

VNIVERSIDAD DE SALAMANCA

FACULTAD DE MEDICINA

*DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y
PEDIATRÍA*



TESIS DOCTORAL

“LEUCEMIA AGUDA INFANTIL:
CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA E
INVESTIGACIÓN EN MODELO TRANSGÉNICO
MURINO Sca I-TEL-AML1”

Marta García Suquía

Salamanca, 2014

Directores

Prof. Dr. Félix Lorente Toledano

Prof. Dra. M^o Victoria Rascón Trincado

Dr. Isidro Sánchez García

Los Doctores **D. FÉLIX LORENTE TOLEDANO**, Catedrático del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría de la Facultad de Medicina y Jefe de Servicio de Pediatría en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca, **Dña. MARÍA VICTORIA RASCÓN TRINCADO**, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría de la Facultad de Medicina, y **D. ISIDRO SÁNCHEZ GARCÍA**, Investigador Científico del CSIC en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC) de Salamanca

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado “LEUCEMIA AGUDA INFANTIL: CARACTERIZACIÓN CLÍNICO-BIOLÓGICA E INVESTIGACIÓN EN MODELO TRANSGÉNICO MURINO Sca1-TEL-AML1” ha sido realizado bajo su dirección por Dña. Marta García Suquía en el Departamento de Obstetricia, Ginecología y Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca, y reúne a nuestro juicio originalidad y contenidos suficientes para optar al Grado de Doctor, autorizando su presentación.

Y para que conste a los efectos oportunos, expedimos el presente certificado en Salamanca a 04 de julio de 2014.

Fdo.: Felix Lorente Toledano

Fdo: Mª Victoria Rascón Trincado

Fdo: Isidro Sánchez García

*Es la parte que más ilusión hace escribir...pero también la más difícil...por
dónde empezar a decir gracias cuando hay tantas que dar...*

*En primer lugar tengo mucho que agradecerte, Carolina...porque sin
conocerme has elegido ayudarme,.desde el primer momento todo han sido facilidades,
has colaborado con tu trabajo en una buena parte de todo esto, has resuleto mis
dudas..siempre con una sonrisa. Una suerte cruzarme con alguien como tú, que elige
ayudar sin obtener nada a cambio. Muchas Gracias.*

*Félix, gracias por tus consejos, por haberme guiado todo este tiempo, por todos
los borradores y mails que te ha tocado leer...Pero sobretodo muchas gracias por tener
siempre un hueco para mí en cuanto me asomaba a la puerta de tu despacho.*

*Marivi, porque siempre me has “picado”para llegar hasta aquí.. no me dejaste
tirar la toalla con la tesina y has seguido insistiendo en que continuara en este mundo
de la facultad...siempre pendiente de mí y dispuesta a echar una mano.Mil gracias.*

*Isidro..por darme la oportunidad de aprender con vosotros..por abrirme las
puertas del “labo”13 desde el primer día que nos conocimos y permitirme seguir en
este campo de la hemtao oncologia que tanto me gusta .*

*Gracias a Purificación...por ponerle rigor a las cifras para poder trasmitir
mejor todo este trabajo.*

*A Rosa y María José..por cada una de las mil veces que he ido a pedir
historias...por buscar nombres..diagnósticos...datos..muchos datos. Muchas gracias,
porque lo habéis hecho siempre con la sonrisa puesta.*

*A Papá...Mamá...porque sin vosotros cerca nada sería igual..por apoyarme en
todo.. incondicionalmente. Siempre habéis creído en mi...quizá demasiado ;))*

Decir Gracias se queda muy corto.

*A Ángela..la mejor compañera de viaje...porque las aventuras compartidas
hacen que uno vuelva al trabajo con más ganas (si sobrevive..claro.. ;)) tenemos que
repetir.*

*A Anibal...muchísimas gracias por todo el tiempo dedicado a darle forma a este
trabajo. Por tantas noches y fines tras la pantalla del ordenador. Sin tu ayuda no lo
hubiera conseguido. Pero sobretodo GRACIAS porque” si estoy feliz, estás feliz..y si
estoy triste...me haces feliz”*

A Manoli... por facilitarme todos los datos...ponerme las cosas tan fáciles... aconsejarme ... Lo que haces cada día desde hace tantos años es lo que me ha llevado hasta aquí...porque fuisteis mis “primeros adjuntos” ..porque ese verano de hace ya 6 años descubrí un mundo que me encantaba ..porque hay nombres que al escucharlos te hacen sonreír sin querer: África..Nora..Elena..Luis..Alberto..Miguel..hacen que todo merezca la pena.

Quizá sea a ellos a quien debería agradecer aquí, por todas las sonrisas que tanto en Salamanca, Madrid y Barcelona me he encontrado en estos años..familias con las que he compartido tanto..

A los que veo crecer y disfrutar cada día, y a los que no volveré a ver pero seré incapaz de olvidar, a vosotros sí que os digo, gracias por enseñarme tanto.

Marta.

ÍNDICE

Índice de gráficas	10
Índice de imágenes	11
Índice de tablas	12
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. LEUCEMIA AGUDA	16
1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA AGUDA	17
1.1.2. CLÍNICA	21
1.1.3. DIAGNÓSTICO	22
1.1.4. GRUPOS DE RIESGO Y PRONÓSTICO	23
1.1.5. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO	24
1.2. TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS.....	28
1.2.1. TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS FRECUENTES EN LA LEUCEMIA AGUDA.....	28
1.3. PAPEL DE ETV6-RUNX1 EN LA LEUCEMIA AGUDA.....	32
1.4. FACTORES DE RIESGO Y LEUCEMIA.....	33
1.4.1. FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS	33
1.4.2. FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES	36
1.4.3. FACTORES DE RIESGO INCIERTOS.....	37
1.5. CARCINOGENICIDAD	44
1.6. MODELOS ANIMALES Y CÁNCER	47
1.6.1. INTRODUCCIÓN	47
1.6.2. HISTORIA DEL RATÓN DE LABORATORIO.	48
1.6.3. RATONES MODIFICADOS GENETICAMENTE.....	49
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	54

3.	MATERIAL Y MÉTODOS	57
3.1.	FASE I. ANÁLISIS CLÍNICO-BIOLÓGICO DE NIÑOS CON LEUCEMIA.....	57
4.	RESULTADOS	70
4.1.	FASE I. ANÁLISIS CLÍNICO-BIOLÓGICO DE NIÑOS CON LEUCEMIA.....	70
4.1.1.	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y DEMOGRÁFICAS.....	70
4.1.2.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y MOLECULARES DE LA MUESTRA	77
4.1.3.	PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO, PRONÓSTICO Y COMPLICACIONES	86
5.	DISCUSIÓN.....	100
5.1	FASE I. ANÁLISIS CLÍNICO-BIOLÓGICO DE NIÑOS CON LEUCEMIA.....	100
5.1.1	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y DEMOGRÁFICAS	100
5.1.2.	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y MOLECULARES DE LA MUESTRA	107
5.1.3.	PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO, PRONÓSTICO Y COMPLICACIONES.....	117
6.	CONCLUSIONES.....	129
7.	BIBLIOGRAFÍA	131

Índice de gráficas

Gráfica 1 - Supervivencia a 5 años del diagnóstico de todos los tumores infantiles en España en el periodo de 1980-2004. (RNTI-SEHOP: http://www.uv.es/rnti/cifrasCancer.html)	15
Gráfica 2 - Supervivencia libre de evento en la serie global de pacientes	25
Gráfica 3 - Resultados de 21 estudios que han evaluado la asociación entre exposición a CEM de frecuencia muy baja y el riesgo de leucemia en niños.....	38
Gráfica 4 - Incidencia de leucemia en el Complejo Asistencial Universitario Salamanca entre 1996-2013	71
Gráfica 5 - Sexo de los pacientes diagnosticados de leucemia	72
Gráfica 6 - Provincias de origen de los pacientes	73
Gráfica 7 - - Porcentaje de pacientes de nuestra muestra que presentaban adenopatías en la exploración física	79
Gráfica 8 - Localización de las adenopatías en niños con leucemia.	80
Gráfica 9 - Porcentaje de pacientes que presentaban hepatoesplenomegalia en la exploración física	80
Gráfica 10 - Porcentaje de los distintos tipos de leucemias agudas encontradas.	81
Gráfica 11 - Clasificación morfológica de las leucemias linfoblásticas agudas.	82
Gráfica 12 - Clasificación morfológica de las leucemias mieloblásticas agudas	82
Gráfica 13 - Evolución de los pacientes con mala respuesta a la prednisona.....	88
Gráfica 14 - Porcentaje de pacientes trasplantados del total de pacientes con leucemia	89
Gráfica 16 - Pronóstico de los pacientes en recaída.	90
Gráfica 15 - Porcentaje de pacientes trasplantados de niños con leucemia en la provincia de Salamanca	90
Gráfica 17 - Situación actual de los pacientes con leucemia de nuestra muestra	91
Gráfica 18 – Supervivencia global al año, 5 años y 10 años en niños con leucemia	92
Gráfica 19 - Supervivencia global al año, 5 años y 10 años de los tres tipos más frecuentes de leucemia infantil.	93
Gráfica 46 - Frecuencia de hiperleucocitosis en los tipos de leucemia infantil más frecuentes.....	109
Gráfica 47 - Porcentaje de adenopatías en pacientes con leucemia	110
Gráfica 48 - Porcentaje de hepatoesplenomegalia en pacientes con leucemia	110
Gráfica 49 - Clasificación morfológica según la FAB de las leucemias infantiles de nuestra muestra vs cifras a nivel mundial ^{122, 124}	112
Gráfica 50 - Comparación de la frecuencia de las distintas translocaciones cromosómicas en los pacientes con LLA de nuestra muestra y las descritas en la literatura 84, 122, 124.	113
Gráfica 51 - Grafico de comparación de la SG a los 5 y 10 años en la LLA entre los pacientes de nuestra muestra y las grandes series publicadas	121
Gráfica 52 - Comparación de la SG a los 5 y 10 años en la LMA entre los pacientes de nuestra muestra y las grandes series publicadas ¹²²	122

Índice de imágenes

Imagen 1 - Frotis de médula ósea de leucemia linfoblástica aguda.....	18
Imagen 2 - Frotis de médula ósea de leucemia mieloblástica aguda.....	18
Imagen 3 - Clasificación inmunobiológica de las leucemias linfoblásticas .	20
Imagen 5 - Cromosoma Filadelfia.....	30
Imagen 9 - Calendario Vacunal vigente en Castilla y León en el año 2014.....	59
Imagen 10 - Esquemas terapéuticos de protocolo SHOP 2005 para LLA, Riesgo Estándar ¡Error! Marcador no definido.	
Imagen 11 - Esquemas terapéuticos de protocolo SHOP 2005 para LLA, Riesgo Estándar ¡Error! Marcador no definido.	
Imagen 12 - Protocolo SHOP 2005 para LLA de Alto Riesgo y Muy Alto Riesgo.	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 13 - Tratamiento SEHOP 2005 para LLA de Alto Riesgo.	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 14 - Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA bajo riesgo 2001	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 15 - Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA bajo riesgo 2001 (Se han omitido las fases de Mantenimiento y Reinducciones)	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 16 - Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA riesgo intermedio 1996. .	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 17 Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA alto riesgo 2005 ¡Error! Marcador no definido.	
Imagen 18 - Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA riesgo intermedio 1996. (Se han omitido las fases de Mantenimiento y Reinducciones)	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 19 - Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA alto riesgo 2005	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 20 - Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA alto riesgo 2005	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 21 -- Esquemas de tratamiento protocolo LLA Lactantes. SHOP -2002.....	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 22 Esquemas de tratamiento protocolo PETHEMA alto riesgo 2005(Se han omitido las fases de Mantenimiento y Reinducciones)	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 23 - Esquemas de tratamiento protocolo LLA Lactantes. SHOP -2002	¡Error! Marcador no definido.
Imagen 24 - Esquemas de tratamiento protocolo LLA Lactantes. SHOP -2002 (Se omita la fase de Mantenimiento).....	¡Error! Marcador no definido.

Índice de tablas

<i>Tabla I – Clasificación FAB de la Leucemia Linfoblástica Aguda</i>	19
<i>Tabla II - Clasificación FAB de la Leucemia Mieloblástica Aguda</i>	19
<i>Tabla III – Alteraciones genéticas y moleculares con valor pronóstico en la Leucemia Linfoblástica Aguda</i> <i>127</i>	21
<i>Tabla IV - Síndromes congénitos asociados con un mayor riesgo de LA</i> ³⁵	34
<i>Tabla V - Resultados del análisis de estudios</i> ^{1, 50} <i>de leucemia en niños expuestos a CEM de muy baja</i> <i>frecuencia, en función de los niveles de exposición (en microTeslas)</i>	40
<i>Tabla VI - Clasificación de la International Agency for Research on Cancer (IARC)</i>	45
<i>Tabla VII - Clasificación WHO (World Health Organization) de las neoplasias de precursores linfoides</i>	60
<i>Tabla VIII – Clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas</i>	61
<i>Tabla IX – Diagnóstico de recaída de Leucemia Linfoblástica Aguda</i>	66
<i>Tabla X - Motivos de consulta más frecuentes de los pacientes con diagnóstico de leucemia</i>	77
<i>Tabla XI - Alteraciones en el hemograma de los pacientes con leucemia</i>	78
<i>Tabla XII - Translocaciones encontradas entre los pacientes con leucemia linfoblástica aguda</i>	84
<i>Tabla XIII - Características clínico-biológicas de los pacientes que presentaron afectación del SNC.</i>	85
<i>Tabla XIV Tabla de clasificación en tres grupos de riesgo de los pacientes con leucemia</i>	87
<i>Tabla XVI - Porcentaje de niños alimentados con lactancia materna vs artificial en España (datos del</i> <i>Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría)</i>	104
<i>Tabla XVII - Diferencias en la edad de las madres de niños con leucemia vs edad materna en nuestro país</i>	105
<i>Tabla XVIII - Tabla comparativa del número de abortos entre las madres de nuestros pacientes y las</i> <i>cifras oficiales en nuestro país</i>	105
<i>Tabla XIX - Motivos de consulta más frecuentes en el comienzo de una leucemia.</i>	107
<i>Tabla XX – Valores de hemoglobina en el hemograma al diagnóstico de pacientes con leucemia</i>	108
<i>Tabla XXI – Cifra de plaquetas en el hemograma al diagnóstico de pacientes con leucemia</i>	108
<i>Tabla XXII - Porcentaje de los distintos tipos de leucemia encontrados en nuestra muestra vs cifras</i> <i>publicadas en la literatura</i>	111
<i>Tabla XXIII - Características de las anomalías cromosómicas encontradas en nuestros pacientes con LMA.</i>	114
<i>Tabla XXIV - Distribución por grupos de riesgo y SLE esperada en LLA/SEHOP</i>	118
<i>Tabla XXV - Distribución por grupos de riesgo y SLE en nuestros pacientes con leucemia</i>	118
<i>Tabla XXVI - Escala para valorar la intensidad de la mucositis</i>	123

INTRODUCCIÓN



1. INTRODUCCIÓN

El cáncer infantil es la segunda causa de muerte, tras los accidentes, en niños mayores de un año en países desarrollados. Su incidencia ha ido aumentando en los últimos 20- 30 años. Más allá de las cifras de mortalidad, que afortunadamente han disminuido con los nuevos avances en los tratamientos, el cáncer en niños tiene una importante morbilidad en los cada vez más numerosos supervivientes, dado que muchos de ellos presentan secuelas permanentes.

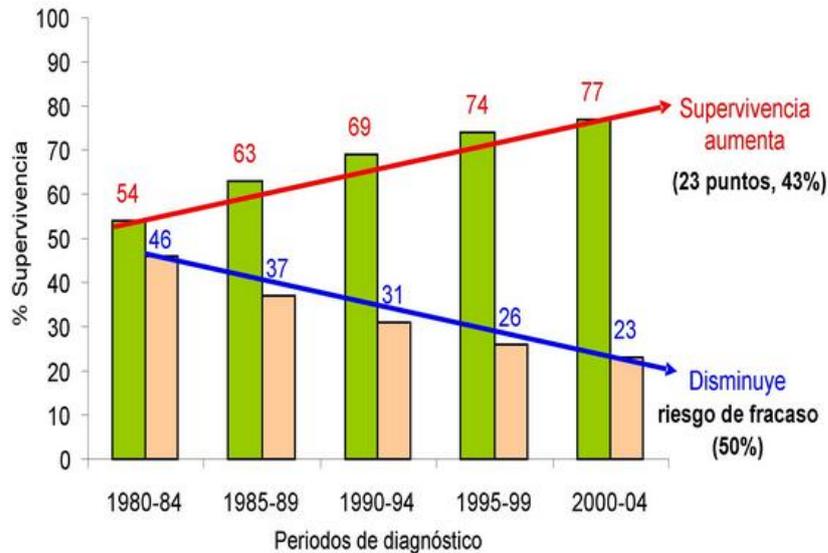
Para documentar todos estos datos y poder sacar conclusiones encaminadas a mejoras en los tratamientos, se crea en nuestro país en 1980 el Registro Nacional de Tumores Infantiles de España (RNTI), ubicado en el Centro de Documentación Biomédica de la Universidad de Valencia, que constituyó el registro de cáncer de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (SEOP). En 2007 se produjo la transformación de la Sociedad Española de Oncología Pediátrica (SEOP) en Sociedad Española de Hematología y Oncología Pediátrica (SEHOP), mejorando el registro de las neoplasias hematológicas.

Siendo un registro central basado en servicios hospitalarios que informan de sus casos, el RNTI-SEHOP cubre el país en un 85% de los tumores infantiles en España, con cobertura principalmente en Aragón, Cataluña, País Vasco, Madrid y Navarra.

Los objetivos principales de este registro son realizar estudios de supervivencia como estimación de la efectividad de la asistencia a los pacientes oncológicos pediátricos, analizar la incidencia del cáncer infantil, sus diferencias entre áreas geográficas y su evolución en el tiempo. Se pretende por tanto conocer las características, distribución y posible crecimiento del cáncer infantil en nuestro país, y sus semejanzas o diferencias con Europa.

El RNTI-SEHOP reconoce que en este momento se desconocen las causas del cáncer en la infancia e insisten en la importancia de estudios cooperativos internacionales dada su baja frecuencia en población pediátrica.

Desde el punto de vista epidemiológico España se sitúa en el contexto europeo occidental, con unas cifras de incidencia similares, con unos 900 casos nuevos de neoplasias por año en niños de 0 a 14 años. Los resultados asistenciales globales de la oncología infantil española se sitúan en el nivel de los de Europa y Estados Unidos.



Gráfica 1 - Supervivencia a 5 años del diagnóstico de todos los tumores infantiles en España en el periodo de 1980-2004. (RNTI-SEHOP: <http://www.uv.es/rnti/cifrasCancer.html>)

La **Gráfica 1** muestra la evolución ascendente de la supervivencia de los niños oncológicos en España desde 1980 hasta 2004, frente a la disminución del riesgo de muerte, demostrando la mejora de los resultados asistenciales globales de la oncología pediátrica española.

1.1. LEUCEMIA AGUDA

La leucemia es la neoplasia más frecuente en niños, representando el 25-30% de todos los casos de cáncer pediátrico, seguida de los tumores que afectan al sistema nervioso central (SNC) con un 20 % del total, los linfomas que afectan a un 15 % de los pacientes y en 4º lugar los neuroblastomas (9%).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) de estirpe B es la más frecuente en edad pediátrica, alcanzando hasta el 70 % de los casos. Existe una mayor incidencia de presentación entre los 2 y los 5 años, y un discreto predominio en el sexo masculino. Encontramos notables diferencias geográficas en esta enfermedad, mientras que en los países menos desarrollados, como Norte de África y Oriente Medio, predominan los linfomas y las LLA de estirpe T, en los países industrializados la LLA de estirpe B es la más frecuente^{77, 84}. Este hecho se ha intentado relacionar con el aumento de exposición a determinados agentes medioambientales “leucemógenos” en los países industrializados; sin embargo, en países con población multirracial se ha observado una mayor incidencia de LLA en la raza blanca⁸⁴.

Las leucemias agudas son proliferaciones clonales malignas de células hematopoyéticas en distintos grados de diferenciación, cuya acumulación progresiva impide la producción de los elementos celulares normales necesarios en la sangre. Las células leucémicas pierden el control del crecimiento y maduración dando lugar a la acumulación de células inmaduras con pérdida de capacidad de diferenciación y conservación de la capacidad de replicación.

La secuencia de acontecimientos que derivan en la transformación maligna de una célula es multifactorial. En el caso de la LLA, estos eventos se producen durante el desarrollo de la estirpe linfoide. Los precursores linfoides presentan una alta tasa de proliferación y de reordenamiento genético, características que favorecen la aparición de mutaciones espontáneas y de otras alteraciones citogenéticas que facilitan la transformación maligna.

El proceso de leucemogénesis, transformación de una célula precursora hematopoyética en célula leucémica, aún no se conoce con exactitud. Sin embargo, se sabe de la existencia de factores genéticos predisponentes, como sugieren la concordancia que existe entre gemelos univitelinos, los síndromes de fragilidad

cromosómica con una mayor predisposición tumoral o patologías como el Síndrome de Down donde existe un riesgo de leucemia muy superior al del resto de la población.

En más del 75% de las LLA de pacientes pediátricos se pueden detectar anomalías genéticas primarias. Los modelos experimentales nos han permitido conocer que, para que se desarrolle una leucemia, son necesarias varias alteraciones genéticas. Los estudios de Mullinghan han identificado una media de 6 alteraciones en las copias de ADN en los casos de LLA infantil^{100 107}.

En cuanto a la influencia de los factores ambientales, a pesar de los trabajos publicados recientemente, existe una gran controversia al respecto y faltan estudios concluyentes sobre la acción de los mismos y la aparición de leucemia aguda.

Se ha dado mucha importancia al papel de los virus en el estudio etiológico de las leucemias; esto es debido a que la mayoría de las LLA se producen en un periodo de la vida en el cual el sistema inmune está en desarrollo y podría ser más susceptible a los efectos oncogénicos de determinados agentes virales. Hasta el momento, el virus de Epstein-Barr en la LLA-L3 y los HTLV (virus linfotrópicos T humanos) I y II en algunos casos de leucemias del adulto, han sido los únicos con una clara asociación⁹⁴.

Se ha demostrado el papel carcinogénico de las radiaciones ionizantes^{41 97}. El aumento de incidencia de leucemia entre los supervivientes de Hiroshima y Nagasaki se relacionó con la proximidad a la explosión^{27, 98, 102} y los agentes alquilantes, la quimioterapia utilizada para el tratamiento de distintos tumores, puede tener efecto leucemógeno. Sin embargo, el riesgo de los campos electromagnéticos^{1, 50, 56,80,88, 101 115}, la profesión de los padres^{91, 139}, edad materna en el embarazo²⁶ o el peso del niño al nacimiento^{78, 116, 117} son factores de los que aún queda mucho por decir.

1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LA LEUCEMIA AGUDA

Existen varios tipos de clasificaciones atendiendo a distintos parámetros:

a) Morfológica

Realizada por el grupo de trabajo Francés-Americano-Británico (FAB) en 1976, se emplea cada vez menos en la actualidad. Sus principales inconvenientes son que no

incluye las leucemias bifenotípicas ni multilínea, y que excluye información esencial para el tratamiento y pronóstico. (**Imágenes 1 y 2. Tablas I y II**)

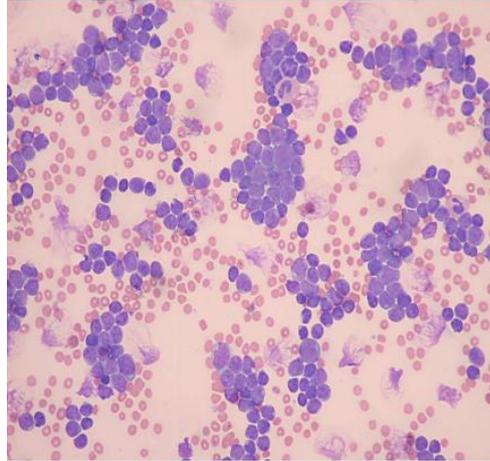


Imagen 1 - Frotis de médula ósea de leucemia linfoblástica aguda.

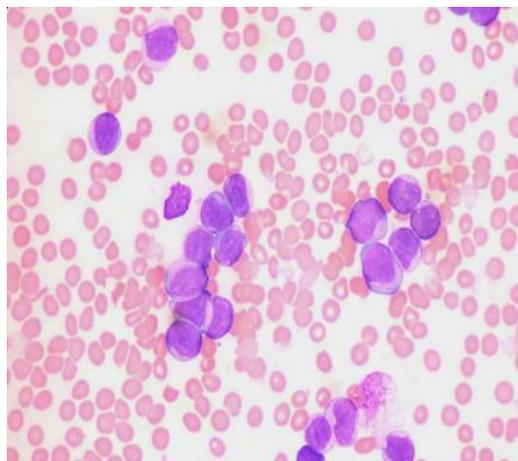


Imagen 2 - Frotis de médula ósea de leucemia mieloblástica aguda.

Tabla I – Clasificación FAB de la Leucemia Linfoblástica Aguda

Características	L1	L2	L3
Tamaño celular	pequeño	grande	grande
Cromatina nuclear	fina o en grumos	fina	fina
Forma núcleo	regular (puede tener hendiduras)	irregular	regular, oval, redondo
Nucléolo	indistinguible	uno o más, grande, prominente	uno o más, grande, prominente
Citoplasma	escaso	moderadamente abundante	abundante
Basofilia	leve	leve	prominente
Vacuolas	ausentes	ausentes	presentes

Tabla II - Clasificación FAB de la Leucemia Mieloblástica Aguda

M ₀	Leucemia indiferenciada
M ₁	Leucemia mieloide con poca diferenciación
M ₂	Leucemia mieloide con diferenciación
M ₃	Leucemia promielocítica
M ₄	Leucemia mielomonocítica
M ₅	Leucemia monocítica
M ₆	Eritroleucemia
M ₇	Leucemia megacarioblástica

b) Inmunobiológica

Esta clasificación es la más utilizada en la actualidad y tiene implicaciones pronósticas y terapéuticas (**Imagen 3**)⁸⁴.

La aparición de anticuerpos monoclonales y las mejoras en las técnicas de citometría de flujo y de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han permitido clasificar las LLA en distintos tipos según el estadio madurativo de sus linfoblastos .

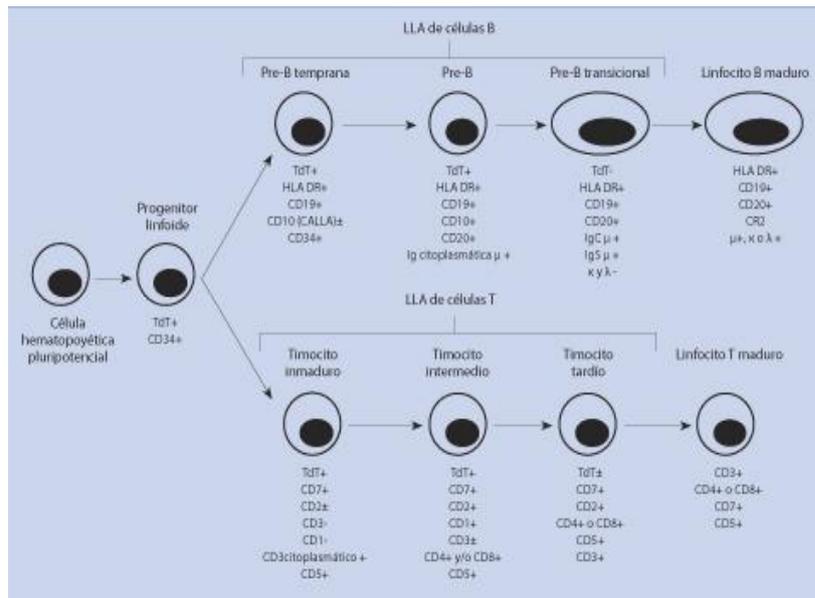


Imagen 3 - Clasificación inmunobiológica de las leucemias linfoblásticas .

c) Citogenética

Los avances en biología molecular de los últimos años han permitido identificar prácticamente la totalidad de las anomalías citogenéticas de los blastos. Éstas pueden afectar al número total de cromosomas o a su estructura. Se ha comprobado que la hiperdiploidía (aumento del número de cromosomas > 51) en los linfoblastos es un factor de buen pronóstico. De todas las anomalías cromosómicas estructurales, las translocaciones son las más frecuentes (**Tabla III**).

Tabla III – Alteraciones genéticas y moleculares con valor pronóstico en la Leucemia Linfoblástica Aguda ¹²⁷.

Pronóstico	Alteración cromosómica	Frecuencia (%)
BUENO	t(12,21)/ETV6-RUNX1	25%
	Alta hiperdiploidia (>51 cromosomas)	30%
INTERMEDIO	T(1,19)/E2A-PBX1	3-5%
	Cariotipo normal	
	MLL reordenado(excluyendo la t(4,11))	9%
MALO	Hipodiploidía (<45 cromosomas)	4-6%
	t(4,11)/MLL-AFF1	2-3%
	t(9,22)/BCR-ABL	3%

1.1.2. CLÍNICA

La mayor parte de los síntomas de la leucemia aguda al diagnóstico reflejan la infiltración de la médula ósea por parte de los blastos, y están relacionados con la insuficiencia medular: palidez y astenia causadas por la anemia, equímosis y petequias por trombopenia y fiebre e infecciones frecuentes por la neutropenia.

El 65% de los pacientes con LLA presentan algún grado de hepatoesplenomegalia, que suele ser asintomática. La anorexia es frecuente, pero no suele existir pérdida de peso importante. A veces, como consecuencia de la infiltración de la médula ósea, pueden presentar dolores óseos y artralgias.

La clínica de las LLA de estirpe T tiene unas características propias. Los pacientes suelen ser de mayor edad y presentar recuentos leucocitarios más elevados al diagnóstico. Con frecuencia debutan con una masa mediastínica y tienen mayor incidencia de afectación del SNC.

1.1.3. DIAGNÓSTICO

En un paciente con clínica compatible con LLA es imprescindible realizar un control analítico. En el hemograma observaremos anemia en el 80 % de los casos, trombopenia en el 75% y leucocitosis a expensas de linfocitosis y neutropenia en el 50%. En la bioquímica es frecuente observar un aumento de la lactato deshidrogenasa (LDH) y del ácido úrico por el *turn over* celular aumentado.

La confirmación del diagnóstico de leucemia aguda se realiza mediante el estudio morfológico, citogenético y molecular de la médula ósea. El diagnóstico de la LLA se basa en la observación morfológica de $\geq 25\%$ de blastos de línea linfoide en médula ósea (MO). Por ello ante una sospecha clínica y analítica siempre debe realizarse un aspirado de médula ósea (AMO).

Por otro lado debe realizarse un análisis del líquido cefalorraquídeo (LCR) con el fin de descartar infiltración leucémica, así como una radiografía de tórax para comprobar la existencia o no de una masa mediastínica.

Finalmente el estudio debe completarse con una ecografía abdominal, estudio cardiológico, bioquímica sanguínea completa, estudio de coagulación, serologías e inmunoglobulinas.

Es importante realizar diagnóstico diferencial con otras enfermedades no neoplásicas como la artritis crónica juvenil, la mononucleosis infecciosa (veremos la presencia de linfocitos activados), la púrpura trombocitopénica idiopática (trombopenia aislada de origen autoinmune), aplasia medular, linfocitosis secundaria a una infección aguda viral, etc.. así como con otros tumores pediátricos como son el neuroblastoma, retinoblastoma o rhabdomyosarcoma, que podrían sugerir infiltración leucémica en esas localizaciones.

1.1.4. GRUPOS DE RIESGO Y PRONÓSTICO

La supervivencia de los pacientes con LLA se ha incrementado notablemente en las últimas décadas, pasando de una supervivencia de menos del 10% en los años sesenta a presentar, con los tratamientos actuales, una supervivencia libre de enfermedad superior al 80% en la mayoría de los casos^{84, 122, 124}

Para conseguir mejorar su pronóstico y optimizar los resultados de los tratamientos se clasifica a los pacientes en función de su riesgo, con la doble finalidad de intensificar los tratamientos que deben realizarse en aquellos pacientes con riesgo elevado de recaída por la agresividad de su leucemia y minimizar los posibles efectos secundarios y la toxicidad de quimioterapias innecesarias en aquellos pacientes de menor riesgo.

Cada protocolo establece sus propios criterios de inclusión en cada grupo de riesgo. En este momento los criterios por los que se rige el protocolo vigente en nuestro país son los siguientes:

Criterios de Riesgo Estándar (RE)

- Edad >1 y <10 años
- Leucocitos <20 x10⁹/l al diagnóstico
- Inmunofenotipo no T
- Ausencia de infiltración del SNC y/o testes
- Citogenética :
 - Alta Hiperdiploidía (51-67 cromosomas)
 - t(12;21) positiva
 - No t(1;19)
 - No reordenamiento MLL
- Presencia de <1.000 blastos/mm³ en día +8 , en sangre periférica
- Presencia de < 5% de blastos y < 0,1% de Enfermedad Mínima Residual (EMR) en médula ósea en día +15 de la Inducción .

Criterios de Alto Riesgo (AR)

- t(4;11) (MLL/AF4)
- Hipodiploidía <44 cromosomas
- 1.000 blastos en día +8 de la Inducción, en sangre periférica
- 25% de blastos y >10% de ERM en el día +15 de la Inducción, en médula ósea
- EMR \geq 1% en el día +33 de la Inducción, en médula ósea y EMR \geq 0,1% antes de la Consolidación, en médula ósea .
- LLA Ph (Philadelphia)+

1.1.5. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO

En los últimos años en nuestro país los pacientes pediátricos con leucemia aguda han seguido tratamientos en el marco de dos sociedades, SHOP y PETHEMA (Programa Español de Tratamientos en Hematología).

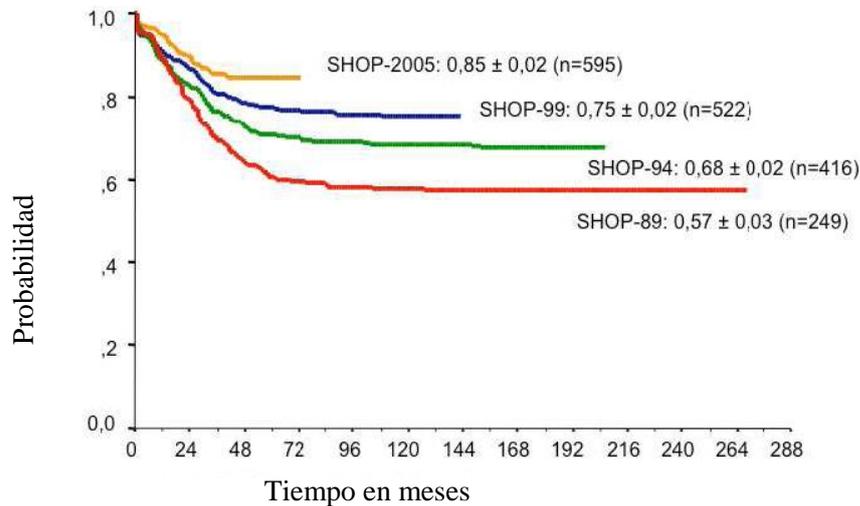
a) El grupo SHOP fue fundado en el año 1989 por miembros de las Sociedades Españolas de Hematología y de Oncología Pediátricas, para mejorar el diagnóstico y tratamiento de la Leucemia y el Linfoma en el niño.

Desde el año 1989 hasta la actualidad, se han desarrollado cuatro protocolos terapéuticos sucesivos SHOP para la leucemia aguda linfoblástica infantil.

Son los protocolos LLA/SHOP-89, LLA/SHOP-94, LLA/SHOP-99 y LLA/SHOP2005 en los que se han incluido un total de 1782 pacientes pediátricos evaluables^I. Este protocolo se ha cerrado en Enero del 2013, con la instauración de un nuevo protocolo común.

^I Datos obtenidos desde el inicio del protocolo hasta Diciembre de 2010, correspondientes a pacientes tratados en 40 centros.

Analizando la supervivencia libre de evento (SLE) en la serie global de pacientes en cada protocolo y comparándolas entre ellas, como muestra la **Gráfica 2**, se observan diferencias estadísticamente significativas^{II}.



Gráfica 2 - Supervivencia libre de evento en la serie global de pacientes
(Gráfica obtenida de protocolo SEHOP-PETHEMA para LLA infantil 2013)

Las conclusiones más destacables de los sucesivos protocolos SHOP de LLA son:

- 1) LLA/SHOP-89: La quimioterapia de consolidación tardía en pacientes de alto riesgo no ofrece ningún beneficio^{III}.
- 2) LLA/SHOP-94: Con la intensificación del protocolo, la ampliación del grupo de pacientes de alto riesgo y la creación de un grupo de muy alto riesgo, se consiguió una mejoría significativa de la SLE aunque aumentó discretamente la mortalidad durante la inducción.

^{II} Probabilidad de SLE en los distintos protocolos: LLA/SHOP-89 **0,57 ± 0,03** a 22 años; LLA/SHOP-94 es del **0,68 ± 0,02** a 17 años; LLA/SHOP-99 es del **0,75 ± 0,02** a 12 años y LLA/SHOP-2005 es del **0,85 ± 0,02** a 6 años.

^{III} La SLE a 15 años en 46 pacientes que recibieron la consolidación tardía fue del 52%, respecto al 50% en 65 pacientes que no la recibieron.

- 3) LLA/SHOP-99: aumentando la intensificación se obtuvo una mejoría significativa de la SLE en pacientes de alto y muy alto riesgo.
- 4) LLA/SHOP-2005: Se obtuvo una mejoría significativa de la SLE en pacientes de todos los grupos de riesgo. La dosis de metotrexato de 5 g/m² condiciona mejores resultados de supervivencia que la dosis de 3 g/m², con una toxicidad aceptable.

b) Con la aplicación de los protocolos PETHEMA en niños en los años 90, los pacientes de riesgo bajo e intermedio han alcanzado una probabilidad de supervivencia libre de evento del 80% y de supervivencia global por encima del 85%. En los pacientes de riesgo alto (el 15% de la totalidad), la SLE y SG fueron inferiores al 50%. Los protocolos se clasifican en función del riesgo de la LLA.

- 1) Protocolo Pethema LLA 2001 de bajo riesgo (BR). surge con intención de aportar mejoras al protocolo vigente en ese momento (PETHEMA LLA-89) con unos objetivos bien definidos:
 - Reducción de los efectos secundarios sobre el miocardio, disminuyendo la dosis total^{IV} acumulada de antraciclinas
 - Evaluación de la respuesta^V en sangre periférica el día +8 .
 - Detección mediante estudio de enfermedad mínima residual (EMR) por citometría de flujo, de los casos de mayor riesgo de recidivas.
 - Evitar la radioterapia con profilaxis de SNC con quimioterapia local.

El estudio se realizó sobre 200 pacientes. La mortalidad durante la inducción fue del 1,2%. La remisión completa se consiguió en un 96,7%. La SLE fue del 90 % y la supervivencia global del 93%.

^{IV} Disminución de dosis de antraciclinas de 180 mg/m² en el protocolo PETHEMA LLA-89 a 120 mg/m² en el Pethema LLA 2001 BR.

^V Respuesta en términos de cifra absoluta de blastos, el día +8, tras 7 días de corticoterapia y 1 dosis de triple terapia intratecal

2) Protocolo Pethema LLA 96 de riesgo intermedio (RI).

Este protocolo pretende mejorar la supervivencia de los pacientes de riesgo intermedio, en especial los afectados de leucemia aguda linfoblástica T, mediante la utilización de ciclofosfamida durante la primera semana, con el objetivo de obtener una rápida respuesta inicial, confirmar la reducción en el número de recaídas en SNC, sin emplear radioterapia y evaluar la eficacia de la quimioterapia de consolidación intensiva.

Se incluyeron 311 pacientes en el estudio, presentando una mortalidad durante la inducción de un 2,6% y alcanzando remisión completa un 93,2%. La SLE fue de 80% y la Supervivencia global del 86%.

3) Protocolo Pethema LLA alto riesgo (AR) 2005.

Con el objetivo de aplicar el estudio de la EMR por citometría de flujo a la adopción de actitudes terapéuticas para excluir el trasplante de progenitores hematopoyético (TPH) en los pacientes con buena eliminación de la ERM y delimitar un subgrupo de muy alto riesgo en el cual se utiliza el TPH alogénico en primera remisión.

Se analizaron 44 pacientes. Con una mediana de seguimiento de 38 meses, se mantienen en primera RC el 59% de los pacientes. La mortalidad fue del 31%^{VI}. La SLE fue del 58% y la Supervivencia global del 61%.

^{VI} Las causas de los fallecimientos fueron: 6 pacientes por progresión, 3 por infección y 5 por complicaciones relacionadas con el TPH.

1.2. TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS

Las translocaciones cromosómicas surgen cuando los brazos de dos cromosomas distintos se unen como consecuencia de fenómenos de recombinación no homóloga. Esto puede dar lugar a que dos genes distales en el genoma entren en proximidad física de forma que uno de ellos pueda controlar la expresión del otro o incluso que se fusionen dando lugar a un gen híbrido con propiedades oncogénicas.

Aunque en muchos casos las alteraciones cromosómicas que se observan no muestran relación con un tipo determinado de cáncer, en ocasiones las anomalías genéticas son específicas y están siempre asociadas a un determinado fenotipo tumoral. El primer ejemplo descrito de este tipo de translocación es el cromosoma Filadelfia, que está presente en más del 90% de los casos de leucemia mieloide crónica (LMC)

1.2.1. TRANSLOCACIONES CROMOSÓMICAS FRECUENTES EN LA LEUCEMIA AGUDA

a) *ETV6-RUNX1 t(12;21)*

En esta translocación críptica de *ETV6-RUNX1*, $t(12;21)$ (p13;q22), también conocida como *TEL-AML1*, el gen *TEL*, localizado en la región telomérica del cromosoma 12, se fusiona con el gen *AML 1*, localizado en el cromosoma 21. El gen *TEL* codifica para un factor de transcripción y el gen *AML 1* codifica una proteína que forma parte del complejo transcripcional $AML1/CBF\beta$ (*core binding factor*).

Como consecuencia de la translocación se origina un gen híbrido que da lugar a la síntesis de una proteína también híbrida, la proteína de fusión *ETV6/RUNX1*, cuyo extremo N-terminal es un segmento del gen *TEL* y el C-terminal es un segmento del gen *AML 1*.

Esta proteína híbrida *TEL-AML 1* tiene propiedades anormales y por lo tanto, afecta la función normal del complejo transcripcional *AML 1/CBF\beta* y por ello, a la síntesis de las proteínas que controla este complejo.

Es la translocación cromosómica más frecuente en la LLA infantil de estirpe B, encontrándose en el 25% de los casos. Por el contrario es raro encontrarla en la LLA de células T.

La t(12;21) se presenta con mayor frecuencia en los niños entre 2 y 9 años y predomina en los niños caucásicos con LLA frente a los hispanos .

La fusión de ETV6-RUNX1 en niños con LLA se asocia a un pronóstico favorable. Sin embargo en un estudio sobre el tratamiento de niños recién diagnosticados con LLA, el análisis multifactorial de los factores pronósticos concluyó que la edad y el recuento leucocitario al diagnóstico eran factores pronósticos independientes, no así el ETV6-RUNX1 que tan sólo lo era asociado a los dos anteriores ⁸⁹.

Se ha visto que la frecuencia de aparición de esta proteína de fusión ETV6/RUNX1 en los recién nacidos sanos supera claramente la tasa de leucemia, poniendo de manifiesto que son necesarios eventos adicionales para la transformación leucémica. Hasta ahora, los mecanismos que desencadenan estos segundos eventos siguen apenas sin conocerse.

Existe la hipótesis de que las recaídas en pacientes con t(12;21) pueden constituir un nuevo segundo impacto independiente en un clon preleucémico persistente (el primer impacto sería la translocación de ETV6-RUNX1) ¹⁶¹.

b) Cromosoma Filadelfia t(9;22)

En este caso se produce una translocación t(9,22)(q34;q11) que une el brazo largo del cromosoma 9 y el brazo largo del cromosoma 22, resultando un cromosoma 22 más pequeño (**Imagen 5**).

Esta translocación da lugar a la yuxtaposición de secuencias 3' del protooncogén *abl* normalmente presente en el cromosoma 9 con secuencias 5' del gen *bcr* (breakpoint cluster region) truncado que permanece en el cromosoma 22. De este modo se genera el oncogén *bcr-abl*, que codifica para una proteína que tiene mucha mayor actividad quinasa que la proteína normal ABL. El altísimo porcentaje de casos de LMC que muestra esta alteración sugiere que la actividad anormal de la proteína quimérica BCR-

ABL es esencial para el desarrollo del tumor, ya que debe de conferir a las células neoplásicas una ventaja selectiva.

El cromosoma Filadelfia t(9;22) está presente en aproximadamente 3% de los niños con LLA y conduce a la producción de una proteína de fusión de BCR-ABL1 con actividad de la tirosina quinasa .

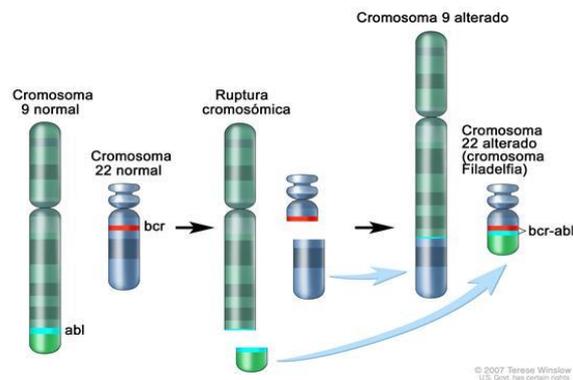


Imagen 4 - Cromosoma Filadelfia.

El cromosoma Filadelfia t(9;22) se ha relacionado con un pronóstico adverso y su presencia se ha considerado un indicador de trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico. Los inhibidores de la tirosina quinasa BCR-ABL, como el mesilato de imatinib, son eficaces en estos pacientes.

c) *Translocaciones de MLL*

Las translocaciones que implican el gen MLL (11q23) se presentan entre el 3-5% de los casos de LLA infantil y se relacionan con un aumento del riesgo de fracaso del tratamiento. La translocación t(4;11) es la más común.

Los pacientes con la translocación t(4;11) son en su mayoría lactantes con hiperleucocitosis al diagnóstico; tienen mayor incidencia de afectación del SNC y con frecuencia su respuesta a la terapia inicial es precaria. Si bien tanto los lactantes como los adultos con translocaciones t(4;11) tienen un riesgo alto de fracaso del tratamiento, los niños mayores de 1 año con esta translocación parecen tener un mejor desenlace ^{108, 73}.

d) *Translocación de E2A-PBX1; t(1;19)*

La translocación t(1;19) se presenta en aproximadamente 5% de los casos de LLA infantil e involucra la fusión del gen E2A en el cromosoma 19 con el gen PBX1 en el cromosoma 1.

Se ha visto que los niños de raza negra son más propensos a presentar LLA Pre-B con la t(1;19) que los niños blancos.

En un ensayo realizado por el St. Jude Children's Research Hospital (SJCRH) en el que se trataron todos los pacientes sin radiación craneal, aquellos con la translocación t(1;19) tuvieron un desenlace general comparable con el de los niños sin esta translocación, con un riesgo más alto de recaída en el SNC y una tasa más baja de recaída en la médula ósea, lo que indica que puede ser necesaria una terapia más intensiva dirigida al SNC para estos pacientes ^{70,106}.

1.3. PAPEL DE ETV6-RUNX1 EN LA LEUCEMIA AGUDA

El 25 % de los casos de leucemia linfoblástica aguda infantil se caracterizan por la presencia de la fusión de los genes *ETV6* y *RUNX1*.

Esta alteración genómica suele aparecer durante la gestación y a menudo desemboca en la enfermedad al poco tiempo de vida; sin embargo, no es suficiente para el desarrollo de leucemia.

Hasta la fecha se desconocía el mecanismo principal por el cual se adquirían las mutaciones adicionales que colaboraban con la fusión *ETV6-RUNX1* en la transformación oncogénica. Recientemente un estudio³² llevado a cabo por investigadores coordinados desde el Instituto Wellcome Trust Sanger (Cambridge, Reino Unido) revela la importancia de la recombinación somática mediada por las proteínas RAG1 y RAG2 en el curso de la enfermedad. Analizaron mediante técnicas de secuenciación masiva genomas y exomas completos de más de 50 pacientes con leucemia linfoblástica aguda y constataron que junto a la mutación de fusión que afecta a los linfocitos B en esta patología, se encuentra la inactivación, mediada por las proteínas RAG, de genes que codifican factores de transcripción claves para la diferenciación de las células B.

Las proteínas RAG reorganizan el genoma en las células inmunes normales con el fin de generar la diversidad de anticuerpos. En todos los pacientes con el gen fusionado, el equipo demostró que estas proteínas eran capaces de cambiar el ADN de los genes implicados en el cáncer, lo que conlleva al desarrollo de la leucemia. Todos los casos mostraron evidencia de eventos que implicaban a las proteínas RAG.

Estos autores encontraron que los restos de esta secuencia se hallaban cerca de más de la mitad de los reordenamientos genéticos que condujeron el cáncer. Este proceso llevó a la pérdida de los mismos genes necesarios para el control del desarrollo normal de las células inmunitarias. Por lo tanto, es la eliminación de estos genes la que, en combinación con el gen de fusión, conduce a la leucemia.

1.4. FACTORES DE RIESGO Y LEUCEMIA

El término "factor de riesgo" fue utilizado por primera vez por el investigador de enfermedades cardíacas Thomas Dawber en un estudio publicado en 1961, el "estudio de Framingham", donde atribuyó a la cardiopatía isquémica determinadas situaciones como son la tensión arterial, el colesterol o el hábito tabáquico.

Un factor de riesgo es cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una determinada enfermedad. Podemos diferenciar dos grandes grupos de factores: genéticos y ambientales.

Los factores de riesgo relacionados con el estilo de vida en algunos cánceres del adulto incluyen sobrepeso, fumar, beber alcohol en exceso o una exposición al sol inadecuada. Estos factores ambientales son importantes en muchos tipos de cáncer en la vida adulta, pero resulta poco probable que desempeñen un papel en la mayoría de los cánceres infantiles.

Actualmente existen pocos factores de riesgo conocidos para la leucemia en niños.

1.4.1. FACTORES DE RIESGO GENÉTICOS

Aunque algunos síndromes congénitos aumentan el riesgo de desarrollar leucemia en niños (**Tabla IV**), la mayoría de los casos de leucemia no están relacionados con ninguna causa genética conocida.

- a) Existen síndromes genéticos que aumentan el riesgo de desarrollar LA:
 - **Síndrome de Down (trisomía 21):** Los niños con síndrome de Down tienen más probabilidades de desarrollar leucemia aguda que el resto de los niños ²⁸, con un riesgo acumulado de leucemia de alrededor de 2,1% a los 5 años y de 2,7% a los 30 años. El síndrome de Down también se ha relacionado con la leucemia transitoria (también conocido como *trastorno mieloproliferativo transitorio*), una afección similar a la leucemia que aparece durante el primer mes de vida y que frecuentemente se resuelve por sí misma sin necesidad de quimioterapia.

- **Síndrome de Klinefelter:** es una anomalía cromosómica en la que los varones tienen un cromosoma “X” adicional. Esto causa infertilidad, evita el desarrollo normal de algunos caracteres masculinos secundarios y está relacionado con un riesgo ligeramente aumentado de desarrollar leucemia.
- **Síndrome de Li-Fraumeni:** causado por una alteración en el gen supresor de tumores *TP53*. Los pacientes presentan un mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer, incluyendo leucemia, sarcomas, cáncer de mama, tumores suprarrenales y del SNC.

Tabla IV - Síndromes congénitos asociados con un mayor riesgo de LA ³⁵.

Enfermedad	Tipo de leucemia
Síndrome de Down	LLA, LMA
Anemia de Fanconi	LMA
Ataxia-Teleangiectasia	LLA,
Síndrome de Bloom	LLA, LMA
Neurofibromatosis tipo I	LMA, LMC juvenil
Síndrome de Wiskott-Aldrich	LMA
Agammaglobulinemia congénita ligada a X	LLA
Deficiencia de IgA	LLA
Síndrome de Kostmann	LMA
Síndrome de Turner	LMA
Síndrome de Poland	LLA
Síndrome de Klinefelter	LMA
Síndrome de Li-Fraumeni	LLA

b) Otros trastornos genéticos también conllevan un mayor riesgo de desarrollar neoplasias, como son la neurofibromatosis¹²⁸ y la anemia de Fanconi¹⁴⁰.

c) Los niños con alteraciones en el sistema inmune, como ocurre en la Ataxia-telangiectasia¹⁴⁵, en el Síndrome de Wiskott-Aldrich o en el Síndrome de Bloom¹⁵⁶, además de tener un riesgo elevado de adquirir infecciones graves debido a su déficit inmunológico, también podrían tener un mayor riesgo de desarrollar leucemia.

d) Factores familiares:

Se han descrito numerosos casos de familias con dos o más miembros con leucemia en los que se observa parentesco de primer y/o segundo grado^{20, 54 109}. Estudios epidemiológicos de series de pacientes con leucemia muestran que entre el 5-10% de ellos han tenido familiares afectados de neoplasias hematológicas frente al 1-2 % de la población sana con los mismos antecedentes^{35, 54}. Esta asociación puede ser debida a factores hereditarios, ambientales o incluso al azar, por lo que son necesarios más estudios al respecto³⁵. Se ha visto que en los casos familiares hay mayor prevalencia de anomalías cromosómicas en los blastos leucémicos.

Diversos estudios revelan que los hermanos y gemelos heterocigóticos de niños con leucemia tienen una probabilidad ligeramente mayor (dos a cuatro veces más elevada que cualquier otro niño)¹⁰⁷ de desarrollar LA en la primera década de su vida, aunque el riesgo general es aún muy bajo. Sin embargo, el riesgo entre gemelos homocigóticos es muchísimo más elevado^{20, 30, 54, 58}. Si un gemelo idéntico desarrolla leucemia en la infancia, el otro gemelo tiene hasta un 20 % de probabilidades de desarrollar leucemia también.³⁵ El riesgo es aún mayor si la leucemia se desarrolla en el primer año de vida. Habitualmente el segundo gemelo desarrolla la leucemia a los pocos meses del primero, posteriormente el riesgo va disminuyendo a medida que aumenta la edad, siendo similar al del resto de los hermanos a la edad de 7 años.

Por el contrario el hecho de que uno de los progenitores desarrolle leucemia en la edad adulta, no parece aumentar el riesgo de que un hijo desarrolle leucemia⁶⁸.

1.4.2. FACTORES DE RIESGO AMBIENTALES

a) Radiaciones ionizantes

La ionización es un proceso por el cual los electrones son desplazados de los átomos y moléculas. Este fenómeno puede generar cambios moleculares potencialmente capaces de dar lugar a lesiones en los tejidos biológicos, incluyendo efectos en el material genético.

Para que este proceso tenga lugar es necesaria la interacción con fotones de muy alta energía, como los de los rayos X y rayos gamma. En consecuencia decimos que los rayos X y los rayos gamma son radiaciones ionizantes, y la absorción de un fotón de estas radiaciones puede originar ionización y el consiguiente daño biológico.

La exposición a altos niveles de radiación es un factor de riesgo para la leucemia infantil. Los supervivientes japoneses de la bomba atómica presentaron un riesgo significativamente mayor de desarrollar leucemia, generalmente en un período de cinco a ocho años después de la exposición ^{14, 148}. Encontramos más ejemplos de este hecho en estudios que publican un aumento de casos de LA infantil en la zona norte de Grecia ¹⁰⁵, zona afectada por una dosis de radiación moderada y en otro accidente nuclear soviético ocurrido en Chelyabinsk en 1957, con contaminación importante del río Techa, que originó un aumento significativo de LA y otros tipos de cáncer en años posteriores entre la población ribereña ¹⁴⁸.

Si un feto es expuesto a radiación durante los primeros meses de su desarrollo, existe la posibilidad de un riesgo potencial de leucemia en su infancia, aunque no queda clara la magnitud del mismo. Los posibles riesgos de la exposición infantil a niveles menores de radiación, como la producida por pruebas radiológicas no se conocen con seguridad.

b) Quimioterapia y otras sustancias químicas

Los niños y los adultos que reciben algunos tratamientos quimioterápicos tienen un mayor riesgo de desarrollar otro tipo de cáncer posteriormente en su vida ^{52, 135}. Los medicamentos como ciclofosfamida, clorambucil y etopósido han sido relacionados con un mayor riesgo de leucemia. Estas leucemias generalmente se desarrollan en un plazo de 5 a 10 años a partir del tratamiento y tienen un pronóstico pobre.

Por otro lado la exposición a químicos como el benceno ^{17, 123} puede causar LA en adultos y, rara vez, en niños. En general la exposición a sustancias químicas está más relacionada con un aumento en el riesgo de LMA que de LLA.

c) Supresión del sistema inmunológico

Los niños que reciben un tratamiento intensivo para suprimir su función inmune tienen un riesgo aumentado de desarrollar ciertos cánceres, como linfoma y LA ⁵².

1.4.3. FACTORES DE RIESGO INCIERTOS

a) Campos electromagnéticos (CEM)

El movimiento de cargas eléctricas en un metal conductor origina ondas electromagnéticas que se propagan a través del espacio vacío a la velocidad de la luz. Estas ondas llevan asociada una energía electromagnética.

Cuando en una región del espacio existe una energía electromagnética, se dice que en esa región hay un campo electromagnético, y este campo se describe en términos de intensidad de campo eléctrico y/o densidad de flujo magnético.

Para medir la intensidad de campo eléctrico se emplea la unidad “voltio/metro”, mientras que para medir la densidad de flujo magnético se utiliza la unidad “tesla” (T).

Al igual que cualquier otro fenómeno ondulatorio, la radiación electromagnética se puede caracterizar por su longitud de onda y su frecuencia. La longitud de onda (λ en metros) es la distancia que existe entre los puntos correspondientes a un ciclo completo de la onda. La frecuencia es el número de ondas que pasan por un determinado punto en un segundo. La unidad de la frecuencia es el hertz (Hz) y es igual a un ciclo por segundo.

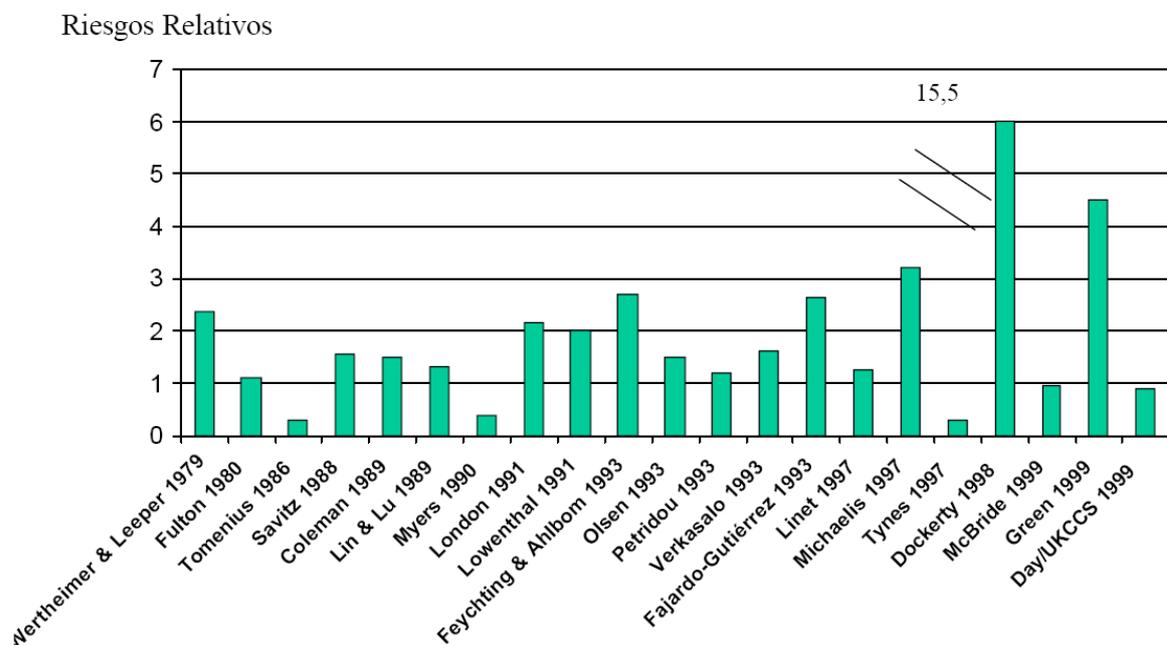
La longitud de onda (λ) y la frecuencia (f) de una señal electromagnética están relacionadas a través de $\lambda \times f = c$. Como el valor de c es fijo, la longitud de onda de las señales electromagnéticas de alta frecuencia es muy corta, mientras que las señales de baja frecuencia tienen una longitud de onda más larga.

Las energías de los fotones asociados con las radiaciones de frecuencias más bajas no son lo suficientemente elevadas como para causar ionización de átomos y

moléculas. Es por esta razón que a los campos electromagnéticos de radiofrecuencia junto con la luz visible, la radiación infrarroja y las radiaciones electromagnéticas de frecuencia extremadamente baja se les denomina radiaciones no-ionizantes.

Las radiaciones no ionizantes comprenden la porción del espectro electromagnético cuya energía no es capaz de romper las uniones atómicas, incluso a intensidades altas. No obstante, estas radiaciones pueden ceder energía suficiente cuando inciden en los organismos vivos, como para producir efectos térmicos, tales como los inducidos por las microondas. También, las radiaciones no ionizantes intensas de frecuencias bajas pueden inducir corrientes eléctricas en los tejidos, que pueden afectar al funcionamiento de células sensibles a dichas corrientes, como pueden ser las células musculares o las nerviosas. Sin embargo, la relevancia en lo que refiere a posibles efectos de los CEM débiles sobre la salud son muy cuestionables ¹⁵³.

Se han realizado múltiples estudios sobre la influencia de los CEM en la leucemia infantil, obteniendo diferentes resultados, como muestra la **Gráfica 3** ¹⁵³.



Gráfica 3 - Resultados de 21 estudios que han evaluado la asociación entre exposición a CEM de frecuencia muy baja y el riesgo de leucemia en niños.

La estimación del riesgo asociado a leucemia es variable. Pocos estudios encuentran resultados estadísticamente significativos, y en muy pocas ocasiones una relación dosis-respuesta; entendida esta relación como la tendencia a aumentar la probabilidad de desarrollar la enfermedad cuando aumenta la exposición. Sin embargo, la mayoría de los trabajos encontraron riesgos incrementados. Uno de los estudios más amplios y exhaustivos es el realizado por el Instituto Nacional del Cáncer de los EE.UU.⁸⁸

Por otra parte, en 1999 se publicó un estudio caso-control realizado en Gran Bretaña (UK Childhood Cancer Study Investigators) sobre 3838 casos y 7629 controles, y sus autores concluyen que no existe evidencia de que la exposición a campos magnéticos procedentes del suministro de energía eléctrica incremente el riesgo de leucemias, cánceres de sistema nervioso central o cualquier otro tipo de cáncer en niños.

En el año 2000 se publicaron dos análisis independientes^{1, 50} en los cuales se evaluaron conjuntamente diversos estudios publicados con anterioridad^{VII}. Ambos trabajos (**Tabla V**) encontraron un aumento del riesgo del orden del 70%-100% en la categoría de sujetos con los niveles más altos de exposición. En exposiciones más bajas no encontraron ningún incremento de riesgo para leucemia. Aunque en ambos análisis se incluyeron miles de niños, en las categorías de alta exposición se incluye solamente un porcentaje muy bajo, aproximadamente el 1% de la población. -

VII En el trabajo de Ahlbom y col. se re-analizaron los datos de 9 estudios (3203 niños con leucemia, 10338 controles), mientras en el meta-análisis de Greenland y col. se analizaron los datos de 15 estudios.

Tabla V - Resultados del análisis de estudios^{1,50} de leucemia en niños expuestos a CEM de muy baja frecuencia, en función de los niveles de exposición (en microTeslas).

Ahlbom y cols 2000	
Nivel de exposición	Riesgo relativo e IC95%
<0.1μT	1 (grupo de referencia)
0.1 – 0.2μT	1.08 (0.86-1.32)
0.3 – 0.4μT	1.12 (0.84-1.51)
>0.4μT	2.08 (1.30-3.33)
Greenland y cols 2000	
<0.1μT	1 (grupo de referencia)
0.1 – 0.2μT	1.0 (0.81-1.22)
0.2 – 0.3μT	1.13 (0.92-1.39)
>0.3μT	1.65 (1.15-2.36)

En conclusión, estas dos investigaciones revelan indicios de un posible aumento del riesgo en niños altamente expuestos. Los autores concluyen: *“En el 99,2% de los niños estudiados, que residen en casas con niveles de exposición menores a 0,4 microTeslas no se encontró incremento en el riesgo de desarrollar leucemia, mientras que el 0,8% de los niños, con exposición mayor a 0,4 microTeslas, presentaron un índice de riesgo duplicado, que es improbable que se deba al azar. Las causas de este aumento son desconocidas, aunque el sesgo de selección podría explicar parte del incremento.”*

b) Peso al nacimiento

Existen diferentes estudios^{78,116,117} que han analizado este parámetro relacionándolo con el riesgo de padecer leucemia, y la gran mayoría de ellos encuentran un riesgo de desarrollar LA dos veces superior al normal en niños con peso elevado al nacimiento. Los resultados estadísticamente significativos se han observado en recién nacidos con peso elevado al nacimiento y diagnóstico de LA en los primeros años de

vida. Existen hipótesis relacionadas con el metabolismo energético y hormonal que intentan explicar esta asociación pero hasta el momento actual se desconocen los mecanismos que puedan explicar este hecho.

Doctores ^{VIII} de Harvard y Boston, realizaron un análisis de 32 estudios para examinar la relación entre el peso al nacer, la leucemia infantil y los tipos LLA y LMA. En el análisis se incluyeron 16.501 casos de todos los tipos de leucemia, 10.974 de LLA y 1.832 de LMA. Comparado con los niños de peso normal, los de mayor tamaño tenían un 35% más riesgo de leucemia, un 23% más de padecer LLA y un 40% más de sufrir LMA. Por cada 1.000 gramos de aumento en el peso de nacimiento, la tasa de posibilidades de leucemia general aumentaba 1,18.

c) Abortos maternos de repetición

Existen varias investigaciones ^{78, 117, 157} que han analizado la asociación entre neoplasias hematológicas pediátricas y una historia materna de abortos espontáneos repetidos. En varios de ellos se encuentra un aumento del riesgo para LLA y LMA que alcanza 25 veces el esperado en aquellos casos en que existen más de dos abortos previos. Este hecho sugiere una misma exposición preconcepcional y /o trasplacentaria o un defecto genético hereditario con expresividad variable, desde la no viabilidad para la vida hasta el desarrollo de LA. Esta hipótesis aun precisa ser validada.

d) Infecciones víricas

Las descripciones ocasionales de los denominados agrupamientos leucémicos, mayor número de casos de LLA que los esperados para una zona geográfica y un período de tiempo concretos, refuerzan la hipótesis de la etiología infecciosa en la leucemogénesis ^{3, 20, 47}. Un estudio realizado en Inglaterra analizando los agrupamientos leucémicos ocurridos, determinó que todos ellos ocurrían después de migraciones poblacionales y justifica las miniepidemias de LLA infantil por la falta de inmunidad pasiva, transplacentaria y por la lactancia materna, frente a los microorganismos prevalentes en las poblaciones de inmigrantes.

^{VIII} Robert W. Caughey, de Escuela de Salud Pública de Harvard, y Karin B. Michels, del Brigham and Women's Hospital, en Boston.

En este estudio se concluye que el cruce poblacional ocasiona en los años posteriores, un riesgo doble al normal de padecer LLA en edad pediátrica ³.

La posibilidad de provocar LA en animales de experimentación con distintos tipos de retrovirus apoya la teoría infecciosa. En 1981 se identificó el primer retrovirus leucemógeno humano, el HTLV-1(Human T cell Leukemia Virus - type I), endémico del Sudeste Asiático, África y América Central, como el agente etiológico de la leucemia-linfoma de células T inmunofenotipo CD 4+ de los adultos. Más adelante otro retrovirus , el HTLV-II, ha sido asociado con tricoleucemias y LLC adulta. No se ha conseguido demostrar la participación de rotavirus en la LLA infantil, pero la relación entre el virus de Epstein-Barr con el linfoma de Burkitt y el subtipo L3 de las LLA ^{48, 51} así como la mayor incidencia de LLA infantiles entre los 2-5 años de edad ^{84, 122} sugieren que las infecciones víricas probablemente predisponen al desarrollo de estas neoplasias hematológicas.

Se ha propuesto un modelo para la leucemogénesis similar al de Knudson ⁸² de la doble mutación para explicar el origen de los tumores embrionarios, explicando que se necesitarían dos alteraciones genéticas distintas para el desarrollo de la LA. Las dos mutaciones espontáneas ocurrirían en los momentos de máximo estrés proliferativo de las células linfoides afectando a los genes reguladores de su crecimiento y diferenciación. Los dos períodos más críticos corresponden al segundo trimestre de embarazo, momento en que las células B fetales inmaduras se dividen más rápidamente y en el cual ocurriría la primera mutación, y durante el 2-3 año de vida, cuando ya ha desaparecido la inmunidad materna pasiva y el contacto con la mayoría de los virus desencadenaría la enfermedad, dado que éstos son los principales estimuladores mitogénicos linfocitarios. Tras un variable pero breve periodo de latencia se desarrollarían las leucemias entre los 2 y los 5 años de edad. Se ha publicado la asociación entre la LLA B común con ciertos tipos de complejos mayores de histocompatibilidad, especialmente haplotipo HLA DQ. Estos niños reaccionarían de una forma exagerada a las infecciones víricas, aumentando el riesgo de presentar una LLA ¹⁴⁴.

e) Clusters

Es frecuente en salud pública la aparición de acúmulos de casos de una misma enfermedad en una zona determinada. El nombre técnico para estas acumulaciones de casos de una enfermedad es "clusters", y hace referencia a un elevado número de casos dentro de unos límites de tiempo y espacio definidos. La metodología para abordar el estudio de "clusters" está bien establecida, existiendo guías de referencia elaboradas por centros de reconocido prestigio, como el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta. Generalmente, la magnitud de los "cluster" no es lo suficientemente grande como para excluir fácilmente el azar de entre sus causas. La identificación de un "cluster" es un problema frecuente en salud pública, y la leucemia es una de las enfermedades que tienden a producir "cluster". La investigación de este tipo de problemas es muy compleja; pocas veces se llega a confirmar que un presunto "cluster" lo es en realidad, y raras veces se consigue determinar sus causas. Aunque es poco probable que evaluaciones futuras de posibles "cluster" de leucemia en las proximidades de cables de alta tensión o en épocas epidémicas de viriasis puedan llegar a probar una asociación causal, es importante que se facilite la realización de estudios de incidencia y mortalidad en este tipo de poblaciones como mecanismo de monitorización. La consideración de que una asociación es causal la mayor parte de las veces es consecuencia de un acúmulo de hallazgos y nunca de los resultados de un único estudio.

f) Otros

Se han realizado numerosos estudios tratando de encontrar nuevos factores de riesgo que puedan tener un papel en la génesis de la LA infantil. Sin llegar a resultados estadísticamente significativos y con mucha controversia al respecto algunos sugieren como posibles factores de riesgo la edad materna en el momento del parto superior a 35 años ²⁶, el tabaquismo de los padres en el embarazo ^{16,71, 130, 136}, la exposición parental a hidrocarburos o profesiones de los padres relacionados con plaguicidas.

1.5. CARCINOGENICIDAD

Desde hace ya unos cuantos años los estudios de toxicidad de cualquier sustancia química incluyen la evaluación del riesgo de carcinogenicidad. La necesidad de este tipo de pruebas radica tanto en razones científicas como en razones legales y reglamentarias. La lista de sustancias químicas y otras sustancias originadas en la naturaleza que por exposición accidental, médica, ocupacional o industrial suponen un riesgo de carcinogénesis es muy numerosa.

A pesar de los avances tan importantes en el desarrollo de pruebas para detectar precozmente la actividad carcinogénica sin necesidad de tener que recurrir al concurso de seres vivos complejos, una parte fundamental de los estudios debe realizarse todavía en animales, porque tal como señala la Organización Mundial de la Salud, la única prueba definitiva de actividad carcinogénica continúa siendo el desarrollo de un tumor histológicamente demostrable en un animal.

Aún y todo, no se puede afirmar con precisión que una sustancia que ha sido comprobada como carcinogénica en animales lo vaya a ser también en los humanos; sin embargo, en la mayoría de los casos, los carcinógenos comprobados en los humanos también lo son al menos en alguna especie animal y, con frecuencia, en varias. En este sentido, se puede asegurar que existe una clara correlación positiva entre las observaciones realizadas en el hombre y los índices de carcinogenicidad en los animales. Por ello, la observación de carcinogenicidad de una determinada sustancia en una especie animal debería, al menos, ser interpretada como una señal de atención para estudiar la adopción de medidas preventivas.

La utilización de los animales en la evaluación de la carcinogenicidad de las sustancias químicas resulta obligatoria ya que la misma clasificación de las sustancias carcinogénicas, se basa, entre otros criterios, en la existencia o no de suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales.

Una de las clasificaciones más empleadas para definir el grado de carcinogenicidad es la de la International Agency for Research on Cancer (IARC) que distingue 5 categorías. (**Tabla VI**).

Tabla VI - Clasificación de la International Agency for Research on Cancer (IARC)

Grupo 1	Carcinógeno para seres humanos	113 agentes
Grupo 2A	Probablemente carcinógeno para seres humanos	66 agentes
Grupo 2B	Posiblemente carcinógeno para seres humanos	285 agentes
Grupo 3	No clasificable por su carcinogenicidad para seres humanos	505 agentes
Grupo 4	Probablemente no carcinógeno para seres humanos	1 agente

Grupo 1.

El agente es carcinogénico para el hombre. Esta categoría se aplica cuando existen pruebas suficientes de carcinogenicidad en humanos. Excepcionalmente, un agente puede ser incluido en esta categoría si las pruebas en humanos no son suficientes, pero sí lo son en animales de experimentación, y existen pruebas contundentes en humanos expuestos que el agente actúa mediante mecanismos relevantes para la carcinogenicidad.

Grupo 2A.

El agente es probablemente carcinogénico para el hombre. Esta categoría se usa cuando existen pruebas limitadas de la carcinogenicidad en humanos y pruebas suficientes de la carcinogenicidad en experimentación animal.

Grupo 2B

El agente es posiblemente carcinogénico para el hombre. Esta categoría incluye agentes, mezclas o condiciones de exposición para los que existen pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas insuficientes de carcinogenicidad en experimentación animal. También puede ser utilizada cuando existan pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos pero suficientes de carcinogenicidad en experimentación animal.

Grupo 3.

El agente no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el hombre. Esta categoría es usada ampliamente para aquellos agentes para los que existen

pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos e inadecuadas o limitadas en animales de experimentación. Se incluyen en esta categoría aquellos que no puedan ser catalogados en otros grupos.

Grupo 4.

El agente es probablemente no carcinogénico para el hombre. En esta categoría se incluyen los agentes o mezclas para los que existen pruebas que sugieren la ausencia de carcinogenicidad en humanos y en animales de experimentación.

1.6. MODELOS ANIMALES Y CÁNCER

1.6.1. INTRODUCCIÓN

La realidad científica precede a la realidad clínica en aproximadamente una década. Un potencial fármaco debe pasar una serie de ensayos preclínicos en cultivos celulares y animales y clínicos en humanos que evalúen su toxicidad y eficacia. Estos ensayos son necesarios porque validan su potencial terapéutico y garantizan seguridad, pero son largos y costosos.

El desarrollo de las ciencias médicas y biológicas va de la mano con el desarrollo de la ciencia de los animales de laboratorio. Tanto la generación como la implantación tumoral en los animales de investigación son actividades experimentales de vital importancia para la consideración del efecto del tumor en el animal.

En los últimos años se ha progresado enormemente en el campo de la oncología y uno de los mayores avances ha sido la generación de modelos de ratón que reproducen las distintas etapas del desarrollo tumoral. Esto está siendo posible gracias al desarrollo en las técnicas de ingeniería genética que nos indican dónde y cuándo se está expresando el gen en estudio. La secuenciación del genoma de ratón y las nuevas tecnologías de clonación de genes están siendo muy importantes, ya que favorecen la generación de modelos que reproducen mejor, y que con frecuencia se obtienen en un corto periodo de tiempo.

A grandes rasgos, la anatomía del ser humano no es muy diferente de la de otros mamíferos. Histológicamente es parecida y generalmente padece enfermedades similares. Para que un modelo animal sea adecuado debe reunir una serie de características: manejo sencillo, que no requieran demasiados cuidados y tener un ciclo reproductivo apropiado. Por otra parte el objeto de la investigación también condiciona el modelo a utilizar. Dos ejemplos donde vemos que son necesarios unos modelos animales en concretos son el empleo del nematodo *C. elegans* para estudiar la apoptosis porque es un gusano de 1090 células y siempre mueren las mismas en el mismo lugar y la misma etapa del desarrollo y el hecho de trabajar con el pez cebra para estudiar las primeras fases del desarrollo embrionario porque es transparente y crece fuera de un útero. En nuestro caso el mejor modelo es el ratón ya que tiene el genoma secuenciado y la posibilidad de ser manipulado genéticamente.

1.6.2. HISTORIA DEL RATÓN DE LABORATORIO.

Hay que remontarse muchos años atrás para encontrar el origen del uso del ratón con fines médicos. Hace más de 300 años en China y Japón se coleccionaba ratones con malformaciones, y ya en el siglo XIX se seleccionaron cepas según el color de su pelaje estudiando las leyes de Mendel. Datos más recientes nos muestran que en los años 30 se cruzaban ratones de forma endogámica para que fueran “genéticamente” idénticos.

A mediados del siglo XX se encontraron “mutantes espontáneos” en los ratones endogámicos y se consiguió identificar qué genes predisponían a algunas patologías. Gracias a ellos se empezaron a conocer las causas genéticas de enfermedades como el cáncer y la obesidad. Sin embargo fue la revolución tecnológica de los años 80 la que hizo posible llegar a la situación actual dado que hasta la fecha las mutaciones se producían al azar.

En 1982 Palmiter y Brinster generan el primer ratón transgénico y en 1983 se obtienen las primeras células madre embrionarias a partir de blastocistos de ratón. En 1987 se consiguieron líneas de ratón con mutaciones en genes específicos y se realizaron los primeros experimentos de manipulación genética y recombinación homóloga en células madre ⁷².

1.6.3. RATONES MODIFICADOS GENETICAMENTE

Los ratones modificados genéticamente son una parte indispensable para el estudio de la función génica y de las bases genéticas de las enfermedades, así como para la generación de modelos animales de múltiples patologías.

Existen dos modelos de ratones modificados genéticamente (**Imagen 6**):

a) Modelos transgénicos convencionales

La transgénesis convencional consiste en introducir un gen en un cigoto. Este gen, al que llamaremos “transgén”, puede ser de la misma especie, de otra diferente o incluso creado de forma artificial. Podemos utilizar el promotor de un gen y la secuencia codificante, los exones, de otro.

Este “transgén” se microinyecta en un cigoto de ratón y se integra al azar y en un número variable de copias en el genoma. Normalmente el ADN se integra en el genoma del 5-30% de los cigotos inyectados. El ratón que nace del cigoto microinyectado no tiene el “transgén” en todas sus células, se dice que es un ratón “mosaico”⁵. En esta transgénesis clásica se produce una integración al azar de un “transgén” y conduce a la expresión ectópica o a la sobreexpresión de un gen. Hay diversas técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para estudiar si se ha incorporado el “transgén”, ya que el ADN que hemos introducido es diferente.

Los sistemas de expresión condicional permiten controlar la expresión del transgén en el tiempo. El sistema más empleado es regulado por tetraciclina. Tiene dos modalidades: tet-ON, la expresión del transgén sólo ocurre cuando se administra doxiciclina al ratón, o tet-OFF, donde la doxiciclina impide la expresión del transgén.

Sin embargo esta tecnología tiene sus limitaciones: no permite controlar el lugar de integración del “transgén” ni el número de copias que se integran, por lo que el fenotipo resultante puede ser causado por la posición de integración.

Para minimizar este hecho es necesario generar varias líneas transgénicas para tener certeza de que el fenotipo observado se debe realmente al “transgén” y no a su posición accidental.

b) Transgénesis dirigida

Estos modelos se diferencian de los anteriores en que la integración del ADN que se introduce en el genoma se dirige a una posición concreta del mismo, con el objetivo de generar una mutación intencionada y previamente diseñada en dicha posición.

Esta tecnología permite la modificación del genoma del ratón de forma dirigida y controlada. No introducimos nuevos genes sino que modificamos uno propio en el mismo sitio en el que se encuentra. Se basa en la utilización de las células madre embrionarias como vehículo para introducir modificaciones genéticas en la línea germinal del ratón. A diferencia de los modelos transgénicos, el ADN exógeno se introduce en las células madre, no en el cigoto. Una célula madre es capaz de integrarse en la masa celular interna de un blastocisto y dar lugar a cualquier tejido de un ratón. Las células madre, una vez modificadas por recombinación homóloga se incorporan a un embrión huésped donde compiten con las del propio embrión para generar todos los linajes celulares embrionarios, incluida la línea germinal. Los animales que nacen se denominan quimeras porque derivan del embrión huésped y de las células introducidas.

En general se puede hablar de dos tipos de modelos generados por esta técnica:

- *Modelos knock-out (ko)*

Son ratones en los que se inactiva un gen determinado en el genoma, generalmente por delección de su secuencia codificante. También se puede interrumpir la secuencia codificante por la integración de otro gen. Para lograrlo se prepara in vitro un vector de ADN que puede ser introducido en el genoma si está flanqueado con secuencias homólogas a las endógenas. Podemos reemplazar por recombinación homóloga las secuencias de un gen diana que se quiere eliminar. Las células madre “recombinantes” se introducen en blastocistos. Al microinyectarlas formarán parte del nuevo embrión.

A base de cruces con estos ratones podemos eliminar las dos copias de un mismo gen, por ello decimos que tenemos un ratón “Knock-Out” (KO). Un ratón knockout es el mejor modelo para estudiar la función de un gen en el contexto fisiológico, analizando el fenotipo que resulta de la pérdida de su función. Sin embargo tienen importantes limitaciones: posible letalidad que impida el estudio de la función del gen en animal adulto y el hecho de que la modificación está presente en todas las

células. Si pensamos en modelos tumorales podemos hacer animales KO para el estudio de los genes supresores de tumores y los genes de reparación del ADN.

- *Modelos knock-in (ki)*

En estos modelos en lugar de eliminar un gen por reemplazamiento con otro como ocurre en los KO, lo que se hace es insertar por recombinación homóloga nuevas secuencias a nuestro gen de estudio.

HYPÓTΗΣΙΣ

υ

ΟΒΙΕΤΙΝΟΣ



2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

A pesar de los grandes avances de los últimos años en el conocimiento de la biología de la leucemia infantil, aún no es posible prevenir su desarrollo evitando la transformación de un clon preleucémico en enfermedad. El motivo principal es que no se conocen los determinantes genéticos que conllevan al desarrollo leucémico, ni la secuencia de hechos que conducen a esta enfermedad en el niño.

El siguiente trabajo pretende aportar nuevos conocimientos sobre la biología y el desarrollo de una enfermedad con tanta relevancia social en la actualidad como es la leucemia aguda infantil.

Partiendo del estudio de los niños con diagnóstico de leucemia en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca el presente trabajo persigue los siguientes objetivos:

1. Determinar variables epidemiológicas comunes así como factores ambientales particulares a los que han podido estar expuestos y su posible correlación.
2. Identificar las principales características clínico-biológicas y su importancia en el pronóstico que presentan los niños afectos de leucemia aguda.
3. Comparar los resultados de nuestra población analizando sus diferencias y semejanzas con los pacientes diagnosticados de leucemia a nivel global

En una segunda fase pretende profundizar en el conocimiento sobre el papel del clon preleucémico en la biología de la leucemia infantil empleando un modelo murino de investigación .

MATERIAL

y

MÉTODOS



3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. FASE I. ANÁLISIS CLÍNICO-BIOLÓGICO DE NIÑOS CON LEUCEMIA

Estudio descriptivo de los niños con diagnóstico de leucemia aguda en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca de acuerdo al siguiente material y métodos:

a) Tipo de estudio: Observacional, descriptivo, retrospectivo , serie de casos.

b) Área de estudio /población: Pacientes del área de salud de la provincia de Salamanca, y aquellos de las provincias limítrofes para los que el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca es hospital de referencia en hemato oncología pediátrica y trasplante de progenitores hematopoyéticos.

c) Muestra: Pacientes pediátricos, menores de 14 años, con diagnóstico de leucemia aguda atendidos en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca en los últimos 18 años (1996-2013)

d) Criterios de inclusión:

- Niños menores de 14 años en el momento del diagnóstico.
- Tener un diagnóstico confirmado de leucemia aguda pediátrica: todo paciente menor de 14 años con aspirado o biopsia de médula ósea donde más del 25% de las células nucleadas sean blastos.

e) Criterios de exclusión

- Niños mayores de 14 años.
- Pérdida de seguimiento.

f) Variables analizadas :

1. *Edad:* edad del paciente en años en el momento del diagnóstico de su leucemia.
2. *Sexo:* hombre / mujer.

3. *Año de diagnóstico*: fecha en que se llega al diagnóstico de su leucemia.
4. *País de origen* : país en el que nació el paciente.
5. *Raza*: caucásica, árabe, negra o amarilla.
6. *Antecedentes personales*: enfermedades que haya padecido el paciente hasta el momento del diagnóstico.
7. *Antecedentes familiares*: en este trabajo se han tenido en cuenta antecedentes familiares relativos a patología hemato-oncológica con un grado de parentesco de primer, segundo y tercer grado.
8. *Localidad y provincia* donde viven los pacientes en el momento del diagnóstico
9. *Medio rural o urbano*: clasificación de los pacientes acorde a la definición de la Ley del Desarrollo Sostenible del Medio Rural (LDSMR) como el “espacio geográfico formado por la agregación de municipios o entidades locales con población menor de 30.000 habitantes y densidad inferior a 100 habitantes /km²”.
10. *Peso al nacimiento*: peso en gramos atendiendo a la siguiente clasificación :
 - Recién nacido de peso elevado para su edad gestacional (RN PEEG): peso al nacimiento por encima de 2 desviaciones estándar (DS) o superior al P₉₀. En términos absolutos en un RN a término corresponde a un peso >4.000-4.500 g
 - Recién nacido bajo peso para su edad gestacional (RN BPEG) : peso al nacimiento inferior a 2 DS o inferior al P₃. En términos absolutos en un RN a término corresponde a un peso < .2.500 g
 - Recién nacido peso adecuado para su edad gestacional (RN PAEG): aquel que se encuentra entre los márgenes anteriormente descritos.
11. *Lactancia materna*: edad del paciente en meses hasta la que recibió alimentación con lactancia materna.

12. *Edad materna* en el momento de nacimiento del niño.
13. *Abortos maternos*: número de abortos sufridos por la madre, considerando “abortos de repetición” en aquellos casos en que había ocurrido en más de dos ocasiones.
14. *Profesión paterna*
15. *Guardería*: si el paciente ha acudido a la guardería en algún periodo.
16. *Animales*: convivencia con animales en el domicilio familiar .
17. *Calendario vacunación* : información sobre si el paciente en el momento del diagnóstico había recibido las vacunas de acuerdo a su calendario vacunal, y si le habían administrado alguna vacuna complementaria, teniendo en cuenta las diferencias de los propios calendarios en función del año y la comunidad autónoma del paciente.

La **Imagen 9** corresponde al calendario vacunal actualmente vigente de la Comunidad de Castilla y León.



Imagen 5 - Calendario Vacunal vigente en Castilla y León en el año 2014.

18. *Motivo de consulta* que condujo al diagnóstico de leucemia : síntomas que le motivaron a consultar en su centro de salud u hospital de referencia.

19. *Leucocitos al diagnóstico* : cifra de leucocitos por mm^3 en el hemograma del diagnóstico.
20. *Hemoglobina* : hemoglobina en g/dl en el hemograma en el momento del diagnóstico.
21. *Plaquetas*: cifra de plaquetas por mm^3 en el hemograma en el momento del diagnóstico.
22. *Tipo de leucemia* , atendiendo a las siguientes clasificaciones:
 - a) Clasificación FAB (Franco- Americana-Británica): Ver **Tabla II** en el capítulo de *Introducción*.
 - b) Clasificación WHO (World Health Organization): (**Tabla VII**).
 - c) Clasificación inmunológica: (**Tabla VIII**).

Tabla VII - Clasificación WHO (World Health Organization) de las neoplasias de precursores linfoides

Clasificación WHO de las neoplasias de precursores linfoides

Leucemia/linfoma linfoblástico B, no especificado

Leucemia/linfoma linfoblástico B con alteraciones genéticas recurrentes

Leucemia linfoblástica B con t(9;22)(q34;q11,2); BCR-ABL1

Leucemia linfoblástica B con t(v;11q23); reordenamiento del gen MLL

Leucemia linfoblástica B con t(12;21)(p13;q22); ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)

Leucemia linfoblástica B con hiperdiploidía

Leucemia linfoblástica B con hipodiploidía

Leucemia linfoblástica B con t(5;14)(q31;q32); IL3-IgH

Leucemia linfoblástica B con t(1;19)(q23;p13.3)

Leucemia/linfoma linfoblástico T

Tabla VIII – Clasificación inmunológica de las Leucemias Linfoblásticas Agudas

Clasificación inmunológica de las LLA

LLA de línea B: CD22+ y/ó CD79a+ y/ó CD19+

Pro-B (B-I): TdT+, CD10-, Ig citoplasma-, Ig membrana-, CD38+.

Común (B-II): TdT+, **CD10+**, Ig citoplasma-, Ig membrana-, CD38+

Pre-B (B-III): TdT+, CD10+/-, **Ig citoplasma +**, Ig membrana-, CD38+/-

B madura (B-IV): **CD20+**, TdT-, CD10-, Ig citoplasma-, **cadena ligera de superficie o citoplasmática+**, CD38-

LLA de línea T: CD3 de citoplasma +

Pro-T (T-I): CD7+, CD2-, CD5-, CD8-, CD1a-

Pre-T (T-II): CD2+ y/o CD5+ y/o CD8+, CD1a-, CD71+

T cortical: **CD1a+**, CD3 de superficie + o -, CD71-

T madura: CD3 de superficie+, CD1a-, CD2+, CD5+, CD4/8+

23. *Infiltración médula ósea al diagnóstico:* porcentaje de infiltración de células blásticas en el aspirado de médula ósea en el momento del diagnóstico. El diagnóstico de la LA se basa en la observación morfológica de $\geq 25\%$ de blastos .

24. *Citogenética:* se analiza el resultado de:

- Cariotipo convencional: será valorable un resultado de cariotipo cuando se hayan analizado un mínimo de 20 metafases.
- Estudio de FISH (Hibridización In Situ Fluorescente): para el estudio de las siguientes alteraciones con implicación pronóstica:
 - Sonda del gen MLL, que identifica sus reordenamientos.
 - Sonda del reordenamiento ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), que identifica a la t(12;21) .

- Sonda del gen TCF3 que detectará la t(1;19)

25. *Biología molecular*: mediante técnicas moleculares pueden detectarse diferentes genes de fusión con implicación pronóstica:

- *ETV6-RUNX1 (TEL-AML1)*, producto de la t(12;21)

- *MLL-AFF1 (MLL-AF4)*, producto de la t(4;11)

- *BCR-ABL*, producto de la t(9;22)

- *TCF3-PBX1 (E2A-PBX1)*, producto de la t(1;19).

26. *Índice de DNA*: estudio de la ploidía mediante citometría de flujo y clasificación de los pacientes en los siguientes grupos con implicación pronóstica.

- Menor de 0,8: corresponde a menos de 44 cromosomas (hipodiploidía).

- 1: se refiere a una dotación diploide, 46 cromosomas.

- 1-1,15: corresponde a 47-50 cromosomas (baja hiperdiploidía)

- 1,16-1,48: equivale a 51-67 cromosomas (alta hiperdiploidía)

- >1,48: implica casi tetraploidía (68-94 cromosomas)

27. *Masa mediastínica*: presencia o no de masa mediastínica (diagnóstico realizado por imagen: Rx torax y /o TAC torácico)

28. *Afectación del Sistema Nervioso Central (SNC)*: la afectación del SNC se define en base a la clínica, imágenes y/o el recuento celular y la citomorfología de LCR. Los pacientes se clasifican en tres grupos:

- SNC-1: ausencia de blastos en el líquido cefalorraquídeo (LCR).

- SNC-2: blastos en el LCR con menos de 5 leucocitos/ μ l y/o punción lumbar traumática (>10 eritrocitos/ μ l) o hemorrágica

- SNC-3: blastos en el LCR con más de 5 leucocitos/ μ l y/o afectación de pares craneales y/o masa tumoral en cerebro o meninges por imagen.

29. *Protocolo de tratamiento*: existen diferentes posibilidades de tratamiento teniendo en cuenta si pertenecen a corriente PETHEMA/SHOP, el grupo de riesgo, edad, año en que se inició el tratamiento y si se trata de una leucemia de nuevo diagnóstico o de una recaída.

- a) En las opciones del grupo SHOP desde el año 1989 hasta la actualidad, se han desarrollado cuatro protocolos terapéuticos sucesivos: LLA/SHOP-89, LLA/SHOP-94, LLA/SHOP-99 y LLA/SHOP-2005.
- b) Dentro del grupo PETHEMA encontramos tres protocolos diferentes, adaptados en función del riesgo de cada paciente: Pethema LLA 2001 de Bajo Riesgo , Pethema LLA 96 de Riesgo Intermedio y Pethema LLA Alto Riesgo 2005 .
- c) Los niños menores de un año siguen un protocolo específico para la leucemia en el lactante: LLA Lactantes. SHOP -2002

30. *Estadía de riesgo*: cada protocolo establece sus propios criterios de inclusión en cada grupo de riesgo por los que se pueden observar diferencias entre unos y otros. En este momento los criterios por los que se rige el protocolo vigente en nuestro país son los siguientes:

- **Riesgo Estándar**: el paciente debe reunir todos estos criterios.
 - Edad >1 y <10 años
 - Leucocitos <20 x10⁹/l al diagnóstico
 - Inmunofenotipo no T
 - Ausencia de infiltración del SNC y/o testes
 - Citogenética :
 - Alta Hiperdiploidía (51-67 cromosomas)
 - t(12;21) positiva
 - No t(1;19)

- No reordenamiento MLL
- Presencia de <1.000 blastos/ mm^3 en día +8 en sangre periférica
- Presencia de $< 5\%$ de blastos y $< 0,1\%$ de Enfermedad Mínima Residual (EMR) en médula ósea en día +15.
- **Alto Riesgo (AR):** el paciente debe cumplir al menos uno de estos criterios.
 - t(4;11) (MLL/AF4)
 - Hipodiploidía <44 cromosomas .
 - ≥ 1.000 blastos en día +8 en sangre periférica
 - $> 25\%$ de blastos y $>10\%$ de EMR en el día +15 de la Inducción, en médula ósea
 - EMR $\geq 1\%$ en el día +33 de la Inducción, en médula ósea.
 - EMR $\geq 0,1\%$ antes de la Consolidación, en médula ósea .
 - LLA Ph+
- **Riesgo intermedio:** engloba a aquellos pacientes que no puedan incluirse en ninguno de los dos grupos anteriores

31. *Respuesta a la prednisona:* valorada el día 8 del tratamiento, considerando como día 1 el día de la primera dosis de prednisona.

- a) Buena respuesta a la prednisona (PGR, *prednisone-good-responder*): el día 8 del tratamiento hay < 1.000 blastos absolutos/ μl en la sangre periférica.
- b) Mala respuesta a la prednisona (PPR, *prednisone-poor-responder*): el día 8 del tratamiento todavía existen ≥ 1.000 blastos absolutos/ μl en sangre periférica. Los pacientes con mala respuesta a la prednisona se clasifican en el grupo de alto riesgo.

32. *Respuesta al tratamiento el día +14*: se valora la respuesta al tratamiento con un aspirado de médula el día +14, redefiniendo el grupo de riesgo del paciente en función del resultado:

- a) Paciente de Riesgo Estándar con >5% de blastos en médula ósea el día +14 pasa a grupo de Alto Riesgo.
- b) Los pacientes de Alto Riesgo que en el día +14 del tratamiento presentan una cifra de blastos entre 5 y 10%, continuarán el mismo protocolo de alto riesgo, repitiendo el examen de médula ósea en el día +21. Si en día +21, la cifra de blastos en médula ósea es <5%, seguirán el protocolo de alto riesgo. Si la cifra de blastos es > 5% blastos, pasarán al grupo de muy alto riesgo.

33. *Remisión completa (RC)*, el paciente se encuentra en RC si cumple los siguientes criterios:

- Médula ósea normocelular o moderadamente hipocelular con <5% de células de morfología blástica con recuperación de parámetros de sangre periférica : Hb >10g/dl y/o reticulocitos >1%, neutrófilos >1 x10⁹/l y plaquetas > 100 x10⁹/l.
- Ausencia de masas/infiltrados leucémicos en examen físico y/o en imágenes.
- Ausencia de células leucémicas en LCR.

34. *Recaída*: En la **Tabla IX** se resumen las definiciones para el diagnóstico de recaída de LLA.

Tabla IX – Diagnóstico de recaída de Leucemia Linfoblástica Aguda

Tipo de recaída	Criterio de definición
MO aislada	Linfoblastos > 25% de células nucleadas en MO
SNC aislada	Células >5 / ul de LCR y linfoblastos en la extensión Masa intracerebral en TC/RMN (la biopsia puede ser necesaria)
Testicular aislada	Aumento de tamaño y /o consistencia de testes (confirmación por ecografía y biopsia)
Combinada	Afectación simultánea de dos o más localizaciones (la MO se considera infiltrada con > 5 % de linfoblastos)

35. *Trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH)*: el TPH es un procedimiento terapéutico que tiene la finalidad de implantar un sistema hematopoyético sano en sustitución del patológico. Como fuente de progenitores hematopoyéticos puede emplearse la sangre periférica (SP), la sangre de cordón umbilical (TSCU) o la médula ósea (MO).

En ocasiones es necesario realizarlo en pacientes con leucemia, bien como parte del protocolo de tratamiento inicial en aquellos pacientes con un riesgo elevado de recaída al diagnóstico o bien ser un procedimiento de rescate en aquellos que hayan sufrido una recaída.

36. *Supervivencia libre de evento (SLE)*: tiempo desde el diagnóstico hasta la presentación de un evento, ya sea la muerte de cualquier etiología, la recaída o la presentación de una segunda neoplasia.

37. *Supervivencia global (SG)* a 1, 5 y 10 años: tiempo desde el diagnóstico hasta la muerte de cualquier etiología.

38. *Situación en el momento actual (datos actualizados a febrero 2014)*: Registrar si el paciente se encuentra en Remisión Completa, ha sufrido una recaída o ha fallecido. Se entiende por RC una infiltración blástica medular inferior al 5% en presencia de un aspirado medular valorable, con celularidad normal y en ausencia de

infiltrados extramedulares y/o de sintomatología clínica de la enfermedad.

Para definir el concepto de RC se utiliza la Enfermedad mínima residual (EMR) que consiste en determinar la presencia de células leucémicas que no se detectan utilizando las técnicas habituales. Existen diferentes técnicas de estudio de la ERM como son la citometría de flujo multiparamétrica y las técnicas de biología molecular basadas en la reacción en cadena de la polimerasa.

El resultado se expresa como % de ERM. Se considera positivo cuando la ERM es $>0,1\%$ que equivale a 10^{-3} .

39. *Toxicidades de la quimioterapia:* la mayoría de los quimioterápicos producen síntomas comunes, tales como vómitos, aplasia medular o alopecia. Sin embargo algunos de ellos provocan síntomas más específicos del propio fármaco:

-VINCRISTINA: neuropatía periférica, estreñimiento.

-METOTREXATE: mucositis, fotosensibilidad, elevación transaminasas.

-MERCAPTOPURINA: hepatotoxicidad, hiperpigmentación.

-ETOPÓSIDO: reacciones anafilácticas, hipotensión.

-DOXORRUBICINA: cardiotoxicidad, mucositis, elevación transaminasas.

-CLOFARABINA: hipotensión, eritrodisestesia palmoplantar, mucositis, dolor extremidades y espalda, elevación transaminasas y bilirrubina, enfermedad veno-oclusiva.

-CITARABINA: fiebre, mucositis.

-CICLOFOSFAMIDA: cistitis hemorrágica.

-ASPARRAGINASA: hipersensibilidad, alteraciones en la coagulación, pancreatitis, elevación transaminasas-

g) **Instrumento de recolección:** la obtención de los datos se ha realizado a partir de las historias clínicas del archivo general del hospital y de los datos clínicos obtenidos en el seguimiento en las consultas de hospital de día.

h) **Procesamiento y análisis de datos:** se han procesado y analizado los datos en colaboración con la Dra. Purificación Galindo Villardón del Departamento de Estadística de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca. Hemos empleado los programas Microsoft Excel y SPSS y analizado los datos con el *Test exacto de Fisher* y la *Chi cuadrado de Pearson*..

i) **Aspectos éticos:**

Al ser informados los padres, tutores o representantes legales de los pacientes de las características de la enfermedad y los protocolos de tratamiento que serán empleados firman un consentimiento informado al respecto en el que se hace referencia al tratamiento de datos con fines médicos y de investigación.

RESULTADOS



4. RESULTADOS

4.1. FASE I. ANÁLISIS CLÍNICO-BIOLÓGICO DE NIÑOS CON LEUCEMIA

Tras llevar a cabo un estudio observacional, descriptivo, retrospectivo de los niños con diagnóstico de leucemia aguda ingresados en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca en los últimos 18 años (1996-2013) y analizar los datos de la muestra, hemos obtenido los siguientes resultados:

4.1.1. CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y DEMOGRÁFICAS.

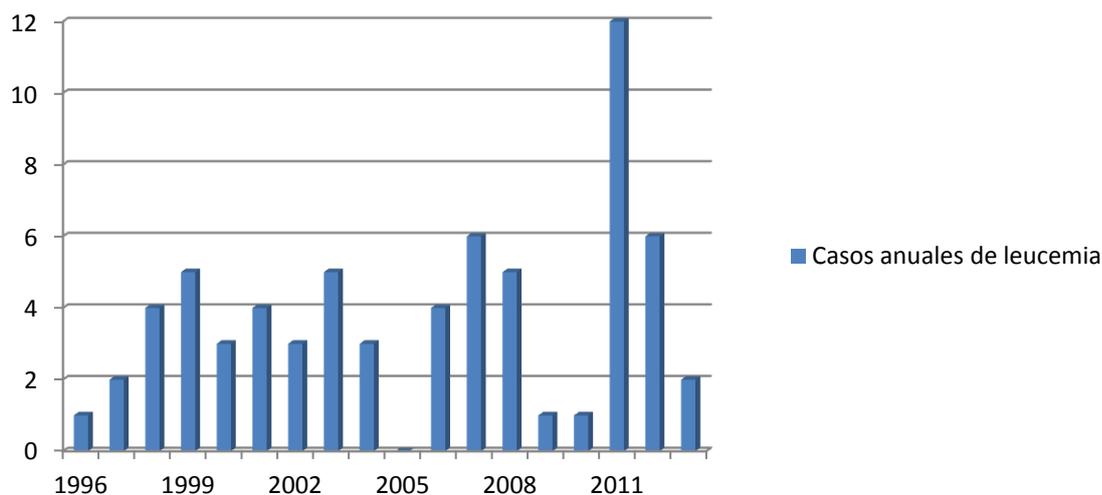
a) Tamaño muestral:

Han sido valorados 66 casos de niños con leucemia, correspondientes a 58 pacientes. De ellos, 57 niños habían sido diagnosticado por primera vez y en 9 casos se trataba de recaídas de su leucemia.

De los 66 casos se descartan tres pacientes que corresponden a leucemias crónicas, cumpliendo los 63 restantes los requisitos expuestos para su inclusión en el presente trabajo.

b) Incidencia:

El número de casos que ha sido atendido anualmente en nuestro centro ha oscilado de unos años a otros (**Gráfica 4**). En 2011 se llegó a un máximo de 12 pacientes diagnosticados, mientras que en 2005 no hubo ningún nuevo diagnóstico de leucemia pediátrica. En este periodo de 18 años (1996-2013) se encontró una incidencia media de 3,66 casos al año.



Gráfica 4 - Incidencia de leucemia en el Complejo Asistencial Universitario Salamanca entre 1996-2013

El número de casos de leucemia procedentes exclusivamente de la provincia de Salamanca fue de 32 pacientes en 18 años, lo que supone una incidencia de 1.77 casos anuales.

c) Edad

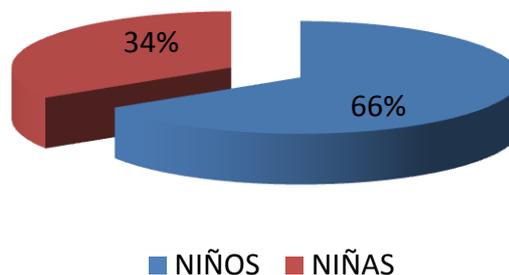
La edad de los pacientes de nuestro estudio varía desde los 6 meses a los 14 años, presentando una edad media en el momento del diagnóstico de 7,3 años con una desviación típica de 4.16 años y una mediana de 6.5 años. La edad de debut más repetida fue de 5 años.

Analizando por separado los pacientes con leucemia linfoblástica aguda de estirpe B y T y los que tienen leucemia mieloide aguda, encontramos grandes diferencias al dividirlos en dos grupos: entre 1 y 10 años (edades de menor riesgo) y <1 año y > 10 (edades de alto riesgo). En el conjunto de pacientes con leucemia linfoblástica aguda predominan los niños con edades comprendidas entre 1 y 10 años, representando el 75,6% de los pacientes diagnosticados de LLA. Mientras que en las leucemias mieloides vemos una proporción inversa, predominando los pacientes en edades de mayor riesgo (<1 año o > 10 años) en un 66,6% de los casos. Resultando estas diferencias estadísticamente significativas con un valor de p de 0,013.

Realizando el mismo análisis entre las leucemias linfoblásticas agudas de estirpe B y las T observamos también unos porcentajes inversos. En las LLA B predominan los niños con edad comprendida entre 1 y 10 años en un 84,2%, mientras que en las LLA T son los pacientes en edades de mayor riesgo, lactantes menores de un año o adolescentes de más de 10, los que conforman el 71,4% de este grupo. . Las diferencias encontradas son estadísticamente significativas con un valor de p de 0.002. Por último, hemos analizado las diferencias entre los pacientes *TELAML1* positivos, translocación más frecuente en leucemias pediátricas y asociada a un buen pronóstico, y los *TELAML1* negativos. Tan sólo el 13,3% de los niños con esta translocación pertenecen a edades de alto riesgo, frente al 42% de los que son *TELAML1* negativos, aunque no encontramos significación estadística (p valor: 0,052.)

d) Sexo

El 66% de los pacientes son varones frente a un 34 % de niñas (**Gráfica 5**).



Gráfica 5 - Sexo de los pacientes diagnosticados de leucemia

Hemos analizado las diferencias en cuanto al género entre los pacientes diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda de estirpe B y T y de leucemia mieloide aguda, predominando en todos los casos los varones, aunque en diferentes proporciones, 1:1,2 en las leucemias mieloides y 1:2,2 en el caso de las leucemias linfoblásticas, sin embargo las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.

e) País de origen y raza

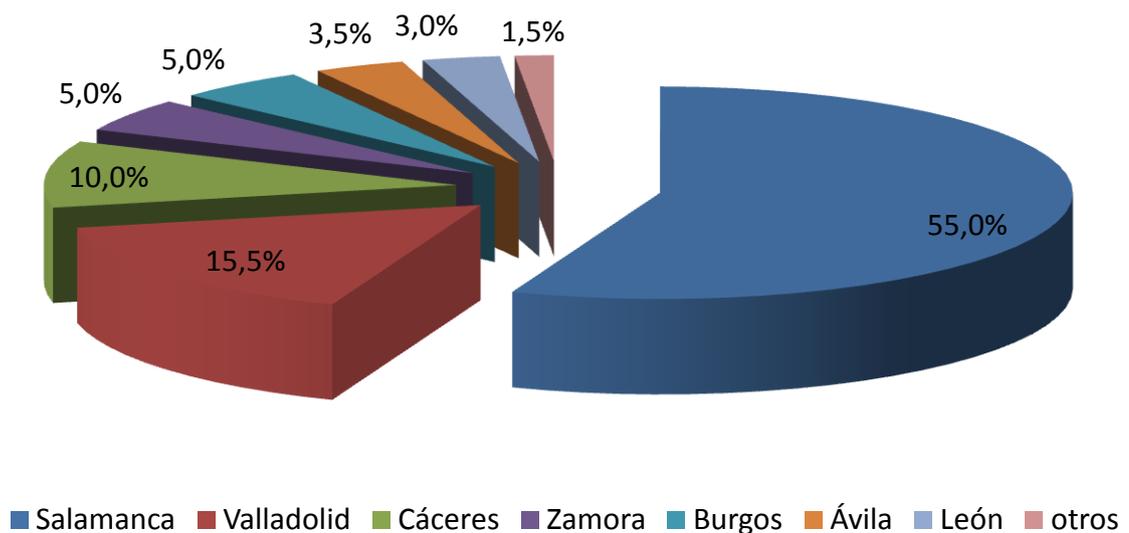
Tan sólo dos pacientes habían nacido fuera de España, siendo originarios de Guinea Ecuatorial y Pakistán. Sin embargo los padres de 6 de ellos eran de origen árabe, colombiano y marroquí.

En cuanto a los rasgos raciales, salvo 4 pacientes árabes el resto son caucásicos.

f) Provincia de origen

El 98.5% de nuestros pacientes proceden de la comunidad autónoma de Castilla y León y del norte de Extremadura.

El 55% del total pertenecen a la provincia de Salamanca (29 % son de la capital y 25% del resto de la provincia), 15,5% fueron derivados desde Valladolid (8,6% capital y 6,9% provincia), 10% de Cáceres; 5% de Zamora; 5% de Burgos; 3,5% de Ávila; 3,5%, de León y 1,5% de otras provincias (**Gráfica 6**).



Gráfica 6 - Provincias de origen de los pacientes

g) Medio rural o urbano :

Atendiendo a la clasificación de la Ley del Desarrollo Sostenible del Medio Rural (LDSMR) un 42 % pertenecían al medio rural frente al 58% que vivían en el medio urbano.

h) Antecedentes personales

De los 58 pacientes estudiados prácticamente todos ellos referían antecedentes de infecciones en los meses previos, con mayor frecuencia de catarros de vías altas y bronquitis. Un 21% habían pasado la varicela.

i) Antecedentes familiares:

El 71 % de los niños con leucemia referían antecedentes familiares de primer, segundo y/o tercer grado con patología oncológica, con un ligero predominio en la rama paterna sobre la materna, y el 10% de ellos antecedentes de leucemia.

Cabe destacar que dentro de nuestra muestra encontramos dos hermanos gemelos que desarrollaron leucemia con una diferencia temporal de 6 meses entre ambos.

El primer gemelo desarrolló la enfermedad a la edad de 2,5 años y el segundo con 3 años. En cuanto a sus antecedentes familiares encontramos que un tío materno había padecido leucemia aguda.

En ambos hermanos las leucemias presentaron similares características: las dos eran linfoblásticas B común, TEL- AML 1 positivo, tenían un índice ADN de 1, una cifra superior a 50.000 leucocitos/mm³ al diagnóstico, y los dos casos fueron clasificados dentro de la categoría de alto riesgo.

El primer gemelo desarrolló además un segundo tumor, un linfoma T mediastínico, por lo que precisó trasplante de progenitores hematopoyético autólogo, y como complicaciones presentó reactivación de citomegalovirus (CMV) y virus de varicela, mientras que el tratamiento de la enfermedad de su hermano transcurrió sin incidencias. Ambos se encuentran en remisión completa tras 15 años del diagnóstico.

j) Peso al nacimiento :

Nuestros pacientes referían un peso medio al nacimiento de 3381g, con un rango que varía desde los 2400g a los 4300g.

La mitad de nuestros pacientes tenía un peso superior a 3500 g, el 30 % pesaban más de 3800 g y el 5,5 % sobrepasaba los 4000 g.

k) Lactancia materna

De acuerdo a lo manifestado por las madres un 15,7 % de los niños tuvieron desde el nacimiento lactancia artificial frente a un 84,3% que siguieron una lactancia materna (exclusiva o mixta). La duración del período de lactancia materna fue muy variable, superando los 6 meses en un 44,7 % y los 12 meses en un 18,4% de los niños.

l) Edad materna

La edad de las madres en el momento del nacimiento del niño que presentaría leucemia fue muy variable, con un rango de edades desde 18 a 44 años. La edad media fue de 29,34 años, con una desviación estándar de 6,42 y una mediana de 28 años. La edad más frecuente fue la de 22 años y el porcentaje de madres mayores de 35 años en nuestra muestra fue del 20 %.

m) Abortos maternos

Existe controversia a la hora de relacionar una historia repetida de pérdida fetal con el aumento del riesgo de tener descendencia con leucemia ^{78, 117, 158}.

Encontramos que 29 madres de pacientes referían no haber sufrido ningún aborto, 6 haber abortado en una ocasión, 2 madres dos veces y una madre había tenido previamente tres abortos. En el resto de los casos no se han encontrado datos al respecto.

n) Calendario de vacunación :

En cuanto al estado de inmunización de los pacientes, sólo uno refería no estar vacunado. En 8 casos no se especificaba el estado de su vacunación y el resto habían sido vacunados de manera correcta según el calendario vacunal.

o) Profesiones paternas:

La profesión de los padres de niños con leucemia fue muy diversa (agricultor, comercial, profesor, responsable supermercado, pintor, abogado, policía, soldador, médico) sin observar mayor frecuencia de ninguna de ellas.

p) Guardería:

Hasta el 50 % de los niños habían acudido durante algún periodo a la guardería. En caso contrario manifestaron haber sido cuidados por abuelos y/o por la madre al no trabajar fuera del domicilio.

q) Animales

En cuanto a la convivencia con animales el 40 % de los niños refería tener alguna mascota en el hogar (canarios, peces, gato, perro, tortugas...)

4.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y MOLECULARES DE LA MUESTRA

a) *Motivo de consulta :*

La **Tabla X** recoge los principales motivos que llevaron a los pacientes a consultar en su centro de salud o en su hospital de referencia y que originaron el diagnóstico de leucemia.

Tabla X - Motivos de consulta más frecuentes de los pacientes con diagnóstico de leucemia

Motivos de consulta en la LLA	
Fiebre	43%
Petequias	38%
Adenopatía	69,9%
Hepatoesplenomegalia	74%
Dolor en extremidades inferiores, cojera	15%
Palidez	17%
Astenia	35%
Anorexia	20%
Pérdida de peso	15%

Otros síntomas que presentaron en su debut fueron: catarro vías altas, tos, lesiones cutáneas, insuficiencia respiratoria, síncope, hematuria macroscópica y coagulación intravascular diseminada (CID).

Cabe destacar que en el subgrupo de las recaídas, donde exceptuando el caso de un paciente que refería astenia importante y anorexia, el resto fueron diagnosticados en un control rutinario de médula ósea.

b) Alteraciones en el hemograma:

Ante una sospecha clínica de leucemia la primera prueba complementaria a realizar que nos aportará información esencial para el diagnóstico es un hemograma. Las principales alteraciones encontradas en el hemograma de los pacientes con leucemia se resumen en la siguiente tabla (**Tabla XI**):

Tabla XI - Alteracione en el hemograma de los pacientes con leucemia

Alteraciones en el hemograma	
Leucocitosis > 50.000 /mm ³	26%
Hemoglobina < 10 g	73,5%
Hemoglobina < 7 g	37.7%
Trombocitopenia < 100.000	68,5%
Trombocitopenia < 20.000	25,9%

Analizamos la incidencia de hiperleucocitosis en los pacientes con distintos tipos de leucemia, hallando hiperleucocitosis en el 31,1% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda vs un 11% de los niños con leucemia mieloblástica aguda, y en un 57,1 % de los enfermos con LLA de estirpe T frente a un 26,3% de los que tenían una LLA B; sin encontrar significación estadística en ambos casos.

c) Masa mediastínica:

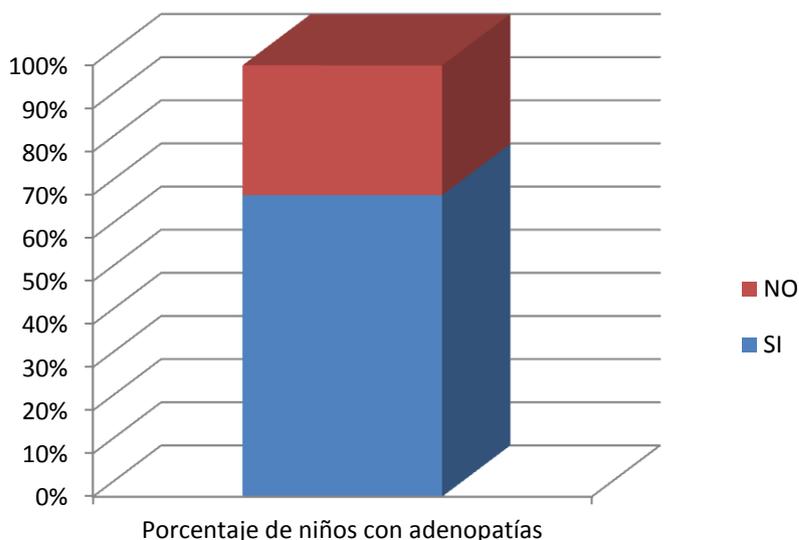
Las masas mediastínicas son poco frecuentes en pediatría y en casi todos los casos son debidas a procesos hematológicos malignos. La mitad de pacientes que presentan masas mediastínicas están asintomáticos al diagnóstico, pero en algunos casos pueden debutar con ortopnea, distrés respiratorio agudo o estridor. Los niños con masas mediastínicas tienen más riesgo de desarrollar complicaciones respiratorias, por lo que previamente a la realización de cualquier sedación, es importante descartarla en el contexto de una leucemia.

En un 8,9 % de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda se encontró una masa mediastínica, siendo en todos los casos pacientes con LLA de estirpe T.

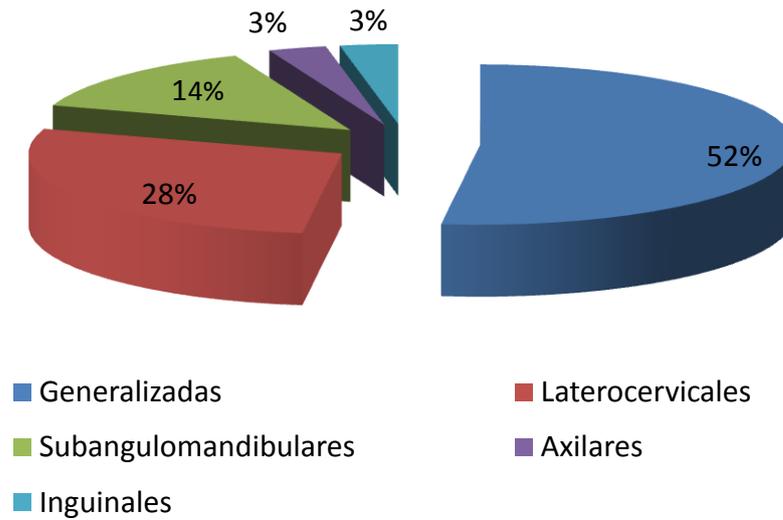
Dentro del subgrupo de pacientes con diagnóstico de leucemia linfoblástica T, el 62, 5% de ellos tenían una masa mediastínica.

d) Adenopatías y hepatoesplenomegalia

Encontramos adenopatías en la exploración física en el 69,9 % de los niños (Gráfica 7). En la mayoría de los casos se trataba de adenopatías generalizadas, en aquellos pacientes que se encontraban circunscritas a una sola región predominaban las adenopatías laterocervicales, en un 28% de ellos, subangulomandibulares en el 14% y con menor frecuencia se trataba de adenopatías inguinales y axilares (3%) (Gráfica 8).

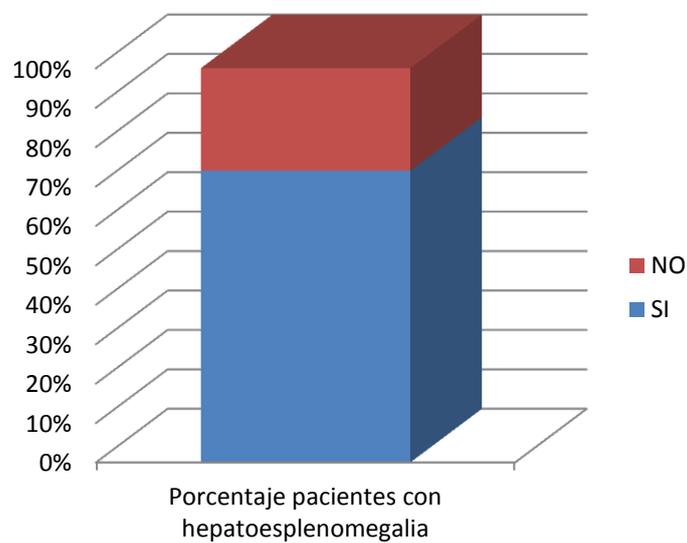


Gráfica 7 - - Porcentaje de pacientes de nuestra muestra que presentaban adenopatías en la exploración física



Gráfica 8 - Localización de las adenopatías en niños con leucemia.

Continuando con la exploración física de los pacientes, encontramos un 74 % de niños con hepatoesplenomegalia (**Gráfica 9**).

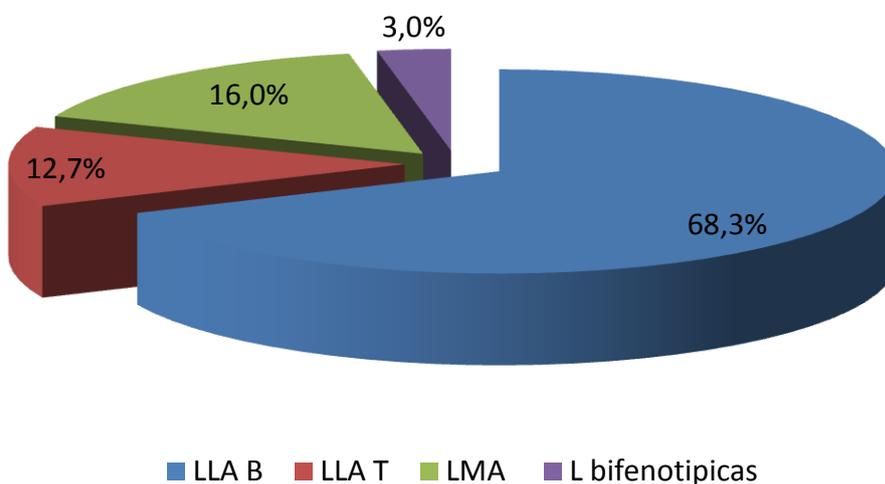


Gráfica 9 - Porcentaje de pacientes que presentaban hepatoesplenomegalia en la exploración física

e) Tipo de leucemia

Los 66 casos de leucemia corresponden a 63 leucemias agudas y 3 leucemias crónicas. En el conjunto de las leucemias agudas se observó la siguiente distribución (Gráfica 10) :

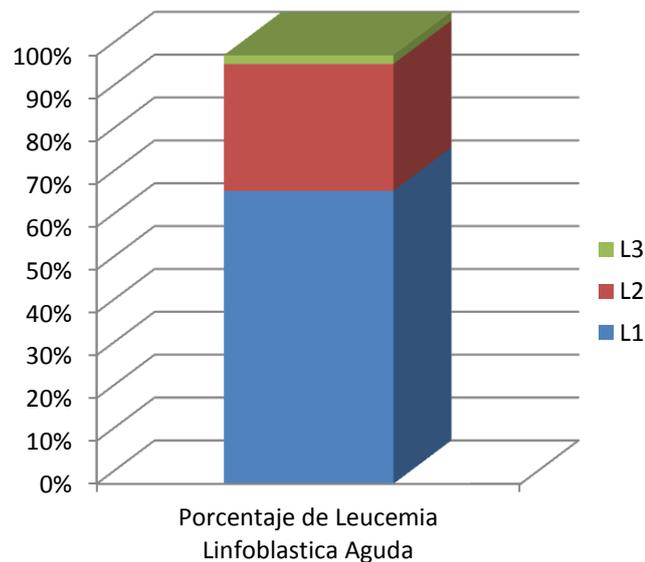
- Leucemia linfoblástica aguda (LLA): tipo de leucemia más frecuente, con un 81% del total. De las cuales un 68,3% corresponden a leucemias linfoblásticas de tipo B (LLA B) y un 12,7% a leucemia linfoblástica de estirpe T (LLAT)
- Leucemia mieloblástica aguda (LMA): 16 % de los casos.
- Leucemia bifenotípica 3%.



Gráfica 10 - Porcentaje de los distintos tipos de leucemias agudas encontradas.

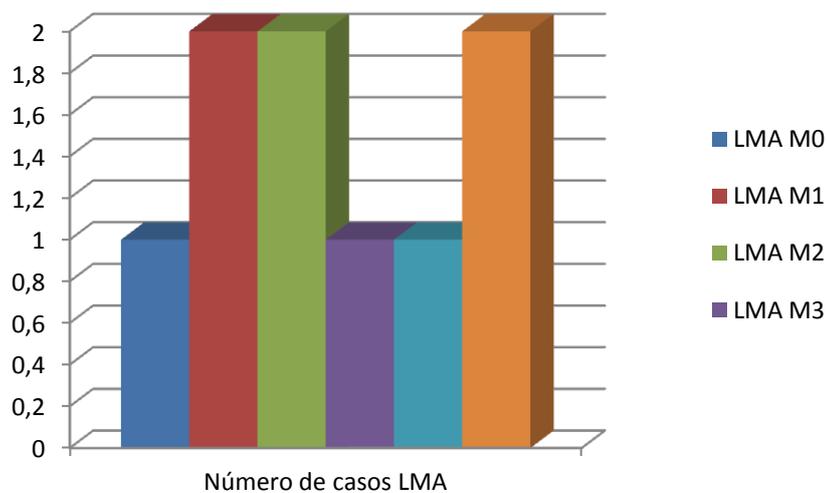
f) Morfología:

Atendiendo a su morfología las leucemias linfoblásticas estudiadas pudimos clasificarlas en tres subtipos: un 69 % de L1, 29 % de L2 y un 2% eran L3 (**Gráfica 11**)



Gráfica 11 - Clasificación morfológica de las leucemias linfoblásticas agudas.

Los 9 casos de leucemia mieloide aguda que encontramos entre nuestros pacientes se distribuyeron atendiendo a su morfología según se muestra en la **Gráfica 12**.



Gráfica 12 - Clasificación morfológica de las leucemias mieloblásticas agudas

- Dentro de nuestra serie encontramos un paciente con una leucemia mieloblástica aguda sin diferenciación (LMA M0), sus blastos no expresan mieloperoxidasa (MPO) en grado microscópico ligero, aunque pueden mostrar gránulos característicos en una microscopía electrónica. La clasificación de M0 supone que los blastos leucémicos no deben mostrar características morfológicas o histoquímicas específicas.
- Dos pacientes presentaban una leucemia mieloblástica aguda con diferenciación mínima (LMA M1), pero con expresión de mieloperoxidasa.
- Otros dos pacientes con leucemia mieloblástica aguda con diferenciación (LMA M2).
- Por último un paciente se diagnosticó de leucemia promielocítica aguda (LMA M3) y otro de leucemia mielomonocítica aguda (LMA M4).

g) Infiltración blástica de la médula ósea al diagnóstico:

En todos los casos se realizó un aspirado de médula ósea (AMO) a los pacientes, lo que permitió llegar al diagnóstico definitivo de leucemia. El porcentaje de infiltración que encontramos en los AMO realizados fue de una media de 79,8 % y una mediana de 90%. Por lo tanto la mitad de los pacientes tenían al diagnóstico una infiltración blástica superior al 90%, lo que justifica la mayoría de los síntomas presentados.

h) Translocaciones cromosómicas:

El estudio de las translocaciones cromosómicas se ha realizado con dos tipos de técnicas: biología molecular y/o citogenética. En algunos casos se han realizado ambas, consiguiendo una mayor sensibilidad, y en otros pacientes el estudio se ha realizado sólo por una de las dos, en función de la disponibilidad de cada momento.

En cuanto al tipo de translocaciones encontradas en los niños diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda hemos observado las siguientes (**Tabla XII**):

- ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), producto de la t(12;21) : positiva en un 34,1 % de los niños.
- MLL-AF4, producto de la t(4;11) : encontrada en el 6% de los casos.
- BCR-ABL, producto de la t(9;22) : 3% de nuestros pacientes
- E2A-PBX1, producto de la t(1;19): 3,8% de nuestros niños

Tabla XII - Translocaciones encontradas entre los pacientes con leucemia linfoblástica aguda .

Tipo de traslocación	Porcentaje de pacientes
ETV6-RUNX1 (TEL-AML1),	34,1%
MLL-AF4	6%
BCR-ABL,	3%
E2A-PBX1,	3,8%

En niños con leucemia mieloide aguda las anomalías cromosómicas son marcadores importantes de riesgo, estas anomalías se identifican aproximadamente en el 75% de casos.

En nuestros pacientes hemos encontrado las siguientes anomalías moleculares:

- NPM1+: mutación de la nucleofosmina.
- t(15,17): traslocación t(15,17).
- inversión cromosoma 16.
- monosomía del cromosoma 7.

Por otra parte cabe destacar que todos los casos de las LMC son Philadelphia+.

i) Índice de DNA

En todos los pacientes con leucemia linfoblástica se realiza estudio de la ploidía mediante citometría de flujo, dado que tiene implicación pronóstica.

En la muestra de los pacientes diagnosticados de LLA encontramos que un 24,3% de ellos eran hiperdiploides con más de 50 cromosomas (alta hiperdiploidía), lo que corresponde a un índice de ADN superior a 1,16.

Un 10 % pertenecían al grupo de baja hiperdiploidia, teniendo entre 47-50 cromosomas (índice de ADN entre 1-1,15).

El conjunto más numeroso fue el de pacientes con 46 cromosomas, que corresponde a una dotación diploide, con un índice de ADN de 1, en el que incluimos al 62.7% de los pacientes.

Tan sólo un 3% de los pacientes pertenecían al grupo de hipodiploides por tener menos de 44 cromosomas, considerado el de peor pronóstico.

j) Afectación del sistema nervioso central (SNC)

La afectación del SNC está presente en menos de un 5% de los casos, y pocas veces es evidente la sintomatología. Puede manifestarse como cefalea, náuseas, vómitos, irritabilidad, rigidez nuchal, papiledema y afectación de pares craneales (III, IV, VI y VII) ³⁹. En 3 pacientes (4,5 % de nuestros casos) existía afectación del sistema nervioso central. En la **Tabla XIII** se reflejan las características de cada paciente :

Tabla XIII - Características clínico-biológicas de los pacientes que presentaron afectación del SNC.

	Tipo de LA	Alteraciones cromosómicas	Evolución
Mujer 13 años	Debut de LLA B	E2A/PBX1 (t(1,19) positivo)	Fallece
Mujer 1 año	Recaída de LLA T	No alteraciones	Fallece
Varon 5 años	Recaída de LLA B	No alteraciones	Fallece

4.1.3. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO, PRONÓSTICO Y COMPLICACIONES

a) *Protocolos de tratamiento*

Los tratamientos de la leucemia suelen ser prolongados. En el caso de la leucemia linfoblástica aguda, leucemia pediátrica más frecuente, tienen una duración aproximada de dos años. Consisten en la administración seriada de varios bloques de quimioterapia: *Inducción*, para inducir a la remisión, *Consolidación*, de la respuesta obtenida, y *Mantenimiento* de la remisión completa.

En nuestra serie de pacientes predomina la corriente del grupo SEHOP, debido a que en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca se emplearon sus protocolos en un 79,3% de los niños tratados.

El tratamiento que han recibido está adaptado a su riesgo de recaída, y en el caso de los pacientes con leucemia linfoblástica, que suponen el 81% de la muestra, ha consistido en los siguientes esquemas terapéuticos:

- Los pacientes incluidos en el grupo de menor riesgo, en este protocolo considerado “Riesgo Estándar”, han recibido una *Inducción* basada en daunorrubicina, vincristina, prednisona, ciclofosfamida y asparraginasa; una *Consolidación* que ha consistido en metotrexato, citarabina y mercaptopurina; y un *Mantenimiento* inicial con prednisona, metotrexato, mercaptopurina y vincristina. , En todos los casos con su correspondiente quimioterapia intratecal
- Por otra parte, los pacientes de Alto y Muy Alto Riesgo han recibido un tratamiento más intensificado, basado en los mismos fármacos con algunas variaciones en sus esquemas de administración, y realizando en caso necesario un trasplante de progenitores hematopoyético .

Un 17,2% de los pacientes han seguido tratamientos del grupo PETHEMA, también adaptados en función del riesgo. Como norma general estos esquemas terapéuticos se dividen en *Inducción*, *Consolidación*, *Reinducción* y *Mantenimiento*. Consisten en la misma base de quimioterápicos que los tratamientos anteriores, con algunas variaciones .

Finalmente en un 3,4% de los niños se siguió un protocolo específico para la leucemia en el lactante, dado el elevado riesgo que presentan los niños menores de 1 año con leucemia, que poseen características propias y se benefician de un tratamiento específico para ellos .

b) Clasificación del riesgo

Es difícil establecer una comparación entre los pacientes que pertenecen a uno u otro grupo de riesgo dado que los distintos protocolos presentan criterios diferentes. Además en ocasiones se realiza una reclasificación en momentos puntuales del tratamiento en función de la respuesta al mismo, por lo que el grupo de riesgo inicial puede ser modificado.

No obstante, si equiparamos ambos protocolos haciendo una clasificación de todos los pacientes en tres grupos de riesgo comunes (**Tabla XIV**), tenemos que en el grupo de más alto riesgo incluiríamos un 22,7 % de los pacientes, en el de riesgo intermedio un 63,6% y en el grupo de menor riesgo tan sólo un 13,6% de los niños diagnosticados .

Tabla XIV Tabla de clasificación en tres grupos de riesgo de los pacientes con leucemia .

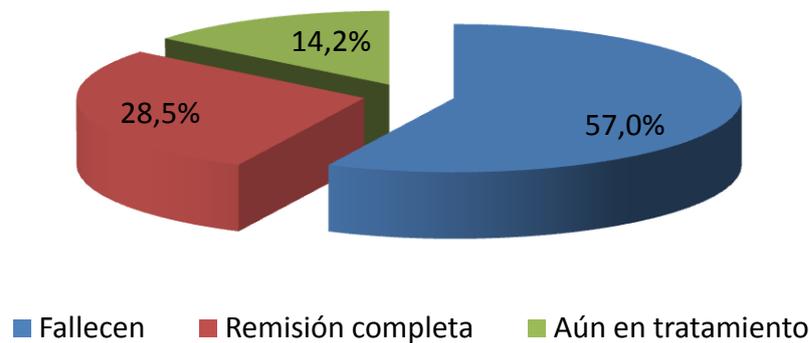
	Pacientes(n)	Pacientes(%)
Riesgo estándar	9	13,6%
Riesgo intermedio	42	63,6%
Alto riesgo	15	22,7 %

c) Respuesta a la prednisona

La respuesta a la prednisona, que es la base del tratamiento de inducción de la LLA, se determina en el día 8 del tratamiento, realizándose el recuento absoluto de blastos en sangre periférica, siendo el día 1 el primer día de administración de la prednisona. Se trata de uno de los factores pronósticos de mayor importancia.

En nuestra serie siete pacientes presentaron mala respuesta dado que el día 8 del tratamiento todavía tenían ≥ 1.000 blastos absolutos/ μl en sangre periférica. A todos ellos se les consideró de alto riesgo y se intensificó el protocolo de tratamiento según correspondiera.

De estos siete pacientes han fallecido cuatro, dos se encuentran en remisión completa y uno aún continúa en la fase de mantenimiento (**Gráfica 13**).



Gráfica 13 - Evolución de los pacientes con mala respuesta a la prednisona

Como podemos observar en nuestros resultados presentar mala respuesta a la prednisona implica un peor pronóstico con mayor riesgo de fallecimiento, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con un p-valor <0.01

d) Remisión completa (RC) tras el tratamiento

En el 93 % de los pacientes con debut de leucosis se consiguió una primera remisión completa inicialmente tras el tratamiento, y el 80% de los niños en recaída alcanzaron una segunda remisión completa. Tan sólo encontramos 6 pacientes que no lograron remisión completa tras el tratamiento de primera línea: 4 pacientes con debut de leucemia y 2 de ellos en recaída.

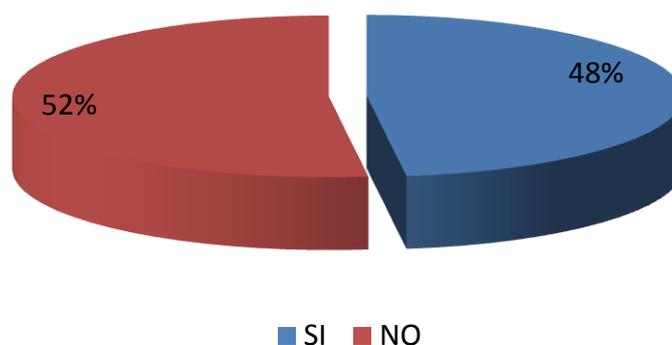
- Los dos pacientes que se encontraban en recaída fallecieron en el momento de la inducción por progresión de la propia enfermedad refractaria al tratamiento.

- De los cuatro pacientes con nuevo diagnóstico de leucemia aguda un paciente falleció en la inducción por complicaciones, presentando aspergilosis invasiva y coagulación intravascular diseminada. Los otros tres casos desarrollaron refractariedad teniendo que recurrir a tratamientos de segunda línea con clofarabina. Dos pacientes también fueron refractarios a clofarabina necesitando tratamiento de tercera línea.
- De todos ellos sólo ha sobrevivido un paciente, que tras tratamiento de segunda línea con clofarabina y haber recibido un trasplante de progenitores hematopoyético, se encuentra en RC a los 3 años del diagnóstico.

Como reflejan los resultados encontrados el pronóstico de los niños con leucemia refractarios al tratamiento de primera línea es muy pobre. Podemos afirmar que la refractariedad al tratamiento estándar implica un peor pronóstico. En estos pacientes, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre aquellos que alcanzan la remisión completa y los que no, con un p -valor <0.01 .

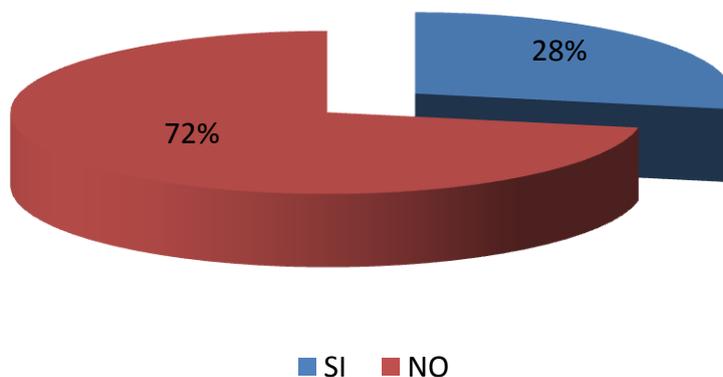
e) *Trasplante de progenitores hematopoyéticos*

En los pacientes pediátricos con leucemia de muy alto riesgo, en recaída o con refractariedad a los tratamientos estándar tiene cabida el trasplante de progenitores. En nuestra muestra de pacientes prácticamente la mitad, el 48% del total, recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos (**Gráfica 14**).



Gráfica 14 - Porcentaje de pacientes trasplantados del total de pacientes con leucemia

Si analizamos los datos teniendo en cuenta tan sólo a los pacientes originarios de la provincia de Salamanca encontramos 9 casos de pacientes trasplantados de un total de 32 (28%)(Gráfica 15).

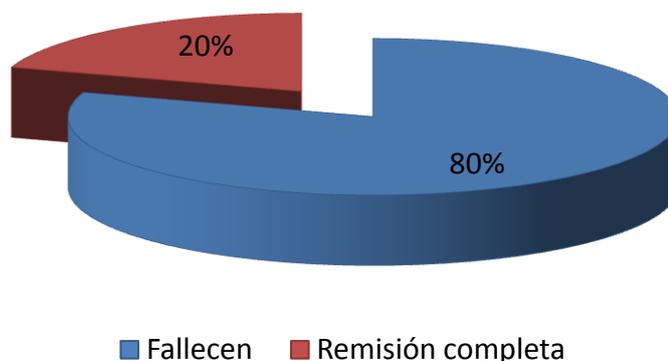


Gráfica 15 - Porcentaje de pacientes trasplantados de niños con leucemia en la provincia de Salamanca

f) Recaída:

Del total de 58 pacientes diagnosticados de leucemia han recaído 10 de ellos, lo que supone un 17,2%. De éstos un niño siguió tratamiento en otro centro, por lo que en nuestra serie hay datos de 9 pacientes.

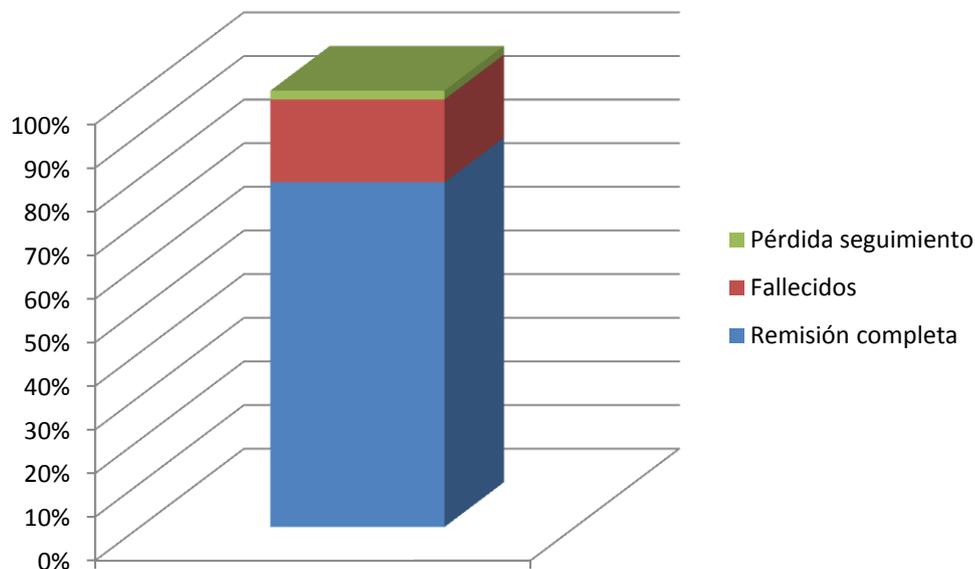
Analizando el pronóstico de los pacientes que habían recaído observamos que tan sólo el 20% se encuentran en remisión completa, habiendo fallecido el 80% (Gráfica 16).



Gráfica 16 - Pronóstico de los pacientes en recaída.

g) Situación en el momento actual (datos actualizados en febrero 2014):

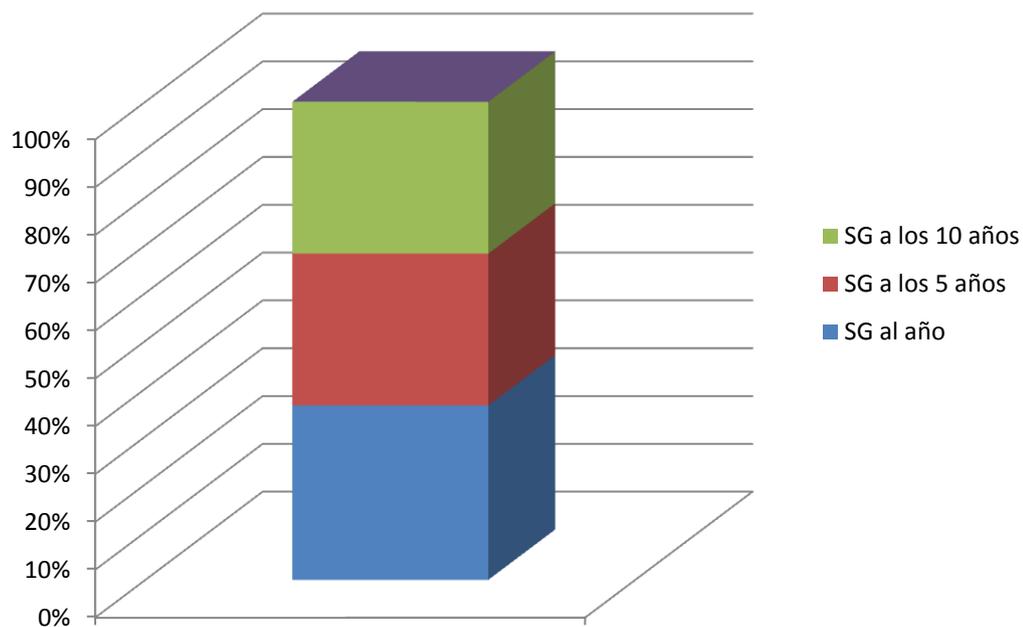
En el momento actual, de los 58 pacientes que componen nuestra muestra, 46 de ellos se encuentran en remisión completa de su enfermedad (79,3%) y 11 han fallecido (18,9%). Hemos tenido un caso de pérdida de seguimiento del que desconocemos su evolución(1,7%) (**Gráfica 17**).



Gráfica 17 - Situación actual de los pacientes con leucemia de nuestra muestra

h) Supervivencia Global (SG) y Supervivencia Libre de Evento (SLE):

Hasta la fecha han fallecido 11 pacientes, lo que supone un 18,9% del total de niños con leucemia. De éstos, 4 fallecieron antes del primer año del diagnóstico, por lo que encontramos una supervivencia global (SG) al año del 93,1%. A los 5 años habían fallecido los 11 pacientes, encontrando una SG a los 5 años del 81 %. Ningún niño falleció después de 5 años tras el diagnóstico. (**Gráfica 18**).

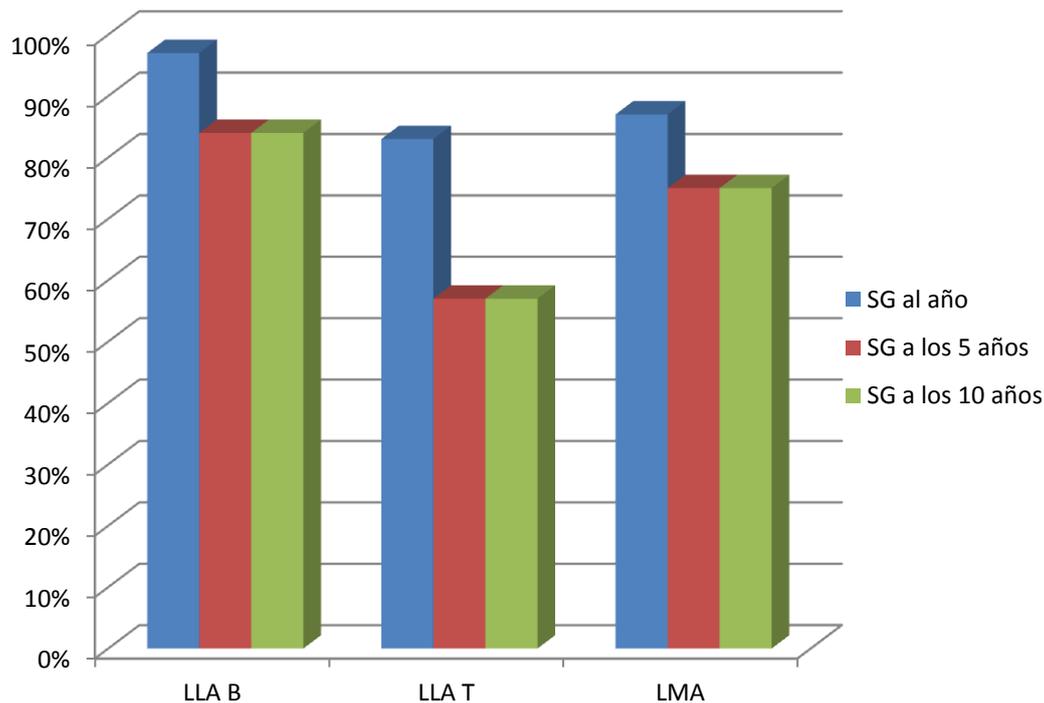


Gráfica 18 – Supervivencia global al año, 5 años y 10 años en niños con leucemia

Analizando por separado el conjunto de pacientes con leucemia mieloide aguda, debido a que presentan un peor pronóstico, se observa una supervivencia global al año de 87,5% y a los 5 y 10 años del 75 %. Sin embargo las diferencias con la supervivencia global en las LLA no son estadísticamente significativas.

Por otro lado, si separamos en dos grupos al conjunto de niños con LLA encontramos los siguientes resultados:

- los pacientes con LLA- B presentan una SG al año de 97,2% frente a un 83,3% en los que tienen LLA- T.
- Si valoramos la SG a los 5 y 10 años encontramos un 84,3 % entre los pacientes de estirpe B y un 57,1% en los que presentaban inmunofenotipo T, siendo las diferencias estadísticamente significativas con un p valor de 0,007 (**Gráfica 19**).



Gráfica 19 - Supervivencia global al año, 5 años y 10 años de los tres tipos más frecuentes de leucemia infantil.

La supervivencia libre de evento (SLE) al año en el total de la muestra fue del 89,4%, ligeramente inferior al 93,1% de supervivencia global dado que dos pacientes se encontraban ya en recaída en este periodo, y a los 5 y 10 años del 81%.

El 46,5 % de los niños han seguido revisiones periódicas durante 10 años o más.

i) Toxicidad del tratamiento e infecciones

- La toxicidad de la quimioterapia, más allá de los propios efectos secundarios descritos que aparecen en la práctica totalidad de los pacientes, es diferente en función del fármaco empleado y la susceptibilidad del propio paciente.
 - En la mayoría observamos mucositis, principalmente secundaria al tratamiento con doxorubicina, metrotexante o citabarina.
 - En 7 casos encontramos toxicidad por asparraginas: cuatro pacientes presentaron una reacción de hipersensibilidad a nivel local, y uno anafilaxia, otro paciente tuvo una pancreatitis y el

séptimo presentó trombosis del seno venoso, probablemente también secundaria a coagulopatía por este mismo fármaco.

- Varios los fármacos empleados en el tratamiento de los distintos tipos de leucemias pueden producir elevación de las transaminasas, como el metotrexate, los corticoides, la asparaginasa, la doxorubicina, o la clofarabina. La hipertransaminasemia, en algún momento del tratamiento, fue observada en 8 de nuestros pacientes.
- La osteoporosis, pérdida de masa ósea superior a 2,5 desviaciones estándar de la normalidad, fue observada en 5 pacientes. La normalidad viene definida en la población pediátrica por los Z scores que establecen la masa ósea esperada para una población concreta definida por sexo y edad. Puede aparecer al diagnóstico, durante el tratamiento y/o mantenerse hasta 20 años después de la finalización del tratamiento¹²⁷. Las causas en pacientes con LLA son multifactoriales, incluyendo la invasión ósea por células leucémicas, el uso de corticoesteroides en el tratamiento de la LLA y más frecuentemente secundario al corticoide empleado en el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (EICH) en aquellos pacientes que lo desarrollaron tras someterse a un trasplante de progenitores hematopoyéticos alogénico, o el metotrexate que inhibe los osteoblastos y activa los osteoclastos. El descenso de la actividad física así como déficits nutricionales que implican alteraciones en el metabolismo del calcio, vitamina D o magnesio juegan también un gran papel. El sexo femenino y la raza caucásica son factores de riesgo adicionales.
- Las infecciones, aunque no pueden considerarse como un efecto tóxico del tratamiento quimioterápico, en parte son secundarias a la propia inmunosupresión que genera la leucemia, y en muchas ocasiones son consecuencia de la inmunodepresión secundaria a los fármacos empleados en el tratamiento. En nuestros pacientes encontramos:

- Aspergilosis: 4 casos de aspergilosis pulmonar, uno de ellos con afectación cerebral.
- Infecciones del catéter: más de la mitad de los pacientes en algún momento del tratamiento han sufrido algún episodio febril que se ha relacionado con infección del reservorio. Los gérmenes implicados con más frecuencia son: estafilococos coagulasa negativos (SPCN), gram negativos y candida.
- Encontramos 5 casos de sepsis por gérmenes gram negativo documentadas microbiológicamente: 2 por E.coli , 2 por Klebsiela y un paciente con infección por Pseudomona.
- Otras infecciones que presentaron fueron:
 - Infecciones respiratorias por virus respiratorio sincitial (VRS), virus influenza A o neumocistis.
 - Infecciones víricas por Virus Varicela Zoster (VVZ) o parvovirus.
 - Infecciones bacterianas: Clostridium difficile y osteomielitis.

j) Otras complicaciones

La leucemia aguda es una patología que causa una importante morbimortalidad. Los pacientes con leucemia pueden presentar complicaciones potencialmente muy graves, como son el síndrome de lisis tumoral, la leucostasis o la coagulación intravascular diseminada (CID) secundarias a hiperleucocitosis.

Aunque la cifra es arbitraria y en cada tipo de leucemia el valor crítico de leucocitos es diferente, en LMA un valor de leucocitos de $50 \times 10^9/l$ puede causar síntomas severos, mientras que pacientes con LLA pueden permanecer asintomáticos a pesar de presentar valores en torno a $400 \times 10^9/l$. Esto es debido en parte a que los blastos mieloides son más grandes y más rígidos que los linfoides y que las leucemias mieloides tienen más predisposición a coagulopatías.

Encontramos hiperleucocitosis en el 12% del total de los pacientes, hallándose en el 50 % de los niños con leucemia linfoblástica de estirpe T como enfermedad de base frente al 7% de los que tenían una leucemia de estirpe B.

En cuanto a la edad, un 86% de todos los pacientes con hiperleucocitosis tenían más de 10 años o menos de uno, por lo que pertenecían a grupo de edades de riesgo de peor pronóstico.

Del subgrupo de pacientes que presentaron hiperleucocitosis fallecieron el 29%.

El síndrome de lisis tumoral es el resultado de la destrucción rápida de gran cantidad de células tumorales dado que el acúmulo de sus productos de degradación produce alteraciones metabólicas (hiperuricemia, hiperfosfatemia, hiperpotasemia, hipocalcemia) que pueden ocasionar sin tratamiento un fallo renal y arritmias cardíacas .

La leucostasis se produce por obstrucción vascular debido al aumento de viscosidad sanguínea por el elevado número de leucocitos circulantes que inducen a hipoxia tisular. Afecta principalmente al SNC provocando confusión, somnolencia, mareos, cefalea e incluso coma, y a los pulmones generando disnea, hipoxemia o hemorragia alveolar.

La hiperleucocitosis y el *turn over* celular aumentado producen un incremento de niveles circulantes de factor tisular que activan la vía extrínseca de la coagulación a partir del factor VII generando alteraciones que pueden conducir a una CID.

Entre nuestros pacientes encontramos el caso clínico de una niña de 12 años que debutó de su leucemia linfoblástica tipo T con una hiperleucocitosis de 761.000 / mm³. Refería cefalea, alteraciones en la coagulación y una hiperuricemia de 13, 2 mg/dl.

Si en un paciente de riesgo, como ocurre en el caso de esta niña, el valor de leucocitos no se reduce antes de iniciar la quimioterapia de inducción, tanto la leucostasis, como el síndrome de lisis tumoral y la CID se pueden agravar con el inicio del mismo ^{38, 55}.

Por ello en esta paciente se realizó leucoaféresis previa al inicio del tratamiento. Se logró una rápida respuesta inicial con un descenso de leucocitos hasta 256.000/ mm³ después de una única sesión con buena tolerancia del procedimiento.

DISCUSIÓN



5. DISCUSIÓN

5.1 FASE I. ANÁLISIS CLÍNICO-BIOLÓGICO DE NIÑOS CON LEUCEMIA

5.1.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS Y DEMOGRÁFICAS

La tasa de incidencia de leucemia infantil en España es de 4,3 casos por cada 100.000 niños menores de 14 años⁸³. En Salamanca hay una población pediátrica de 41.058 niños hasta los 14 años según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE), por lo que cabría esperar una incidencia estimada en nuestra muestra de 1,76 casos anuales, cifra muy inferior a los 3,66 casos al año que encontramos en este periodo de 18 años (1996-2013). Sin embargo estas cifras están subestimadas, ya que el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca es centro de referencia para un área de salud mucho más amplia que la propia provincia de Salamanca y a él se derivan pacientes desde otras localidades. Para eliminar este sesgo, poder comparar ambas incidencias y ver si realmente la incidencia de leucemia en nuestra población es superior a la media de nuestro país, valoramos la incidencia real del número de casos de leucemia en los pacientes procedentes de la provincia de Salamanca. Observamos que han sido registrados 32 pacientes con diagnóstico de leucemia en estos 18 años, lo que supone una media de 1,77 casos anuales, cifra prácticamente idéntica a los 1,76 casos estimados.

Hemos estudiado la edad de presentación de la leucemia, y comparando nuestros datos con los que encontramos en la literatura vemos que los valores son muy similares a otras series de pacientes. La edad media fue de 7,3 +- 4,16.años. La edad de debut más repetida fueron los 5 años. La edad media no es de mucha utilidad para realizar comparaciones ya que tiene una desviación típica muy elevada, sin embargo vemos que existe un pico de incidencia a los 5 años, similar al que describen otros autores⁸⁴, que sitúan la edad de debut más frecuente en torno a los 4-5 años.

Hemos comprobado en los resultados que la distribución por edades en función del tipo de leucemia es muy variable, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre la LLA vs LMA y dentro de las linfoblásticas entre las LLA-B y LLA-T. Predominan los pacientes en edades consideradas de bajo riesgo (1-10 años) en las LLA B, mientras que los lactantes y niños mayores de 10 años son el grupo mayoritario en las LLA-T y LMA, ambos tipos de leucemias con peor pronóstico que la LLA-B. Aunque esta asociación se refleja en otras series de pacientes, siguen considerándose factores de riesgo independientes, edad y tipo de leucemia, y como tal figuran en los criterios de riesgo de los protocolos de tratamiento ¹²⁷ .

En el análisis de los niños que presentan la tanslocación *TELAML1* frente a los que no, aunque no encontramos significación estadística, el porcentaje de pacientes *TELAML1* positivo que se encuentran en edades de alto riesgo es mucho menor , con un valor de p de 0,052. Dato que sugiere que quizá en una muestra más amplia podrían obtenerse resultados estadísticamente significativos al respecto.

En cuanto a las diferencias de género en los niños con leucemia, a nivel mundial todas las series de pacientes reflejan un predominio de esta patología en varones, aunque las diferencias son variables entre los distintos trabajos publicados ^{84,124} .

Hemos analizado las diferencias en cuanto al género entre los pacientes diagnosticados de leucemia linfoblástica aguda de estirpe B y T y de leucemia mieloide aguda. En todos los casos predominan los varones, aunque en diferentes proporciones, 1:1,2 en las leucemias mieloides y 1:2,2 en el caso de las leucemias linfoblásticas, sin embargo las diferencias encontradas no son estadísticamente significativas.

Si tenemos en cuenta la nacionalidad de los pacientes diagnosticados de leucemia en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca en los años estudiados, solamente el 3,4 % son extranjeros originarios de Guinea Ecuatorial y Pakistán. El 10,3 %, aun nacidos en España, sus progenitores eran extranjeros predominando el origen árabe, colombiano y marroquí. Son cifras similares a las encontradas en niños sanos, ya que según datos del INE el 6,1% de la población de la provincia de Salamanca es extranjera.

Respecto a su lugar de origen, un 42 % de nuestros pacientes pertenecían al medio rural frente al 58% que vivían en medio urbano. Comparando los niños enfermos de leucemia con la población de nuestro medio, encontramos un mayor

porcentaje de pacientes con procedencia del medio rural, ya que según las cifras del Instituto Nacional de Estadística el 66% de la población de la provincia de Salamanca vive en medio urbano. Esta diferencia puede explicarse en parte si tenemos en cuenta los datos analizados engloban años anteriores al censo del que se han tomado los datos de referencia, donde el porcentaje de población rural era superior al actual. Por tanto los resultados en los pacientes con leucemia no difieren de los encontrados en niños sanos, no pudiendo concluir que aumente el riesgo de desarrollar LA el hecho de vivir en uno u otro ambiente.

Como hemos visto existe gran controversia en torno a las teorías que sugieren la asociación de las viriasis y la leucemia aguda infantil. Exceptuando los argumentos expuestos en la *Introducción* sobre los trabajos de Taylor¹⁴⁴ que asocian la LLA-B con ciertos complejos principales de histocompatibilidad, que reaccionarían de una forma exagerada a las enfermedades víricas, y los casos concretos de retrovirus leucemógenos, estas teorías se centran en la coincidencia temporal de la mayor incidencia de leucemia aguda y las infecciones víricas en la franja etaria de 2 a 5 años. Este hecho se constata en los pacientes de nuestra muestra, sin embargo, estos hallazgos son similares a la frecuencia de esas patologías en el niño sano, por lo que no pueden sacarse conclusiones que relacionen las viriasis con un aumento de la leucemia.

Un 21 % de los niños referían haber padecido la varicela. Aunque es una cifra importante no nos llama la atención, ya que el 90% de los menores de 15 años en nuestro país en los años del estudio habían padecido esta enfermedad. Esto es debido a que la gran mayoría de los niños aún no habían sido vacunados puesto que, aunque la vacuna se implantó en España en 1998 permaneció tan sólo para uso hospitalario en grupos de riesgo hasta que empezó a comercializarse en el 2005.

Como hemos señalado anteriormente en el capítulo de *Resultados*, el 10 % de los niños enfermos referían antecedentes familiares de leucemia. Este hallazgo concuerda con datos publicados por múltiples autores^{20, 35, 54, 109} que describen numerosos casos de familias con dos o más miembros afectados de leucemias. En estudios epidemiológicos de series muy numerosas de pacientes entre el 5-10% han tenido familiares afectados de leucemias, mientras que entre la población sana sólo el 1-2% presentan familiares con dichos antecedentes^{20, 35}. Los agregados familiares pueden ser debidos a factores hereditarios, medioambientales o al azar, aunque es un dato a tener en cuenta³⁵

Respecto al caso expuesto en los *Resultados* en el apartado 4.1.1, de dos hermanos gemelos que desarrollaron una leucemia con una diferencia temporal de 6 meses entre ambos, vemos ejemplos similares descritos en la literatura donde se refleja el elevado riesgo de padecer leucemia si un hermano gemelo la desarrolla ^{20, 30, 54,58}: “*si un gemelo idéntico desarrolla leucemia en la infancia, el otro gemelo tiene hasta un 20 % de probabilidades de desarrollar leucemia también. Habitualmente el segundo gemelo desarrolla la leucemia a los pocos meses del primero*”³⁵.

Otra de las características estudiadas en los niños con leucemia ha sido su peso al nacimiento, debido a que varios trabajos publicados han asociado el peso elevado en el recién nacido con un aumento de riesgo de padecer leucemia aguda. Aunque el peso medio al nacimiento de los niños con leucemia en la muestra de nuestro trabajo, 3381 g, es superior a los 3316 g de la media en nuestro país para los recién nacidos a término ⁴, el porcentaje de niños con peso elevado para su edad gestacional, 5,5% del total de los niños con leucemia, que son aquellos que en principio se han relacionado con un mayor riesgo de padecer LLA ^{78, 116, 117}, es similar al de los niños sanos en nuestro país, que se ha mantenido entre el 5-6% en el periodo desde 1995 a 2002 ⁴.

En el análisis del tipo de lactancia que recibieron en su momento los niños con leucemia, comparamos nuestros resultados con los aportados por el Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría (**Tabla XVI**)²⁴. Observamos que el porcentaje de niños alimentados con lactancia materna en el periodo neonatal es prácticamente idéntico en ambos grupos, 84,3 % vs 84,2 %. Sin embargo la duración de la lactancia materna en nuestros pacientes fue superior a la esperada según el informe del comité, a los 6 meses de vida aún la mantenían un 44,7 % de las madres de los pacientes con leucemia frente al 24,8% de todas las madres en nuestro país, y al año un 18,4 % frente a 7,2%.

Tabla XV - Porcentaje de niños alimentados con lactancia materna vs artificial en España (datos del Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría)

Edad en meses	% lactancia materna (exclusiva o suplementada)	% lactancia artificial
0	84,2	15,8
3	54,9	45,1
6	24,8	75,2
9	11,6	88,4
12	7,2	92,8

El porcentaje de madres mayores de 35 años en el momento del nacimiento del niño que acabaría desarrollando leucemia fue del 20%. Algunos autores refieren que es en este grupo de madres mayores de 35 años en el que se observa un riesgo aumentado de leucemia infantil. Dockerty²⁶ et al relacionan el aumento de la edad materna en el momento del parto superior a 35 años con una mayor incidencia de LA con una $p < 0,001$ y del padre de más de 40 años con una $p < 0,002$ ²⁶.

Sin embargo en nuestro caso las cifras de edad materna son similares e incluso inferiores a las de la edad media de las madres de nuestro país, según datos obtenidos del INE y del estudio Euro-Peristat (**Tabla XVII**).

Tabla XVI - Diferencias en la edad de las madres de niños con leucemia vs edad materna en nuestro país

	Madres niños con LA en nuestra muestra	Madres en España
Edad media materna en el parto	29, 34 años	29,96 (en el 1995)
		30,72 (en el 2000)
		30,95 (en el 2005)
		31,56 (en el 2012)
Porcentaje de madres con más de 35 años	20 %	29,5 % (en el 2013)

Existe controversia a la hora de relacionar una historia repetida de pérdida fetal con el aumento del riesgo de tener descendencia con leucemia ^{78, 117, 158}. En trabajos anteriormente citados se señala un aumento del riesgo para la leucemia 25 veces al esperado en aquellos casos en que existen más de dos abortos previos.

En nuestra serie encontramos una frecuencia superior a la esperada de madres que han sufrido 2 o más abortos (7,8 % vs 2-5%) (**Tabla XVIII**).

Tabla XVII - Tabla comparativa del número de abortos entre las madres de nuestros pacientes y las cifras oficiales en nuestro país.

	Madres de nuestros pacientes	Madres en España
0 abortos	76,3%	82 %
1 aborto	15,7%	15%
2 o más abortos	7,8 %	2-5%

Hemos encontrado gran diversidad en las profesiones paternas sin observar predominio de ninguna. Sin embargo es respecto al trabajo de las madres de niños con leucemia, de los cuales en nuestra muestra de pacientes no tenemos apenas información, donde diversos autores^{125, 151} publican un aumento del riesgo de leucemia asociado a sectores como la fabricación de metal, textiles y/o farmacéutico. Shu, Xo et al publican un estudio de casos y controles de más de 3.500 niños encontrando un aumento del riesgo con la exposición materna a los solventes (OR = 1,8, IC 95%, 1.3 a 2.5) y pinturas (OR = 1,6, IC del 95%, 01.02 a 02.02) durante el periodo preconcepcional (OR = 1,6, IC 95%, 1.3 a 2.5), y durante el embarazo (OR = 1,7, IC 95%, 1.2-2.3), pero no durante el período postnatal¹³¹. Por todo ello cabe destacar que la profesión materna debería ser un dato a registrar de ahora en adelante en las historias clínicas para poder contrastarla con los datos referidos en la bibliografía.

En cuanto a otras variables estudiadas, como vacunas recibidas, si habían acudido o no a guardería y la convivencia con animales domésticos no se ha encontrado ningún resultado significativo.

5.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANALÍTICAS Y MOLECULARES DE LA MUESTRA

Los principales signos y síntomas que llevaron a los pacientes a consultar en su centro de salud y/o en su hospital de referencia, y que motivaron el diagnóstico, son los mismos que se recogen en la mayoría de los trabajos publicados al respecto, y como señalamos en la siguiente tabla (**Tabla XIX**), con frecuencias similares.

Tabla XVIII - Motivos de consulta más frecuentes en el comienzo de una leucemia.

	Nuestros pacientes	Cifras literatura ^{84, 124}
Fiebre	43%	60%
Petequias	38%	48-50%
Adenopatía	69,9%	50-60%
Hepatoesplenomegalia	74%	68-80 %
Dolor en extremidades inferiores , cojera	15%	23-25%
Palidez	17%	55%
Astenia	35%	30%
Anorexia	20%	33%
Pérdida de peso	15%	

La forma de debut más frecuente de una leucemia es el hallazgo de citopenias en un control analítico realizado a un paciente en el contexto de una fiebre de duración mayor a la esperada para una infección banal, una astenia progresiva o por referir hematomas ante mínimos traumatismos o incluso espontáneos. Sin embargo no hay que olvidar que el dolor óseo y articular también está presente en un 25-30% de las leucemias en pediatría. Se trata de un dolor generalizado, aunque es frecuente que en los

niños más pequeños se manifieste como cojera, impotencia funcional o rechazo a la deambulaci3n¹⁵⁹. El origen del dolor radicaría en la propia infiltraci3n de la médula ósea y del periostio, la insuflaci3n peri3stica por lesi3n cortical o la presencia de infartos óseos^{29, 133}.

Ante la sospecha clínica de leucemia la primera prueba complementaria a realizar es un hemograma. En los resultados de los hemogramas de los en el momento del diagnóstico, encontramos leucocitosis con valores por encima de 50.000 /mm³ en un 26% de los pacientes, una frecuencia similar al 25% publicado en otras series¹²². En las tablas siguientes (**Tablas XX y XXI**) reflejamos la comparaci3n del resto de parámetros del hemograma entre los pacientes con leucemia de nuestra muestra y niños con leucemia pertenecientes a otras series. Un hallazgo frecuente es la anemia, presente hasta en 8 de cada 10 niños, siendo severa aproximadamente en la mitad de los casos, y una trombocitopenia moderada en el 80% de los pacientes que puede permanecer asintomática en muchas ocasiones, alcanzando valores inferiores a 20.000 plaquetas en uno de cada 4-5 niños, en quienes aumenta considerablemente el riesgo de hemorragias.

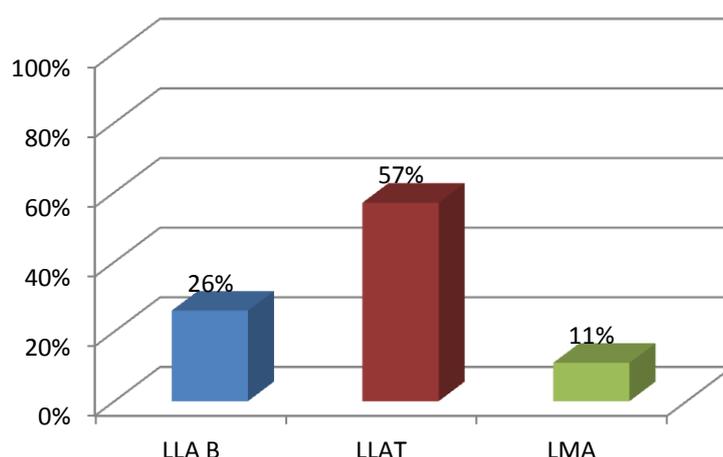
Tabla XIX – Valores de hemoglobina en el hemograma al diagnóstico de pacientes con leucemia

	Nuestra muestra	Valores en LA infantil ¹²²
Hemoglobina < 10 g /dl	73,5%	80%
Hemoglobina < 7 g /dl	37.7%	40%

Tabla XX – Cifra de plaquetas en el hemograma al diagnóstico de pacientes con leucemia

	Nuestra muestra	Valores en LA infantil ¹²²
Trombocitopenia < 100.000/mm ³	68,5%	80%
Trombocitopenia < 20.000/mm ³	25,9%	20%

Aunque no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas, los resultados corroboran la mayor frecuencia de hiperleucocitosis descrita en las leucemias linfoblásticas de estirpe T ^{84,124}, estando presente en un 57,1% de estos pacientes frente a las LLA-B, 26,3% y las LMA 11% (**Gráfica 46**).

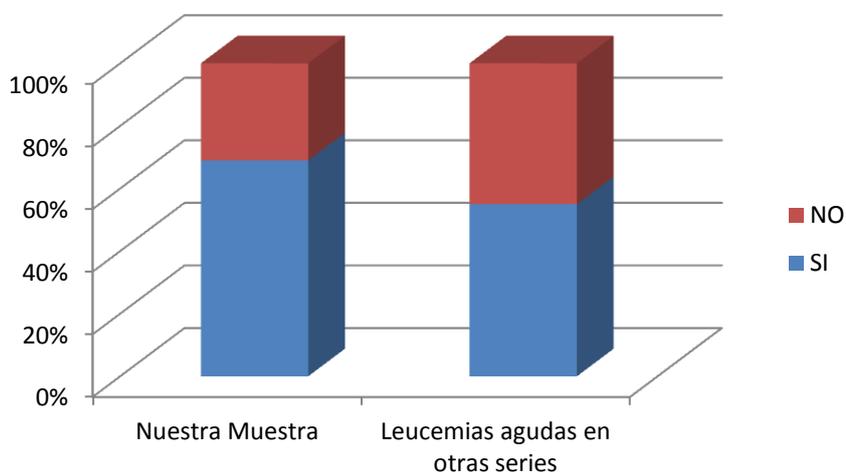


Gráfica 20 - Frecuencia de hiperleucocitosis en los tipos de leucemia infantil más frecuentes.

Destacar también que a pesar de la asociación existente entre la hiperleucocitosis y el inmunofenotipo T, son factores de riesgo independientes y ambos continuando siendo marcadores de riesgo ¹²⁷.

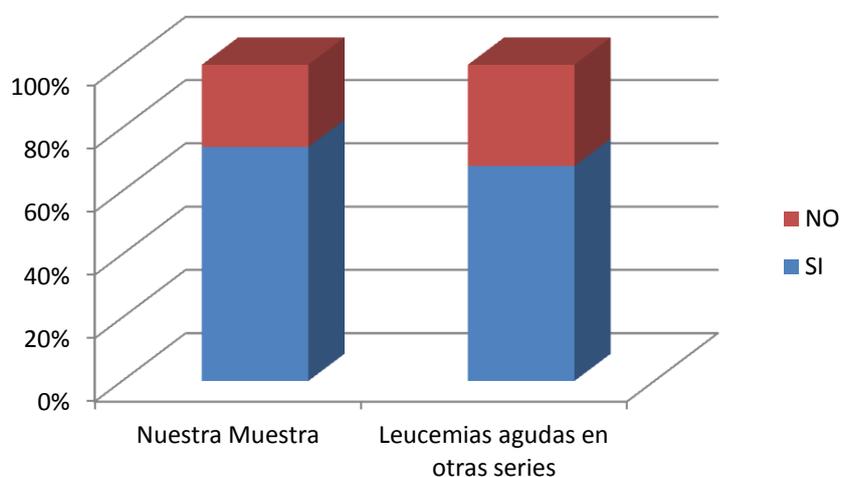
Continuando con el proceso diagnóstico, al realizar las pruebas de imagen correspondientes, se encontró una masa mediastínica en un 8,9 % de pacientes con leucemia linfoblástica aguda. Todos los casos con masa mediastínica correspondieron a pacientes con leucemias de estirpe T, representando el 62,5% del total de las leucemias linfoblásticas T. Estos resultados son similares a los esperados, según las publicaciones de otras series de pacientes: *“una masa mediastínica demostrable en la radiografía de tórax suele estar presente en un 10% de las LLA, sobre todo en las de tipo T”* ³⁹.

En la exploración física encontramos adenopatías en el 69% de los niños, porcentaje superior a los valores publicado en otras series que se encuentran entre el 50 y el 60% ^{84, 124} (**Gráfica 47**).



Gráfica 21 - Porcentaje de adenopatías en pacientes con leucemia

También encontramos una 74% de niños con hepatoesplenomegalia, frente a un 68% publicado en otras series (**Gráfica 48**).



Gráfica 22 - Porcentaje de hepatoesplenomegalia en pacientes con leucemia

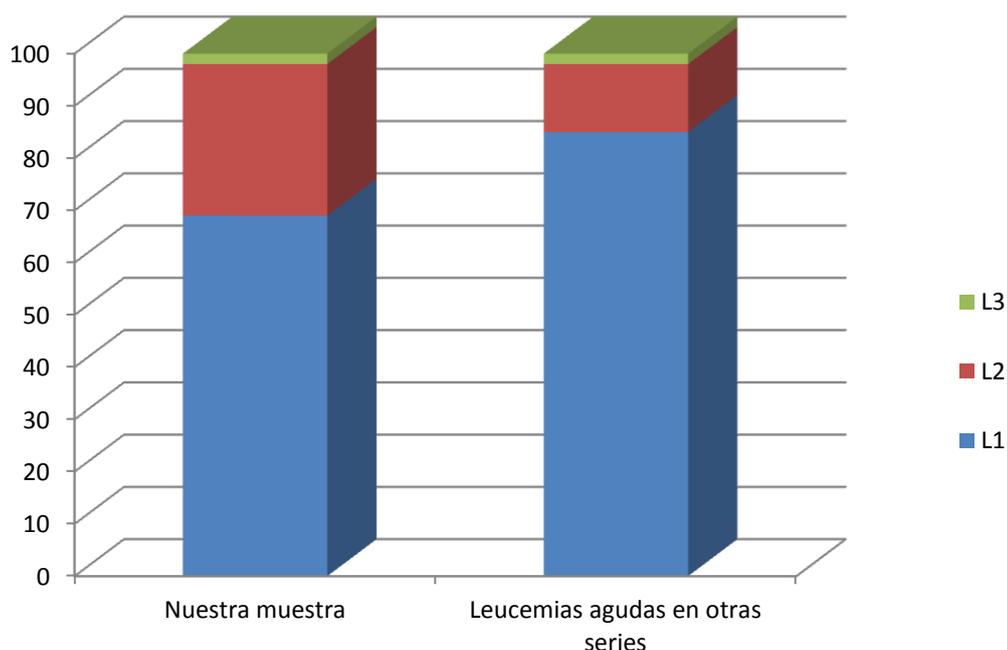
Si comparamos los distintos tipos de leucemia encontrados entre los niños diagnosticados en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca con el porcentaje de leucemias diferentes que se conocen a día de hoy encontramos los siguientes resultados que se muestran en la **Tabla XXII**.

Tabla XXI - Porcentaje de los distintos tipos de leucemia encontrados en nuestra muestra vs cifras publicadas en la literatura.

Tipo de leucemia	% en niños de nuestra muestra	% en grandes series de pacientes ^{84, 122, 124}
Leucemia Linfoblástica Aguda	81 %	75-80%
LLA B	68, 3% (84% de LLA)	63-68%(85% de LLA)
LLA T	12, 7%(15,6% de LLA)	11% (15 % de LLA)
Leucemia Mieloblástica Aguda	16%	15-25%
Leucemias bifenotípicas	3%	4-6%

La leucemia linfoblástica aguda es la más frecuente en pediatría, alcanzando el 75-80% de los casos^{84, 122,124}, frente a un 15-25 % de leucemias mieloides^{84, 122}. Dentro de las leucemias linfoblásticas, predominan las leucemias de estirpe B, que suponen el 85 % de las leucemias linfoides, frente a un 15% de estirpe T⁸⁴. Resultados muy similares a los encontrados en nuestro estudio.

Si tenemos en cuenta la clasificación morfológica de la FAB de las leucemias diagnosticadas en los pacientes de nuestra muestra encontramos dentro del grupo de las leucemias linfoblásticas agudas un 69% de L1, 29 % de L2 y un 2% de L3, frecuencias muy similares a las descritas en otras publicaciones^{122 124} (**Gráfica 49**). Predominando la forma L1, hasta en el 85% de los casos, en segundo lugar la L2, 13-15%, y la forma menos frecuente, el subtipo L3, que tan sólo aparece en un 2% de todas las leucemias linfoblásticas infantiles.



Gráfica 23 - Clasificación morfológica según la FAB de las leucemias infantiles de nuestra muestra vs cifras a nivel mundial ^{122, 124}.

Como hemos señalado en el capítulo de *Resultados*, dada su menor frecuencia, la muestra de niños diagnosticados de leucemia mieloide aguda (LMA) es pequeña, por lo que no podemos extrapolar los datos para su comparación con grandes series de pacientes. Por otra parte cabe destacar que al igual que ocurre en uno de los niños diagnosticados en nuestro centro, la identificación de una LMA M3, también llamada leucemia promielocítica (LPM) y que aparece en un 5-15% de los niños con LMA ¹²⁴, es muy importante, debido al elevado riesgo de complicaciones hemorrágicas mortales antes o durante la inducción, y a que el tratamiento adecuado es diferente al de otros subtipos de LMA.

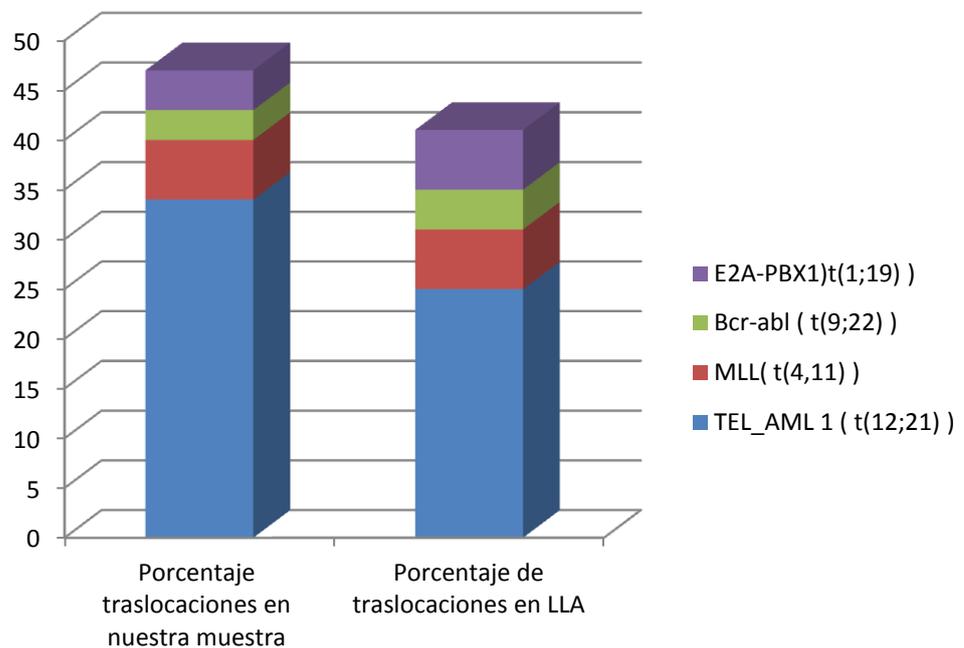
Otro dato importante a la hora de caracterizar una leucemia y que aporta información pronóstica es la existencia o no de translocaciones cromosómicas. En cuanto al tipo de translocaciones encontradas en los niños con leucemia linfoblástica aguda hemos obtenido los siguientes resultados(**Gráfica 50**):

- ETV6-RUNX1 (TEL-AML1), producto de la t(12;21) : hallada en un 34,1 % de los niños, frente a un 25% de pacientes pediátricos en otras series publicadas ^{84, 122} .

- MLL-AF4, producto de la t(4;11) : encontrada en el 6% de los paciente, porcentaje superior al de otras publicaciones que se mantiene en torno al 2 % ^{84, 124} . Sin embargo su frecuencia es variable en función de la edad , aumentando muchísimo en los lactantes, llegando incluso al 70% en menores de 1 año ^{122, 124} .

- BCR-ABL, producto de la t(9;22) : esta translocación ha sido encontrada en las células del 3% de los pacientes con leucemia linfoblástica aguda, frecuencia similar a la de otras series publicadas en la literatura, 3-5% ^{84,122,124})

- E2A-PBX1, producto de la t(1;19): el 3,8% de nuestros niños la presentaron frente a un 5-6% descrito ^{84,122,124} .



Gráfica 24 - Comparación de la frecuencia de las distintas translocaciones cromosómicas en los pacientes con LLA de nuestra muestra y las descritas en la literatura ^{84, 122, 124}.

En niños con leucemia mieloide aguda las anomalías cromosómicas son marcadores importantes de riesgo y pueden identificarse aproximadamente en el 75% de casos. En los pacientes con LMA encontramos mutaciones de la nucleofosmina (NPM1+), translocación t(15;17), inversión del cromosoma 16 y monosomía del cromosoma 7 (**Tabla XXIII**).

Destacar también que todos los casos de leucemia mieloide crónica fueron *Philadelphia* +, compatible con los datos de otras publicaciones que refieren una frecuencia de positividad del 95%.

Tabla XXII - Características de las anomalías cromosómicas encontradas en nuestros pacientes con LMA.

Anomalías moleculares en LMA	Tipo de LMA relacionada	Pronóstico	Frecuencia en niños con LMA	Otros
inv(16) Inversión del cromosoma 16	M4	FAVORABLE SG a 5 años: 85%	7-9 %	El gen de la <i>CBFβ</i> en la banda del cromosoma 16q22 se fusiona con el gen <i>MYH11</i> en la banda del cromosoma 16p13
t(15;17): traslocación t(15;17)	M 3 / LPA (leucemia promielocítica aguda)	FAVORABLE	7%	Da como resultado la producción de una proteína de fusión que incluye el receptor α del ácido retinoico
NPM1 Mutaciones de la nucleofosmina		FAVORABLE	8%	Se caracteriza por un cariotipo normal
7q- Monosomía 7		DESFAVORABLE	4%	

En todos los pacientes con leucemia linfoblástica se realizó estudio de la ploidía mediante citometría de flujo, debido a su implicación pronóstica. El 25-30 % de los niños con LLA presentan hiperdiploidía de más de 50 cromosomas y aunque existen muchos cromosomas implicados, ciertos cariotipos parecen ser prevalentes. El cromosoma 21 está implicado con mayor frecuencia, seguido de los cromosomas 6, 4, 8, 10 y 14. Los pacientes con hiperdiploidía de más de 50 cromosomas suelen tener buen pronóstico. Esto puede explicarse por que las células leucémicas hiperdiploides tienen una mayor predisposición a la apoptosis, al ser capaces de acumular mayor concentración de metabolitos activos de determinados fármacos empleados en el tratamiento de la leucemia, aumentando su sensibilidad a éstos ⁸⁴. El porcentaje de curación para estos pacientes oscila entre el 75 y el 80 %, aunque el pronóstico es menos favorable para los que presentan alteraciones estructurales ⁹⁵.

Entre nuestros pacientes con LLA encontramos que un 24,3 % de ellos eran hiperdiploides con más de 50 cromosomas (alta hiperdiploidía), lo que corresponde a un índice de ADN superior a 1,16. Un 10 % pertenecían al grupo de baja hiperdiploidia, teniendo entre 47-50 cromosomas (índice de ADN entre 1-1,15).

Los cariotipos con menos de 46 cromosomas son poco frecuentes detectándose en el 7-9 % de los casos; la mayoría presentan 45 cromosomas con una alta incidencia de alteraciones estructurales. La hipodiploidía puede deberse a la pérdida completa de cromosomas, translocaciones desequilibradas o cromosomas dicéntricos. En estos casos la pérdida del cromosoma 20 es la más frecuente. Se asocian a una supervivencia corta pese a tratamientos intensivos. Los raros casos de hipodiploidías de menos de 30 cromosomas tienen una media de supervivencia de 11 meses ⁹⁵. En nuestra muestra tan sólo un 3% de los pacientes pertenecían al grupo de peor pronóstico al ser hipodiploides por tener menos de 44 cromosomas.

El conjunto más numeroso fue el de pacientes con 46 cromosomas, que corresponde a una dotación diploide, con un índice de ADN de 1, en el que incluimos al 62.7% de los pacientes.

La afectación del sistema nerviosos central (SNC) en las series publicadas está presente en menos de un 5% de los casos ³⁹, cifra en consonancia con los datos encontrados en nuestros pacientes, donde tres de ellos, un 4,5 % del total, presentaba

infiltración el sistema nervioso central. Sabemos que se asocia con mayor frecuencia a las LLA de estirpe T^{39,84}. En nuestro estudio encontramos afectación del SNC en el 4.4 % de las LLA B y en el 12,5% de las LLA T, una frecuencia casi tres veces superior. Los tres niños que presentaron infiltración en el SNC fallecieron. Probablemente este dato no sea valorable debido a la baja incidencia, pero sí un indicador de gravedad. Es cierto que es un factor que empobrece el pronóstico y precisa intensificar los tratamientos, pero la cifra de mortalidad no es equiparable a la de otras series. De hecho existen estudios que no lo consideran factor pronóstico independiente¹²², sino que afirman que simplemente está asociado a otros factores de mal pronóstico como la hiperleucocitosis, leucemias de estirpe T o edades de riesgo. En nuestra muestra observamos que dos de los tres pacientes con afectación de SNC eran recaídas, lo que hace mucho más probable atribuir a ello el mal pronóstico de estos niños.

5.1.3. PROTOCOLOS DE TRATAMIENTO, PRONÓSTICO Y COMPLICACIONES.

Hemos visto en el capítulo de *Introducción*, punto 1.1.5, que en los últimos años en nuestro país los pacientes pediátricos con leucemia aguda han seguido tratamientos en el marco de dos sociedades, SEHOP y PETHEMA. En nuestra serie de pacientes predomina la corriente del grupo SEHOP dado que en nuestro centro se emplean sus protocolos, con un 79,3% de los niños tratados. Mientras que tan sólo un 17,2% de los pacientes han seguido tratamientos del grupo PETHEMA. El tratamiento que estos pacientes han recibido está adaptado a su riesgo de recaída, y ha consistido en los esquemas terapéuticos que hemos visto en el apartado de *Resultados*. Finalmente en un 3, 4% de los niños se siguió un protocolo específico para la leucemia en el lactante, dado el elevado riesgo que presentan los niños menores de 1 año con leucemia, quienes poseen unas características propias y se benefician de un tratamiento específico.

En el año 2009 ambos grupos acordaron tener un protocolo único de tratamiento de la leucemia aguda linfoblástica en edad pediátrica, en nuestro país.¹²⁷. A partir de Marzo del 2010 se reunieron miembros de ambos grupos para definir los objetivos y establecer los diferentes grupos de trabajo para el diagnóstico y tratamiento de la leucemia en el niño. En cuanto a la leucemia aguda linfoblástica se decidió seguir los esquemas de tratamiento del grupo BFM (Berlim-Frankfurt-Münster) internacional, adaptados a nuestro país. Se hizo la valoración de los antecedentes de trabajo de ambos grupos que hemos resumido en la *Introducción*. A mediados del 2013 entró en vigor el nuevo protocolo SEHOP/PETHEMA 2013 para tratamiento de los pacientes con LLA entre 1-19 años.

En él “*Se estima la inclusión de 250 pacientes anuales con una proporción aproximada de un 15% en Riesgo Estándar, 65% en Riesgo Intermedio y un 20% en Alto Riesgo.*”¹²⁷

Podemos ver en las tablas que aparecen a continuación (**Tablas XXIV y XXV**) que son unos porcentajes prácticamente idénticos a los encontrados en la clasificación del riesgo entre nuestros pacientes con leucemia

Tabla XXIII - Distribución por grupos de riesgo y SLE esperada en LLA/SEHOP-PETHEMA 2013, durante 5 años (datos obtenidos del protocolo SEHOP/PETHEMA 2013)

	Pacientes (n)	Pacientes (%)	SLE
RE	188	15	95
RI	812	65	80
AR	250	20	70

Tabla XXIV - Distribución por grupos de riesgo y SLE en nuestros pacientes con leucemia

	Pacientes (n)	Pacientes (%)	SLE 5 años
Riesgo estándar	9	13,6%	100%
Riesgo intermedio	42	63,6%	92%
Alto riesgo	15	22,7 %	46%

Uno de los factores pronósticos más importantes a tener en cuenta es la respuesta del paciente a la prednisona en la fase de inducción del tratamiento. Se determina en el día 8 realizándose el recuento absoluto de blastos en sangre periférica, siendo el día 1 el primer día de administración de la prednisona. En nuestra serie 7 pacientes presentaron mala respuesta dado que el día 8 del tratamiento todavía tenían más 1.000 blastos absolutos por μl en sangre periférica. De estos siete pacientes han fallecido cuatro, dos se encuentran en remisión completa y uno aún continúa en la fase de mantenimiento. En nuestros resultados una mala respuesta a la prednisona implica un peor pronóstico con mayor riesgo de fallecimiento, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos con un valor de $p < 0.01$.

En los criterios de clasificación del riesgo del nuevo protocolo SEHOP-PETHEMA 2013 se hace hincapié que este factor es determinante a la hora de definir el riesgo, ya que por sí mismo es criterio de Alto Riesgo.

La principal variable pronóstica es la respuesta al tratamiento⁸⁴. Como reflejan los resultados encontrados el pronóstico de los niños con leucemia refractarios al tratamiento de primera línea es muy pobre. Podemos afirmar que la refractariedad al tratamiento estándar implica un peor pronóstico en estos pacientes, encontrando diferencias estadísticamente significativas entre aquellos que alcanzan la RC y los que no, con un valor de $p < 0.01$. Sin embargo, el porcentaje de niños que alcanzan esa primera remisión completa (RC) es muy elevado, 95-97%¹²⁴. En los pacientes de nuestra muestra con debut de leucosis el 93 % consiguió la primera RC tras el tratamiento, mientras que en las recaídas lograron la segunda RC el 80% de los pacientes, cifra similar a las de otras publicaciones^{122, 124}. En nuestra muestra encontramos 6 pacientes que no lograron RC tras el tratamiento de primera línea, 4 pacientes con debut de leucemia y 2 de ellos en recaída. Los dos pacientes que se encontraban en recaída fallecieron en el momento de la inducción por progresión de la enfermedad. De los cuatro pacientes que no lograron la remisión tras el tratamiento de primera línea, uno falleció en la inducción por complicaciones y los otros tres desarrollaron refractariedad al tratamiento teniendo que recurrir a una segunda línea con clofarabina. De todos ellos sólo ha sobrevivido un paciente, que tras tratamiento de segunda línea y recibiendo un trasplante de progenitores hematopoyético, se encuentra en RC tras 3 años de seguimiento.

Del total de los 58 pacientes incluidos en este trabajo han recaído 10, sin embargo un niño siguió tratamiento en otro centro, por lo que tenemos reflejados datos tan sólo de 9 de ellos. Las series de pacientes publicadas reflejan tasas de recaída en torno al 20-25% en LLA y 30-35% para LMA, superiores al 17,2% de nuestros pacientes que recayeron. Cabe destacar el menor porcentaje de recaídas que hemos encontrado, teniendo en cuenta el sesgo de ser centro de referencia para TPH, lo que hace que sean derivados mayor número de pacientes de alto riesgo, si bien es cierto que en la comparación de la clasificación del riesgo apenas se encuentran diferencias con los porcentaje estimados.

Si analizamos el pronóstico de los pacientes en recaída tan sólo el 20% se encuentran en remisión completa, cifra ligeramente inferior a las publicadas de

supervivencia global en las recaídas de pacientes con leucemia, que son del 25% en LMA y el 30 % en LLA ¹²².

Es en gran parte de estos pacientes en recaída o con refractariedad a los tratamientos estándar donde tiene cabida el trasplante de progenitores hematopoyético en el tratamiento de la leucemia pediátrica.. Las indicaciones en primera remisión completa son estrictas dada la importante morbimortalidad del procedimiento. Los protocolos empleados en los tratamientos difieren en algunos aspectos en cuanto a las indicaciones de TPH, a continuación enumeramos las indicaciones en primera remisión completa que refleja el nuevo protocolo SEHOP-PETHEMA 2013 vigente en este momento en nuestro país:

- No remisión completa citomorfológica tras la inducción (día +33)
- ERM \geq 1% tras Inducción (día +33) y ERM \geq 0,1% en el día +78
- t(4;11) y/o hipodiploidía y/o LLA-T con mala respuesta a prednisona (cualquiera de los tres anteriores) con ERM \geq 0,1% en el día +78
- En los pacientes de alto riesgo: la ERM persistentemente positiva $>$ 0,01%

La mitad de los pacientes, el 48%, recibieron un trasplante de progenitores hematopoyéticos. Estas cifras son mucho más elevadas que las que encontramos en series publicadas de pacientes con leucemia donde el porcentaje que precisa un TPH está en torno al 20 %. Esta diferencia puede explicarse en parte porque el servicio de hemato oncología pediátrica del Complejo Asistencial Universitario de Salamanca es de referencia para trasplante pediátrico, y de los 28 pacientes trasplantados en este periodo 11 fueron derivados desde otras provincias específicamente para TPH.

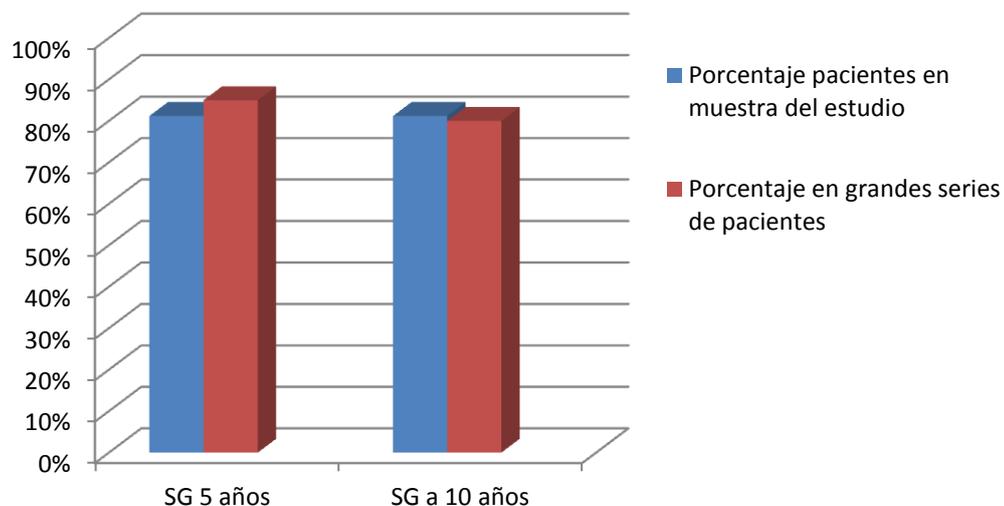
Excluyendo los pacientes originarios de fuera de la provincia de Salamanca encontramos que 9 de un total de 32 recibieron un trasplante, lo que supone un 28% de los niños con diagnóstico de leucemia trasplantados, cifra más próxima al 20 % reflejado en la literatura.

Para valorar el pronóstico de los pacientes con leucemia y poder comparar nuestros resultados con los de otros trabajos empleamos la Supervivencia Global (SG) y la Supervivencia Libre Evento (SLE) descritas anteriormente. Si comparamos la SG a los 5 y 10 años entre nuestros pacientes con leucemia linfoblástica aguda con la

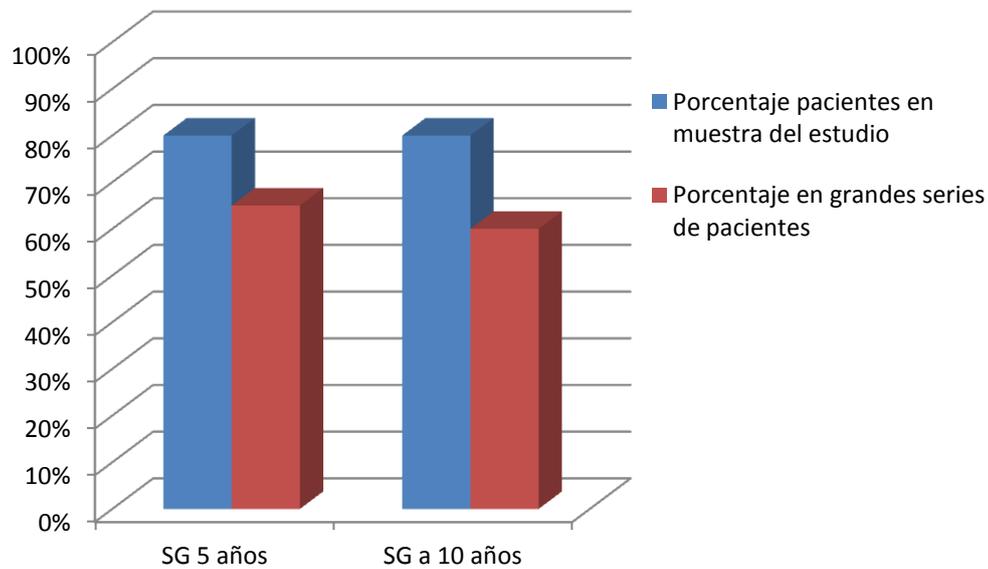
descrita en la literatura encontramos valores similares: 81% vs 85-90% a los 5 años y 81 vs 80% a los 10 años ¹²² (**Gráfica 51**). La SG a los 5 y a los 10 años no varía, ya que en nuestra serie ningún paciente que sobreviviera los 5 primeros años ha fallecido.

En cuanto a la SG en los pacientes con leucemia mieloide aguda encontramos entre los niños de nuestra muestra una supervivencia mayor a las grandes series publicadas : 75% vs 65% a los 5 años y 75% vs 60% a los 10 años, aunque hemos de tener en cuenta que nuestro trabajo incluye tan sólo a 9 pacientes con LMA (**Gráfica 52**).

Destacar que la supervivencia global a los 5 y 10 años encontramos un 84,3% entre los pacientes de estirpe B y un 57,1% en los que presentaban inmunofenotipo T, siendo las diferencias estadísticamente significativas con un p valor de 0,007. Un claro ejemplo del peor pronóstico de las leucemias de estirpe T, consideradas de mayor riesgo en la literatura ^{84,127}.



Gráfica 25 - Grafico de comparación de la SG a los 5 y 10 años en la LLA entre los pacientes de nuestra muestra y las grandes series publicadas



Gráfica 26 - Comparación de la SG a los 5 y 10 años en la LMA entre los pacientes de nuestra muestra y las grandes series publicadas¹²²

Si comparamos la SLE a los 5 años con la descrita en la literatura encontramos valores similares: 81% vs 75-83%.

En conjunto encontramos un pronóstico similar al de las grandes series de pacientes, sin embargo, al igual que hacíamos alusión anteriormente al sesgo de ser centro de referencia y que sean derivados pacientes de mayor riesgo directamente a trasplante, en teoría deberíamos observar un peor pronóstico en nuestra muestra por este motivo, por lo que podemos deducir que los resultados encontrados son muy satisfactorios.

Por último hemos querido reflejar las complicaciones sufridas por los pacientes con leucemia durante su tratamiento, principalmente debidas a infecciones, hiperleucocitosis o a los efectos secundarios de los fármacos empleados.

En la mayoría de los pacientes se observó mucositis, principalmente secundaria al tratamiento quimioterápico. Es una complicación frecuente descrita en todos los estudios. La intensidad de la misma es muy variable en función de la susceptibilidad de cada niño y de los fármacos empleados. En la **Tabla XXVI** podemos ver su escala de gravedad.

Tabla XXV - Escala para valorar la intensidad de la mucositis

Grado 0	No mucositis
Grado 1	Eritema, dolor moderado, úlceras no dolorosas
Grado 2	Eritema con edema y úlceras dolorosas pero que permiten la ingesta oral
Grado 3	No es posible la ingesta oral
Grado 4	Requiere soporte enteral o parenteral.

Más de la mitad de los pacientes en algún momento del tratamiento ha sufrido algún episodio febril que se ha relacionado con infección del reservorio. La tasa de bacteriemia relacionada con el catéter venoso central es de entre 3 y 10 episodios por cada 1000 días de uso ¹⁸. Los gérmenes implicados con más frecuencia han sido: estafilococos coagulasa negativos (SPCN), gram negativos y candida, mismos gérmenes que los descritos en la literatura.

Encontramos 5 casos de sepsis por gérmenes gram negativo documentadas microbiológicamente entre nuestros pacientes: dos infecciones por E.coli , dos por Klebsiela y un paciente con infección por Pseudomona.

Las cifras de sepsis, bacteriemias e infecciones de catéter probablemente estén subestimadas por varias razones: en primer lugar porque no todos los episodios quedan reflejados en todos los casos en sus informes clínicos y en segundo es debido a que la

rentabilidad de los hemocultivos es baja en muchas ocasiones por no extraer suficiente cantidad de sangre. No podemos olvidar que son niños con pesos muy inferiores a los adultos y con un riesgo nodespreciable de anemización por múltiples extracciones. Además en los episodios febriles no siempre se extrae muestra periférica y de todas y cada una de las luces del catéter central, pauta recomendada en estos pacientes ante una sospecha de infección de catéter, debido a que son niños muy pinchados, con cifras bajas de plaquetas y por el sufrimiento que conlleva en la mayoría de las ocasiones. Por otra parte el tratamiento de estos pacientes con neutropenia febril es empírico y de amplio espectro, no pudiendo posponerse a la espera de resultados microbiológicos, por lo que tampoco cambiaría la actitud terapéutica.

Destacamos un paciente que desarrolló trombosis del seno venoso. A propósito de ello debemos comentar que la LLA es la enfermedad maligna que con más frecuencia se asocia con tromboembolismo venoso (TEV) en niños, aunque su frecuencia es muy variable entre distintas series (entre el 0% y el 36%)¹²⁷. En su etiopatogenia influyen las alteraciones del sistema hemostático producidas por diversos factores como son la propia enfermedad, al tratamiento con L-Asparaginasa, la utilización de vías centrales y la presencia de factores de trombofilia hereditarios. La mayoría de TEV sintomáticos ocurren en el sistema nervioso central (trombosis de senos venosos) o en el sistema venoso superior.

La hiperleucocitosis tiene una incidencia en torno al 5-13% en LMA y 10-30 % en LLA, y presenta dos picos de edad, los lactantes menores de un año y los adolescentes¹²⁷. Encontramos hiperleucocitosis en el 12% de los pacientes, y el 86 % de ellos tenían menos de un año o más de 10, perteneciendo a grupos de edades de riesgo de peor pronóstico.

La hiperleucocitosis es más frecuente en las leucemias agudas linfoblásticas de estirpe T que en las B, dato que hemos corroborado, puesto que el 50% de los pacientes diagnosticados de LLA T presentaron hiperleucocitosis frente al 7% de los que tenían una leucemia de estirpe B.

La hiperleucocitosis es causa importante de morbimortalidad en las leucemias, en nuestra muestra del subgrupo de pacientes que presentaron hiperleucocitosis fallecieron el 29%. Las manifestaciones clínicas que puede causar son el síndrome de lisis tumoral, la leucostasis y la coagulopatía intravascular diseminada (CID).

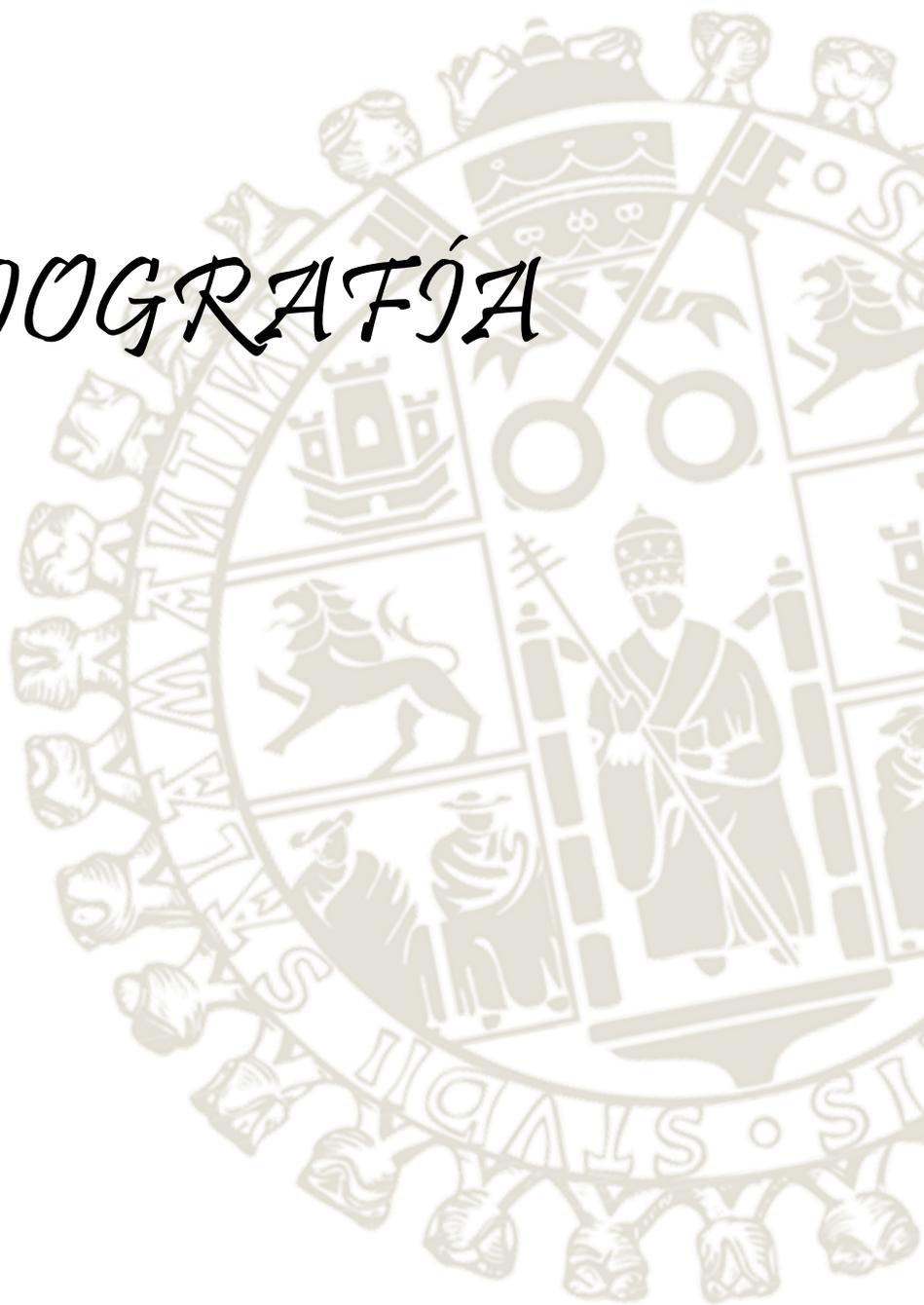
CONCLUSIONES



6. CONCLUSIONES

1. No podemos afirmar que el peso elevado del paciente al nacimiento, la edad materna superior a 35 años, o determinadas profesiones paternas, factores de riesgo descritos en otras publicaciones, predominen en los pacientes con leucemia aguda de nuestro estudio.
2. La elevada frecuencia de antecedentes familiares de leucemia sugiere la presencia de factores genéticos de predisposición y/o susceptibilidad en estas familias.
3. La tasa materna de abortos de repetición fue tres veces superior a la esperada, pero dada la baja incidencia no permite concluir que los antecedentes de abortos en la madre sea un factor de riesgo de padecer leucemia.
4. La supervivencia de los niños con leucemia con mala respuesta a la prednisona y /o refractarios al tratamiento de primera línea es muy baja, siendo éste el factor pronóstico más importante..
5. La incidencia de leucemia aguda registrada en el Complejo Asistencial Universitario de Salamanca en el periodo comprendido entre 1996 y 2013 es similar a la descrita en nuestro país, y las características que presentan estos pacientes son superponibles a las encontradas en la literatura.
6. La supervivencia global de nuestra serie ha sido ligeramente superior a la estimada con una menor tasa de recaídas, lo que pone de manifiesto la importancia de que sean centros de referencia los que traten a estos pacientes para mejorar en lo posible su pronóstico.

BIBLIOGRÁFIA



7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ahlbom A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, et al. A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 2000; 83:692–698.
2. Aldrich MC, Zhang L, Wiemels JL, et al.: Cytogenetics of Hispanic and White children with acute lymphoblastic leukemia in California. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15. 2006; 578-81.
3. Alexander FE, Chan LC, Lam TH, Yuen P, Leung NK, Ha SY, Yuen HL, Li CK, Li CK, Lau YL, Greaves MF. Clustering of childhood leukaemia in Hong Kong: association with the childhood peak and common acute lymphoblastic leukaemia and with population mixing. *Br J Cancer*. 1997;75(3):457-63.
4. Alonso, V., Fuster, V., Luna, F., La Evolución del Peso al Nacer en España (1981-2002) y su relación con las características de la Reproducción. *Antropo* 2005; 10, 51-60.
5. Andras Nagy et al . “Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual” (3rd Edition) Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2003
6. Andreasson P, Schwaller J, Anastasiadou E, Aster J, Gilliland DG. The expression of **ETV6/CBFA2(TEL/AML1)** is not sufficient for the transformation of hematopoietic cell lines **in vitro** or the induction of hematologic disease **in vivo**. *Cancer Genet Cytogenet*. 2001;130:93–104.
7. Al-Hajj, M. and Clarke, M.F. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*, 2004; 23(43): 7274-82
8. Armstrong SA, Look AT: Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2005, 23 (26): 6306-15.
9. Attarbaschi A, Mann G, König M, et al.: Incidence and relevance of secondary chromosome abnormalities in childhood TEL/AML1+ acute lymphoblastic leukemia: an interphase FISH analysis. *Leukemia* 2004, 18 (10): 1611-6.

10. Austin, T.W., Solar, G.P., Ziegler, F.C., Liem, L., and Matthews, W. A role for the Wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. *Blood*, 1997; 89(10): 3624-35
11. Bernardin F, Yang Y, Cleaves R, Zahurak M, Cheng L, Civin CI, Friedman AD. TEL-AML1, expressed from t(12;21) in human acute lymphocytic leukemia, induces acute leukemia in mice. *Cancer Res*. 2002;62:3904–3908
12. Bissell, M.J. and Labarge, M.A. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment? *Cancer Cell*, 2005; 7(1): 17-23.
13. Bohlander, S.K. ETV6: a versatile player in leukemogenesis. *Semin Cancer Biol*, 2005; 15(3): 162-74.
14. Boice JDJ, Inskip FD. Radiation induced leukemia. En: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. *Leukemia*. 6ª edición. Philadelphia: WB Sanders, 1996;195-209.
15. Borst L, Wesolowska A, Joshi T, Borup R, Nielsen FC, Andersen MK, et al. Genome-wide analysis of cytogenetic aberrations in ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol* 2012 May;157(4):476-482.
16. Brondum J, Shu XO, Steinbuch M, Severson RK, Potter JD, Robison LL. Parental cigarette smoking and the risk of acute leukemia in children. *Cancer*. 1999;85:1380–1388.
17. Brown D, et al. A PML-RAR α transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2251-2556.
18. Campos, A. Soler-Palacín, P , Actualización en la prevención, diagnóstico y tratamiento de las infecciones relacionadas con catéteres vasculares en pdiatría .2009. Unidad de Patología Infecciosa e Inmunodeficiencias Pediátricas Hospital Vall d’Hebron.
19. Carroll WL, Bhojwani D, Min DJ, Raetz E, Relling M, Davies S, et al. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Hematology(Soc Hematol Educ Program)*.2003; 102-31

20. Cartwright RA, Staines A. Acute leukaemias. En: Fleming AF, ed. *Epidemiology of Haematological Disease*. 1ª edición. London: Bailliere Tindell, 1992; 45-60.
21. Cheng, L.C., Tavazoie, M., and Doetsch, F. Stem cells: from epigenetics to microRNAs. *Neuron*, 2005; 46(3): 363-7
22. Cigudosa, J.C., Rao, P.H., Calasanz, M.J., Odero, M.D., Michaeli, J., Jhanwar, S.C., and Chaganti, R.S. Characterization of nonrandom chromosomal gains and losses in multiple myeloma by comparative genomic hybridization. *Blood*, 1998; 91(8): 3007-10.
23. Cobaleda, C., Gutierrez-Cianca, N., Perez-Losada, J., Flores, T., Garcia-Sanz, R., Gonzalez, M., and Sanchez-Garcia, I. A primitive hematopoietic cell is the target for the leukemic transformation in human philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 2000; 95(3): 1007-13.
24. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. Informe técnico sobre la lactancia materna en España. *An Esp Pediatr* 1999;50:333-340.
25. Dick, J.E. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. *Semin Immunol*, 1996; 8(4): 197-206.
26. Dockerty JD, Draper G, Vincent T, Rowan SD, Bunch KJ. Case-control study of parental age, parity and socioeconomic level in relationship to childhood cancers. *Int J Epidemiol*. 2001;30:1428–1437.
27. Doll R, Wakeford R. Risk of childhood cancer from fetal irradiation. *Br J Radiol*. 1997;70:130–139.
28. Dordelmann M, Schrappe M, Reter A, Zimmerman M, Graf N, Schott G, et al. Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials, Berlin-Frankfurt-Munster Group. *Leukemia*. 1998;12:645–651
29. Dorronsoro Martín I, Merino Muñoz R, Sastre-Urguellés A, García-Miguel García-Rosado P, García-Consuegra Molina J. Manifestaciones reumáticas como forma de comienzo de enfermedad maligna. *An Pediatr (Barc)*. 2004; 61:393-7.

30. Draper GJ, Heaf MM, Kinnier Wilson LM. Occurrence of childhood cancers among sibs and estimation of familial risks. *J Med Genet.* 1977;14:81–90.
31. Eberwine, J. Amplification of mRNA populations using aRNA generated from immobilized oligo(dT)-T7 primed cDNA. *Biotechniques*, 1996;20(4): 584-91.
32. Elli Papaemmanuil et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nature Genetic.* 2014 feb; . vol46. p 16-124
33. Evans WE, Crews KR, Pui CH. A health-care system perspective on implementing genomic medicine: pediatric acute lymphoblastic leukemia as a paradigm. *Clin Pharmacol Ther.* 2013 Aug ;94(2):224-9.
34. Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*, 2005;65(20): 9328-37.
35. Ferrís i Tortajada, J; Garcia i Castell , J, Lopéz Andreu J.A., O.Berbel Tornero. *FACTORES DE RIESGO PARA LAS LEUCEMIAS AGUDAS INFANTILES.* *An Esp Pediatr* 1999; 50:439-446.
36. Fischer M, Schwieger M, Horn S, Niebuhr B, Ford A, Roscher S, Bergholz U, Greaves M, Löhler J, Stocking C. Defining the oncogenic function of the TEL/AML1 fusion protein in a mouse model. *Oncogene.* 2005; 24:7579–7591.
37. Fraga, M.F., Uriol, E., Borja Diego, L., Berdasco, M., Esteller, M., Canal, M.J., and Rodriguez, R. High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of 5-methyl 2'-deoxycytidine in genomic DNA: application to plant, animal and human cancer tissues. *Electrophoresis*, 2002; 23(11): 1677-81 .
38. Ganzel C, Becker J, Mintz PD, Lazarus HM, Rowe JM. Hyperleukocytosis, leukostasis and leukapheresis: practice management. *Blood Rev.* 2012 May;26(3):117-22.
39. García Bernal, M., Badell Serra I. Leucemia en la infancia, signos de alerta. *Anales Pediatría Continuada.* 2012; 10:1-7. Vol.10. Num.1.
40. Garcia-Hernandez, B., Castellanos, A., Lopez, A., Orfao, A., and Sanchez-Garcia, I. Murine hematopoietic reconstitution after tagging and selection of

- retrovirally transduced bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997; 94(24): 13239-44.
41. Gardner MJ. Father's occupational exposure to radiation and the raised level of childhood leukemia near the Sellafield Nuclear Plant. *Environ Health Perspect*. 1991; 94:5-7.
42. Gardner MJ, Snee MP, Hall AJ, Powell CA, Downes S, Terrell JD. Results of case-control study of leukemia and lymphoma among young people near Sellafield nuclear plant in West Cumbria. *BMJ*. 1990; 300:423-429.
43. Gaynon PS. Acute leukemia in children. *Curr Opin Hematol* 1995; 2:240-246.
44. Gibbs, C.P., Kukekov, V.G., Reith, J.D., Tchigrinova, O., Suslov, O.N., Scott, E.W., Ghivizzani, S.C., Ignatova, T.N., and Steindler, D.A. Stem-like cells in bone sarcomas: implications for tumorigenesis. *Neoplasia*, 2005;7(11): 967-76.
45. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 3616-22.
46. Greaves MF. The new biology of leukemia. En: Henderson ES, Lister TA eds. *Leukemia*. 6ª edición. Philadelphia: WB Saunders, 1996; 34-45.
47. Greaves MF, Alexander FE. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia*. 1993;7(3):349-360.
48. Greaves M, Colman SM, Kearney L, Ford AM. Fusion genes in cord blood. *Blood*. 2011; 117: : 369-370.
49. Greaves, M. Is telomerase activity in cancer due to selection of stem cells and differentiation arrest? *Trends Genet*, 1996; 12(4): 127-8.
50. Greenland S, Sheppard AR, Kaune WT, Poole C, Kelsh MA. A pooled analysis of magnetic fields, wire codes, and childhood leukemia, Childhood-EMF Study Group. *Epidemiology*. 2000; 11:624-634.
51. Gross L. Viral etiology of cancer and leukemia: a look into the past, present and future. *Cancer Res*. 1978; 38:485-493.

52. Grünwald H, Rosner F. Chemicals and leukemia. En: Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. Leukemia. 6ª edición. Philadelphia: WB Saunders, 1996; 179-194.
53. Hans-Peter Kantner, Wolfgang Warsch, Alessio Delogu,* Eva Bauer, Harald Esterbauer, Emilio Casanova,* Veronika Sexl, and Dagmar Stoiber ETV6/RUNX1 induces reactive oxygen species and drives the accumulation of DNA damage in B cells. *Neoplasia* 2013 Nov;15(11):1292-300
54. Harras A, Edwards BK, Blot WS, Gloecker-Ries LA, editors. Cancer. Rates and Risk. National Institutes of Health. National Cancer Institute. NIH Publ 1996;No 96-691.
55. Hasse R, et all. Leukaferesis and exange transfusion in children with acute leukemia and hyperleucocytosis. A single center experience. *Klin Padiatr* 2009 Nov-Dec; 221(6):374-8.
56. Hatch EE, Linet MS, Kleinerman RA, Tarone RE, Severson RK, Hartsock CT, et al. Association between childhood acute lymphoblastic leukemia and use of electrical appliances during pregnancy and childhood. *Epidemiology*. 1998; 9:234–245.
57. Hauri D, Spycher B, Huss A, Zimmermann F, Grotzer M, von der Weid N, Weber D, Spoerri A, Kuehni CE, Rösli M; Domestic radon exposure and risk of childhood Cancer: a prospective census-based cohort study. 2013.
58. Heath CW, Jr, Moloney WC. Familial leukemia: five cases of acute leukemia in three generations. *N Engl J Med*. 1965;272:882–887.
59. Hogan B, C.F.L., *Manipulating the mouse embryo: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY. 1995.
60. Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., and Gelfand, D.H. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991; 88(16): 7276-80.
61. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, et al.: The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet* 45 (3)2013; 242-52.

62. Hopman S, Merks J, Eussen H, Douben H, Snijder S, Hennekam R, de Klein A, Caron H. Eur J Cancer. 2013 Mar 6. pii: S0959-8049(13)00109-3.
63. Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. Dev Cell, 2003; 5(2): 351-8.
64. Houldsworth, J. and Chaganti, R.S. Comparative genomic hybridization: an overview. Am J Pathol, 1994.;145(6): 1253-60
65. Hunger SP: Chromosomal translocations involving the E2A gene in acute lymphoblastic leukemia: clinical features and molecular pathogenesis. Blood, 1996; 87 (4): 1211-24.
66. Hunger S, Lu X, Devidas M, et al. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children´s oncology group. J Clin Oncol. 2012. Epub ahead of print.
67. Hutchinson RJ., Gaynon PS, Sather H., et al. Intensification of therapy for children with lower-risk acute lymphoblastic leukemia: long-term follow-up of patients treated on Children's Cancer Group Trial 1881. J Clin Oncol. 2003; 21(9): 1790-7.
68. Infante-Rivard C, Guiguet M. Family history of hematopoietic and other cancers in children with acute lymphoblastic leukemia. Cancer Detect Prev. 2004;28:83–87.
69. Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene, 1990; 96(1): 23-8.
70. Jeha S, Pei D, Raimondi SC, et al.: Increased risk for CNS relapse in pre-B cell leukemia with the t(1;19)/TCF3-PBX1. Leukemia 2009; 23 (8): 1406-9.
71. Ji BT, Shu XO, Linet M, Xheng W, Wacholder S, Gao YT, et al. Paternal cigarette smoking and risk for childhood cancer among offspring of nonsmoking mothers. J Natl Cancer Inst.1997;89:238–244
72. Jiménez Schuhmacher, Alberto. El ratón como modelo animal en oncología. Pasado, presente y futuro. Boletín oncológico del área sanitaria de teruel. Boletín 23, vol. 2, año 2006.

73. Johansson B, Moorman AV, Haas OA, et al.: Hematologic malignancies with t(4;11)(q21;q23)--a cytogenetic, morphologic, immunophenotypic and clinical study of 183 cases. European 11q23 Workshop participants. *Leukemia* 1998; 12 (5): 779-87.
74. Jones, R.J., Matsui, W.H., and Smith, B.D. Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst*, 2004; 96(8): 583-5.
75. Kanerva J, Saarinen-Pihkala UM, Niini T, et al.: Favorable outcome in 20-year follow-up of children with very-low-risk ALL and minimal standard therapy, with special reference to TEL-AML1 fusion. *Pediatr Blood Cancer* 42 (1) 2004:: 30-5.
76. Kang H, Wilson CS, Harvey RC, et al.: Gene expression profiles predictive of outcome and age in infant acute lymphoblastic leukemia: a Children's Oncology Group study.. *Blood* 119 (8) 2012; 1872-81.
77. Kara M, Kelly MD. Acute Lymphoblastic Leukemia. En: Weiner MA, Cairo eds, MS, *Pediatric Hematology/Oncology Secrets*. Philadelphia. Hanley and Belfus Inc.; 2002; p. 109-14.
78. Kaye SA, Robison LL, Smithson WA, Gunderson P, King FL, Neglia JP. Maternal reproductive history and birth characteristics in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*.1991;68:1351–1355.
79. Kinlen LJ. Epidemiological evidence for an infective basis in childhood leukaemia. *Br J Cancer*. 1995 Jan; 71(1):1-5.
80. Kleinerman RA, Kaune WT, Hatch EE, Wacholder S, Linet MS, Robison LL, et al. Are children living near high-voltage power lines at increased risk of acute lymphoblastic leukemia? *Am J Epidemiol*. 2000; 151:512–515.
81. Klunk, W.E., Pettegrew, J.W., and Abraham, D.J. Quantitative evaluation of congo red binding to amyloid-like proteins with a beta-pleated sheet conformation. *J Histochem Cytochem*, 1989; 37(8): 1273-81.
82. Knudson AG .Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* April 1971; 68 (4): pp. 820–3

83. Kosary CL, Gloeckler-Ries LA, Miller BA, Hankey BF, Harras A, Edwards BK, editors. SEER cancer statistics review, 1973-1992. National Cancer Institute. NIH 1996;Publ No 96-2789.
84. Lassaleta Atienza, A. Leucemias. Leucemia linfoblástica aguda .Pediatría integral Sepeap. Órgano de expresión de la Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria . Volumen XVI. Número 6. Jul-Ago 2012; 453-459.
85. Lausten-Thomsen U, Madsen HO, Vestergaard TR, Hjalgrim H, Nersting J, et al. Prevalence of t(12;21)[ETV6-RUNX1]-positive cells in healthy neonates. Blood 117 2011. ; 186–189)
86. Lessard, J. and Sauvageau, G. Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. Nature, 2003; 423(6937): 255-60.
87. Lilljebjorn H, Sonesson C, Andersson A, Heldrup J, Behrendtz M, Kawamata N, et al. The correlation pattern of acquired copy number changes in 164 ETV6/RUNX1-positive childhood acute lymphoblastic leukemias. Hum Mol Genet 2010 Aug15; 19(16): 3150-3158.
88. Linet MS, Hatch EE, Kleinerman RA, Robison LL, Kaune WT, Friedman DR, et al. Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children. N Engl J Med.1997;337:1–7.
89. Loh ML, Goldwasser MA, Silverman LB, et al.: Prospective analysis of TEL/AML1-positive patients treated on Dana-Farber Cancer Institute Consortium Protocol 95-01. Blood 107 (11)2006;: 4508-13.
90. Lombardi C, Heck JE, Cockburn M, Ritz B. Solar UV radiation and cancer in young children. Cancer Epidemiol Biomarkers. Prev. 2013 Jun; 22(6):1118-28.
91. Lowengart RA. Childhood leukemia and parent's occupational and home exposures. J Natl Cancer Inst. 1987; 79:39–46.
92. Ma, X., Ling, K.W., and Dzierzak, E. Cloning of the Ly-6A (Sca-1) gene locus and identification of a 3' distal fragment responsible for high-level gamma-interferon-induced expression in vitro. Br J Haematol, 2001; 114(3): 724-30.
93. Malagoli C, Fabbi S, Teggi S, Calzari M, Poli M, Ballotti E, Notari B, Bruni M, Palazzi G, Paolucci P, Vinceti M. Risk of hematological malignancies associated

- with magnetic fields exposure from power lines: a case-control study in two municipalities of northern Italy. *Environ Health*. 2010 Mar 30; 9:16.
94. Margolin JF, Steuber CP, Poplack DG. Acute lymphocytic leukemia. In: *Principles and Practice of Pediatric Oncology* (Pizzo PA, Poplack DG, eds). Philadelphia:JB Lippincott,2001; 518-565.
95. Martín Ramos ML, Fernández Martínez FJ, Barreiro Miranda E. Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. *Anales pediatría* Julio 2001; Vol.55 Núm.01.
96. Milan Škorvaga,Ekaterina Nikitina, Miroslav Kubeš, Pavol Košík, Beata Gajdošechová,Michaela Leitnerová,Lucia Copáková, and Igor Belyaev. Incidence of Common Preleukemic Gene Fusions in Umbilical Cord Blood in Slovak Population. *PLoS One*. 2014; 9(3): e91116.
97. Miller RW. Persons with exceptionally high risk of leukemia. *Cancer Res*. 1967;27:2420–2423.
98. Moloney W. Leukemia in survivors of atomic bombing. *N Engl J ed*. 1955;253:88–90.
99. Mori H, Colman SM, Xiao Z, Ford AM, Healy LE, Donaldson C, Hows JM, Navarrete C, Greaves M. Chromosome translocations and covert leukemic clones are generated during normal fetal development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8242–8247.
100. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LA, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. 2009;41:1243–1246.
101. Myers A, Clyden A, Cartwright RA, Cartwright SC. Childhood cancer and overhead powerlines: a case-control study. *Br J Cancer*. 1990;62:1008–1014.
102. Neel JV, Schull WJ, Noshchenko AG, Moysich KB, Bondar A. Patterns of acute leukemia occurrence among children in the Chernobyl region. *Int J Epidemiol*. 2001;30:125–129.
103. Ortega Aramburu JJ. Leucemias agudas en el niño: treinta años después (1968/1997). *Haematologica* (ed. esp.). 1998; 83(Supl. 1).

104. Perez-Caro, M., Perez-Mancera, P.A., Voces, F., and Sanchez-Garcia, I. Of man in mouse: modelling human cancer genotype-phenotype correlations in mice. *Current Genomics*, 2005; 6: 81-88.
105. Petridou E, Trichopoulos D, Dessypris E, et al. Infant leukaemia after in utero exposure to radiation from Chernobyl. *Nature* 1996; 382: 352-353.
106. Pui CH, Campana D, Pei D, et al.: Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation *N Engl J Med* 2009; 360 (26): 2730-41.
107. Pui CH, Carrol WL, Meschini S, Arceci R. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol.* 2011; 29: 551-65
108. Pui CH, Chessells JM, Camitta B, et al.: Clinical heterogeneity in childhood acute lymphoblastic leukemia with 11q23 rearrangements. *Leukemia* 2003; 17 (4): 700-6..
109. Pui CH. Leucemias infantiles. En: Murphy GP, Laurence Jr W, Lenhard Jr RE, eds. *Oncología Clínica. Manual de la American Cancer Society. 2ª edición.* Washington: Organización Panamericana de la Salud, 1996;561-586
110. Pulte D, Gondos A, Brenner H: Improvement in survival in younger patients with acute lymphoblastic leukemia from the 1980s to the early 21st century. *Blood* 2009; 113 (7): 1408-11.
111. Rabin KR, Poplack DG. Management strategies in acute lymphoblastic leukemia. *Oncology.* 2011; 25(4): 328-35.
112. Ravindranath Y. MBBS. Recent advances in pediatric acute lymphoblastic and myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 2003; 15: 23-35.
113. Reya, T., Duncan, A.W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D.C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I.L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, 2003; 423(6938): 409-14.
114. Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001; 414(6859): 105-11.
115. Rivard CE, Deadman JE. Maternal occupational exposure to extremely low frequency magnetic fields during pregnancy and childhood leukemia. *Epidemiology.* 2003;14:437-441.

116. Robison LL, Codd M, Gunderson P, Neglia JP, Smithson WA, King FL. Birth weight as a risk factor for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol*. 1987;4:63–72.
117. Ross JA, Potter JD, Shu XO, Reaman GH, Lampkin B, Robison LL. Evaluating the relationship among maternal reproductive history, birth characteristics, and infant leukemia: a report from the Children's Cancer Group. *Ann Epidemiol*. 1997; 7:172–179.
118. Rubnitz JE, Camitta BM, Mahmoud H, et al.: Childhood acute lymphoblastic leukemia with the MLL-ENL fusion and t(11;19)(q23;p13.3) translocation. *J Clin Oncol* 1999; 17 (1): 191-6.
119. Rubnitz JE, Pui CH. Recent advances in the biology and treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Hematol* 1997; 4:233-241.
120. Russell, D. *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Third ed. Cold Spring, 2001: Lab. Harbor. Press. Plainview, NY.
121. Sabaawy HE, Azuma M, Embree LJ, Tsai HJ, Starost MF, Hickstein DD. TEL-AML1 transgenic zebrafish model of precursor B cell acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:15166–15171.
122. Sanchez d Toledo Codina J, Ortega Aramburu JJ. *Manual practico de hematologia y oncologia pediatricas*. Barcelona. Ergon. 2010; p 193-208.
123. Sandler DP, Ross JA. Epidemiology of acute leukemia in children and adults. *Semin Oncol* 1997; 24: 3-16.
124. Sanz Miguel A; Carreras Enric. *Manual práctico de hematología clínica*. 4ª edición. Barcelona. Antares. 2012; p 247-260.
125. Savitz, D.A., and J. Chen. Parental occupation and childhood cancer: Review of epidemiologic studies. *Environ. Health Perspect*. 1990; 88:325-337.
126. Schindler JW, Van Buren D, Foudi A, Krejci O, Qin J, Orkin SH, Hock H. TEL-AML1 corrupts hematopoietic stem cells to persist in the bone marrow and initiate leukemia. *Cell Stem Cell*. 2009;5:43–53
127. SEHOP- PETHEMA Protocolo Leucemia aguda linfoblástica. 2013.

128. Shearer P, Parham D, Kovnar E, Kun L, Rao B, Lobe T, et al. Neurofibromatosis type I and malignancy: review of 32 pediatric cases treated at a single institution. *Med Pediatr Oncol.* 1994;22:78–83.
129. Shi, R. and Chiang, V.L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*, 2005; 39(4): 519-25.
130. Shu XO, Ross JA, Pendergrass TW, Reaman GH, Lampkin B, Robison LL. Parental alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of infant leukemia: a Children's Cancer Group study. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88(1):24–31
131. Shu XO, Stewart P, Wen WQ, Han D, Potter JD, Buckley JD, et al. Parental occupational exposure to hydrocarbons and risk of acute lymphocytic leukemia in offspring. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8:783–791.
132. Silverman Lewis B. Acute lymphoblastic leukemia. En: Orkin SH, Fisher DE, Llok AT, Lux SE, Ginsburg D, Nathan DG, editors. *Oncology of Infancy and Childhood*. 1st edition. Philadelphia: Saunders; 2009; p. 297-330.
133. Silverman LB, Stevenson KE, O'Brien JE, et al.: Long-term results of Dana-Farber Cancer Institute ALL Consortium protocols for children with newly diagnosed acute lymphoblastic leukemia (1985-2000). 2010; 24 (2): 320-34.
134. Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*, 2003.; 63(18): 5821-8.
135. Smith MA, Mc Caffrey RP, Karp JE. The secondary leukemias: challenger and research. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88: 407-418.
136. Sorahan T, Lancashire R, Prior P, Stewart A. Childhood cancer and parental use of alcohol and tobacco. *Ann Epidemiol.* 1995;5:354–359
137. Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, 1988; 241(4861): 58-62.
138. Subdirección General de Sanidad Ambiental y Salud Laboral Dirección General de Salud Pública y Consumo Ministerio de Sanidad y Consumo) CAMPOS ELECTROMAGNÉTICOS Y SALUD PÚBLICA INFORME TÉCNICO ELABORADO POR EL COMITÉ DE EXPERTOS

139. Shu, M.R., Lee, Y., Kim, J.Y., Kim, S.K., Moon, S.H., Lee, J.Y., Cha, K.Y., Chung, H.M., Yoon, H.S., Moon, S.Y., Kim, V.N., and Kim, K.S. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 2004; 270(2): 488-98.
140. Swift M. Fanconi's anemia in the genetics of neoplasia. *Nature*. 1971; 230:370–373.
141. Swiss National Cohort; Swiss Paediatric Oncology Group (SPOG). Domestic radon exposure and risk of childhood cancer: a prospective census-based cohort study. *Environ Health Perspect* 2013; 121:1239-1244
142. Taipale, J. and Beachy, P.A. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature*, 2001. 411(6835): 349-54.
143. Tanaka, T.S., Jaradat, S.A., Lim, M.K., Kargul, G.J., Wang, X., Grahovac, M.J., Pantano, S., Sano, Y., Piao, Y., Nagaraja, R., Doi, H., Wood, W.H., 3rd, Becker, K.G., and Ko, M.S. Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000; 97(16): 9127-32.
144. Taylor GM, Birch JM. The hereditary basis of human leukemia. Henderson ES, Lister TA, Greaves MF, eds. *Leukemia*. 6ª edición. Philadelphia: WB Saunders 1996; 210-245.
145. Toledano S, Lange B. Ataxia-telangiectasia and acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1980; 45:1675–1678.
146. Tsuzuki S, Seto M, Greaves M, Enver T. Modeling first-hit functions of the t(12;21) TEL-AML1 translocation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:8443–8448
147. Uckun FM, Sensel MG, Sather HN, et al.: Clinical significance of translocation t(1;19) in childhood acute lymphoblastic leukemia in the context of contemporary therapies: a report from the Children's Cancer Group.. *J Clin Oncol* 1998; 16 (2): 527-35.
148. United Nations Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Sources and Effects of Ionizing Radiation. New York: United Nations. 1994;.Publ E 94-IX-11.

149. Van Delft FW, Horsley S, Colman S, et al.: Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011; 117 (23): 6247-54.
150. Van der Weyden L, Giotopoulos G, Rust AG, Matheson LS, van Delft FW, Kong J, Corcoran AE, Greaves MF, Mullighan CG, Huntly BJ, et al. Modeling the evolution of ETV6-RUNX1-induced B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in mice. *Blood*. 2011; 118:1041–1051.
151. Van Steensel-Moll HA, Valkenburg HA, Vandenbroucke JP & van Zanen GE Are maternal fertility problems related to childhood leukemia. *Int J Epidemiol* 14:1985; 555–559 .
152. Vaquerizas, J.M., Conde, L., Yankilevich, P., Cabezon, A., Minguez, P., Diaz-Uriarte, R., Al-Shahrour, F., Herrero, J., and Dopazo, J. GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33.
153. Vargas Francisco, Ubeda Alejandro et al. Campos electromagneticos y salud publica. Informe técnico elaborado por el comité de expertos. P. 8 -11
154. Vicente Dueñas, Carolina; Voces, Felipe; Pérez-Caro, María; González-Herrero, I., and Sánchez-García., I. Improving the development on new cancer treatments: challenges and opportunities. *Drug Design Review-Online*, 2005; 2(5): 341-48(8).
155. Wagers, A.J., Sherwood, R.I., Christensen, J.L., and Weissman, I.L. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science*, 2002; 297(5590): 2256-9.
156. Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*, 2006; 66(4): 1883-90; discussion 95-6.
157. Willis A, Lindahl T. DNA ligase deficiency in Bloom's Syndrome. *Nature*. 1987; 325:355–357.
158. Yeazel MW, Ross JA, Buckley JD, Woods WG, Ruccione K, Robison LL. High birth weight and risk of specific childhood cancers: a report from the Children's Cancer Group. *J Pediatr*. 1997.Nov;131(5):671-7.

159. Yones OY, Spencer ChH, Bowyer SL, Dent PB, Gottlieb BS, Rabinovich EE. A Multicenter case-control study on predictive factors distinguishing childhood leukemia from juvenile rheumatoid arthritis. *Pediatrics*. 2006; 117:e840-44.
160. Yu, J., Wang, F., Yang, G.H., Wang, F.L., Ma, Y.N., Du, Z.W., and Zhang, J.W. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006; 349(1): 59-68.
161. Zhang, B., Pan, X., and Anderson, T.A. MicroRNA: a new player in stem cells. *J Cell Physiol*, 2006; 209(2): 266-9.
162. Zuna J, Ford AM, Peham M, et al.: TEL deletion analysis supports a novel view of relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res* 2004; 10 (16): 5355-60.
163. Zuna J, Madzo J, Krejci O, Zemanova Z, Kalinova M, Muzikova K, Zapotocky M, Starkova J, Hrusak O, Horak J, Trka J ETV6/RUNX1 (TEL/AML1) is a frequent prenatal first hit in childhood leukemia. *Blood*. 2011 Jan 6; 117(1):368-9; author reply 370-1.

