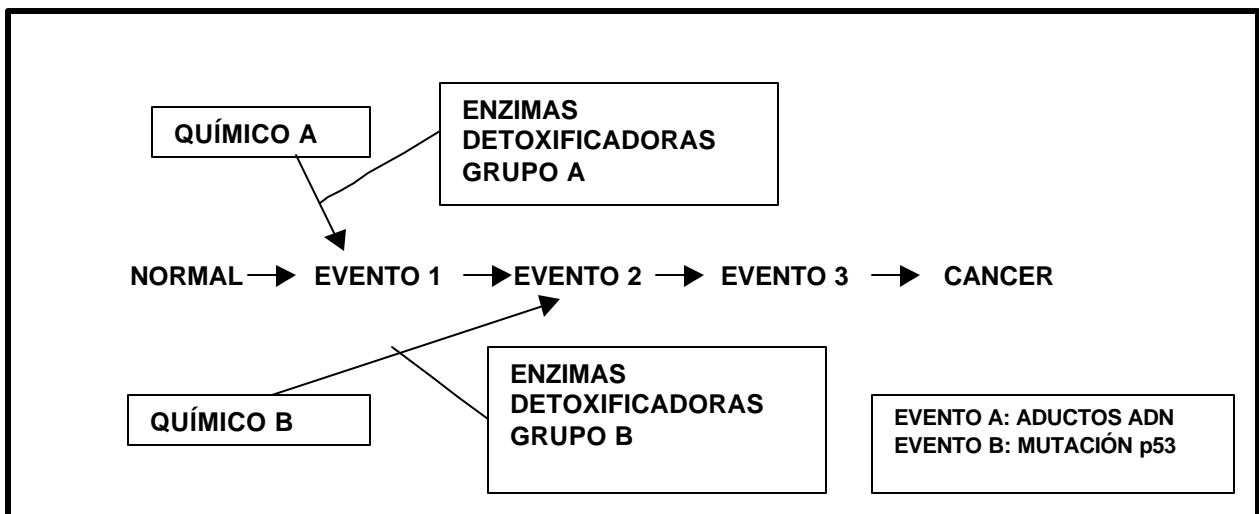
diferente, estableciéndose el riesgo de enfermedad mediado por la capacidad del individuo en metabolizar los tóxicos del humo del cigarrillo.

En los últimos años diferentes trabajos han tratado de explicar el origen de la LLA en niños, como una combinación de interacciones entre factores genéticos y exposiciones ambientales (Chen C-L., et al, 1997; Krajinovic M., et al,1999; Lemos M.C., et al, 1999; Sinnett D., et al, 2000; Krajinovic M., et al, 2001; Alves S, et al, 2002; Krajinovic M, et al, 2002). Modelos como se observan en la Figura. 3, muestran el efecto de detoxificación de químicos endógenos y exógenos en el proceso carcinogénico.

En este contexto la LLA definitivamente debe considerarse como una enfermedad muy compleja que según los diferentes estudios que tratan de establecer la etiología puede ser causada por un efecto ambiental carcinogénico que es modificado o influenciado por una serie de genes que codifican para estas enzimas y que presentan gran variabilidad genética (polimorfismos genéticos) interindividual y étnicos, que a su vez modulan la capacidad del individuo a metabolizar todas estas sustancias.



**Figura 2.** Efecto de los polimorfismos de fase I y II en el metabolismo del benzo [a] pireno. Adaptación de Fryer A.A., Jones P.W.,( 1999) Interactions between detoxifying encimes polymorphisms and susceptibility to cancer. In Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publication N°148, pp304.



**Figura 3.** Efecto de la detoxificación de químicos endógenos y exógenos en el proceso carcinogénico. Tomado de Fryer A.A., Jones P.W., (1999) Interactions between detoxifying enzymes polymorphisms and susceptibility to cancer. In Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer. IARC Scientific Publication N°148, pp305.

### 2.2.1 Citocromo P450

Las isoenzimas de la p450 corresponden a una gran familia de enzimas que están presentes en la naturaleza desde antes de la división entre organismos procariontas y eucariotas. Se han identificado más de 500 miembros agrupadas en 74 familias de las cuales 20 están presentes en el genoma humano, y de ellas solo las familias 1, 2 y 3 que tiene a su vez subdivisiones, participan en el metabolismo de sustancias ambientales (Nelson D.R., et al., 1996). En un gran número de casos las isoenzimas de la p450, específicamente las de la familia 1, 2 y 3 participan en el metabolismo de procarcinógenos y compuestos muy citotóxicos (Guengerich F.P., & Shimada T., 1991; Guengerich F.P., 1992; Gonzalez F.J. & Gelboin H.V., 1994).

Teniendo en cuenta que la activación de las enzimas del citocromo juegan un papel importante en la toxicidad por drogas en humanos (Park B.K, Pirmohamed M. & Kitteringham N.R., 1995) y que se ha asociado a cáncer humano, estos polimorfismos genéticos dan lugar a unas variaciones interindividuales en el metabolismo y toxicidad a xenobióticos (De Groot M.J. & Vermeulen, N.P., 1997).

En familia de las CYP1, la CYP1A1 es la enzima principal que se encarga de metabolizar los hidrocarburos policíclicos aromáticos como el benzo [a] pireno y el dimetil benzatranceno, carcinógenos presentes en el humo de cigarrillo y contaminantes del aire. Algunos de estos compuestos requieren mas de un paso metabólico para su activación en donde otras enzimas del citocromo pueden participar activamente. Varios polimorfismos de esta enzima se han asociado con riesgo de cáncer (Kawajiri K., 1999). La CYP1A2 tiene diferencias claras con la anterior en los sustratos, pues las nitrosaminas, arilaminas heterocíclicas, y la aflotoxina B1 son sus principales blancos (Guengerich F.P., & Shimada T., 1991).

La familia de las CYP2 es la más grande de las CYPs y un vasto numero de compuestos estructuralmente diferentes, son metabolizados por las enzimas de esta familia. Hay diferencias esenciales en las propiedades catalíticas en los miembros de las diferentes subfamilias así como en la misma familia. (Nelson D.R., Koymans L., 1996). Dentro de las más importantes la CYP2A6 metaboliza carcinógenos importantes como las nitrosaminas y la aflotoxina B1, además de ser la principal catalizadora de la nicotina (Raunio et al. ,1999) y la CYP2D6 que metaboliza drogas muy utilizadas en la clínica. Su papel en la carcinogénesis es controversial (Wolf R., Smith G., 1999).Revisaremos mas afondo la CYP2E1.

#### 2.2.1.1. CYP2E1

La CYP2E1 ha sido de mucho interés científico debido a su papel en el metabolismo y catabolismo de muchos solventes por reacciones de oxidorreducción como por ejemplo las N – nitrosaminas, benceno, tetracloruro de carbono, etilen glicol, cloroformo, paracetamol, estireno y etanol (Guengerich F.P., Kim D.H., et al, 1991).También es responsable del metabolismo de algunos compuestos endógenos como la acetona y el acetal. Algunos otros sustratos están referidos en el Cuadro. 8 (Lieber C.S., 1997). Aparentemente los compuestos hidrofóbicos de bajo peso molecular son sus principales sustratos.

El sitio activo de la enzima probablemente esta diseñado para acomodarse a partículas relativamente pequeñas y a su vez de diferentes estructuras indicando que como metaboliza un gran numero de compuestos su sitio activo no encaja específicamente con alguno, lo que indica que los sustratos no tiene una afinidad alta a ale enzima y es por esta razón se necesita una gran concentración de sustrato para que se obtenga la optima actividad de la enzima (Guengerich F.P., & Shimada T., 1991). Muchos de estos sustratos son carcinógenos o son metabolizados a carcinógenos (Wormhoudt L.W., et al, 1999).

Se han documentados diferencias interindividuales tanto en su actividad catalítica como en los niveles de proteína. La CYP2E1 ha sido implicada en un gran numero de patologías asociadas al alcohol, como el alcoholismo, cirrosis hepática (Tsutsumi M., Takada J.S.,1994), cáncer de la cavidad oral, nasofaringe, esófago,( Hildesheim A., et al, 1997), pulmón(el Zein R.A., et al, 1997), seno y estomago( Nishimoto I.N., et al,2000).

El gen p450IIE1 (CYP2E1) es polimórfico(Watanabe J., et al 1990), y esta localizado en el cromosoma 10( Mc Bride O.W., et al, 1987). Los polimorfismos genéticos de la CYP2E1 mas estudiados son los estudiados con las enzimas de restricción *Pst I/Rsa I* y *Dra I* donde se han detectado un gran numero de RFLPs (Uematsu F., et al, 1991). La mejor estudiada es la de los polimorfismos de la región franqueante transcripcional 5' con *Pst/Rsa I* ( G<sub>1259</sub>C) Y los polimorfismos de *Dra I* en el intron 6 del gen de la CYP2E1.Se generan tres genotipos: el A/A o c2/c2 que es el alelo más raro, C/C o c1/c1 que es el alelo mas comun y la forma heterocigota que se denomina C/A o c1/c2 ( Uematsu et al. , 1991).

Se ha reportado una variación étnica de estos (Kato S., et al. , 1992).Los polimorfismos de la *Pst I/Rsa I* por ejemplo, ocurren con mucha mas frecuencia en orientales como en los Japoneses y Chinos cuando se compara con los caucásicos, Afro-americanos y europeos americanos (Oyama T., et al, 1997; Kato S., et al, 1993).Hay información contradictoria sobre el papel de los polimorfismos y el cáncer. Algunos alelos presentan mas riesgo de cáncer. Por ejemplo en algunos estudios, el polimorfismo obtenidos con *Rsa I* se han asociado a cáncer nasofaríngeo, encontrando que los individuos que poseen el alelo c2 tienen mas riesgo que los que tiene el alelo c1 (Hildesheim A., et al, 1997).

ALCOHOLES, ALDEHIDOS CETONAS, NITRILOS	COMPUESTOS AROMÁTICOS	ACIDOS GRASOS	ALCANOS Y ALKENOS HALOGENADO S	NITROSAMINAS COMPUESTOS AZO	ETER
Acetaldehido Butanol Etanol Glicerol Metanol Propanol Pentanol	Acetaminofen Anilina Benceno Bromobenceno Chlorzoxazone Isoniazida Fenol Pyrazole Teofilina Tolueno Styreno Tamoxifen p-nitrofenol	Acido araquidónico Acido Laurico	Acetona Acetonitrilo Cloroformo Clorometano Tetracloruro de carbono Diclorometano Cloruro de metilo  Otros	Azoxymetano NN-Dietilnitrosamina N- Nitrosometilbenzilami na Otros	

**Cuadro 8.** Sustratos de la enzima CYP2E1. (Adaptación de Lieber C., 1997)

### 2.2.2. Glutation – S – transferasa (GST)

La familia de las enzimas Glutation S- transferasa (GSTs) son un grupo de enzimas dimericas que catalizan la conjugación del glutatión a xenobióticos electrofílicos para poder inactivarlos y poder facilitar su excreción del organismo. Las enzimas GSTs, se expresan en la mayoría, sino en todos los organismos vivos, lo que demuestra el papel tan importante que juega en el ámbito celular, protegiéndola contra las sustancias químicas a las que se expone. Las isoenzimas están divididas en siete clases, cinco de las cuales están en el citoplasma (alpha, mu, pi, theta y kappa) y dos están unidas a la membrana citoplasmática (Pickett C.B. & Lu A.Y., 1989; Board P., 1990; Pemble S., et al, 1996). Hay evidencia clara de que hay varios alelos en cada una de las familias alpha, mu, theta y pi (Strange R.C., Fryer A.A., 1999).

El rango de sustratos de estas enzimas es grande y juegan un papel muy importante en la detoxificación de productos del estrés oxidativo y de xenobióticos o carcinógenos ambientales incluyendo los presentes en el humo de cigarrillo (Hayes J., Pulford D., 1995; Armstrong, R.N., 1997).

No son muy claros los mecanismos en los que los sustratos generados por el estrés oxidativo de los lípidos y del ADN, son metabolizados tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Sin embargo se sabe por ejemplo que las enzimas de la clase alpha son básicas para metabolizar productos de la peroxidación de los lípidos como el hidroperóxido de cumeno (Hayes & Pulford, 1995). Mientras que las de la familia pi (GSTP1) participan de manera muy efectiva en la detoxificación del proenal de timina y uracilo que se originan de la oxidación del ADN (Berhane K., et al, 1994). Otros productos del estrés oxidativo como los metabolitos de las quinonas derivadas de las catecolaminas y de la adrenalina son metabolizadas por las GSTM1-2 (Baez S., et al, 1997).

Con respecto a los sustratos encontrados en el ambiente, contribuye a detoxificar sustancias encontradas en el aire, los alimentos y algunas drogas. Los encontrados en los productos de combustión como los Hidrocarburos policíclicos Aromáticos son de los más importantes. La activación de estos requiere las enzimas de fase I como ya se menciono convirtiéndolos en metabolitos supremamente tóxicos que luego serán detoxificados por las GSTs. El humo de cigarrillo contiene por lo menos 55 carcinógenos que se pueden agrupar en tres grupos: Hidrocarburos policíclicos aromáticos, N-Nitrosaminas, y Asz-arenas (IARC. , 1986;Hecht S.,

1999). En el grupo de los hidrocarburos aromáticos, el benzo(a) pyreno diol epoxido es el más estudiado. La activación de este compuesto resulta en la transformación a 7,8-diol-9,10 epoxido, un sustrato conocido de la enzima GSTM1 (Vineis P., et al, 1999).

El metabolismo de estas sustancias carcinogénicas involucran un equilibrio en los diferentes pasos para la activación de los productos reactivos intermedios para luego en el paso de la detoxificación producir sustancias solubles en agua. La activación de estas sustancias también esta mediada por algunas enzimas del citocromo p450 que en algún momento pueden generarse compuestos que se unen covalentemente al ADN, formando aductos. La acumulación de estos en los ciertos sitios críticos del ADN como por ejemplo en algún oncogen o genes supresores de tumores particularmente sobre la p53, conllevando a mutaciones somáticas y desregulación del ciclo celular (Hecht S., 1999), probablemente contribuyendo al proceso carcinogénico.

Otros carcinogénicos presentes en el humo del cigarrillo son el oxido de etileno y los epoxibutanos que son sustratos conocidos de la GSTT1 (Vineis P., et al. , 1999). Ambas enzimas participan también en el metabolismo de algunos pesticidas como los halometanos y el bromuro de metilo (Hayes J., Pulford D., 1995; IARC. ,1999) así como los organofosforados y contaminantes ambientales, al igual que algunos productos quimioterapéuticos como algunos agentes alquilantes. (Wormhoudt L.W., et al, 1999; Salinas A.E., Wong M.G., 1999).

Así entonces como juegan un papel importante en la detoxificación de compuestos potencialmente genotóxicos, tienen por consiguiente un papel protector fundamental en la carcinogénesis química. (Ketter B., 1988; Coles B. & Ketterer B., 1990), estableciendo de alguna manera la posibilidad de identificar los individuos que al poseer ciertos genotipos o combinaciones particulares de genotipos serian deficientes en su mecanismo de detoxificación determinando de esta manera el riesgo individual al cáncer.

Se han descrito diversos polimorfismos de estas enzimas en diferentes grupos étnicos (Rebbeck T.R., 1997) incluso múltiples variaciones dentro de la misma raza blanca (Cosma G., et al, 1993; Taioli G., et al, 1995), estableciendo posibles asociaciones con cáncer de vejiga, tracto gastrointestinal, seno (Zhong S., et al, 1993), cerviz (Warwick A., et al, 1994) y piel (Heagerty A., et al, 1993) entre otros.

Los polimorfismos genéticos GSTM1-1, GSTT1-1, son los que nos presentan interés en este trabajo.

#### 2.2.2.1. Glutathion S- Transferasa *theta* (GSTT1):

El gen que codifica para la GSTT1 está localizado en el cromosoma 22q11.2 (Webb, G., et al, 1996). A través de estudios genéticos se ha identificado la presencia de dos polimorfismos genéticos uno funcional y uno nulo, como consecuencia de la delección del gen (Pemble, S., et al, 1994). La frecuencia en la que ocurre esta delección, es diferente en las poblaciones, indicando que hay un alto grado de variabilidad inter-étnica. Los estudios realizados en Norteamérica muestran que el polimorfismo de delección de la GSTT1 es mucho menor que el de la GSTM1. En la población americana con descendencia europea se encontró que entre el 15-31% presentaba el polimorfismo de delección de la enzima (Cotton S., et al, 2000), mientras que en la población afroamericana era aproximadamente del 22% (Nelson H.H, et al, 1995), y en las poblaciones de descendencia hispana fue del 10-12% (Crump C., et al. , 2000). En la población europea por ejemplo en Suecia, la delección del gen ocurre con una frecuencia del 10% (Warholm M., et al, 1995) mientras que en los Italianos fue del 21% y del 28% en los Eslovacos (Palli D., et al. , 2000; Salagovic J., et al, 1999).

En los Orientales, como por ejemplo los chinos, presentan una frecuencia muy alta del polimorfismo de delección, con 61% (Nelson H.H, et al, 1995; Lee E.J., et al, 1995). En un estudio realizado en el Brasil se encontró que la frecuencia para la delección del gen fue de 18% en los caucásicos, y el 19% en los negros descendientes de africanos, mientras que en los indígenas del Amazonas se encontró una frecuencia del 11% (Arruda V.R., et al, 1998).

#### 2.2.2.2. Glutathion S- Transferasa *Mu* (GSTM1)

Se localiza en el cromosoma 1p13.3 (Seidegard J., et al, 1988). La GSTM1 se expresa en el hígado, estómago, cerebro y otros tejidos. El polimorfismo del locus GSTs fue reportado por primera vez en GSTM1 (Borrad P.G., 1981). El modelo se basó en tres alelos: GSTM1<sup>0</sup>, GSTM1<sup>A</sup> y GSTM1<sup>B</sup>. El GSTM1<sup>0</sup> corresponde al genotipo homocigoto nulo, el cual presenta delección completa y no expresa proteína, mientras que los otros dos polimorfismos solo difieren en una base en el exón 7. Los estudios in vitro muestran que son muy similares en su función catalítica. Así que los individuos que son homocigotos para el polimorfismo de delección se categorizan como individuos no conjugadores, mientras que los que tienen cualquiera de los dos



polimorfismos genéticos funcionales se agrupan en un solo grupo de individuos conjugadores (Seidegard J., et al, 1988; Rebbeck T.R., 1997).

También se han reportado variaciones de los polimorfismos en diferentes poblaciones. En Estados Unidos se reporta que el polimorfismo de deleción de la GSTM1 varia en los diferentes grupos étnicos: en los descendientes de africanos es del 23-41%, en descendientes de asiáticos es del 35-53%, en descendientes de hispánicos es del 40-53%, y en descendientes de europeos es del 35-62%. (Cotton S., et al., 2000; Rebbeck T.R., 1997). Entre los Americanos caucásicos se ha reportado un intervalo de frecuencia entre 48-57% del polimorfismo de deleción (Crump C., et al. , 2000; Chen C., Madeleine M., 1999; Gerting D., et al., 1998).

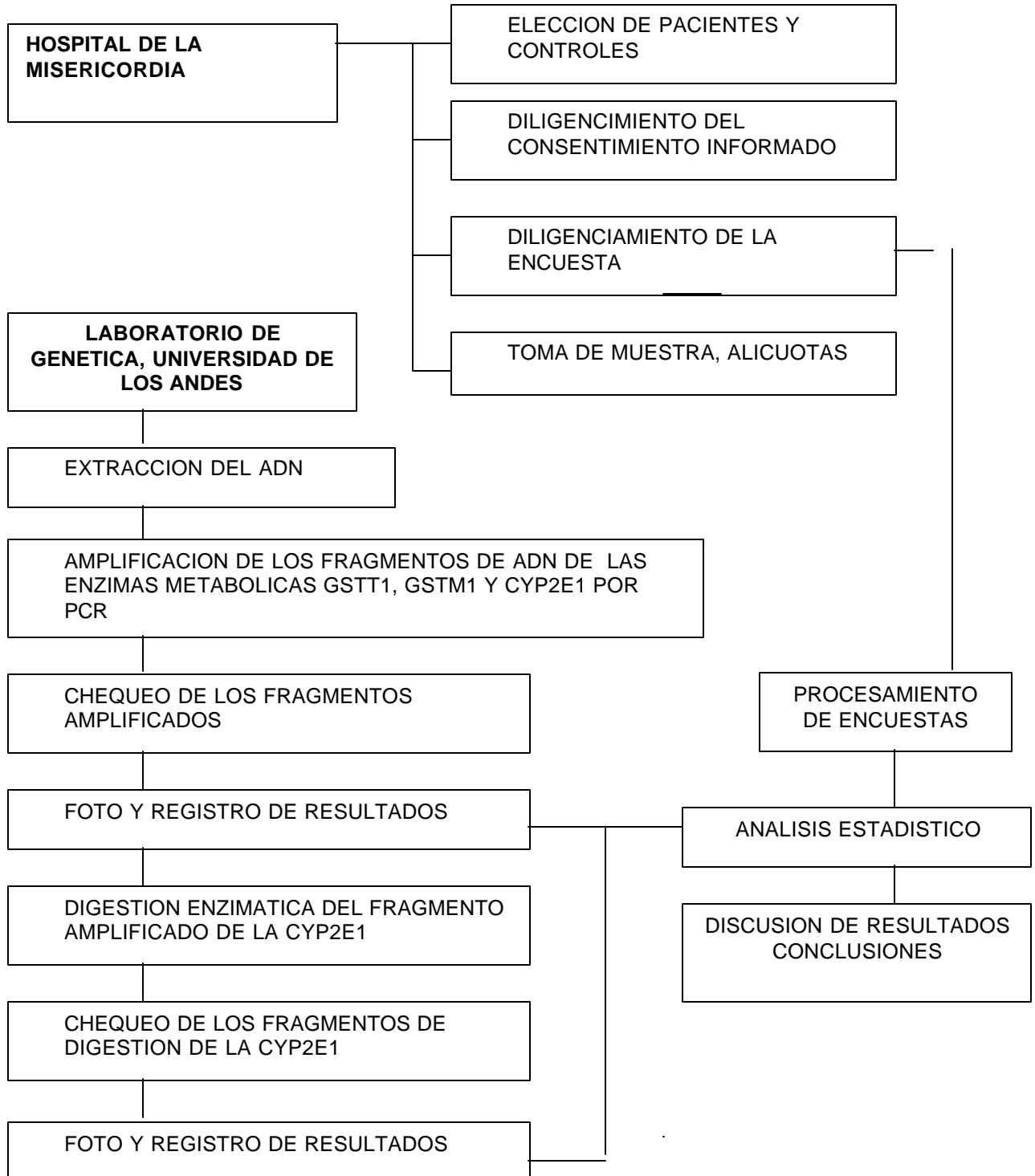
En Sur América se ha reportado en un estudio de Chilenos una frecuencia del 21%(Quiñónez L., et al. , 1999) mientras que en caucásicos Brasileños 55%, negros Brasileños 33% y 20% para los indígenas del Brasil (Arruda V., et al, 1998).

En Europa se observan variaciones interétnicas, pues en un estudio de Franceses se reporta un 46% del polimorfismo de deleción (Strucker I, et al., 1999), mientras que en Italianos es del 53% (Palli D., et al., 2000), en Hungría 44% (Kiss I., et al., 2000) y en la republica de Eslovenia es del 50% (Salagovic J., et al, 1999).

En Asia por ejemplo se reportan una alta frecuencia del polimorfismo de deleción, pues entre los chinos se observa un intervalo de frecuencia de 35-63% y en los japoneses entre 48-50% (Rebbeck T., 1997).

### 3. MATERIALES Y METODOS

#### DIAGRAMA DE FLUJO



### 3.1. POBLACION DE ESTUDIO

Se estudiaron 147 niños con Leucemia Linfoide Aguda (n = 147), que fueron diagnosticados en el servicio de Oncohematología del Hospital de la Misericordia de Bogotá entre Enero de 1982- Agosto del 2002. Concomitante se estudio un grupo de niños(n = 160) que llegaron a la consulta externa del Hospital de la Misericordia y a los cuales no se les diagnostico enfermedad hematología maligna, quienes constituyeron el grupo control. Para el desarrollo de este estudio se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

-Criterios de inclusión:

- Niños colombianos con diagnostico de Leucemia Linfoide Aguda, cuyos padres libremente autorizaran que el menor participara en el estudio.
- Historia clínica completa.
- Disponibilidad de la sangre periférica.
- Consentimiento Informado debidamente diligenciado.

-Criterios de exclusión:

- Niños con diagnóstico de enfermedad hematológica maligna diferente a Leucemia Linfoide Aguda.
- Padres que no aceptaron libremente hacer parte del estudio.

Tanto a los casos como a los controles se lea aplico un cuestionario estandarizado que incluyo algunos datos personales como: edad, género, procedencia, ocupación del padre y de la madre. Con respecto a las interacciones ambientales y hábitos, se tuvo en cuenta los siguientes factores: la exposición a químicos, interrogándose si eran almacenados en la casa o emitidos al ambiente por cercanía de fabricas o talleres; el uso de pesticidas o insecticidas bien fuera en su domicilio o en cercanías a él; la vecindad de subestaciones eléctricas o transformadores que generaran campos electromagnéticos importantes; el habito de fumar de los padres o la exposición al humo de cigarrillo bien fuera del menor o de la madre durante el embarazo; Finalmente el uso de drogas o medicamentos y el consumo de alcohol tanto en el periodo prenatal como postnatal tanto de la madre como del padre. Algunos hábitos alimenticios del menor como el consumo de alimentos a la brasa, alimentos industriales o con preservativos. Se cuestiono especificamente a las madres de situaciones emocionales relevantes en el periodo prenatal o en los menores antes de la aparición de la enfermedad. Los antecedentes de cáncer familiar también fueron tenidos en cuenta. El resumen de estas variables se muestra en la Tabla. 1.

<b>FACTORES</b>	
EDAD, GENERO	En el caso de los enfermos, la edad que se tuvo en cuenta fue la del momento del diagnostico de la enfermedad.
PROCEDENCIA DEL MENOR	Se tuvo en cuenta tanto la del padre como la madre.
ORIGEN	Si provenían de la zona rural o urbana
EXPOSICION A SUSTANCIAS QUIMICAS	Que se almacenaran en la casa, o que el menor tuviera contacto en la casa, o la madre durante el embarazo.
CERCANIA A FABRICAS	Que la vivienda del menor fuera cercana a fabricas que emitieran al ambiente humo u olores a sustancias químicas contaminantes.
CERCANIA A TALLERES	Que la vivienda del menor fuera cerca de un taller o que viviera en un taller de mecánica, pintura, ornamentación, carpintería, o que usen sustancias químicas.
EXPOSICION A PESTICIDAS	Si fumigaban la casa y conque producto y la frecuencia. Si tenían cercanía a cultivos.
EXPOSICION A CAMPOS ELECTROMAGNETICOS	Cercanía de la vivienda del menor a líneas de alta tensión o generadores eléctricos.
EXPOSICION A HUMO DE CIGARRILLO	Que la madre fumara durante el embarazo, o estuviera expuesta al humo de esté, o que el menor se expusiera al humo del cigarrillo y conque frecuencia.
CONSUMO DE MEDICAMENTOS O DROGAS	Si durante el embarazo se consumió algún medicamento o drogas.
CONSUMO DE ALIMENTOS INDUSTRIALES	Consumo de productos industriales (comida empaquetada) por parte del menor previo a la manifestación de enfermedad.
CONSUMO ALIMENTOS A LA BRASA	Que cocinaran con leña, o frecuencia en que se consumían productos a la brasa.
CONSUMO DE ALCOHOL EN EL EMBARAZO	Consumo por parte de la madre de alcohol

	durante el embarazo y la frecuencia.
CONSUMO PATERNO DE ALCOHOL	Consumo de alcohol por parte del padre previo al embarazo y la frecuencia.
PROBLEMAS EMOCIONALES	Problemas emocionales relevantes en la madre durante el embarazo o en el menor previo a la manifestación de enfermedad .
ANTECEDENTES DE CANCER	Antecedentes de cáncer familiar en ambos padres.

**Tabla 1.** Resumen de los factores ambientales y hábitos de la población a estudio

A su vez se obtuvo el consentimiento informado para la obtención de la muestra de sangre periférica y para la participación del estudio en cuestión. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Misericordia. (Anexo 1 y Anexo 2).

Se revisaron las Historias Clínicas de los 147 pacientes leucémicos para la recolección de la información clínica y de laboratorio que se tuvieron en cuenta en este trabajo como: presencia o ausencia de Hepato-Esplenomegalia, compromiso de Sistema Nervioso Central (SNC) o Testicular en el momento del diagnóstico, recuento inicial de leucocitos y plaquetas, presencia en sangre periférica de células blásticas; también se incluyó la inmunotipificación de la leucemia teniéndose en cuenta la expresión del antígeno CD10 o CALLA y la co- expresión de antígenos mieloides como el CD33, CD34 y CD13 entre otros.

### 3.2. TOMA DE MUESTRA

Se tomaron aproximadamente 5ml de sangre venosa en tubos con EDTA Na<sub>2</sub>. Se hicieron alícuotas de 0.2 ml, las cuales fueron almacenadas a -20°C, mientras se hizo la extracción del ADN.

### 3.3. EXTRACCIÓN DEL ADN

El ADN fue extraído de sangre completa a partir del método basado en el uso de una resina de intercambio iónico, el *Chelex<sup>R</sup> 100 al 20%* (Walsh P.S., Metzger D.A., Higushi R., 1991), según el protocolo descrito en el Anexo 3. La composición química de la resina es a base de copolímeros

de estireno divinilbenceno que contienen iones pareados de iminoacetato que actúan como grupos quelantes. Singer -Sam y colaboradores reportaron que el uso de *Chelex*<sup>R</sup> 100 permitía incrementar la señal de amplificación por PCR de pequeñas cantidades de ADN obtenidas de células de cultivo de tejidos (Singer-Sam et al, 1989). Por esta metodología las células son suspendidas en el *Chelex*<sup>R</sup> al 20% y al someterlas a temperatura de ebullición se produce la ruptura de las membranas celulares y la desnaturalización del ADN, pero la resina previene esto por acción de los iones metálicos polivalentes que actúan como catalizadores en la ruptura del ADN en suspensiones de fuerza ionica baja.

### 3.4. GENOTIPIFICACION

#### Análisis De Los Polimorfismos Genéticos De Las GSTM1 Y GSTT1

La obtención de los segmentos de ADN de interés para las enzimas GSTM1 Y GSTT1 se obtuvieron mediante una amplificación enzimática múltiple que permite amplificar ambos segmentos en una sola reacción (PCR Múltiplex) (Sherif Z., Abdel A., Randa A., et al, 1996). La mezcla de reacción y las condiciones de temperatura se muestran en la Tabla. 2.

En el Anexo 4 se describe detalladamente la metodología.

La secuencia de los iniciadores utilizados es la siguiente( Promega):

- GSTT1-A: 5'-TTC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC-3'
- GSTT1-B: 5'-TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA-3'
- GSTM1-A: 5'- GAA CTC CCT GAA AAG CTA, AAG C -3'
- GSTM1-B: 5'GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3'

REACTIVOS	CONCENTRACION	VOLUMEN DE REACCION	CONCENTRACIÓN FINAL
MUESTRA(ADN extraído)		5µl	50-100ng
GSTM1- A	30 pmol	1.25µl	20µM
GSTM1-B	30 pmol	1.25µl	20µM
GSTT1-A	30 pmol	1.25µl	20µM

GSTT1-B	30 pmol	1.25µl	20µM
AGUA QM	-	2.5µl	-
PCR MASTER MIX: ( Promega)	2X	12.5µl	1X
Tris-HCL( pH 8.3)	25mM	-	1.5
MgCl <sub>2</sub> ( Promega)	3.0 mM	-	1.5 mM
Taq ADN polimerasa	50 U/ml	-	25 U/ml
dNTPs	400µM	-	200µM
VOLUMEN FINAL	-	25µl	-

**Tabla 2.** Condiciones de amplificación para segmentos de GSTT1 y GSTM1

### Condiciones de amplificación

ETAPA	PROCESO	TEMPERATURA	DURACIÓN	CICLOS
1	Temperatura inicial	94°C	5 min	1
2		94°C	2 min	35
3	anillado	59°C	1 min	
4	extensión	72°C	10 min	

Los productos de amplificación se analizaron electroforéticamente en geles de Agarosa al 2% teñidos con Bromuro de Etidio. La presencia o ausencia de los genes de la GSTT1 se detecto por la presencia de una banda de 480 pb y de la GSTM1 por la presencia o ausencia de una banda de 215pb.

### Polimorfismo de la CYP2E1

La reacción de PCR para la amplificación del gen CYP2E1 fue realizada según lo descrito por Kato y col. (Kato S., Shields P.G., Caporaso R.E., et al, 1992). La mezcla de reacción y condiciones de temperatura se muestran en la Tabla 3. El protocolo de amplificación se puede ver en Anexo 5.

INICIADORES (Integrated ADN Technologies, Inc.):

- CYP2E1-A: 5'-TTC ATT CTG TCT TCT AAC TGG-3'
- CYP2E1-B: 5'-CCA GTC GAG TCG AGT CTA TGT CA-3

REACTIVOS	CONCENTRACION	VOLUMEN REACCION	CONCENTRACIÓN FINAL
MUESTRA	-	5µl	50-100ng
AGUA QM	-	5µl	-
CYP2E1-A	174.24nM	1.25µl	20uM
CYP2E1-B	170.18nM	1.25µl	20uM
PCR MASTER MIX: ( Promega)	2X	12.5µl	1X
Tris-HCL( pH 8.3)	25mM	-	1.5mM
MgCl <sub>2</sub>	3.0 mM	-	1.5 mM
Taq ADN polimerasa	50 U/ml	-	25 U/ml
VOLUMEN TOTAL	-	25µl	-

**Tabla 3.** Condiciones de amplificación para el segmento de la CYP2E1

### Condiciones de amplificación

ETAPA	PROCESO	TEMPERATURA	DURACIÓN	CICLOS
1	Temperatura inicial	94°C	20 sg	1
2	fusión	54°C	20 sg	36
3	anillado	72°C	20 sg	1
4	extensión	54°C	10 min	1
5		72°C	10 min	1



El producto del amplificado se chequeo por electroforesis con Bromuro de Etidio en Agarosa al 2%, donde se identifica un fragmento de 412pb.

Para establecer los polimorfismos de la CYP2E1 se hizo la digestión del fragmento amplificado con la Endonucleasa *Rsa I*, según lo descrito por Nishimoto I.N., y cols. (Nishimoto I.N., Hanaoka T., Sugimura H., et al, 2000), Tabla. 4.

Una vez chequeado el amplificado fue sometido a digestión enzimática por la Rsa I durante una hora a 37°C. Las condiciones de digestión se resumen en la Tabla 3. Los productos de digestión fueron chequeados por electroforesis en un gel de Agarosa 1.8% (mezcla de agarosa 3v/v de agarosa SeaKem y Metaphorm respectivamente) con Bromuro de Etidio.

	CONCENTRACION	VOLUMEN REACCION	CONCENTRACIÓN FINAL
ENZIMA		0.15ul	
BUFFER	10X	1.5ul	1X
MUESTRA		Aprox 5ul	

**Tabla 4.** Condiciones de digestión de la CYP2E1 por la Endonucleasa *Rsa I*

La Tabla 5. Resume los productos obtenidos de la digestión. Se generaron fragmentos de 360,50,y 410 pb. Los individuos homocigotos con ausencia del sitio de corte solo presentan bandas de 412pb( se denomina alelo A siendo entonces el individuo A/A o  $c_2/c_2$ , que corresponde al alelo menos frecuente). Mientras que los homocigotos para el sitio de corte de Rsa I generan pequeñas bandas de 360 pb, las de 50pb se salen del gel (se denominan genotipo homocigotos C/C o  $c_1/c_1$  que es el alelo más común). Los heterocigotos tienen dos bandas, una de 410pb y otra de 360pb, pues las de 50pb se salen del gel y no se observan ( es el genotipo C/ A o  $c_1/c_2$ ). (Nishimoto I.N., Hanaoka T., Sugimura H., et al, 2000; Cai L., Yu S-Z., Zhang Z-F., 2001).El protocolo de digestión se puede ver en el Anexo 6.

ENZIMA	FRAGMENTO AMPLIFICADO(pb)	FRAGMENTO DIGERIDO(pb)	GENOTIPO
Rsa I(Gibco)	412	360,50,410	
		412	Ausente para el sitio corte, homocigotos -(A/A o c2/c2)
		410/360	Heterocigotos para sitio de corte (C/A o c1/c2)
		360	Homocigotos para el sitio de corte (C/C o c1/c1)

**Tabla 5.** Productos de la Digestión de la CYP2E1 con la enzima *Rsa I*

### 3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

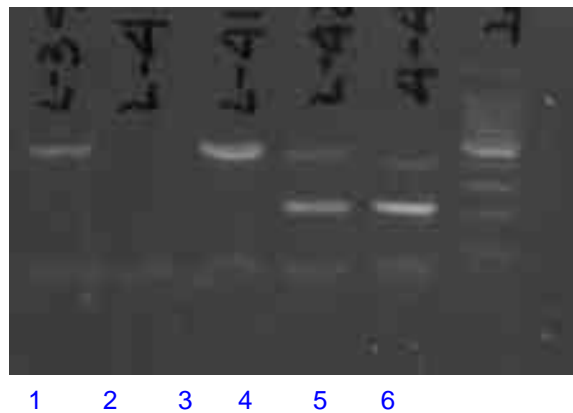
Se analizó la relación entre la Leucemia Linfoide Aguda, los polimorfismos genéticos de la GSTT1, GSTM1 y CYP2E1 de los casos y controles y algunos posibles factores de riesgo para en el desarrollo de la enfermedad utilizando como medida de asociación la Razón de Disparidad o Odds ratio (OR) con un intervalo de confianza del 95%(IC 95%).Inicialmente se calcularon los OR crudos para todas las variables independientes. Posteriormente se plantearon varios modelo de regresión logística para establecer los OR ajustados donde se estimo la relación entre la Leucemia Linfoide Aguda y los polimorfismos como factor de exposición , enfocando nuestro análisis principalmente al efecto del polimorfismo de deleción enzimática de la GSTM1 y algunos factores de riesgo como la exposición a ciertos químicos y al humo del cigarrillo. Estos análisis fueron realizados con el programa estadístico Stata 7.0.

## 4. RESULTADOS

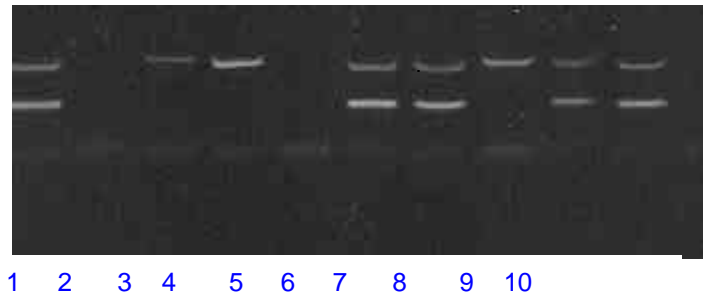
### 4.1. RESULTADOS METODOLÓGICOS

Desde el punto de vista metodológico se estandarizo la obtención de ADN de 147 niños con diagnóstico de Leucemia Linfoide Aguda (LLA) y 160 niños control libres de enfermedad maligna, mediante la utilización de la resina de intercambio iónico, Chelex<sup>R</sup> al 20%. Este proceso de estandarización se llevo acabo teniendo en cuenta que los niños enfermos presentan algunos de ellos leucopenia, y que los leucocitos son la fuente del ADN (Anexo 3).

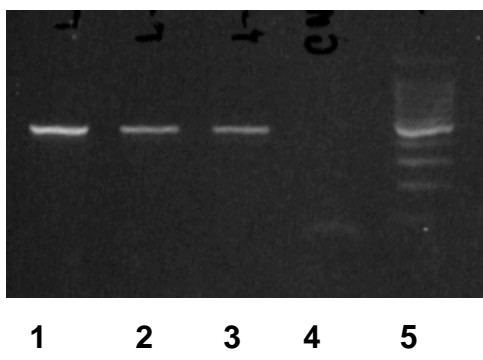
A su vez se estandarizo la amplificación de las GSTM1, GSTT1 (Figuras. 4 y 5) y la amplificación de la CYP2E1( Figura 6.) y la digestión de la CYP2E1 con la enzima *Rsa I* (Figura.7 y 8).



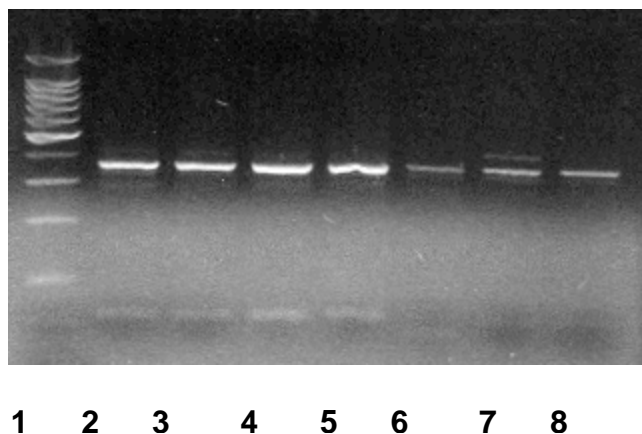
**Figura 4.** Patrón de electroforesis Multiplex para la amplificación de los fragmentos de la Glutation S-Transferasa GSTT1 y GSTM1 por PCR. Las columnas 4 y 5 muestran la amplificación de los dos fragmentos de las dos enzimas, GSTT1 (480pb) y GSTM1 (215pb). En las columnas 1 y 3 se observa el fragmento de amplificación de la GSTT1 pero estos individuos son homocigotos para el polimorfismo de delección de la GSTM1. La columna 2 muestra un individuo con un genotipo doblemente nulo para las dos enzimas. La columna 6 corresponde al marcador de peso molecular.



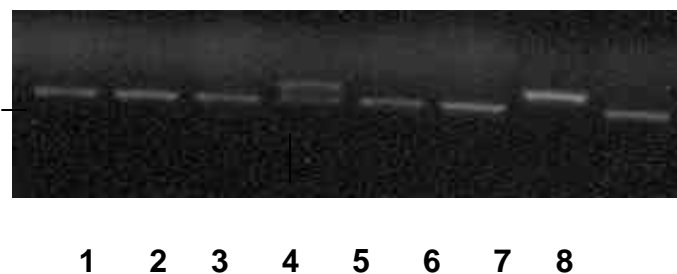
**Figura 5.** Patrón de electroforesis Multiplex para la amplificación de los fragmentos de la Glutation S-Transferasa GSTT1 y GSTM1 por PCR. En la columna 1, 6, 7, 9, 10 se observa la presencia de los alelos de la GSTT1 Y GSTM1. Las columnas 3, 4, 8 muestran la ausencia del alelo de la GSTM1. La columna 2 y 5 son individuos doblemente nulos para los alelos GSTT1 y GSTM1.



**Figura 6.** Patrón de Electroforesis de los Productos de amplificación de la CYP2E1 por PCR. Columna 1, 2, 3 muestran el producto amplificados de la CYP2E1 (412pb). La columna 5 corresponde al marcador de peso molecular y la columna 4 corresponde al control negativo.



**Figura 7.** Patrón de electroforesis para la digestión de la CYP1E1 con la enzima de restricción *Rsa I* por PCR. Se generan fragmentos de 360, 50 y 410 pb. En la columna 1 se muestra el patrón de peso molecular. En la columna 2, 3, 4, 5, 6 se observan los productos de digestión de 360pb correspondientes al genotipo homocigoto C/C o c1/c1 que es el más común. La columna 7 muestra un individuo heterocigoto para el genotipo C/A o c1/c2 con dos fragmentos uno de 410pb y otro de 360pb.



**Figura 8.** Patrón de electroforesis para los fragmentos de digestión de la CYP2E1 con la enzima *Rsa I* por PCR. En la columna 1, 2, 3, 5, 6 8 se observan bandas de 360pb que corresponden a individuos homocigotos C/C o c1/c1, él alelo más común. La columna 4 muestra un individuo heterocigoto con un genotipo C/A o c1/c2, mientras que en la columna 7 se observa una banda de 412pb que corresponde al alelo A/A o c2/c2 que es el menos frecuente.

## 4.2. RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE ENCUESTAS

Las encuestas fueron analizadas creándose una base de datos en Excel. En la Tabla 6. se resume la tabulación de los datos obtenidos en la encuesta.

CATEGORIA	FACTORES	CONTROLES	LLA
		n(%)	n(%)
	Genero		
0	Masculino	65(40.6)	78(53.1)
1	Femenino	95(59.4)	69(46.9)
	Edad ( Riesgo)		
0	0-6 años	82(51.3)	96(65.3)
1	7-12	52(32.5)	36(24.5)
2	13-17	26(16.3)	15(10.2)
	Edad ( Pronostico)		
0	Menor de 1 año	9(5.6)	1(0.7)
1	Entre 1 y 10	108(67.5)	121(82.31)
2	Mayor de 10	43(26.9)	25(17.01)
	Origen		
0	Rural	25(16.0)	15(10.6)
1	Urbano	131(84.0)	126(89.4)
	Ubicación Geográfica		
	Bogotá	91(58.3)	99(70.2)
	Boyacá	11(7.2)	11(7.8)
	Cundinamarca	22(14.2)	10(7.1)
	Llanos Orientales	11(7.1)	11(7.8)
	Tolima, Huila	13(8.4)	8(5.6)
	Otros	8(4.8)	2(1.7)
	Exposición a Químicos		
0	No	110 (70.5)	81 (57.9)
1	Si	46 (29.5)	59 (42.1)
	Cercanía Fabricas		
0	No	141( 90.4)	107( 76.6)
1	Si	15 (9.6)	33 (23.4)
	Cercanía Talleres		
0	No	133( 85.3)	105 (74.5)
1	Si	23 (14.7)	36 (25.5)
	Cercanía Redes Eléctricas		

0	No	116 (74.4)	104 ( 73.8)
1	Si	40 (25.6)	37 (26.2)
	Exposición a Pesticidas		
0	No	92 (59)	71 (50.4)
1	Si	64 (41)	70( 49.6)
	Alimentos A La Brasa		
0	No	43 (27.6)	35 (24.8)
1	Si(cada 1-2 semanas)	33 (21.2)	32( 22.7)
2	Si(1 - 3 meses)	36 (23.1)	30 (21.3 )
3	Si (4 - 6 meses)	12 (7.7)	15 (10.6)
4	Si( cada año)	22 (14.1)	27 (19.1)
5	Si (Todo el tiempo)	10 (6.4)	2 (1.4)
	Productos Industriales		
0	No	31 (19.9)	27( 19.1)
1	Si( todos los días)	35 (22.4)	30 (21.3)
2	Si(una vez a la semana)	10 (6.4)	9 (6.4)
3	Si (cada 15 días)	12 (7.7)	11( 7.8)
4	Si (cada mes)	68 (43.6)	64 (45.4)
	Verduras y frutas		
0	No	0 (0)	2 (1.4)
1	Si	156(100)	139 (98.6)
	Exposición Alcohol Madre		
0	No	133 (85.3)	128( 90.8)
1	Si (por lo menos 3 veces semana)	2 (1.3)	3 (2.1)
2	Si( Cada semana)	7 (4.5)	4 (2.8)
3	Si (Cada mes)	6 (3.8)	6 (4.3)
4	Si (Cada 2-4)	3 (1.9)	0
5	Si (Cada 6 meses)	5 (3.2)	0
	Exposición Alcohol Padre		
0	No	24( 24.5)	27( 30)
1	Si (por lo menos 3 veces semana)	3 (3.1)	5 (5.6)
2	Si( Cada semana)	33 (33.7)	20( 22.2)
3	Si (Cada mes)	29 (29.6)	26 (28.9)
4	Si (Cada 2-4)	5 (5.1)	3 (3.3)
5	Si (Cada 6 meses)	4( 4.1)	9 (10)
	Exposición Drogas en el Embarazo		
	No	122 (78.2)	99( 70.2)
0	Si	34 (21.8)	42 (29.8)
1	Exposición humo del cigarrillo		

0	No	89 (57.1)	67 (47.5)
1	Si (Todos los días)	57 (36.5)	69 (48.9)
2	Si (1-3 por semana)	0 (0)	3 (2.1)
3	Si( Ocasional)	10( 6.4)	2 (1.4)
	Problemas Emocionales		
0	No	120 76.9	92 (65.2)
1	Si	36 23.1	49 (34.8)
	Antecedentes de cáncer		
0	No	78(50.3)	64 (45.4)
1	Si	77 49.8	77 (54.6)

**Tabla.6.** Tabulación de los datos de la encuesta

Para unas de las variables, con el fin de reducir el número de categorías en la misma variable, y se fusionaron en dos categorías: 0 (no consume) y 1 (sí consume):

- Alimentos a la brasa, categoría 0= 0+2+3+4 y categoría 1= 1+5
- Consumo de productos industriales categoría 0= 0+2+3 y categoría 1= 1+4
- Exposición de alcohol en la madre durante el embarazo, categoría 0= 0+5 y categoría 1= 1+2+3+4
- Exposición de alcohol por el padre, categoría 0= 0+5 y categoría 1= 1+2+3+4
- Exposición al humo del cigarrillo, categoría 0= 0+3 y categoría 1= 1+2

Características de la Población de estudio:

La población de estudio estuvo conformada por 147 niños diagnosticados con Leucemia Linfocítica Aguda, con un promedio de edad de 6 años ( $\pm 3.94$ ) y el grupo de los controles de 160 niños libres de enfermedad maligna, los cuales tenían un promedio de edad de 7.22 años ( $\pm 4.57$ ). Para los análisis estadísticos la edad fue estratificada en 3 grupos, los cuales se muestran en la Tabla 7.

Con respecto al género, en el grupo de los casos, el 53.1% corresponden al sexo masculino mientras que el 46.9% corresponden al sexo femenino; en el grupo de controles, el 40.6% correspondían al género masculino mientras que el 59.4% correspondió al sexo femenino. Tanto los casos como los controles provenían de diferentes regiones del país, especialmente del altiplano Cundí-Boyacense, Tolima, Huila, los Llanos Orientales que incluyen los departamentos del Meta, Caquetá, Casanare, Arauca, Vichada y Guainia, bien fuera de la zona urbana o rural. Se tuvo en cuenta la procedencia de los padres, que no fue muy diferente a la de los niños,



aunque con una distribución menos frecuente en la ciudad de Bogotá. En 6 casos y 4 controles no fue posible establecer la ubicación geográfica. Tabla 7.

	<b>Controles</b>	<b>LLA</b>
	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>
<b>Genero</b>		
Masculino	65(40.6)	78(53.1)
Femenino	95(59.4)	69(46.9)
Total	160	147
<b>Edad</b>		
0-6	82(51.3)	96(65.3)
7-12	52(32.5)	36(24.5)
13-17	26(16.3)	15(10.2)
Total	160	147
<b>Origen</b>		
Rural	25(16.0)	15(10.6)
Urbano	131(84.0)	126(89.4)
Total	156	141
<b>Ubicación Geográfica</b>		
Bogotá	91(58.3)	99(70.2)
Boyacá	11(7.2)	11(7.8)
Cundinamarca	22(14.2)	10(7.1)
Llanos Orientales	11(7.1)	11(7.8)
Tolima, Huila	13(8.4)	8(5.6)
Otros	8(4.8)	2(1.7)
Total	156	141

**Tabla.7.** Características generales de la población de estudio

Al aplicar las pruebas de Chi- Cuadrado y las de la Razón de la probabilidad encontramos que hay algunas asociaciones importantes y se resumen en la Tabla 8. En primer lugar hay asociación significativa con respecto al genero( $X^2=4.8$ ,  $p=0.03$ ), indicando que el sexo femenino tiene un efecto protector con respecto a la enfermedad.

Las asociaciones con la edad tomada como factor de riesgo mostró que la mayoría de los casos se manifiestan en los primeros años de vida; en nuestro caso en el primer grupo entre los 0 y 6 años ( $X^2=6.9$ ,  $p=0.04$ ) (solamente un paciente era menor de 1 año) lo cual corresponde a lo reportado en la literatura (Reaman G., et al, 1985). Lo mismo se ve cuando la edad es tomada como factor pronóstico, que se asocia estadísticamente el grupo entre 1 año y diez años indicando que la enfermedad es más frecuente en este grupo. Sin embargo en este trabajo no se puede tomar como factor pronóstico porque no se está evaluando este parámetro desde este punto de vista.

Al realizarse los análisis de encuestas se procedió inicialmente a agrupar a los casos y a los controles para cada variable en diversas categorías, que luego se unificaron y de esa manera se manejaron para realizar el análisis estadístico.

Con respecto a la exposición a ciertos factores ambientales y de algunos hábitos de los niños y de sus padres antes y/o durante el embarazo del menor como por ejemplo: el consumo de alcohol, fumar cigarrillo o exposición al humo de este, uso de algunas drogas o medicamentos, alimentos a la brasa, alimentos industriales o con preservativos, los resultados se resumen en la Tabla 8.

Se encontró inicialmente que hay asociación a la exposición a ciertas sustancias químicas, con un OR crudo de 1.74 (1.1-2.9) IC95%, a la vez que la cercanía a fábricas y talleres donde se obtuvo un OR crudo = 2.9 IC95% (1.4-6.0) y 1.98 IC95% (1.1-3.7) respectivamente. Básicamente los niños estaban expuestos a químicos ambientales ya sea que almacenaban en su casa estas sustancias o eran vecinos de algunas fábricas o/y talleres, o sus madres estuvieron expuestas durante el desarrollo prenatal. La exposición específica a pesticidas e insecticidas como al uso prenatal de algunas drogas no tuvieron asociación. La exposición al humo del cigarrillo de los niños en algún momento, sea en la etapa prenatal o previa a la aparición de enfermedad mostró asociación con un OR crudo 61.8 IC95% (1.1-3.0). La compilación de las sustancias a las que se expusieron los 2 grupos a estudio se relacionan en la Tabla 9.

Con respecto a otras de los factores ambientales que se evaluaron, como la exposición a campos electromagnéticos (como subestaciones eléctricas o transformadores eléctricos), vivienda rural o urbana no tuvieron significancia estadística en este estudio.

Entre los hábitos alimenticios como el consumo de productos a la brasa y alimentos industriales o con contenido de preservativos tampoco mostraron significancia estadística.

El consumo de alcohol por parte del padre, que se evaluó teniendo en cuenta que fuera antes de la concepción del menor, al igual que en la madre previo o durante el embarazo, no mostró una asociación significativa.

Se cuestiono la presencia o ausencia de problemas emocionales relevantes o de trascendencia para la madre durante el desarrollo prenatal o para el menor previo a la aparición de enfermedad y se encontró significancia estadística, OR crudo = 1.8 IC95%(1.1-3.1).

Finalmente los antecedentes familiares de cáncer no fueron relevantes en este estudio.

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>Controles</b>	<b>LLA</b>	<b>OR crudo</b>	<b>X<sup>2</sup> p</b>
	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P&lt;0.05</b>
<b>Genero</b>				
Masculino	65(40.6)	78(53.1)	0.6(0.38-0.97)	
Femenino	95(59.4)	69(46.9)		
Total	160	147		4.8 p=0.03*
<b>Edad ( Riesgo)</b>				
0-6	82(51.3)	96(65.3)		
7-12	52(32.5)	36(24.5)		
13-17	26(16.3)	15(10.2)		
Total	160	147		6.9 p=0.04*
<b>Edad ( Pronostico)</b>				
Menor de 1 año	9(5.6)	1(0.7)		
Entre 1 y 10	108(67.5)	121(82.31)		
Mayor de 10	43(26.9)	25(17.01)		
Total	160	147		11.37 p=0.003*
<b>Origen</b>				
Rural	25(16.0)	15(10.6)	0.62(0.31-1.23)	
Urbano	131(84.0)	126(89.4)		
Total	156	141		1.8 p=0.17
<b>Compuestos Químicos</b>				
Expuesto	46(29.5)	59(42.1)	1.74(1.1-3.0)*	
No expuesto	110(70.5)	81(57.9)		
Total	156	140		5.2 p=0.023*

<b>Fabricas</b>				
Si	15(9.6)	33(23.4)	2.9(1.4-6.0)*	
No	141(90.4)	108(76.6)		
Total	156	141		10.4p=0.001*
<b>Talleres</b>				
Si	23(14.7)	36(25.5)	1.98(1.1-3.7)*	
No	133(85.3)	105(74.5)		
Total	156	141		5.4 p=0.02*
<b>Plaguicidas</b>				
Expuesto	64(41.0)	70(49.6)	1.4(0.9-2.3)	
No expuesto	92(59.0)	71(50.4)		
Total	156	141		2.22 p=0.13
<b>Campos Electromagnéticos</b>				
Expuesto	40(25.6)	37(26.2)	1.03(0.61-1.8)	
No Expuesto	116(74.4)	104(73.8)		
Total	156	141		0.01 p=0.9
<b>Consumo de medicamentos</b>				
Si	34(21.8)	42(29.8)	1.52(0.90-2.7)	
No	122(78.2)	99(70.2)		
Total	156	141		2.48 p=0.11
<b>Habito de Fumar †</b>				
Fumador	57(36.5)	72(51.1)	1.81(1.1-3.0)*	
No fumador	99(63.5)	69(48.9)		
Total	156	141		6.3p=0.01*
<b>Alimentos Industriales</b>				
Consumo frecuente	103(66.0)	94(66.7)	1.0(0.6-1.7)	
No	53(34.0)	47(33.3)		
Total	156	141		0.01 p=0.9
<b>Alimentos a la brasa</b>				
Consume	43(27.6)	34(24.1)	0.83(0.47-1.5)	
No consume	113(72.4)	107(75.9)		
Total	156	141		0.46 p=0.5
<b>Consumo de alcohol en el embarazo</b>				
Si	18(11.5)	13(9.2)	0.8(0.3-1.8)	
No	138(88.5)	128(90.8)		
Total	156	141		0.43 p=0.5
<b>Consumo de alcohol del</b>				

<b>padre</b>				
Si	70(71.5)	54(60.0)	0.60(0.32-1.15)	
No	28(28.6)	36(40.0)		
Total	98	90		2.7 p=0.09
<b>Problemas emocionales</b>				
Si	36(23.1)	49(34.8)	1.8(1.1-3.1)*	
No	120(76.9)	92(65.2)		
Total	156	141		4.9 p=0.026*
<b>Antecedentes cáncer</b>				
Si	77(49.7)	77(54.6)	1.2(0.8-2.0)	
No	78(50.3)	64(45.4)		
Total	155	141		0.72 p=0.4

**Tabla.8.** Pruebas de Chi-Cuadrado y OR crudo de las características generales y ambientales de la población de estudio

‡Exposición a humo de cigarrillo

\*asociación estadísticamente significativa

<b>QUIMICOS</b>	<b>FUMIGANTES</b>	<b>DROGAS</b>
ACPM	Plaguicidas para soya	Acetaminofen
Alcanfor	Plaguicidas para arroz	Mejoral (Acido acetilsalicílico con cafeína)
Cemento	Plaguicidas para flores	Ibuprofeno
Ceras	Plaguicidas para café	Anticonceptivos(Etinilestradiol, Levonorgestrel, Gestodeno)
Decol( Hipoclorito de sodio)	Matamalezas	Anticonvulsivantes (Acido Valproico, Carbamacepina, Fenitoina, Clonacepam)
Gasolina	Baygon/Novan	Calmet ( Ibuprofeno –cafeína)
Lacas	Raid	Plasil (Metoclopramida)
Pegantes(Bóxer)	Cipermitrina	Ampicilina, Penicilina
Soldadura	Cupex	Neosaldina(Dipirona, clorhidrato de isometilamina, cafeína anhidra)

Sustancias curtiembres	Detil	Buscapina( N-butilbromuro de hiosina)
Tinner	Azufre	Aspirina( Acido acetilsalicílico)
Tintas tipografía		Captopril
Varsol		Artensol( Clorhidrato de propranolol)
		Ponstan( Acido mefenámico)

**Tabla.9.** Sustancia más frecuentes a las que se expusieron los grupos a estudio.

Los resultados obtenidos a partir de la genotipificación de los diferentes polimorfismos genéticos y su relación con la enfermedad se resumen en la Tabla 10. Encontrándose asociación significativa la presencia del polimorfismo de deleción de la GSTM1 en el grupo de pacientes leucémicos con respecto al grupo control, OR: 2.32 C95%(1.4-4.0). El genotipo GSTT1 y los polimorfismos de la CYP2E1 no mostraron asociación.

<b>Genotipos</b>	<b>Controles</b>	<b>LLA</b>	<b>OR crudo</b>	<b>X2 p</b>
	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>IC 95%</b>	<b>P&lt;0.05</b>
<b>GSTM1</b>				
Presente	125(78.1)	89(60.5)		
Ausente	35(21.9)	58(39.5)	2.32 (1.41-4.0)*	
Total	160	147		11.21 p=0.0008*
<b>GSTT1</b>				
Presente	132(82.5)	123(83.7)		
Ausente	28(17.5)	24(16.3)	0.92 (0.50-1.67)	
Total	160	147		0.07 p=0.78
<b>CYP2E1</b>				
C/C	117(73.1)	95(64.6)	1.49 (0.9-2.5)	
C/A + A/A	43 (26.9)	52(35.4)		
Total	160	147		2.6 p=0.10

**Tabla 10.** Relación entre los polimorfismos genéticos de las enzimas GSTM1, GSTT1 y CYP2E1 en niños con leucemia linfóide aguda y controles.

\*asociación estadísticamente significativa

En la Tabla 11, se resume la comparación de las frecuencias entre el género de los dos grupos, relacionándolos con los genotipos de riesgo (nulo o de delección en el caso de las GSTs y los genotipos A/A y C/A en el caso de la CYP2E1). No se encontró asociación entre los diferentes polimorfismos y la edad en ninguno de los grupos. Con respecto al género se observó un aumento en la frecuencia de los niños con respecto a las niñas en el grupo de enfermos del genotipo nulo de la GSTM1.

<b>GENOTIPO</b>	<b>Niños</b>	<b>Niñas</b>	<b>TOTAL</b>
	n(%)	n(%)	n(%)
<b>GSTT1 nulo</b>			
Controles	9/65(13.8)	19/95(20)	28(17.5)
Leucémicos	14/78(17.9)	10/69(14.5)	24(16.3)
<b>GSTM1 nulo</b>			
Controles	13/65(20)	22/95(23.2)	35(21.9)
Leucémicos	33/78(42.3)	25/69(36.2)	58(39.5)
<b>GSTT1 nulo +GSTM1 nulo</b>			
Controles	0/65(0)	3/95(3.1)	3(1.8)
Leucémicos	5/78(6.4)	2/69(2.8)	7(4.8)
<b>CYP2E1 (C/A+A/A)</b>			
Controles	22/65(33.9)	22/95(23.2)	43(26.9)
Leucémicos	30/78(38.5)	22/69(31.9)	52(35.4)

**Tabla 11.** Genotipos Nulos en Controles y Leucémicos

Con los resultados anteriores se diseñaron unos modelos de regresión logística para poder estimar la relación entre Leucemia Linfocítica Aguda y el polimorfismo de delección de la GSTM1, ajustándolos a los diferentes factores de riesgo que se estudiaron y que en un principio mostraron significancia estadística.

En la Tabla 12. se relaciona el primer Modelo de Regresión Logística donde se incluyeron todas las variables que habían mostrado un OR significativo. Se puede observar que se mantienen las asociaciones entre la enfermedad y el polimorfismo de delección de la GSTM1, obteniéndose un OR ajustado: 2.0(1.15-3.4) IC 95%, a la vez que con la exposición al humo del cigarrillo, OR ajustado: 1.78(, 1.0-3.0)IC 95%, perdiéndose la significancia estadística a la exposición a

químicos directamente y a la influencia de las cercanías a fabricas y talleres así como los factores emocionales relevantes en estos enfermos.

Inicialmente el género que había mostrado asociación significativa con la enfermedad, la pierde en este modelo. Lo mismo sucede con los grupos de edad especialmente el grupo de edad 1 que es el de mayor riesgo; cuando esta variable se incluye en el modelo queda en el limite de la significancia pero el intervalo de confianza superior es de 4. 0.

<b>EFFECTOS</b>	<b>OR Ajustado</b>	<b>IC 95%</b>
Genero	0.65	(0.40-1.0)
GSTM1	2.0	(1.15-3.4)*
Grupo de edad 1	1.9	(0.9-4.0)
Grupo de edad 2	1.0	(0.45-2.5)
Químicos	1.42	(0.85-2.4)
Fabricas	1.9	(0.93-3.87)
Talleres	1.45	(0.77-2.75)
Cigarrillo	1.78	(1.0-3.0)*
Emociones	1.51	(0.87-2.7)

**Tabla 12.** Primer Modelo de Regresión Logística de los efectos principales de los factores de riesgo

\*asociación estadísticamente significativa

En el Segundo Modelo de Regresión Logística resumido en la Tabla 13, se propuso establecer la posible relación entre dos variables o si dos variables pueden interactuar simultáneamente y asociarse al hecho de tener leucemia. En este modelo básicamente se mantiene la asociación del polimorfismo de delecion de la GSTM1 y la leucemia linfoide aguda. Se observa claramente una asociación entre la influencia de las cercanías a fabricas y enfermedad, mientras que los otros factores ambientales no muestran asociación.



EFFECTOS E INTERACCIONES	OR ajustado	IC 95%
GSTM1	2.4	(1.0-5.5)*
Genero	0.64	(0.4-1.0)
Grupo de edad 1	2.0	(0.93-4.58)
Grupo de edad 2	1.15	(0.5-2.7)
Químicos	1.77	(0.95-3.3)
Fabricas	5.8	(1.5-22.0)*
Talleres	1.22	(0.4-3.7)
Humo cigarrillo	1.36	(0.5-3.65)
Emociones	1.63	(0.92-2.86)
GSTM1*Químicos	0.5	(0.15-1.6)
GSTM1*Taller	1.4	(0.4-5.6)
GSTM1*Fábricas	0.16	(0.03-0.85)
GSTM1*Humo Cigarrillo	1.45	(0.5-4.6)

**Tabla 13.** Segundo Modelo de Regresión Logística mostrando efectos e interacciones con respecto a la enfermedad

\*asociación estadísticamente significativa

Teniendo en cuenta que el OR crudo de la asociación exposición a humo de cigarrillo y enfermedad, se generó un modelo de regresión logística que tuviera en cuenta las variables independientes y solo una interacción entre la exposición al humo del cigarrillo y el polimorfismo de deleción. Tabla 14. En este modelo vemos que se mantiene la asociación de la influencia de la cercanía de las fabricas y la leucemia en los niños estudiados. La asociación con el polimorfismo de deleción sigue siendo significativa al igual que la interacción entre este con la exposición al humo de cigarrillo y la enfermedad.

EFFECTOS E INTERACCIONES	OR Ajustado	I.C 95%
Genero	0.65	(0.4-1.0)
Grupo de edad 1	1.9	(0.87-4.0)
Grupo de edad 2	1.1	(0.45-2.5)
Químicos	1.5	(0.9-2.5)

Fabricas	2.0	(1.0-4.0)*
Talleres	1.5	(0.8-2.8)
Emociones	1.5	(0.87-2.6)
GSTM1	2.7	(1.5-5.0)*
GSTM1*Humo Cigarrillo	2.0	(1.1-3.66)*

**Tabla 14.** Tercer modelo de Regresión Logística mostrando efectos e interacciones con la enfermedad.

\*asociación estadísticamente significativa

Las características clínicas de los pacientes leucémicos se resume en la Tabla 15. Encontramos que el 53.1% de los pacientes eran del sexo masculino y que el 65.3% de los enfermos estaban entre los 0 y los 6 años de edad en el momento del diagnóstico de la enfermedad. Entre los hallazgos del Cuadro Hemático que se tuvieron en cuenta, se encontró que el 30.8% se manifestaba con leucopenia, mientras que el 31.5% mostraba un recuento de blancos normal y solo el 14.4% un recuento de leucocitos por encima de 50.000/  $\mu$ l. El 74.7% mostraba blastos en la periferia y el 91.1% presentaba trombocitopenia. La presencia de Hepatomegalia y Esplenomegalia fue 59.2% y del 42.9% respectivamente. Ningún paciente manifestó compromiso del sistema nervioso central e infiltración testicular en el momento del diagnóstico.

Con respecto a las características encontradas en la inmunotipificación se vio que la mayoría de los niños, el 51.8%, presentaba un fenotipo de células B, la mayoría en estado temprano de maduración, Pre- pre B. El 79.5% presento el antígeno CD10 o CALLA positivo, a la vez que el 58.9% presentaba co-expresión de por lo menos un marcador mieloides. Es importante mencionar que 35 pacientes de los incluidos en este estudio no fueron inmunotipificados.

Finalmente las asociaciones entre los diferentes polimorfismos y las manifestaciones clínicas y de laboratorio incluidas en este trabajo de la enfermedad no fueron estadísticamente significativas.

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>n(%)</b>
<b>Genero</b>	
Masculino	78(53.1)
Femenino	69(46.9)
Total	147
<b>Edad</b>	
0-6	96(65.3)
7-12	36(24.5)
13-17	15(10.2)
Total	147
<b>Recuento Leucocitos ( <math>\mu</math> L)</b>	
0-4500	45(30.8)
4500-12000	46(31.5)
12000-50000	34(23.3)
Mayor 50000	21(14.4)
Total	146
<b>Recuento Plaquetas( <math>\mu</math> l)</b>	
Normales(140-450)	13(8.9)
Trombocitopenia	133(91.1)
Total	146
<b>Blastos en Sangre Periférica</b>	
No	37(25.3)
Si	109(74.7)
Total	146
<b>Hepatomegalia</b>	
No	60(40.8)
Si	87(59.2)
Total	147
<b>Esplenomegalia</b>	
No	84(57.1)
Si	63(42.9)
Total	147

<b>Inmunotipificación</b>	
Pre pre B	58(51.8)
Pre B	41(36.6)
B	5(4.5)
T	7(6.3)
<b>Cel.dendritica plasmocitoide</b>	1(0.9)
Total	112
<b>CD10</b>	
Presente	89(79.5)
Ausente	23(20.5)
Total	112
<b>Marcadores Mieloides</b>	
Presente	66(58.9)
Ausentes	46(41.1)
Total	112

**Tabla 15.** Características Clínicas Y Hallazgos De Laboratorio De Los Pacientes Leucémico

## 5. DISCUSION DE RESULTADOS

En el presente trabajo se encontró que hay una asociación estadística entre el grupo de niños enfermos con LLA y el polimorfismo enzimático de delección de la GSTM1, [OR crudo: 2.32 (1.41-4.0)], lo cual ha sido reportado por otros autores. (Chen C-L., et al, 1997; Krajinovic M., et al 1999; Lemos M.C., et al.,1999; Sinnett D., Krajinovic M., et al, 2000; Krajinovic M.,et al, 2001; Alves S., et al., 2002; Krajinovic M, et al, 2002).

Sin embargo recientemente Davies y colaboradores en un estudio, hasta el momento él más grande realizado, al evaluar la relación de las GSTs con LLA en niños reportan que no hay asociación de ninguno de los polimorfismos de delección de la GSTT1 y GSTM1 con LLA en niños. (Davies S.M., et al, 2002). Estos resultados tan contradictorios pueden reflejar la variabilidad y heterogeneidad de la posible etiología de la enfermedad en las diferentes poblaciones estudiadas, las diferencias en la susceptibilidad genética en los diferentes grupos raciales y en las diferentes áreas geográficas, así como en la metodología de estudio. El polimorfismo de delección de la GSTM1 no solo ha sido asociado a LLA en niños sino también a otros tipos de cáncer como de cabeza y cuello, colorectal, estomago, piel, pulmón (en fumadores) y vejiga entre otro (Rebbeck T.R., 1994). La asociación del polimorfismo de delección de la GSTM1 con LLA y no la GSTT1 (este polimorfismo no se asocio) podría sugerir que los sustratos de esta enzima se relacionan con la etiología de este tipo de leucemia a diferencia de los sustratos de otros enzimas.

Si se tienen en cuenta algunas de las asociaciones que encontramos con respecto a los factores ambientales y la enfermedad, se obtuvieron resultados muy significativos, pues en primer lugar se ve claramente que la exposición a sustancias químicas en el grupo de los afectados tiene relación con el riesgo a sufrir la enfermedad [OR crudo: 1.74 (1.1-3.0)], al igual que los expuestos a las cercanía a fabricas [ORcrudo: 2.9 (1.4-6.0)] y a talleres [OR crudo: 1.98 (1.1-3.7)].

Básicamente podríamos considerar estas tres variables indirectamente como una sola, pues se esta teniendo en cuenta la exposición a sustancias químicas bien sea directamente almacenadas en la vivienda o en los lugares donde habita el menor y a la vez la cercanía a fabrica y talleres que muchas viviendas tienen en la vecindad, o que en muchos casos las familias viven en ellas,

y que emiten contaminantes químicos al ambiente( productos de combustión) en la mayoría de los casos sin ningún control por parte de sanidad ambiental. También es importante resaltar que en algunos casos la manipulación de estas sustancias no se hace con las normas y cuidados adecuados (falta de conocimiento, educación) y que madres gestantes y niños menores conviven con estos sin ningún tipo de precaución. Entre los químicos mas mencionados en las encuestas se incluyen algunos hidrocarburos derivados del petróleo como el ACPM, gasolina, solventes como Tinner y Varsol; sustancias químicas como ceras, lacas, pinturas, tintas, productos para curtiembres; pegantes como Bóxer. Estos resultados en conjunto sugieren fuertemente que las diversas sustancias químicas a las que los niños o sus madres durante el periodo prenatal se exponen y la no-actividad enzimática para metabolizar estas sustancias son factores importantes en la patogénesis de la enfermedad, pues enzimas como la GSTM1 participan en la detoxificación de algunas de estas sustancias, llevándonos a la conclusión de que la relación de estos factores ambientales y el polimorfismo de delación de la GSTM1 estarían implicados directamente con el desarrollo de enfermedad.

Otras sustancias que aunque no fueron asociadas directamente con la enfermedad en este trabajo, como son los pesticidas a base de carbamato, podrían sumarse a los químicos antes mencionados y asociarse a enfermedad; estos pesticidas especialmente el Baygon, recientemente fue asociado con la fusión del gen MLL en niños muy pequeños con LLA, atribuyéndose esto a la exposición de este compuesto durante el periodo prenatal así como algunas drogas, específicamente las dipironas o medicinas herbales y algunos alimentos que inhiben la topoisomerasa II( Alexander F., et al, 2001). Es importante resaltar que la etapa previa a la concepción y el periodo prenatal son relevantes en la etiología de la LLA. Esto a su vez se ha relacionado en algunos estudios con los genes de la GSTs y algunas enzimas del cP450 en los padres de niños con LLA, estableciéndose que estos podrían jugar un papel relevante en la etiología de la enfermedad pues podrían conferir a sus hijos la susceptibilidad a la LLA como consecuencia de sus polimorfismos (Labuda D., et al, 2002; Gaste S., et al., 2000).

Es claro que hay diferentes interacciones entre las enzimas de fase I y fase II y entre enzimas de la misma fase para el proceso de detoxificación de las sustancias tanto endógenas como exógenas y que estas interacciones probablemente jueguen un papel trascendente en el riesgo a enfermedad. Teniendo en cuenta estos aspectos, estimamos inicialmente la frecuencia de algunos de los polimorfismos de la CYP2E1, específicamente la CYP2E\*5 obtenidos a través de la digestión de la enzima RsaI, y no encontramos asociación de estos con la enfermedad. Sin embargo, esta enzima es una de la encargadas de metabolizar derivados del benceno, y teniendo en cuenta que la exposición a químicos y la cercanía a fabricas y talleres si se asociaron con la leucemia, se

podría tener en cuenta para mirar su interacción con otras enzimas que también participan en este proceso de detoxificación de estos productos derivados del benceno como por ejemplo la NQ01 que algunos de sus polimorfismos han sido relacionados con susceptibilidad a LLA en niños (Taylor G.M., et al., 1998).

Así mismo se estudio la relación del consumo de alcohol por parte de la madre durante el embarazo y del consumo de alcohol por parte del padre antes del embarazo y no se encontró ningún tipo de asociación. Como se reviso anteriormente, la CYP2E1 es una de las principales enzimas que participan en el metabolismo del alcohol, y algunos estudios han tratado de relacionar el uso de alcohol de los padres antes de o durante el embarazo como riesgo de enfermedad, encontrando resultados contradictorios. Según Shu O.X., el uso materno de alcohol durante el embarazo se asocia a un incremento en el riesgo tanto de leucemia linfocítica como mielocítica, aunque mayor en esta última (Shu X., O., Ross J., et al., 1996). Sin embargo al observar otros estudios donde esto se evaluó, pero relacionándolo con algunos polimorfismos genéticos que están involucrados con el metabolismo del alcohol como la CYP2E1 y la GSTM1, se encontró que el efecto del alcohol con ciertos polimorfismos confería un efecto quimioprotector, probablemente por el efecto de los flavonoides encontrados en el vino y la cerveza; y que por lo tanto, parcialmente, este efecto estaba genéticamente determinado ( Infante-Rivard C., Krajcinovic M., Labuda D., et al., 2002).

Contrario a lo anterior cuando se evaluó la exposición al humo de cigarrillo por parte del menor bien sea porque la madre fumara durante el embarazo, o se expusiera al humo de este, o que el padre fuera fumador previo a la gestación, se encontró que si se asocio con enfermedad [OR crudo: 1.81 (1.1-3.0)]. Esto es comparable con lo descrito en la literatura, pues en el estudio de Shu y cols., aunque el habito de fumar en las madres durante el embarazo no se relaciono con la enfermedad, el habito de fumar en los padres previo a la concepción si se asocio con enfermedad ( Shu X., O., Ross J., et al., 1996). Sin embargo, otros estudios realizados, tratando de relacionar algunos polimorfismos genéticos específicos con el habito de fumar antes o durante el embarazo y enfermedad, mostraron resultados contradictorios pues no muestran asociación con leucemia, pero se concluye que el efecto del humo del cigarrillo puede ser modificado por la variabilidad genética en las diferentes enzimas que participan en su metabolismo ( Infante- Rivard C., Krajcinovic M., Labuda D., Sinnett D., 2000). Ahora, es importante anotar, que puede ser que no se manifieste leucemia en la infancia pero si otros tipos de cáncer en la edad adulta, lo que esta bien documentado (Perera F., 1997).

Los factores emocionales presentaron asociación con la enfermedad lo que concuerda con algunos datos encontrados en la literatura, donde la progresión del cáncer se asocia a ciertas características psicológicas (Garssen B.& Goodkin K., 1999), que en nuestro medio no dejan de ser absolutamente relevantes. En primer lugar hay que mencionar que el impacto sobre nuestra población de las condiciones políticas y socio económicas que se viven en nuestro país desde hace ya varias décadas, posiblemente se traduzcan en la manifestación de este tipo de enfermedad en la población infantil, pues este grupo (incluidos sus padres) está expuesto a todos estos problemas. Y esto, sumado a otros de los factores de riesgo ya mencionados como la forma de vivir, muchas veces en los mismos talleres o fábricas, con problemas de nutrición que en muchos casos vienen desde su progenitora, con posible inmunosupresión por el estrés, sumándose las características genéticas, pueden conferir riesgo a enfermedad.

Si se tiene en cuenta que algunas de estas enzimas como la GSTM1, se encargan de metabolizar sustancias producidas endógenamente como las derivadas de la adrenalina y las catecolamina (Baez S., et al, 1997), se podría pensar en que hay una asociación entre las situaciones de estrés causadas por lo antes mencionado con ciertos polimorfismos genéticos, podrían ser factores que contribuyen a la etiología de la enfermedad en nuestra población, lo que genera un campo de investigación todavía poco conocido.

Al tratar de establecer la interacción mediante algunos modelos de regresión logística entre los diferentes factores que independientemente se asociaron a la enfermedad se encontró que definitivamente la presencia del polimorfismo de delección de la GSTM1 se asocio en todos los modelos mostrando clara relación con la enfermedad. La exposición al humo de cigarrillo se asocia a la enfermedad, [OR ajustado: 1.78(1.0-3.0)], en el modelo descrito en la Tabla 12. La cercanía a las fabricas [OR ajustado: 5.8 (1.5-22.0)] se asocio notablemente en el modelo descrito en la Tabla 13, cuando se incluyeron las interacciones del polimorfismo de Delección con las variables que inicialmente se habían asociado como variables independientes, indicando claramente la relación de estos factores ambientales con la susceptibilidad genética. En el modelo descrito en la Tabla 14, vemos que se mantiene la asociación de la cercanía a fabricas en una proporción menor a lo visto en el segundo modelo [OR ajustado: 2.0 (1.0-4.0)], asociándose claramente a la vez la interacción entre el polimorfismo de delección y el humo del cigarrillo [ORajustado: 1.1-3.66]. Al mirar en conjunto lo encontrado en estos modelos se denota claramente que las exposiciones ambientales a sustancias químicas contaminantes que se generan de la cercanía de fabricas y a la exposición al humo de cigarrillo están claramente asociada con el riesgo a la enfermedad.

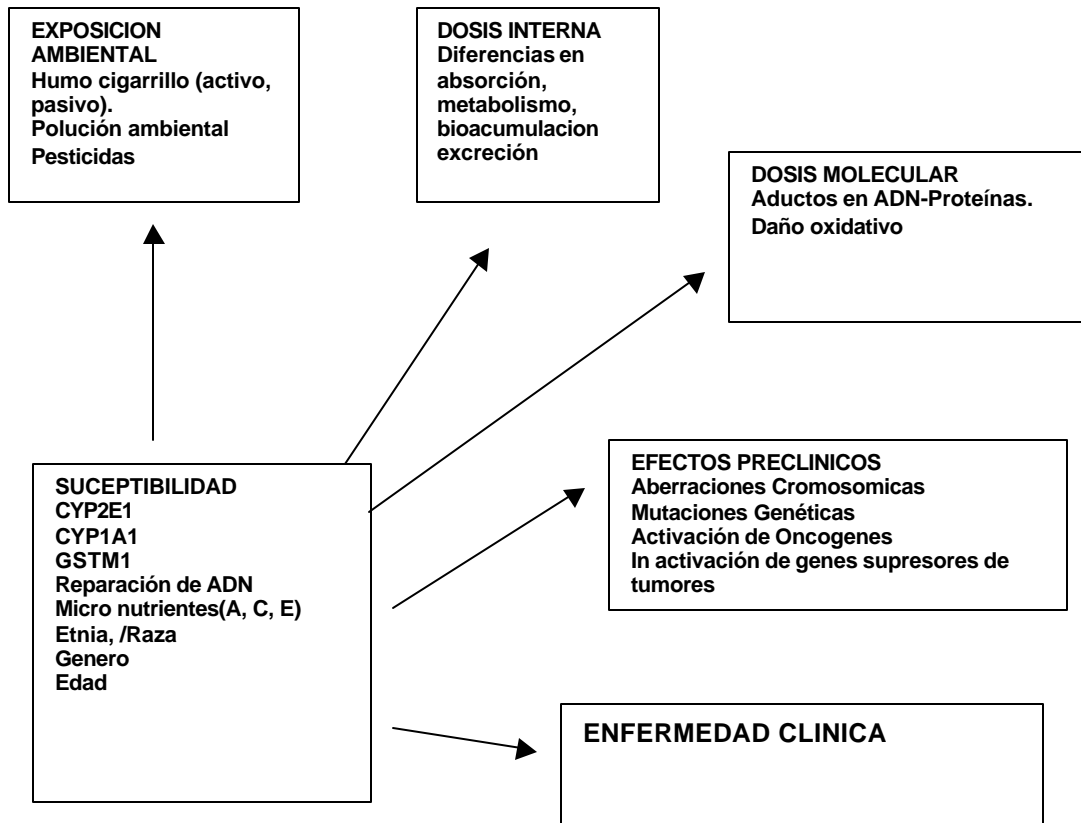


Se propusieron algunos modelos de regresión involucrando la enzima CYP2E1, a pesar de que inicialmente no se asocio, para evaluar si potencializaba alguno de los factores que se habían asociados inicialmente, y no mostró ninguna diferencia.

El hecho que algunas variables que inicialmente se asociaron independientemente pierden significancia en el modelo de regresión, no necesariamente indica que no participan como factor de riesgo si no que posiblemente necesitan de otras interacciones para que tengan significancia estadística.

Finalmente todos estos resultados llevan a demostrar que el riesgo a desarrollar cáncer se asocia de alguna manera a los diferentes polimorfismos genéticos de las enzimas metabólicas y a las interacciones con el medio ambiente; además que son un conjunto de factores de diferentes orígenes que interactúan y generan múltiples respuestas, entre ellas el cáncer y específicamente la leucemia, las cuales son resumidas por Perera (Perera F.P. y Weinstein J.B., 1982), y se ilustran en la Figura 9.

Con respecto a la procedencia y ubicación geográfica de la población de estudio vemos que en el caso de los enfermos, el 70% era procedente de la ciudad de Bogotá, mientras que el 30% restante se distribuye entre el altiplano Cundi-Boyasence y los Llanos Orientales, mostrando mucha similitud con el grupo de controles. Además que el 89.4% de los afectados residían en la zona urbana, mientras que en una menor proporción procedían de la zona rural, además que este evento no se asocio con el riesgo de enfermedad. Es importante resaltar que aunque gran parte de los niños eran procedentes de Bogotá, sus padres no presentaban una frecuencia de procedencia tan acentuada en la ciudad de Bogotá, sino que tenían una distribución más pareja con las otras regiones ya mencionadas; además que una buena proporción de los padres si procedían de zona rural, sino que por diversas circunstancias habían tenido que emigrar de la zona rural a la urbana y por consiguiente sus niños residían en la ciudad



**Figura 9.** Clasificación de los biomarcadores que participan en la etiología del cáncer. Adaptación de Perera F.P. & Weinstein J.B.1982.

Con respecto a la edad de los niños se tuvieron en cuenta dos categorías. La primera fue para estimar el pico de frecuencia de diagnóstico(o riesgo) de la enfermedad y la segunda, para evaluar los grupos de edad como factor pronóstico de la enfermedad. En la primera es importante resaltar que como lo muestran los resultados, el pico de edad en el cual se hace con mayor frecuencia el diagnóstico de leucemia es en el primer grupo entre los 0 y los 6 años, mostrando una  $p=0.04$ , lo que indica que esta edad es de riesgo para sufrir la enfermedad y a medida que el niño crece disminuye el riesgo de, como lo describe la literatura (SEER, 1998).

Si se tiene en cuenta la edad como factor pronóstico se encontró que el 82.3% de los casos estaban entre uno y 9 años, menores de un año solo el 0.68% y mayores de 10 años el 17%. Como mencionamos antes el grueso de la población estudiada se encontraba en la segunda

categoría que según lo descrito en la literatura es considerado de buen pronóstico, claro que esta variable se recomienda tener en cuenta concomitante con otros hallazgos de laboratorio y manifestaciones clínicas pues según algunos estudios estas características no operan independientemente sino que hay que considerar las interrelaciones entre estas para que sea considerado como un factor pronóstico adecuado (Reaman G.H., et al, 1999; Mastrangelo R., et al, 1986). Además este trabajo trata la variable de edad más como un evento de riesgo para enfermedad que como un factor pronóstico.

Con respecto al género, encontramos que en los casos predomina ligeramente el sexo masculino (53.1%), además de asociarse estadísticamente ( $p=0.03$ ) como un factor de riesgo, indicando que el sexo femenino tiene efecto protector hacia la enfermedad, lo que también se observa en otros estudios reportados por la literatura (Chessells J.M., et al, 1995; Parkin D.M., et al, 1997). Este efecto protector del género femenino ha sido relacionado en el trabajo de Krajinovic y cols. (Krajinovic M., et al 1999) a uno de los polimorfismos de la CYP1A1, el CYP1A1\*4, que al estudiar un grupo de niños con LLA se encontró que este polimorfismo se observa muy poco en las niñas sugiriendo que esto puede ser un evento protector y explicando la prevalencia de la enfermedad en los varones; es así como otros aspectos diferentes a los hormonales se han estudiado poco como posibles fuentes de variación en el riesgo a desarrollar cáncer en los diferentes géneros.

Al estimar la frecuencia de los polimorfismos de las enzimas GSTT1, GSTM1 de la población a estudio en general, nos damos cuenta que con respecto a los polimorfismos enzimáticos de las GSTs, la frecuencia en la población estudiada del polimorfismo de delección de la GSTM1 es del 30.3% mientras que con respecto a la GSTT1 es apenas del 16.94%, lo que es muy similar a lo descrito por otros estudios realizados Colombia. Pues los resultados obtenidos por Rodriguez y cols. (Rodriguez B. et al, 2002), en los cuales se estudio una población de adultos provenientes de diferentes regiones del país se observo para el polimorfismo de delección de la GSTT1 un 21% y un 49% para la GSTM1; en otro trabajo realizado con una población de individuos provenientes del Cauca (Acosta C., et al, 2002) se observa un 46% para la GSTM1 y un 16% para la GSTT1. Trabajos realizados en Suramérica (Arruda V., et al, 1998) muestran resultados similares aunque una prevalencia mucho menor para la población indígena de la amazonia brasileña, con un 11% para la GSTT1 y un 20% para la GSTM1 lo que demuestra probablemente las diferencias étnicas en la expresión de estos polimorfismos.

Seria interesante poder analizar un mayor proporción de la población colombiana y en especial poblaciones indígenas para observar su comportamiento si se tiene en cuenta el hecho de que en la población de indígenas amazónicas se obtuvo los valores mas bajos reportados en la literatura.

Los polimorfismos de la CYP2E1 obtenidos mediante la digestión con la enzima Rsa I, presenta el polimorfismo C/C(alelo c1/c1) como el al mas frecuente, con el 69.06%, siguiéndole el genotipo heterocigótico C/A(alelo c1/c2) con el 28.99% y solo el 1.95% presento el genotipo A/A(alelo c2/c2), lo que es muy semejante el algunos trabajos realizados en Brasil donde se observo una frecuencia similar (Nishimoto I.N., et al, 2000).No existen trabajos reportados en Colombia con estos polimorfismos.

En cuanto a las características clínicas de los enfermos y los polimorfismos genéticos estos no se asociaron a enfermedad como ha sido reportado en otros trabajos (Chen C-L., et al, 1997; Krajinovic M. et al 1999). Sin embargo podemos ver algunas características de la manifestación de la enfermedad en nuestra población. Por ejemplo se observa que no es usual que la enfermedad se presente con leucocitosis, sino con un recuento de leucocitos entre limites normales (31.5%) o que con leucopenia (30.8%). El 91.1% de los niños presenta trombocitopenia y en el 74.7% se le observan células blásticas en el frotis de sangre periférica.

En cuanto a la inmunotipificacion la gran mayoría, el 51.8%, presenta leucemias de precursores temprano de células B y el 36.6% Pre B, con CD10 positivo (79.5%), coexpresando marcadores mieloides en el 58.9%, Siendo claro que como lo reporta la literatura las LLA de origen de células T es menos frecuente que las de células B. (Buckley J.D. et al, 1994) y la mayoría expresan el CD10 (Greaves M.F., 1985). El 57.1% presenta al diagnóstico esplenomegalia y el 59.2% Hepatomegalia. Muchos de estos factores son considerados como factores pronósticos, pero en este trabajo no se pueden medir como tal puesto que inicialmente los queríamos asociar a factores de riesgo que no fueron estadísticamente significativos.

## 6. CONCLUSIONES

Podemos concluir que posiblemente los polimorfismos genéticos, especialmente la GSTM1, contribuyan de manera importante en la susceptibilidad de la Leucemia Linfocítica Aguda en los niños, al igual que la interacción de estos con el medio ambiente.

Se pudieron identificar algunas exposiciones ambientales que juegan un papel relevante como la exposición al humo del cigarrillo y la cercanía a fábricas que emiten contaminación y que participan en el desarrollo de enfermedad en nuestra población, lo que es muy importante para generar correctivos en el manejo de la contaminación ambiental y a su vez desarrollar planes de educación para el conocimiento de los riesgos al exponerse a estas, bien sea en la etapa prenatal como postnatal. Definitivamente la etapa previa al embarazo y el periodo prenatal parecen tener un papel relevante en la génesis de la leucemia.

## RECOMENDACIONES

Continuar con este trabajo ampliando el grupo de pacientes, y el número de polimorfismos genéticos estudiados para poder establecer cuales podrían ser los polimorfismos candidatos involucrados en el proceso leucémico de nuestra población.

Es necesario ampliar los estudios para conocer la frecuencia de otros polimorfismos diferentes a los estudiados en este trabajo y que pueden ser buenos candidatos para participar en este proceso.

También se plantea la necesidad de realizar una encuesta mas especifica diferenciando claramente las diferentes exposiciones en las diferentes etapas que pudieran estar relacionadas con la enfermedad.

Como ya se menciona que la susceptibilidad a la enfermedad podría ser una consecuencia de los genotipos paternos de los polimorfismos genéticos de las enzimas metabólicas, seria muy interesante poder estudiar los padres de los enfermos.

La necesidad de implementar los estudios citogenéticos y moleculares de nuestros pacientes para la identificación de las traslocaciones mas frecuentes en la LLA que son importantes para poder proyectar estudios al futuro con estos polimorfismos.

Realizar un estudio complementario a este trabajo teniendo en cuenta los niños que ya fueron tratados y que están libres de enfermedad estableciendo que polimorfismos presentaban para mirar su posible relación con la respuesta al tratamiento.

Establecer la influencia de estos polimorfismos en otras leucemias en niños.

Difundir al común de la población algunos aspectos de las precauciones en el uso o exposición a sustancias tóxicas que podrían aumentar el riesgo de enfermedad maligna en sus hijos.

## BIBLIOGRAFIA

- Acosta C., Torres M.M. Groot H.(2002). Análisis de los marcadores de susceptibilidad al cáncer gástrico: Glutation –S-transferasa en dos poblaciones colombianas. Tesis de Maestría en Biología. Universidad de Los Andes, Bogota.
- Alexander F.E., Patheal S.L., Biondi A., Brandalise S., Cabrera M-E, Li C., Chen Z., et al.(2001). Transplacental chemical exposure and risk of infant leukemia with MLL gene fusion. *Cancer Research* 61: 2542-2546.
- Alves S, Amorin A., Ferreira F., et al.(2002). The GSTT1 and GSTM1 genetic polymorphisms and susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in children from north Portugal. *Leukemia* 16: 1565-1567.
- Anwar W.A, Abdel –Rahman S.Z, et al. (1996). Genetic polymorphism of GSTM, CYP2E1 and CYP2E in Egyptian bladder cancer patients, *Carcinogenesis* 17:1923-1929.
- Arico M., Valsecchi M.G., Camita B. et al (2000). Outcome of treatment in Children with Philadelphia chromosome –positive acute lymphoblastic leukemia. *N Eng J Med* 342:998-1006.
- Armstrong, R.N. (1997). Structure, catalytic mechanism and evolution of the glutathione transferases. *Chem. Res. Toxicol.*10: 2.
- Arruda V.R., Grignolli C.E., Goncalves M.S., Soares C., Menezes R. Saad S. Costa F.F.(1998). Prevalence of homozygosis for the deleted alleles of the glutathione S-transferase mu (GSTM1) and theta (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: relevance to environmental carcinogenesis. *Clin. Genet.* 54:210-213.
- Auvinen A., Hakulinen T., Groves E. (2000). Homophiles influenzae type B vaccination and risk of childhood leukemia in a vaccine trial in Finland. *Br J Cancer* 83:956-958.
- Avnon L., Oryan I, Kordysh E., et al. (1998). Cancer incidence and risks in selected agricultural settlements in the Negrev of Israel. *Arch Environ Health* 53:336.
- Baez S., Segura-Aguilar J., Widersten M., Johansson A., Mannervik B. (1997). Glutathione Transferases catalyze the detoxification of oxidized metabolites (o-quinones) of catecholamines and may serve as an antioxidant system preventing degenerative cellular damage. *Biochem. J.* 324:25-28

- Bain B.J.(1999). Acute Leukaemia, Immunophenotyping, Cytogenetics and Molecular Genetics- the MIC and MIC-M Classifications. In *Leukaemia Diagnosis*: pp 53-112, Blackwell Science, London.
- Behm F.G., Raimondi S.C., et al. (1992). Lack of CD45 antigen on blast cells in childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with chromosomal hyperdiploidy and other favorable prognostic features. *Blood* 79:1011.
- Behm F.G., Smith F.O., Raimondi S.C. et al.(1996). Human homologue of the rat chondroitin sulfate proteoglycan, NG2, detected by monoclonal antibody 7.1, identifies childhood acute lymphoblastic leukemia with t(4;11)(q21;q23) or t(11;19)(q23;p13) and MLL gene rearrangements. *Blood* 87: 1134-1139.
- Bene M.D., Castoldi G., et al. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 9:1783.
- Bennett J.M., Catovsky D., Daniel M.T. et al. (1981). The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: Concordance among observers and clinical correlations. *Br J Haematol.* 47:553.
- Berg S.L., Steuber C.P., Poplack D.G. (2000). Clinical Manifestations of Acute Lymphoblastic Leukemia. In Hoffman R(Ed). *Hematology, Basic Principles and Practice*: pp 1070-1078, Churchill Livingstone, Philadelphia.
- Berhane K., Widerstein M., Engstrom A., Kozarich J.W., Mannervik B.(1994). Detoxification of base propanals and other  $\alpha$  -unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 91:1480-1484
- Bernard O.A. & Berger R. (1995). Molecular basis of 11q23 rearrangements in hematopoietic malignant proliferations. *Genes chromosomes Cancer* 13:75-85.
- Bhatia S., Sather H., Zhang J. et al. (1999). Ethnicity and survival following childhood acute lymphoblastic leukemia: Follow-up of the Children's Cancer Group (CCG) Cohort. *Pro American Assoc. Clin Oncol.* 18:568a.
- Biondi A., Cimino G., Pieters R., Pui C-H. (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood* 96:24-33.
- Blair A., Zahm S.H.(1995). Agricultural exposures and cancer. *Environ Health Perspect.*103:205.
- Bleyer W.A., Sather H., Coccia P. et al. (1986). The staging of childhood acute lymphoblastic leukemia: Strategies of the Children's Cancer Study Group and tree-dimensional technique of multivariate analysis. *Med Pediatr. Oncol.* 14:271.
- Bloomfield C.D., Secker-Walker L.M., et al. (1989) .Six year follow-up of the clinical significance of karyotype in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 40:171.



- Board, P., Coggan, M., Johnston, P., V., Suzuki, T., Webb, G. (1990). Genetic heterogeneity of the human glutathione –S-transferases, a complex of gene families. *Pharmacol. Ther.* 48, 357.
- Boobis A.R. (1996). Interindividual variability in metabolic activation in humans in vivo. *Environ. Toxicol and Pharmacol* 2:161.
- Boobis A.R. (1992). Molecular basis for differences in susceptibility to toxicants, introduction. *Toxicol. Letter* 64/65, 109.
- Borkhardt A., Cazzaniga G., Viehmann S., Valsecchi M.G. et al. (1997). For the 'Associazione Italian Ematologia Oncologia Pediatrica' and the Berlin-Frankfurt-Münster' Study Group'. 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*,90, 571-577,
- Borowitz M., Shuster J., Land V. et al. (1991). Myeloid-antigen expression in childhood acute leukemia. *N Engl J Med* 325:1378.
- Borrad PG.(1981). Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *Am J Hum Genet* 33:36-43.
- Bovbjerg D.H., (1991). Psyconeuroimmunology, Implications for Oncology. *Cancer* 67:828-832.
- Brahams D.(1993).Cancer cluster around nuclear installation. *Lancet* 342:981.
- Broice J.D, Fraumeni J.F. Jr (eds).(1984),Radiation Carcinogenesis. Raven Press, New York.
- Brondum J., Shu X.O., Steinbuch M., et al, (1999). Parental cigarette smoking and the risk of acute leukemia in children. *Cancer* 85:1380.
- Buckley J.D., Buckley C.M., Ruccioni K., Sather H.N., Waskerwitz M.J., Woods W.G., Robinson L(1994). Epidemiological characteristics of childhood acute lymphoblastic leukemia analysis by immunophenotype. *Leukemia* 8:856.
- Cai L., Yu S-Z., Zhang Z-F. (2001). Cytochrome P450 genetic polymorphism and gastric cancer in Changle, Fujian Province. *World J Gastroenterology* 7: 6.
- Calabrese J.R., Kling M.A., Gold P.W. (1987). Alterations in immunocompetence during stress, bereavement and depression: Focus on neuroendocrine regulation. *Am J Psychiatry* 144:1123-1138.
- Cantu-Rajnoldi A., Putti C., et al. (1991). Co-expression of myeloid antigen in children acute lymphoblastic leukemia: relationship with the stage of differentiation an clinical significance. *Br J Haematol* 79:40.
- Chan L.C., Cari K.K., et al.(1987). A novel *abl* protein expressed in Philadelphia chromosome + acute lymphoblastic leukemia. *Nature* 325:635.
- Chaplin R., Gale R.P.(1989).Acute Lymphoblastic leukemia: recent advances in biology and therapy. *Blood* 73:2051.

- Chen C., Madeleine M., Weiss N., Daling J., (1999) Glutathione S-transferase M1 genotypes and risk of vulvar cancer: a population-based case control study. *American Journal of Epidemiology* 150:437-442.
- Chen C-L., Liu Q., Pui C-H., Rivera G., et al. (1997). Higher frequency of glutathione S-transferase deletion in black children's with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 89: 1701-1707.
- Chen H., Sandler D.P., Taylor J.A., Shore D.L., Liu E., Bloomfield C.D., Bell D.A. (1996). Increased risk for myelodysplastic syndromes in individuals with glutathione transferase theta 1 (GSTT1) gene defect. *Lancet* 347:295.
- Chessells J.M., Richards S.M., Bailey C.C., et al. (1995). Gender and treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: report from MRC UKALL trials. *Br J Haematol.* 89:364-372.
- Chessells J.M., Swansbury G.J., Reeves B., et al (1997). Cytogenetics and prognosis in childhood lymphoblastic leukemia: results of MRC UKALL X. Medical Research Council Working Party in Childhood Leukaemia. *Br J Haematol* 99:93-100.
- Chilvers C., Mc Pherson K., et al. (1989). Oral contraceptive use and breast cancer risk in young woman. *Lancet* 1:973-982.
- Coles B. & Ketterer B. (1990). The role of glutathione and glutathione transferases in chemical carcinogenesis. *Crit. Rev. Biochem .Mol. Biol.* 25:47.
- Committee on the biological effects of Ionizing Radiations. (1980). The effects on Populations of Exposure to low levels of ionizing radiation. National Academic press, Washington DC.
- Cooper C.L., Wartson M., eds. (1991). *Cancer and Stress: Psychological, Biological and Coping Studies*. Jhon Wiley & Sons, Chichester.
- Cosma G., Crofts F., Currie D., Wirgin I., Toniolo P., Garte S.J. (1993). Racial differences in restriction fragments length polymorphisms and messenger RNA inducibility of the human CYP1A1 gene. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2:53.
- Cotton S., Sharp L., Little J., Brockton N. (2000). Glutathione S-transferase polymorphism and co rectal cancer. *American Journal of Epidemiology* 151: 7-32.
- Crist W.M., Boyett J. (1984). Pre B-cell leukemia responds poorly to treatment: a pediatric Oncology Group Study. *Blood* 63: 407.
- Crist W.M., Shuster J.J., et al. (1988). Clinical features and outcome in childhood T-cell leukemia-lymphoma according to the stage of thymocyte differentiation: a pediatric oncology group study. *Blood* 72:1891-1897.
- Croce C.M., Nowell P.C. (1985). Molecular basis of human B cell neoplasia. *Blood* 65:1.

- Crump C., Chen C., Appelbaum F., et al. (2000). Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia. *Cancer Epidemiology Biomarkers & prevention* 9:457-460.
- Davies S., Robinson L., Buckley J., Radloff G., Ross J., Perentesis J.(2000). Glutathione S-transferases polymorphisms in children with Myeloid Leukemia: A children's cancer group study. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 9: 563-566.
- Davies S.M., Bhatian S., Ross J.A., Kiffmeyer W.R., Gaynon P., Radloff G., Robinson L., Perentesis J.(2002). Glutathione S-transferase genotypes, genetic susceptibility and outcome of therapy in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 100: 67-7.
- De Groot M.J., and Vermeulen, N.P.E. (1997). Modeling the active sites of the cytochrome P450s and glutathione S- transferases, two of the most important biotransformation enzymes. *Drug Metab. Rev.*29: 747.
- Delabesse E., Bernard M., Landman-Parker J., et al. (1997). Simultaneous SIL-TAL1 RT-PCR detection of all *tal<sup>d</sup>* deletions and identification of novel *tal<sup>d</sup>* variants. *Br J Haematol*, 99,901-907.
- Diller L., Li F.P.(1998). Epidemiology of cancer in childhood. In Nathan and Oski's (eds): *Hematology of Infancy and Childhood*: pp1071-1091, W:S Saunders Co., Philadelphia.
- Doll R., Evans H.J., Darby S.C.(1994).Paternal exposure not to blame. *Nature* 367:678.
- Doll R., Wakeford R.(1997). Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol* 70:130.
- Donadieu J., Auclerc M.F., Baruchel A., et al. (1998). Critical study of prognostic factors and childhood acute lymphoblastic leukemia: differences in outcome are poorly explained by the most significant prognostic variables. Fralle group. French Acute lymphoblastic Leukaemia Study group. *Br J Haematol*. 102:729-739.
- Dordelmann M., Reiter A., et al. (1999). Prednisone response is the strongest predictor of treatment outcome in infant cute lymphoblastic leukemia. *Blood* 94:1209-17.
- Draper G.J., Stiller C.A., et al.(1993). Cancer in Cumbria and in the vicinity of the Sellafield nuclear installation 1963-1990. *Br M Journal* 306:89.
- Dube I.D., Kamel-Reid S., et al. (1991). A novel human home box gene lies at the chromosome 10 breakpoint in lymphoid neoplasia with chromosomal translocation t(10;14) in T cell leukemia. *Blood*; 78:2996-3003.
- El Zein R.A., Conforti-Froes N. (1997). Interactions between genetic predisposition and environmental toxicants for development of lung cancer. *Environ. Mol. Mutagen* 30:196-204.
- El Zein R.A., Zwischenborger J.B., Abdel-Rahman S.Z., Sankar A.B., Au W.W., (1997). Polymorphism of metabolizing genes and lung cancer histology: prevalence of CYP2E1 in adenocarcinoma, *Cancer Letters* 112:71-78.

- Eriksen H.R., Olff M., Murison R., Ursin H. (1999). The time dimension in stress responses: relevance for survival and health. *Psychiatry Research* 85:39-50.
- Evans W.E., Relling M.V.(1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics *Science* 286:487.
- Felix C.A. (1998). Secondary leukemias induced by topoisomerase-targeted drugs. *Biochim Biophys Acta* 1400:233.
- Felix C.A., Lange B.J., Chessells J.M. (2000). Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia: Challenges and Controversies in 2000. *Hematology* 286-302.
- Filipovich A.H., Spector B.D., et al.(1980). Immunodeficiency in humans as a risk factor in the development of malignancy. *Prev. Med.* 9:252.
- Fink R.M., Koller U., et al. (1993). Prognostic significance of myeloid antigen expression on blast cells in children with lymphoblastic leukemia. *Med. Pediatr. Oncol.* 21:340.
- First MIC Cooperative Study Group. (1986) Morphologic, immunologic and cytogenetic (MIC) working classification of acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 23:189-197.
- Fletcher J.A., Kimball V.M., et al. (1989). Prognostic implications of cytogenetic studies in an intensively treated group of children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 74:2130.
- Foon K., Todd R.I.(1986).Immunologic classification of leukemia and lymphoma. *Blood* 68:1.
- Ford A.M., Bennet C.A., Price C.M., et al. (1998). Fetal origins of the TEL-AML1 fusion gene in identical twins with leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:4584-4588.
- Ford A.M., Ridge S.A., et al. (1993). In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukemias. *Nature* 363:358-360.
- Gale K.B., Ford A.M., Repp R., et al.(1997).Backtracking leukemia to birth: identification of clonotypic gene fusion sequences in neonatal blood spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:13950-13954.
- Gale R.E., Wainscoat J.S. (1993). Clonal analysis using X-linked DNA polymorphisms.*Br J Haematology* 85:2.
- Garsen B., Goodkin K. (1999). On the role of immunological factors as mediators between psychological factors and cancer progression. *Psychiatry Research* 85:51-61.
- Gaste S., Taioli E., Crosti F., Barisone E., Luciani M., Jankovic M, Biondi A. (2000). Deletion of parental GST genes as possible susceptibility factor in etiology of infant leukemia. *Leukemia Research* 24: 971-974.
- Gaynon P.S., Crotty M.L., Sather H.N.,et al.(1997).Expression of BCR-ABL, E2A-PBX1, and MLL-AF4 fusion transcript in newly diagnosed children with acute lymphoblastic leukemia: A children's Cancer Group initiative. *Leukemia Lymphoma* 26:57.

- Gaynon P.S., Desai A.A., Bostrom B.C., et al. (1997). Early response to therapy and outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia: a review. *Cancer* 80: 1717-26.
- Gaynon P.S., Siegel S. (2002). Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. In Henderson E.S., Lister T.A., Greaves M.F (Eds). *Leukemia* pp601-620. Saunders, Philadelphia.
- German J., Passarge E. (1989): Bloom's syndrome XII. Report from the registry for 1987. *Clin. Genet.* 35:57-69.
- Gerting D., Stamfer M., Haiman C., Hennekens C., et al., (1998). Glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphism and colorectal cancer risk: a prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers& Prevention* 7:1001-1005.
- Gilliland D.G. (1993). Clonal evolution in acute myeloid leukemia. *Blood* 82:337.
- Golub T.R., Gilliland D.G. (1998). The Molecular Biology of Cancer. In Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and Childhood*: pp1092-1146, W.S.Saunders, Philadelphia.
- Gonzalez F.J. & Gelboin H.V. (1994). Role of human cytochromes p450 in the metabolic activation of chemical carcinogens and toxins. *Drug Metab. Rev* 26:165.
- Greaves M.F. (1999). Molecular genetics, natural history and demise of childhood leukemia. *Eur J Can* 35:173.
- Greaves M.F. (2002). Biology of Leukemia. An Overview. In: Henderson E.S., Lister T.A., Greaves M.F. (Eds): *Leukemia*: pp8, Saunders, Philadelphia.
- Greaves M.F. (2002a). Childhood leukaemia. *BMJ* 342:283-287.
- Greaves M.F. (1988). Speculations on the cause of children acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2:120.
- Greaves M.F., Alexander F. (1993). An infection etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood?. *Leukemia* 7:27.
- Greaves M.F., Chan L.C., et al. (1986). Lineage promiscuity in hemopoietic differentiation and leukemia. *Blood* 67:1.
- Greaves M.F.,( 1997).Aetiology of Acute Leukemia. *Lancet* 349:344.
- Greaves M.F., Pegram S.M., Chan L.C.(1985). Collaborative group study of the epidemiology of acute lymphoblastic leukemia subtypes: Background and first report. *Leukemia Research* 9:715.
- Griesser H., Tkachuk D., Reis M.D., et al. (1989). Gene rearrangements and translocations in lymphoproliferative diseases. *Blood* 73:1402.
- Guengerich F.P, Kim D.H et al. (1991). Role of human cytochrome P-450 IIE1 in the oxidation of many low-molecular-weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.*,4:168-179.
- Guengerich F.P., Shimada T. (1991). Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochromeP450enzymes.*Chem.Res.Toxicol.*4: 391-407.

- Guengerich F.P.(1992). Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol. Ther.* 54,17.
- Guengerich F.P., Shimada T. (1998). Activation of procarcinogens by human cytochrome P450 enzymes. *Mut. Res.* 400:201-213.
- Gurney J.G., Davis S., Severson R.K., et al.(1996). Trends in cancer incidence among children in the US. *Cancer* 78: 532.
- Hall A.G, Autzen P., Cattan A.R., Malcolm A.J., Cole M., Kernahan J., Reid M.M. (1994). Expresión of mu class glutathione s-transferase correlates with event free survival childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 54:5251.
- Hammond D., Sather H., Nesbit M., et al.(1986). Analysis of prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol*14:124.
- Harbott J., Ritterbach J., et al. (1993). Clinical significance of cytogenetic studies in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM trial. *Recent Results Cancer Res.* 131:123.
- Hatano M., Roberts C.W., et al. (1991). Desregulation of the home box gene, HOX11, by the t(10;14) in T cell leukemia. *Science* 253:79-82.
- Hawkins M.M., Wilson L.M., et al. (1992). Epipodophyllotoxins, alkylating agents and radiation and risk of secondary leukemia after children cancer. *BMJ* 304:951-958.
- Hayes J., Pulford D. (1995). The Glutathione S- Transferase supergene family: Regulation of GST\* and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprevention and drug resistance. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30:445-600.
- Heagerty A., Smith A., English J., Leader J., Perkins W., Bowers B., Jones P., Gilford J., Alldersea J., Fryer A., Strange R.C.(1993).Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: Significant interactions between glutathione S- transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. *BrJ Cancer* 73:44.
- Hecht F., Hecht B.K. (1990). Cancer in ataxia telangiectasia patients. *Cancer Genet Cytogenet* 46:9.
- Hecht S. (1999). Tobacco Smoke Carcinogens and Lung Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 91:1194-1210.
- Heerema N.A., Nachman J.B., Sather H.N., et al. (1999). Hyperdiploidy with less than 45 chromosomes confers adverse risk in childhood acute lymphoblastic leukemia: A report from the Children's Cancer Group. *Blood* 94:4036.
- Heerena N.A., Sather H.N., Sesel M.G., et al.(2000). Prognostic impact of trisomies of chromosomes 10, 17 and 5 among children with acute lymphoblastic leukemia and high hyperdiploidy (>50 chromosomes). *J Clin Oncol* 18:1879.

- Heizisouer K.J., Selmin O., Huang H-Y., et al.(1998).Association between glutathione S-transferase M1, P1, and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. J Natl Cancer Inst.90:512.
- Henderson B.E.(1989).Establishment of an association between a virus and a human cancer. J Natl Cancer Inst 81:320-322.
- Hildesheim A., Anderson L., Che C-J., et al. (1997).CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. J Natl Cancer Inst. 89: 1207-1212.
- Hildesheim A., Anderson L., Chen C-J., et al.(1997).CYP2E1 genetic polymorphism and the risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. J Natl Cancer Ins. 89: 1207-1212.
- Hirvonen A.(1997).Combinations of susceptible genotypes and individual responses to toxicans. Environ.Health Perspect 105(Suppl) 4189-222.
- Hunger S.P., Galili N., Carroll A.J., et al. (1991). The (1;19)(q23;p13) results in consistent fusion of E2A and PBX1 coding sequences in acute lymphoblastic leukemia. Blood 77:687-693.
- IARC. (1986). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon.
- IARC. (1999). IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon.
- Ihle J.N.(1996). STATs: signal traducers and activators of transcription. Cell 84:331-334.
- Inaba T., Roberts W.M., Shapiro L.H., et al.(1992). Fusion of the leucine zipper gene HLF to the E2A gene in human acute B-linage leukemia. Science 257, 531.
- Infante- Rivard C., Krajinovic M., Labuda D., Sinnett D. (2000). Parental smoking, CYP1A1 genetic polymorphisms and childhood leukemia (Québec Canada). Cancer Causes Control 11:547-553.
- Infante-Rivard C., Amre D., Sinnett D. (2002). GSTT1 and CYP2E1 polymorphism and trihalomethanes in drinking water: effect on childhood leukemia. Environ Health Perpesct. 6: 591-593.
- Infante-Rivard C., Labuda D, Krajinovic M, Sinnett D.(1999). Risk of childhood leukemia associated with exposure to pesticides and with gene polymorphism. Epidemiology 5:481-487.
- Iyer L., Ratain M.J.(1998). Pharmacogenetics and cancer chemotherapy. Eur J Cancer.. 34:1493.
- Janossy G., Counstain-Smith E., et al. (1989). The reliability of cytoplasmic CD3 and CD22 antigen expression in the immunodiagnostic of acute leukemia: a study of 500 cases. Leukemia 3:170.
- Jennings C.D., Foon K.A. (1997). Recent advances in flow citometry: applications to the diagnosis of hematologic malignancy, Blood 90:2863-2892.

- Ji B.T., Shu X.O., Linet M.S., et al. (1997). Parental cigarette smoking and the risk of childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. *J Natl. Cancer Inst*, 89:238.
- Johansson B., Moorman A.V., Has O.A., et al. (1998). On behalf of the European 11q23 Workshop participants. Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)- a cytogenetic, morphologic, immunophenotype and clinical study of 183 cases. *Leukemia* 12:769-778.
- John E.M., Savitz D.A., et al. (1991). Prenatal exposure to parent's smoking and childhood cancer. *Am J Epidemiol.* 133: 123-132.
- Kalwinsky D., Roberson P., Dahl G., et al. (1985). Clinical relevant of lymphoblastic leukemia. *J Clin. Onc.* 3: 477.
- Kato S., Shields P.G., Caporaso N.E., Hoover R.N., et al. (1992). Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variations, and lung cancer risk. *Cancer Res.* 52: 6712.
- Kawajiri K. (1999)CYP1A1. In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer.* IARC Scientific Publication N°148, pp159-169.
- Keller-Byrne J.E., Khuder S.S., Schaub E.A. (1995). Meta analysis of leukemia and farming. *Environ Research* 71:-10.
- Ketter B.(1988). Protective role of glutathione and glutathione transferases in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202, 34:343.
- Kiecolt-Glaser J.K., Glaser R. (1988). Psychological influences on immunity: Implications for AIDS. *Am Psychol.* 27:892-898.
- Koehler M., Behm F.G., et al. (1993). Expression of activation antigens CD38 y CD71 is not clinically important in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 7:41.
- Kohn H.I., Fry R.J.M.(1984). Radiation Carcinogenesis. *N Engl. J Med* 301:504.
- Krajinovic M., Labuda D., Mathonnet G., Labuda M., Moghrabi A., Champagne J., Sinnett D. (2002). Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin. Cancer Res.* 8:802-10.
- Krajinovic M., Labuda D., Sinnett D. (2001). Childhood acute lymphoblastic leukemia: genetic determinants of susceptibility and disease outcome. *Rev Environ Health.* 16: 263-279.
- Krajinovic M., Laduba D., Richer C., Karimi S., Sinnet D. (1999). Susceptibility to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: Influence of CYP1A1, CYP2D6, GSTM1, and GSTT1 Genetic Polymorphism. *Blood* 93:1496.
- Krishnan E., Wegner K., et al. (1978). Congenital hypoplastic anemia terminating in acute promyelocytic leukemia. *Pediatrics* 61:898.
- Lanier A.P., Noller K.L.(1973).Cancer and stilbestrol: a follow-up of 1719 persons exposed to estrogens in utero and born 1943-1959. *Mayo Clin. Proc.* 48:793.



- Lee E.J., Wong J.Y., et al. (1995). Glutathione-S-transferase (GSTT1) genetic polymorphism among Chinese, Malays and Indians in Singapore. *Pharmacogenetics* 5:332.
- Leiken S., Miller D., Sather H., et al. (1981). Immunologic evaluation in the prognosis of acute lymphoblastic leukemia: a report from Children's Cancer Group. *Blood* 58:5601.
- Lemos M.C., Cabrita F.J., Silva H.A., Vivan M., Placido F., Regateiro F.J.(1999). Genetic polymorphism of CYP2D6, GSTM1 and NAT2 and susceptibility to hematological neoplasias. *Carcinogenesis* 20: 1225-1229.
- Li F.P.(1988a). Prevention of cancer in adulthood. In Pizzo PA, Poplack DG (eds): *Principles and practices of pediatric Oncology*: pp1075-1080, J.B. Lippincott Co, Philadelphia.
- Li F.P.(1988b).Cancer Families: Human models of susceptibility to neoplasia. *Cancer Res* 48: 5381-5386.
- Li F.P., Fraumeni J.F. Jr, et al. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-5362.
- Lieber C.S. (1997). Cytochrome P-450E1, Its physiological and pathological role. *Physiol. Rev* 77: 517.
- Lilleyman J., Hann I., Stevens R. (1986). The clinical significance of blast cell morphology in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol* 14: 144.
- Lin H.J., Han C.Y., Bernstein D.A., Hsiao W., Lin B.K., Hardy S. (1994). Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 15: 1077.
- Linet M.S., Hatch E.E., Kleinerman R.A., et al. (1997). Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. *N Engl J Med*.337:1.
- Ludwig W-D., Harbott J., et al. (1993).Incidence and prognostic significance of the immunophenotypic subgroups in childhood acute lymphoblastic leukemia: experience of the BFM study 86. In Ludwig W-D. (Eds): *Recent results in Cancer Research*: pp269-282Berlin/Heidelberg, Springer-Verlag.
- Ludwig W-D., Reiter A., et al. (1994).Immunophenotype features of childhood and adult acute lymphoblastic leukemia(LLA): experience of the German multicentre trials ALL\_BFM and GMALL. *Leuk Lymphoma* 13:71.
- Mahmoud H.H., Ridge S.A., et al.(1995). Intrauterine monoclonal origin of neonatal concordant acute leukemia in monozygotic twins. *Med Pediatr Oncol* 24:77-81.
- Mannervick B., Danielson N.H. (1988). Glutathione transferase structure and catalytic activity. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 23:283-337.
- Martinez–Clement J.A.(1997). Molecular cytogenetics of childhood hematological malignancies. *Leukemia* 11:1999,.

- Mastrangelo R., Poplack D., Bleyer A., Riccardi R., Sather H., D'Angio G.(1986). Report and recommendations of the Rome workshop concerning poor-prognosis acute lymphoblastic leukemia in children: biologic bases for staging, stratification and treatment. *Med& Ped Oncol* 14:191-194.
- Mc Bride O.W., Umeno M., et al.(1987). A Taq polymorphism in the human P450IIIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E). *Nucl Acids Res* 15:10071.
- Mc Lean T.W., Ringold S., Neuberg D.,et al.(1996). TEL/AML1 dimerized and is associated with a favorable outcome in Children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 88: 4252-4258.
- Meydan N., Grunberger T., et al. (1998). Inhibition of acute lymphoblastic leukemia by a Jak-2-inhibitor. *Nature* 379: 645-648.
- Miller R.W.(1976).Effects of cigarette smoking on the fetus and child. *Pediatrics* 57:411.
- Miller R.W.(1978). Environmental causes of cancer in childhood. *Adv Pediatrics* 25:97.
- Mirro J., Kitchingman G.R.(1989).The morphology, cytochemistry, molecular characteristics and clinical significance of acute mixed lineage leukemia. In Scott C.S. (Eds): *Leukaemia Cytochemistry: Principles and Practice*. pp155- 179, Ellis Horwood, Chichester.
- Mirro J., Zipf T.F.,et al.(1985). Acute mixed leukemia: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Blood* 66:1115.
- Moorman A.V., Clark R., Farell D.M., et al. (1996). Detecting hidden hyperdiploidy in ALL.Br *J Haematol* 93(suppl) 2:331.
- Mulder G.J.(1995). Polymorphism in drug conjugation in man is it a factor of cancer in drug toxicity or efficacy?. *Eur J Pharm Sci* 3: 57.
- Mulvihill J.J., Miller R.W., et al.(1977).*Genetics of Human Cancer.*, Raven press, New York.
- Nachman J.B., Sather H.N., Sensel M.G., et al.(1998). Augmented post induction therapy for children with high-risk acute lymphoblastic leukemia and slow response to initial therapy. *N Engl J Med* 338:1663-71.
- Nelson D.R., Koymans L., et al.(1996). P450 super family: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1.
- Nelson D.R., Koymans L., Kamataki T., Stegeman J.J, et al. (1996). P450 super family, update on a new sequence, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42.
- Nelson H.H., Wiencke J.K., Christian D.C., et al(1995). Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione-S transferase theta. *Carcinogenesis* 16,:1243.
- Nishimoto I.N., Hanaoka T., Sugimura H., et al. (2000). Cytochrome P450 2E1 Polymorphism in gastric cancer in Brazil: Case Control Studies of Japanese Brazilians and Non-Japanese Brazilians. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9:675-680.

- Nossal G. (1993). Life, death and the immune system. *Scientific American* 269:20-30.
- Oyama T., Kawamoto T., Mizoue T., et al.(1997).Cytochrome P450 2E1 polymorphism as a risk factor for lung cancer : in relation to p53 gene mutation. *Anticancer Res.* 17,583-587.
- Palli D., Vineis P., Russo A. Et al.(2000) Diet metabolic polymorphism and DNA adducts: the ETIC-Italy cross-sectional study. *International Journal of Cancer.*87: 444-451.
- Par B.K., Pirmohamed M., Kitteringham N.R. (1995). The role of the cytochrome P450 enzymes in hepatic and extra hepatic drug toxicity. *Pharmacol. Ther* 68:385.
- Parkin D.M., Muir C.S., Welan S.L., et al. (1997). Cancer incidence in five continents. IARC Scientific Publication Vol 7N°143,Lyon.
- Pemble, S.E., Schroder, K.R., et al. (1994).Human glutathione –S transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 300: 271.
- Pemble, S.E., Wardle, A.F., Taylor, J.B.(1996). Glutathion –S- transferase class kappa: characterization by the cloning of rat mitochondrial GST and identification of a human orthologue. *Biochem. J.* 319: 749.
- Perentesis J., Ramsday N., et al.(1983).Biphenotypic leukemia: immunologic and morphologic evidence for a common lymphoid-myeloid progenitor in humans. *J Pediatrics* 102:63.
- Perera F.P.(2002) Molecular epidemiology: Insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *Natl Cancer Inst* 88:496.
- Perera F.P., Weinstein I.B. (2000) Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 21: 517-524.
- Pickett C. B., Lu A.Y.H. (1989). Glutathione –S-transferases gene structure, regulation and biological function. *Ann Rev. Biochem* 58:743.
- Pickett, C.B.& Lu, A.Y.H.(1988). The structure, genetics and regulation of soluble glutathione – S-transferases. In : *Glutathione Conjugation:* pp 137, Academic Press, San Diego.
- Pincel D.(1996). Selecting treatment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Oncol* 14:4-6.
- Pollock B.H., DeBaun M.R., Camita B.M., et al.(2000). Ethnic differences in the survival of childhood B- precursor acute lymphoblastic leukemia: A pediatric oncology group study. *J Clin Oncol* 18:813.
- Preamble S., Schoeder K.R., Spencer S.R., et al.(1994). Human Glutathione S-transferase theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem J.* 300:271.
- Pui C-H-, Frankel L-S, et al.(1991a). Clinical characteristics and treatment outcome of childhood acute lymphoblastic leukemia with the t(4;11)(q21;q23): a collaborative study of 40 cases. *Blood* 77:440-447.

- Pui C-H. (2001). Acute Lymphoblastic Leukemia. In Beutler E (eds): *William's Hematology*: p1141-1161, Mc Graw-Hill, New York.
- Pui C-H.(1997). Acute Leukemia in Children. *Curr opin Hematol* 3:249.
- Pui C-H., Behm F., Singh B., et al.(1990a). Myeloid- associated antigen expression lacks prognostic value in childhood acute leukemia treated with intensive multiagent chemotherapy. *Blood* 75:198.
- Pui C-H., Behm F.G., et al.(1989).Secondary acute myeloid leukemia in children treatment for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med* 321:136.
- Pui C-H., Behm F.G., et al.(1993a).Clinical and biologic relevance of immunologic markers studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82:343.
- Pui C-H., Boyett J.M., Hancock M.L., et al.(1995).Outcome of treatment for childhood cancer in blacks compared with white children: The St Jude Children's Research Hospital Experience, 1962 through 1992.*JAMA* 273:633-637.
- Pui C-H., Boyett J.M., Relling M.V., et al. (1999). Sex differences in prognosis for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 17:818.
- Pui C-H., Crist W., Look A.(1990b). Biology and clinical significance of cytogenetic abnormalities in childhood lymphoblastic leukemia. *Blood* 76:1449.
- Pui C-H., Crist W.M. (1999).Acute lymphoblastic leukemia . In *Childhood leukemia* (Eds) C-H Pui: pp288, Cambridge University press, New York.
- Pui C-H., Evans W.E.( 1998). Acute lymphoblastic leukemia *N Engl J Med* 339:605-15.
- Pui C-H., Hancock M.L., et al.(1993b). Clinical significance the CD34 expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 82:889.
- Pui CH., Raimond S.C., et al. (1991b). Characterization of childhood acute leukemia with multiple myeloid and lymphoid markers at diagnosis and at relapse. *Blood* 78:1327.
- Pui C-H., Ribero R..C, et al. (1991c). Acute myeloid leukemia in children treated with epipodophyllitoxins for acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med* 325: 1682-1687.
- Pui C-H., Williams D.L., et al.(1988). Correlation of the karyotype and immunophenotype in childhood acute leukemia. *J Clin Oncol* 6:56.
- Quiñónez L., Berthou F., Varela N., Simon B., Gil L., Lucas D.(1999). Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian Chilean populations. *Cancer Letters*141: 167-171.
- Raimondi S.C., Shurleff S.A., Downing J.R., et al. (1997). 12q abnormalities and the TEL gene (ETV6) in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 90:4559-4566.
- Raunio H., Husgafvel-Pursiainen, et al. (1995). Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating enzymes and cancer susceptibility- a review. *Gene* 159:113-121.

- Raunio H., Rautio A., Pelkonen O.(1999). The CYP2A subfamily: function, expression and genetic polymorphism. In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publication N°148, pp197-207.
- Raynaud S., Cave H., Bastard C., et al. (1996). The 12;21 translocation involving TEL and deletion of the the TEL allele: two frequently associated alterations found in childhood lymphoblastic leukemia. *Blood* 87, 2891-2899.
- Reaman G.H., Sposto R., Sensel M.G., et al. (1999). Treatment outcome and the prognostic factors for infants with acute lymphoblastic leukemia treated on two consecutive trial of the children's Cancer group. *J Clin Oncol* 17:445-455.
- Reaman G.H., Zeltzar P., Bleyer W., et al. (1985). Acute lymphoid leukemia in infants less than one year of age: a cumulative experience of the children's Cancer group. *J Clin Oncol* 3:1513.
- Rebbeck T.R. (1997). Molecular epidemiology of the human glutathione S- transferase genotypes GSTM1 and GSTT1 in cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 6:733.
- Redd W., Siberfarb P., Andersen B., Andrykowski M., et al. (1991). Physiologic and psychobehavioral research in oncology. *Cancer* 67: 813-822.
- Reiter A., Schrappe M. et al, (1992). Reiter A, Schrappe M et al: Favorable outcome of B-cell acute lymphoblastic leukemia in childhood: a report of the three consecutive studies of the BFM group. *Blood* 80:2471.
- Ritterbach J., Hiddemann W., Beck J.D., et al. (1998). Detection of hyperdiploid karyotypes (>50 chromosomes) in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL) using fluorescent in situ hybridization (FISH). *Leukemia* 12:42.
- Rodriguez B.X., Torres M.M, Groot H.(2002) Frecuencias de los genotipos de los polimorfismos nulos GSTT1-GSTM1 en diferentes poblaciones Colombianas. Tesis de Magister en Biología. Universidad de Los Andes. Bogota.
- Rollinson S., Roddam P., Kane E., Roman E., Cartwright R., Jack A., Morgan G.( 2000). Polymorphic variation within the glutathione S-transferase genes and risk of adult acute leukemia. *Carcinogenesis* 21:43-47.
- Romana S.P., Poirel H., Leconiat M., et al. (1995). High frequency of t(12;21) in childhood B-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 86:4263.
- Roos J.A.(1998). Maternal diet and infant leukemia: role for topoisomerasa II inhibitors?. *Int J Cancer Suppl.*11:26-28
- Roos J.A., Potter J.D., Reaman G.H., et al. (1996). Maternal exposure to potencial inhibitors of DNA topoisomerasa II and infant leukemia (USA): A report from the cancer group. *Cancer Causes Control* 7:581.

- Ross J.A., (2000). Dietary flavonoids and the MLL gene: A pathway to infant leukemia? .PNAS .97:4411-4413.
- Rowley J.D. (2000) Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia* 14:513.
- Rubnitz J.E., Link M.P., Shuster J.J., et al. (1994). Frequency and prognostic significance of HRX rearrangements in infant acute lymphoblastic leukemia: A pediatric Oncology Group study. *Blood* 84: 570.
- Rubnitz J.E., Pui C-H, Downing J.R.(1999). The role of TEL fusion genes in pediatric leukemia's. *Leukemia*13:6 .
- Rubnitz J.E., Pui C-H., Downing J.R.(1999). The role of TEL fusion genes in pediatric leukemias. *Leukemia* 13:6.
- Salagovic J., Kalina I., Habalova V., Hrivnak M.,Valansky L., Biros E. (1999).The role of human glutathione S-transferases M1 and T1 in individual susceptibility to bladder cancer.*Physiological Research* 48:465-71.
- Salama A., Sierra-Torres C., et al. (1999). A multiplex-PCR/RFLP procedure for simultaneous CYP2E1, mEH and GSTM1 genotyping. *Cancer letters* 143:51-56.
- Salinas A.E., Wong M.G. (1999). Glutathione S-transferasa. *Curr Med Chem.* 6:279-309.
- Sarasua S., Savitz D.A. (1994). Cured and broiled meta consumption in relation to childhood cancer. *Cancer Causes and Control* 5:141-148.
- Sasco A.J., Vainio H.(1999). From in utero and childhood exposure to parental smoking to childhood cancer: A possible link and the need for action. *Hum Exp Toxicol* 18:192.
- Saunders EF, et al1967: Variation of proliferative activity in leukemic cell population of patients with acute leukemia. *J Clin Invest* 46:1356,
- Scharappe M., Arico M., Harbott J., et al.(1998).Philadelphia chromosome-positive (Ph+) childhood acute lymphoblastic leukemia: good initial steroid response allows early prediction of a favorable treatment outcome. *Blood* 92:2730-41.
- Schatzkin A., Greenwald P., et al.(1989). The dietary fat breast cancer hypothesis is alive. *JAMA.* 261:3284-3287.
- Schmahl D., Thomas C., et al. (1977). *Iatrogenic Carcinogenesis.* Berlin, Springer-Verlag.
- Schottenfeld D., Fraumeni J.F.Jr (eds). (1982). *Cancer epidemiology and prevention.* W.B. Saunders Co, Philadelphia.
- Schulz T.F., Neil J.C.(2002). Viruses and leukemia. In Henderson E.S., Lister T.A. and Greaves M.F. *Leukemia.* , pp200-2205, Saunders, Philadelphia.
- Secker-Walker L.M., Chessells J.M., et al.(1989). Chromosome and other prognostic factors in acute lymphoblastic leukemia: along term follow-up. *Br Journal Haematol* 72:336.
- SEER Cancer Statistics review, 1973-1995. (1998). National Cancer Institute.

- Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W., et al.(1988).Hereditary differences in the expression of the human glutathione S- transferase activity on trans-stilbele oxide are due to a gene deletion. Proc Natl Acad Sci USA 85: 7293-7297.
- Seidegard J., Vorachek W.R., Pero R.W., Pearson W.R.(1988).Hereditary differences in the expression of the human glutathion transferase activity on trans-stibene oxide are due to gene deletion. Proc Natl Acad Sci USA. 85:7293.
- Setiawan V., Zhang Z-F., Yu G-P., et al.(2000). GSTT1 and GSTM1 null genotypes and risk of gastric cancer: A case-Control Study in a Chinese Population. Cancer Epidemiol, Biomarkers& Prevention.9:73-80.
- Severon R.K., Buckley J.D., Woods W.G., et al.(1993).Cigarette smoking and alcohol consumption by parents of children with acute myeloid leukemia : An analysis within morphological subgroups-a report from the Children´s Cancer group. Cancer Epidemiol Biomark Prev 2:433.
- Sherif A. A., El- Zein R.Anwar W.A, Au W.W., et al.(1996). A multiplex PCR procedure for polymorphic analysis of GSTM1 and GSTT1 genes in population studies. Cancer Letters 107:229-233.
- Shu X.O., Gao Y.T., Brinton L.A. (1988). A population based case-control study of childhood leukemia in Shanghai. Cancer 62:635.
- Shu X.O., Linet M.S., Steinbuch M. et al.(1999a). Breast-feeding and risk of childhood acute leukemia. J Natl Cancer Inst 91:1765.
- Shu X.O., Ross J.A., et al. (1996). Parental alcohol consumption cigarette smoking and risk of infant leukemia: A children´s Cancer group study. J Natl Cancer INS 88:24.
- Shu X.O., Stewart P., Wen W.Q., et al.(1999b). Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphoblastic leukemia in offspring. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 8:783.
- Shuster J.J., Wacker P., Pullen J., et al. (1998). Prognostic significance of sex in childhood B-Precursor acute lymphoblastic leukemia: A pediatric Oncology group study. J Clin Oncol 16:2854-2863.
- Shuz J., Kaatsch P., Kaletsch U., et al.(1999).Association of childhood cancer with factors related to pregnancy and birth. Int Epidemiol 28: 631.
- Sieber S., Adamson R.(1975). Toxicity of antineoplastic agents in man, chromosomal aberrations, antifertility effects, congenital malformations, and carcinogenic potential. Adv Cancer Res 22:57.
- Sinnett D., Krajinovic M., Labuda D., (2000). Genetic susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. Leuk Lymphoma 38:447-462.

- Smith M.A., Arthur D., Camitta B., et al.(1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Onc* 14:18.
- Smith M.A., Gloecker Ries L., Roos J.(1999). *Leukemia SEER Pediatric Monograph*. Nacional Cancer Institute.
- Smith M.A., Simon R., Strickler H.D., et al. (1998). Evidence that childhood acute lymphoblastic leukemia is associated with infectious agent linked to hygiene conditions. *Cancer Causes Control* 9: 285.
- Sorahan T., Prior P., Lancashire R.J., et al.(1997).Childhood cancer and parental use of tobacco: Deaths from 1971 to 1976. *Br J Cancer* 76:1525.
- Stanulla M., Scrappe M., Brechlin M., Zimmermann M., Welte K.(2000). Polymorphisms within glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) and risk of relapse in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: a case-control study. *Blood* 95:1222-1228.
- Stass S., Mirro J., et al(1984). Linage switch in acute leukemia. *Blood* 64:701.
- Stolley P.D., Hibberd P.L. (1982). Drugs. In Schottenfeld D, Fraument JR Jr (Eds): *Cancer Epidemiology and prevention*: pp 304, W.B Sanders Co, Philadelphia.
- Strange R.C., Fryer A.A.(1999). The glutathione S-transferases: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In *Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to cancer*. Vineis P., Malats N., Lang M.,d'Érrico A., Caporaso N., Cuzick J, Boffetta P., (Eds). IARCS Scientific Publications N°148:pp231, Lyon.
- Strick R., Strissel P.L., Borgers S., et al. (2000). Dietary bioflavonoids induce cleavage in the MLL gene and mey contribute to infant leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4790.
- Strucker I., de Waziers I., Cenee S., et al.(1999) GSTM1, smoking and lung cancer: a case-control study. *International Journal of Epidemiology* 28:829-835.
- Sullivan M.P., Pullen D.J., et al.(1990). Clinical and biological heterogeneity of childhood B cell acute lymphocytic leukemia: implications for clinical trials. *Leukemia* 4:6.
- Swansbury G.J., Slater R., Bain B.J., et al. (1998). Hematological malignancies with t(9;11)(p21-22;q23) : A laboratory and clinical study of 125 cases. *European 11q23 Workshop participants*. *Leukemia* 12:792.
- Swift M. (1971). Fanconi's anemia in the genetics of neoplasia. *Nature* 230:370.
- Taioli E., Crofts F., Trachman J., Demopoulos R., Toniolo P., Garte S.J.(1995).Racial differences in CYP1A1 Genotype and function. *Toxicol* 77:357.
- Tang D., Warburton D, Tannenbaum S:R;; Skipper P., et al.(1999). Molecular and Genetic damage from environmental tobacco smoke in young children. *Cancer Epidemiology, Biomarkers& Prevention* 8:427-431.



- Taylor G.M., Dearden S., Payner N., Ayres M., Gokhale D.A., Birch J.M., et al.(1998). HLA-DQA1-DQB1 haplotype influences susceptibility in childhood common acute lymphoblastic leukemia in males provides further support for an infection-related aetiology. *Br J Cancer* 78:561-565.
- Terracini B., Pastore G., et al. (1983). Association of father's occupation and cancer in children. *Biol. Res Preg Perinatol* 4:40.
- Tew K.D.(1994). Glutathione-associated enzymes in anticancer drug resistance. *Cancer Res* 54:4313.
- The Third International Workshop on Chromosomes in Leukemia. (1981). *Cancer Genet Cytogenet.* 4:95.
- Thompson J.R., FitzGerald P., Willoughby M., Armstrong B.(2001). Maternal folate supplementation in pregnancy and protection against common acute lymphoblastic leukemia in childhood : a case control study. *Lancet* :358:1935-1940.
- Treworthy R., Shuster J., Look T., et al. (1992). Ploidy of lymphoblasts is the strongest predictor of treatment outcome in B-progenitor cell acute lymphoblastic leukemia of childhood:a pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10:606.
- Tsuchida S, Sato K 1992: Glutathione transferases and cancer. *CRC Crit Rev Biochem Mol* 27:337,
- Tsutsumi M., Takada J.S.(1994). Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcohol liver disease. *Gastroenterology* 107 1430-1435.
- Uematsu F., Kikuchi H., Ohmachi T., et al.(1991). Two common RFLPs of the human CYP2E1 gene. *Nucl. Acids Res* 19:5797.
- UK Childhood Cancer Group Investigators. (2000<sup>a</sup>). Childhood cancer and residential proximity to power lines. *Br J Cancer.* 83:1573-1580.
- UK Childhood Cancer Group Investigators.(2000).The United Kingdom childhood cancer study: objectives,materials and methods.*Br J Cancer*,82:1073-1102.
- van der Plas D.C., Hahlen K., Hagemeijer A.(1992).Prognostic significance of karyotype at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 6:176.
- Vannier J.P., Bene M.C., et al.(1989). Investigation of the CD10 (cALLA) negative acute lymphoblastic leukemia: further description of a group with poor prognosis. *Br J Haematol* 72:156.
- Vineis P., Malats N., Lang M., et al., (1999). Metabolic Polymorphism and Susceptibility to Cancer. International Agency for research on Cancer, Lyon France.
- Walker L.G., Eremin O. (1995). Psychoneuroimmunology: a new fad of the Fifth Cancer Treatment Modality?. *American Journal of Surgery* 170:2-4.

- Walsh P.S., Metzger D.A., Higushi R.(1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based typing from forensic material. *Bio Techniques* 10,4:506.
- Warholm M., Rane a., et al. (1995). Genotyping and phenotyping determination of polymorphic glutathione transferase T1 in a Swedish population. *Pharmacogenetics* 5:252.
- Warwick A., Sarhanis P., Redman C.W., Pemble S., Talor J.B., Ketterer B., Jones P., Alldersea J., Gilford J., Yengi L., Fryer A., Strange R.C.(1994).Theta class Glutathione S- transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: Interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. *Carcinogenesis* 15:2840.
- Wasserman R., Galili N., ItoY., et al.(1992).Predominance of fetal type DJ<sub>H</sub> joining in young children with B precursor lymphoblastic leukemia as evidence for an in utero transforming event. *J Exp Med.* 176: 1577-1581.
- Watanabe J., Hayashi S., et al. (1990). PstI and RsaI RFLPs in complete linkage disequilibrium at the CYP2E gene. *Nucleic Acids Res* 18:7194.
- Webb, G., Vaska, V., et al. (1996). Chromosomal localization of the gene for the human theta class glutathione transferase (GSTT1). *Genomics* 33, 121.
- Wiemels J.L., Cazzaniga G., Daniotti M., et al.(1999). Prenatal Origin of acute lymphoblastic leukemia in children. *Lancet* 94, 354:1499-1503
- Wiemes J.L., Ford A.M., et al.(1999). Protracted and variable latency of acute leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero. *Blood* 94:1057-1062.
- Wiemels J.L., Pagnamenta A., Taylor G.M., Edeo O.B., Alexander F.E., Greaves M.F., et al.(1999). A lack of functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele in selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. *Cancer Res* 59:4095-4099.
- Wiemels J.L., Pagnamenta A., Taylor G.M., et al.(1999). A lack of a functional NAD (P) H: quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leucemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators. *Cancer Res* 59,4095.
- Wiemels J.L., Smith R.N., Taylor G.M., Eden O.B., Alexander F.B., Greaves M.F.(2001).Methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) polymorphisms and risk of molecular defined subtypes of childhood acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4004-4009.
- Wiersma S.R., Ortega J., et al.(1991). Clinical importance of the myeloid-antigen expression in acute lymphoblastic leukemia of the childhood. *N Eng J Med* 324:800.
- Winick N.J., Mc Kenna R.W., et al. (1993). Secondary acute myeloid leukemia in children with acute lymphoblastic leukemia treated with etoposide. *J Clin Oncol* 11: 209-217.
- Wolf R., Smith G.(1999).Cytochrome P450 CYP2D6. In *Metabolic polymorphisms and susceptibility to Cancer*. IARC Scientific Publication N°148, pp209-229.

- Wormhoudt L.W., Jan N.M., et al.(1999).Genetic polymorphisms of Human N-acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione –S- Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 29(1):59-124.
- Wrighton S.A. & Stevens J.C. (1992). The human hepatic cytochromes P450 involved in drug metabolisms. *Crit Rev. Toxicol.* 22:1.
- Young B.D.(1992).Cytogenetic and molecular analysis of chromosome 11q23 abnormalities in leukemia. *Baillieres Clin Haematol* 5:881.
- Young J.I., Ries L.G., et al.(1986).Cancer incidence, survival and mortality for children younger than age15years.*Cancer* 58:598.
- Young N.S., Alter B.P.(1994).Aplastic anemia, acquired and inherited. WB Saunders, Philadelphia.
- Zahm S.H, Ward M.H., Blair A.(1997).Pesticides and cancer. *Occup Med.* 12:269.
- Zhong S., Wyllie A.H., Barnes D., Wolf C.R., Spurr N.k.(1993). Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis* 14:1821.

## ANEXO 1

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### **“FRECUENCIA DE LOS POLIMORFISMOS DE LAS ENZIMAS GSTT1, GSTM1 y CYP2E1 EN UNA POBLACION COLOMBIANA DE NINOS CON LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA”**

El Hospital de La Misericordia y el Laboratorio de Genética Humana de La Universidad de Los Andes llevara acabo un estudio para establecer las frecuencias de los polimorfismos de la Glutation S-transferasa y del Citocromo p450 en muestras de niños diagnosticados con Leucemia Linfoide Aguda y poder establecer la relación de estos polimorfismos con el riesgo a la enfermedad.

Estas enzimas participan en el metabolismo de diferentes sustancias químicas, y así mismo sus polimorfismos, o las diferentes formas como pueden estar expresados estos genes, pueden mostrar diferencias interindividuales a la exposición de sustancias.

He sido informado amplia y suficientemente de los objetivos del estudio y acepto la publicación de los resultados generados en este trabajo.

La participación del menor será de una sola vez donde su nombre será remplazado por códigos para asegurar la confiabilidad y el carácter anónimo de la identidad del niño. Los resultados eran presentados en forma conjunta por el grupo de investigadores una vez concluya el trabajo. La participación en el estudio no genera ningún beneficio económico.

Yo \_\_\_\_\_ identificado con C.C. \_\_\_\_\_  
Como adulto responsable del niño(a) \_\_\_\_\_ autorizo libre y voluntariamente a que el menor sea incluido en el estudio de Polimorfismos genéticos de las Enzimas Glutation S- Transferasa y del Citocromo p450.

FIRMA: \_\_\_\_\_

CC. \_\_\_\_\_

FECHA: \_\_\_\_\_

CODIGO DE ID:

**ANEXO 2**

**ENCUESTA**

PACIENTE: \_\_\_\_\_ EDAD: \_\_\_\_\_ SEXO: M\_\_\_ F\_\_\_

DIAGNOSTICO: \_\_\_\_\_ INMUNOTIPIFICACION: \_\_\_\_\_

FASE TRATAMIENTO: \_\_\_\_\_

LUGAR DE NACIMIENTO Y PROCEDENCIA (ESPECIFICAR DE QUE REGION DEL PAIS PROCEDE):

CIUDAD \_\_\_\_\_ DTO \_\_\_\_\_ TIEMPO  
PERMANENCIA \_\_\_\_\_

DONDE VIVE ACTUALMENTE: ZONA RURAL      ZONA URBANA

CIUDAD \_\_\_\_\_ DTO \_\_\_\_\_ TIEMPO  
PERMANENCIA \_\_\_\_\_

OCUPACION MADRE: \_\_\_\_\_ CASA  AFUERA

OCUPACION PADRE: \_\_\_\_\_ CASA  AFUERA

PRESENCIA DEL MENOR EN HORAS LABORALES: SI \_\_\_\_\_ NO \_\_\_\_\_  
CUAL \_\_\_\_\_

CONTACTO CON QUIMICOS: SI\_\_\_NO\_\_\_ CUALES:  
DISTANCIA

CERCANIA FABRICAS: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ CUAL:  
DISTANCIA

TALLERE : SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ CUAL:  
DISTANCIA

SUBESTACIONES ELECTRICAS: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_  
LINEAS DE TRANSMISION ELECTRICA: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_  
DISTANCIA

FUMIGACION: CASA \_\_\_\_\_ CULTIVOS \_\_\_\_\_

HABITOS ALIMENTICIOS:  
LENA \_\_\_\_ GAS \_\_\_\_ LUZ \_\_\_\_

ALIMENTOS A LA BRASA FRECUENCIA 1 2 3 4 5 OTROS

PRODUCTOS AHUMADOS SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_  
FRECUENCIA

ALIMENTOS EMPACADOS: SI \_\_\_\_ NO \_\_\_\_ FRECUENCIA 1 2 3 4 5 6 7

ALIMENTOS NATURALES:  
INGESTION ALCOHOL EMBARAZO:  
INGESTIÓN ALCOHOL PADRE:  
DROGAS DURANTE EMBARAZO:

CONTACTO CON FUMADORES: (CUANTOS) 1 2 3 4 5 6  
# CIGARRILLOS \_\_\_\_\_

PROBLEMAS EMOCIONALES:  
ANTECEDENTES DE CANCER: SI \_\_\_\_ NO: \_\_\_\_ CUAL \_\_\_\_  
QUIEN \_\_\_\_\_

### ANEXO 3

#### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DEL ADN

1. Marcar los viales estériles con el número de muestra que se va analizar dentro de la cámara de bioseguridad
2. Adicione 1ml de agua destilada estéril
3. Adicione los 20µl de la muestra sangre completa, que debe ser anticoagulada con EDTA
4. Resuspenda ocasionalmente y deje incubar a temperatura ambiente por mínimo 30 minutos
5. Centrifugue a 12.000 rpm durante 3 minutos
6. elimine cuidadosamente el sobrenadante sin dañar el botón de células
7. Si el pellet tiene trazas de hemoglobina, adicione nuevamente 1 ml de agua destilada estéril, incube por media hora mas y repita los pasos 5 y 6
8. Adicione 200 µl de la resina de intercambio iónico *Chelex*<sup>R</sup> al tubo con el pellet. La resina se ha preparado en una concentración del 20% y debe estar en constante agitación previa a su uso. La resina es sensible a la luz así que debe protegerse contra esta, manteniendo la en un recipiente oscuro.
9. De un paso de vortex suave y lleve los viales al baño maría a 56°C durante 30 minutos
10. Posteriormente de un paso de vortex suave y centrifugue a 12.000 rpm durante 3 minutos
11. Luego lleve los viales a un baño serológico con temperatura de ebullición por 8 minutos
12. De un paso de vortex suave y centrifugue por 3 minutos a 12.000 rpm
13. En el sobrenadante se encuentra el ADN en suspensión para ser utilizado para la amplificación por PCR
14. Si no se va a trabajar en el momento se puede guardar bien tapado a 4°C.

## ANEXO 4

### PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE LAS ENZIMAS GSTT1 Y GSTM1:

Previo a iniciar la amplificación de cualquier fragmento se recomienda tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- Esterilizar por medio de autoclave debidamente el material con que se va a trabajar incluyendo: tubos para PCR de 0.2ml, tubos eppendorf de 2ml, puntas para micropipetas ( 10ul,100ul, 1000ul), gradillas, gasa y guantes
- La cámara de UV donde se guardan los materiales debe permanecer encendida por lo menos 30 minutos antes de empezar el trabajo.
- No se debe haber manipulado **previamente** productos de amplificación de ninguna clase (amplicones), pues se puede introducir CONTAMINACIÓN CON ESTOS AMPLICONES.
- Mantener hielo para la realización de la PCR.

### AMPLIFICACIÓN

1. Se reconstituyen los iniciadores según recomendación de la casa comercial, y se separan alícuotas para preparar la solución de trabajo. Esto se debe realizar en condiciones de esterilidad en la cámara de bioseguridad.
2. Tomar tubos estériles para amplificar y marcar, teniendo en cuenta que se use marcador indeleble
3. Servir 5µl del sobrenadante donde se encuentra en suspensión del ADN. (Si este estaba guardado en la nevera, realizar un paso de vortex y una centrifugación a 12.000rpm por 3 minutos).



4. Calcular previo al montaje de la PCR según el número de muestras el volumen de iniciadores y de Master Mix que se va usar en la reacción:

	<b>1TUBO( <math>\mu</math> l)</b>	<b># TUBOS</b>
MASTER MIX	12.5	
GSTT1-A	1.25	
GSTT1-B	1.25	
GSTM1-A	1.25	
GSTM1-B	1.25	
AGUA DESTILADA QM	2.5	
MUESTRA	5	
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>25</b>	

5. Preparar la mezcla de trabajo (según el orden anterior) en un vial estéril siempre sobre hielo, a la vez que se deben dejar descongelar los iniciadores sobre el hielo. Una vez preparado la mezcla de trabajo en mantener en hielo picado.
6. Proceder a servir 20  $\mu$  l de la mezcla de reacción en cada tubo de extracción y mezclar con el ADN con mucho cuidado sin formar burbujas, e ir poniéndolos en la bandeja con hielo.
7. Luego poner los tubos muy bien tapados en el termociclador, el cual debe ser programado con anterioridad, según la necesidad y asegúrese que la máquina se encuentra bien cerrada.
8. Inicie la amplificación.
9. Una vez terminado el proceso de amplificación, sacar los amplicones y proceder a chequear el amplificado( sino se va a chequear, guardarlos en la nevera, teniendo en cuenta que no sea en la misma nevera donde se tienen las suspensiones de ADN.)

## PROTOCOLO PARA CHEQUEO DE AMPLIFICADOS POR ELECTROFORESIS CON BROMURO DE ETIDIO

1. Pesar a agarosa( la agarosa puede ser de diferentes tipos). Para chequear las GSTT1 y GSTM1 se prepara Agarosa Seakem al 1.8% con TBE al 1%(Tris Borato EDTA) Calcular según volumen de muestras.
2. Poner en una fiola la agarosa mas el TBE al 1% y 10  $\mu$ l de Bromuro de Etidio( de una concentración de 10 microgramos por ml) y llevar al horno microondas, pero
3. Previamente se alista la cámara de electroforesis, cubriendo con cinta de enmascarar la bandeja donde se va a montar el gel con los peines correspondientes para el numero de muestras y agregar el buffer TBE al 1% en la cámara.
4. Se derrite la agarosa en el microondas hasta que este bien disuelta, chequeando constantemente que no se vaya a regar.
5. Una vez disuelta llenar la bandeja con mucho cuidado sin formar burbujas colocando la bandeja en un lugar nivelado para que al solidificarse el gel quede parejo.
6. Una vez se solidifica la agarosa se procede a retirar los peines con cuidado de no romper los pozos. Luego se pone el gel con la bandeja dentro de la cámara que ya tiene el TBE al 1% y que debe cubrir el gel.
7. Se procede a realizar un diagrama de los pozos con las muestras, poniendo en el principio y al final un marcador de peso molecular (25bpADN sep Ladder, Promega) para establecer el tamaño de los fragmentos obtenidos.
8. Se procede a mezclar 2  $\mu$ l de agua destilada, mas 2  $\mu$ l del buffer carga (Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega), mas 4  $\mu$ l del amplicón en una placa recubierta de papel parafilm.
9. Una vez mezclado lo anterior se procede a montar las muestras en el gel sumergido en el buffer.
10. Este procedimiento hay que hacerlo rápido para que no se difunda la muestra, y con cuidado para no dañar el gel.
11. Se tapa la cámara y se pone a correr durante 35 minutos a 90 wt
12. Una vez terminado el tiempo de corrido se procede a chequear el gel para la identificación de las bandas en el transiluminador de luz UV, previa protección de los ojos y cara.

13. Se toman las fotografías correspondientes y se identifican para la interpretación de resultados.
14. Hay que tener precauciones con el manejo de estos geles por contener el bromuro de Etidio que es altamente tóxico, por tal motivo deben ser descartados en las condiciones correctas, al igual que el material utilizado en este procedimiento.

## ANEXO 5

### PROTOCOLO PARA LA AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA PARA LA IDENTIFICACIÓN DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DE LA ENZIMA CYP2E1:

Seguir las recomendaciones generales para cualquier amplificación ya mencionadas,

#### AMPLIFICACIÓN:

1. Se reconstituyen los primers según recomendación de la casa comercial, y se separan alícuotas para preparar solución de trabajo. Esto se debe realizar en condiciones de esterilidad en la cámara de bioseguridad, MANTENIÉNDOLAS EN HIELO.
2. Tomar tubos estériles para amplificar y marcar, teniendo en cuenta que se use marcador indeleble
3. Servir 5  $\mu$ l del sobrenadante donde se encuentra en suspensión el ADN. ( Si este estaba guardado en la nevera, realizar el paso 12 del protocolo de extracción del ADN)
4. Calcular previo al montaje de la PCR según el número de muestras el volumen de iniciadores y de Master Mix que se va usar en la reacción:

	1 TUBO ( $\mu$ l)	# TUBOS
MASTER MIX	12.5	
CYP2E1	1.25	
CYP2E1	1.25	
AGUA DESTILADA	5	
MUESTRA	5	
<b>VOLUMEN TOTAL</b>	<b>25</b>	

10. Una vez preparada la solución de trabajo en un vial estéril (según el orden anterior) se debe mantener en hielo picado.

11. Proceder a servir 20  $\mu$  l de la mezcla en cada tubo de extracción y mezclar con el ADN con mucho cuidado sin formar burbujas, e ir poniéndolos en la bandeja con hielo.
12. Luego poner los tubos muy bien tapados en el termociclador, el cual debe ser programado con anterioridad, según la necesidad.
13. Una vez terminado el proceso de amplificación, sacar los amplicones y proceder a chequear el amplificado (sino se va a chequear, guardarlos en la nevera, teniendo en cuenta que no sea en la misma nevera donde se tienen las suspensiones de ADN.)

Una vez chequeada la amplificación del amplicon se procede con la digestión enzimática.

## ANEXO 6

### DIGESTIÓN DEL FRAGMENTO DE LA CYP2E1 CON LA ENZIMA Rsa I (Gibco):

1. Se calcula inicialmente el número de muestras que se van a digerir para preparar la suspensión de enzima según las recomendaciones de la casa comercial.
2. Se requiere 0.15ul de enzima y 2ul de buffer de enzima al 1% por muestra. De esa manera se calcula para cuantas muestras preparar la mezcla de buffer y enzima.
3. Se prepara en buffer de la enzima al 1% (viene al 10%) con agua destilada estéril grado molecular.
4. Se procede a realizar la mezcla manteniéndola y hielo picado.
5. Se agrega a cada tubo del amplificado que se quiere digerir, y tiene un volumen aproximado de 10-15ul del amplicon sobre hielo picado.
6. Se ponen al baño María los tubos a 37°C durante una hora
7. Se para la reacción adicionando 2ul del buffer carga( Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega)
8. Se procede a chequear los productos de digestión en el gel de agarosa 1.8% (mezcla de agarosa 3v/v de SeaKem y Metaphorm respectivamente) con bromuro de etidio, para la identificación de los fragmentos con un marcador de peso molecular ( 25bp ADN sep Ladder, Promega)
9. Se identifican bandas de 412pb, que son los individuos que tienen ausencia completa (homocigotos) del punto de corte de la enzima y se denominan (A/A). O bandas de 350pb, que corresponden a los individuos que son homocigotos para el punto de corte de la enzima(C/C). Finalmente pueden verse individuos que muestran 2 fragmentos de 410/360pb respectivamente y son los heterocigotos para el punto de corte de la enzima y se denominan (C/A).

## PROTOCOLO PARA CHEQUEO DE AMPLIFICADOS POR ELECTROFORESIS CON BROMURO DE ETIDIO

15. Pesar a agarosa( la agarosa puede ser de diferentes tipos. y para el chequeo de la CYP2E1 se utiliza una mezcla de agarosa 2% (tres partes de agarosa Seakem y una parte de agarosa Metaphorm.) con TBE al 1%(Tris Borato EDTA). Calcular según volumen de muestras.
16. Poner en una fiola la agarosa mas el TBE al 1% y 10  $\mu$ l de Bromuro de etidio( de una concentración de 10 microgramos por mL) y llevar al horno microondas, pero
17. Previamente se alista la cámara de electroforesis, cubriendo con cinta de enmascarar la bandeja donde se va a montar el gel con los peines correspondientes para el número de muestras y agregar el buffer TBE al 1% en la cámara.
18. Se derrite la agarosa en el microonda hasta que este bien disuelta, chequeando constantemente que no se vaya a regar.
19. Una vez disuelta llenar la bandeja con mucho cuidado sin formar burbujas colocando la bandeja en un lugar nivelado para que al solidificarse el gen quede parejo.
20. Una vez se solidifica la agarosa se procede a retirar los peines con cuidado de no romper los pozos. Luego se pone el gel con la bandeja dentro de la cámara que ya tiene el TBE al 1% y que debe cubrir el gel.
21. Se procede a realizar un diagrama de los pozos con las muestras, poniendo en el principio y al final un marcador de peso molecular (25bpADN sep Ladder, Promega) para establecer el tamaño de los fragmentos obtenidos.
22. Se procede a mezclar 2  $\mu$ l de agua destilada, mas 2  $\mu$ l del buffer carga( Blue/Orange 6X Loading Dye, Promega), mas 4  $\mu$ l del amplicón en una placa recubierta de papel parafil.
23. Una vez mezclado lo anterior se procede a montar las muestras en el gel sumergido en el buffer.
24. Este procedimiento hay que hacerlo rápido para que no se difunda la muestra, y con cuidado para no dañar el gel.
25. Se tapa la cámara y se pone a correr durante 35 minutos a 90 wt
26. Una vez terminado el tiempo de corrido se procede a chequear el gel para la identificación de las bandas en el transiluminador de luz UV, previa protección de los ojos y cara.
27. Se toman las fotografías correspondientes y se identifican para la interpretación de resultados.

28. Hay que tener precauciones con el manejo de estos geles por contener el bromuro de etidio que es altamente toxico, por tal motivo deben ser descartados en las condiciones correctas, al igual que el material utilizado en este procedimiento.