

Características y valor de las aberraciones cromosómicas inducidas por los tratamientos antitumorales en pacientes pediátricos con cáncer

R. López de Mesa, L. Sierrasesúмага, ¹M^a J. Calasanz, ²A. López de Cerain, A. Patiño

Laboratorio de Pediatría, Departamento de Pediatría.

¹Departamento de Genética, ²Laboratorio de Toxicología, C.I.F.A., Universidad de Navarra

RESUMEN: Con el fin de determinar el número y tipo de alteraciones cromosómicas inducidas por las drogas citostáticas, analizamos, mediante cariotipo convencional, muestras de sangre periférica (n=127) de pacientes pediátricos con tumores (n=80) que fueron obtenidas al diagnóstico, durante el tratamiento, en remisión clínica y en recidiva tumoral. Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo del número de cariotipos alterados en las muestras recogidas durante el tratamiento y en recidivas tumorales, reduciéndose a valores próximos a los obtenidos al diagnóstico en las muestras de pacientes que llevaban, al menos, dos años en remisión clínica. La mayoría de las aberraciones cromosómicas (AC) eran de tipo no equilibrado (75%) y afectaban principalmente a los cromosomas 1, 3, 5, 6, 11, 12, 16 y 17.

Existe una destacable coincidencia entre los puntos de rotura detectados en nuestra serie y lugares cromosómicos que han sido descritos como loci para oncogenes (75%), genes de supresión tumoral (33%) y puntos frágiles (58%).

Los resultados obtenidos sugieren que las drogas citostáticas inducen un incremento temporal en la fragilidad cromosómica que no se distribuye al azar si no que coincide con lugares genéticos implicados en la aparición y progresión de determinados tumores.

SUMMARY: Cytogenetic studies were performed on 80 pediatric cancer patients to test the chromosomal damage induced by the chemotherapy treatments. G-banded karyotypes were performed on peripheral blood lymphocytes (PBL) (n=127) obtained at diagnosis, during treatment, at remission and at relapse.

We detected a significant increase in the number of altered karyotypes in the samples during treatment, lowering to similar values to those at diagnosis at two-year remission. Most of the chromosomal aberrations (CA) detected during chemotherapy were unbalanced (75%) and affected most frequently chromosomes 1, 3, 5, 6, 11, 12, 16 and 17. There was also a marked increase of CA in samples at relapse, with similar features (type and distribution) to those detected during treatment. There was an outstanding correlation between the chromosomal breakpoints in our series and fragile sites (58%), oncogene (75%) and tumour suppressor gene (33%) loci described in the literature.

The results obtained suggest that the cytostatic drugs induce a transient increase in chromosome fragility that focuses to several cancer-associated breakpoints.

Palabras clave

Aberraciones cromosómicas, quimioterapia, tumores pediátricos.

Key words

Chromosomal aberrations, chemotherapy, pediatric cancer.

Correspondencia

Dra. Ana Patiño García
Laboratorio de Pediatría
Universidad de Navarra
31080 Pamplona (España)
Teléfono: 948-425653
Fax: 948-425652
E-Mail: apatigar@unav.es

Introducción

El análisis de las aberraciones cromosómicas (AC) detectadas en linfocitos de sangre periférica (peripheral blood lymphocytes, PBL) es un método utilizado para medir la inestabilidad cromosómica inducida por mutágenos en diferentes poblaciones expuestas a agentes genotóxicos (1). Diversos autores, basados en la hipótesis de que el daño genético detectado en el PBL refleja en cierta forma los eventos carcinogénicos que tienen lugar en los tejidos diana, han demostrado que un incremento de AC, a menudo se relaciona con mayor riesgo de desarrollar un tumor (2-4). Los estudios cromosómicos en pacientes con cáncer pueden considerarse un método adecuado y fiable para valorar la genotoxicidad inducida por los tratamientos antitumorales.

Muchas de las drogas utilizadas como agentes citostáticos son capaces de inducir daños cromosómicos (5), y han mostrado su capacidad de producir leucemias y síndromes mielodisplásicos secundarios (6). Así como las alteraciones genéticas presentes en las células tumorales frente a las normales han sido ampliamente estudiadas (7), los daños genéticos que se producen debido a los tratamientos no están bien caracterizados. Algunos autores han encontrado un aumento de AC asociado a los tratamientos de qui-

mioterapia (8, 9), pero no sólo el incremento en la frecuencia, sino también el tipo y distribución de las aberraciones estructurales son importantes y deben analizarse.

Diversos autores han demostrado que las roturas cromosómicas inducidas por agentes mutagénicos y carcinogénicos coinciden, con mucha frecuencia, con la localización de los puntos de rotura que se han descrito en la bibliografía asociados con el desarrollo de tumores (10). La mayoría de los oncogenes cuyos loci son conocidos se localizan en estos puntos de rotura (4, 11). También se han descrito lugares conocidos como sitios frágiles que, de hecho, mapean en las mismas bandas cromosómicas o algunas muy cercanas físicamente a loci de oncogenes o genes de supresión tumoral (12, 13).

El objetivo de este trabajo era, no sólo comprobar que la frecuencia de AC incrementa debido a los regímenes antitumorales, sino también determinar el tipo de alteraciones y su posible relación con las bandas implicadas en puntos de rotura asociados con sitios frágiles o con loci de oncogenes y genes de supresión tumoral. Finalmente, se intentará analizar su persistencia temporal y su posible relación con un riesgo incrementado de desarrollo de recidivas tumorales o segundos tumores.

Tabla I

Esquema de los tratamientos recibidos por los pacientes incluidos en el estudio

TUMOR	³ Grupo A	⁴ Grupo B	⁵ Grupo C	⁶ Grupo D	Radioterapia
¹ SE	+	+	+	+	+
Osteosarcoma	+	+	+	+	-
Linfoma	+	+	+	+	+
² Tumor SNC	+	-	+	+	+

¹SE, Sarcoma de Ewing, ²SNC, Sistema Nervioso Central, ³Agentes alquilantes (ciclofosfamida, ifosfamida, CCNU, BCNU), cisplatino y procarbazona; ⁴Antibióticos citostáticos (actinomicina D, adriamicina, bleomicina, daunomicina); ⁵Antimetabolitos (metotrexate, arabinósido de citarabina); ⁶Inhibidores del huso (vincristina, vimblastina). El signo "+" indica que todos los pacientes con ese diagnóstico han recibido una o varias drogas pertenecientes a ese grupo, y el signo "-" indica ausencia de ese grupo concreto de drogas o tratamiento.

Material y métodos

• Pacientes y muestras

El estudio cromosómico se realizó a 80 pacientes pediátricos. Los pacientes se distribuyeron en cuatro grupos tumorales: 22 Sarcomas de Ewing (ES), 32 Osteosarcomas (OS), 13 linfomas y 13 tumores del sistema nervioso central (SNC). Se obtuvieron un total de 127 muestras de sangre periférica, anticoagulada en heparina, en los siguientes momentos de evolución: 11 al diagnóstico, 37 al final del tratamiento, 38 en remisión a corto plazo (entre el primer y segundo año tras finalizar el tratamiento), 31 en remisión a largo plazo (más de dos años tras finalizar el tratamiento) y 10 en recidiva tumoral.

En la Tabla I se resume el tipo de tratamiento recibido por los pacientes, en la que los diferentes citostáticos se han dividido en grupos según su mecanismo de acción.

• Estudio citogenético

Se analizaron un mínimo de 50 metafases obtenidas a partir de cultivos de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina. Las aberraciones cromosómicas se detectaron mediante bandas G y se describieron siguiendo las indicaciones del *International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)* (14).

• Análisis estadístico

Se realizó utilizando el programa *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)*, versión 9.0. Los métodos utilizados fueron el test de contingencia de Chi-cuadrado y el test de Kruskal-Wallis, según el tipo de variables estudiadas y el cumplimiento de los criterios de normalidad. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas a partir de $p \leq 0.05$.

Resultados

Se han analizado 127 muestras de pacientes pediátricos con cáncer obtenidas antes, durante y al finalizar los tratamientos antitumorales. En el total de muestras analizadas 55.1% (70/127) presentaban un cariotipo alterado. La frecuencia de muestras con cariotipo alterado era mayor en los ES y en los linfomas, aunque no se observan diferencias significativas entre los cuatro grupos tumorales.

En el estudio de los cariotipos respecto al estadio (Tabla II) se observa una diferencia significativa ($p=0.04$) en la distribución de cariotipos aberrantes en los distintos momentos de evolución. El cariotipo se altera significativamente en el grupo en tratamiento (64.8%, $p=0.03$) y en el grupo de recidivas (80%, $p=0.05$).

Respecto al tipo de alteraciones cromosómicas, no se detectaron diferencias significativas en ninguno de los tipos de alteraciones ni en el total de las mismas

Tabla II

Resultados de la comparación de los cariotipos normales/aberrantes en los diferentes estadios considerados

Estadio	Número de muestras(n)	Cariotipo normal	¹ Cariotipo alterado	² Probabilidad (p)
Diagnóstico	11	7	4 (36.4)	0.36
Tratamiento	37	12	24 (64.8)	0.03
Remisión corta	38	16	22 (57.9)	0.33
Remisión larga	31	19	12 (38.7)	0.20
Recidiva	10	2	8 (80)	0.05
Total	127	56	70 (55.1)	0.04

¹Los números en paréntesis hacen referencia al porcentaje de cariotipos alterados en cada uno de los estadios,

²Test de contingencia de Chi-cuadrado: estadísticamente significativo $p \leq 0.05$

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

entre los cuatro grupos tumorales. Por el contrario, sí se detectaron diferencias significativas en el número y tipo de aberraciones cromosómicas entre los diferentes estadios (Tabla III).

Los pacientes presentaban cariotipos muy complejos, especialmente en el grupo de tratamiento y recidiva (Figuras 1 y 2). En los 70 cariotipos alterados se encontraron un total de 275 alteraciones, lo que supone 3.9 alteraciones por cariotipo alterado, esta proporción aumenta significativamente ($p=0.02$) en el grupo de tratamiento (5.5), y en el de recidivas (5.26). En el resto de los grupos las proporciones son menores y similares (Tabla III).

Del total de 275 alteraciones cromosómicas, 68 eran equilibradas (57 translocaciones) y 207 no equilibradas (56 deleciones y 89 pérdidas). Únicamente las alteraciones no equilibradas aumentan ($p=0.05$) durante el tratamiento y en las recidivas, con una proporción de 4.1 alteraciones por cariotipo alterado, frente a 2.8 en remisión a corto plazo y 1.5 en remisión a largo plazo y diagnóstico. En el caso de las pérdidas la diferencia se hace casi significativa ($p=0.06$).

En cuatro de los cariotipos estudiados (un linfoma de Hodgkin, un osteosarcoma y dos tumores del sistema nervioso central) se encontraron alteraciones clonales, definidas como la presencia de, al menos, dos células con el mismo cromosoma supernumerario o aberración cromosómica, o tres células con deleción completa del mismo cromosoma.

Con el fin de representar las aberraciones y puntos de rotura más frecuentes de una manera más comprensible y racional, se ha diseñado un idiograma en el que se representan los resultados obtenidos en las muestras obtenidas durante los tratamientos (Figura 3).

En el grupo de pacientes en tratamiento quimioterápico la proporción de cariotipos alterados y el número de alteraciones totales se hallaba incrementada significativamente, sin hallarse diferencias significativas en relación con el tipo de tumor. El total de alteraciones encontradas en este grupo fueron 134, de las cuales 30 eran equilibradas y 104 no equilibradas. Dichas alteraciones no seguían un patrón de distribución aleatorio. Las alteraciones más frecuentes fueron las pérdidas cromosómicas, un total de 46, que afectaron

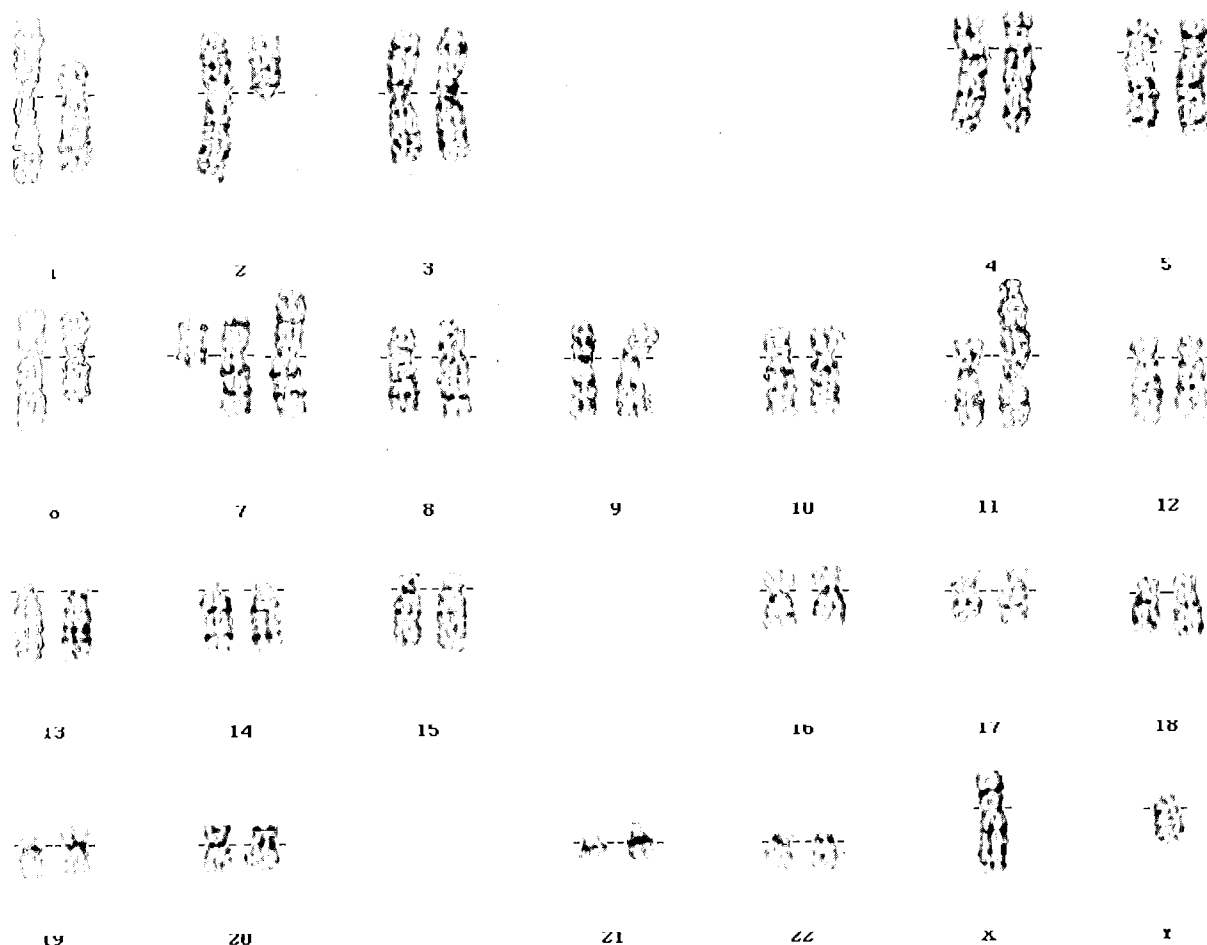
Tabla III

Aberraciones cromosómicas detectadas en los diferentes estadios considerados

Estadio	Cariotipos alterados ¹ p = 0.04 ² c	Nº total de aberraciones p = 0.02 3n (n/c)	Equilibradas p = 0.81 n (n/c)	No Equilibradas		Translocaciones p = 0.80	Deleciones p = 0.40	Pérdidas cromosómicas p = 0.06
				p = 0.05	n (n/c)			
Diagnóstico	4	9 (2.2)	3 (0.7)	6 (1.5)	3	0	3	
Tratamiento	24	134 (5.5)	30 (1.2)	104 (4.3)	21	23	46	
⁴ R.C.	22	62 (2.8)	16 (0.7)	46 (2.8)	15	16	16	
⁵ R.L.	12	28 (2.3)	10 (0.8)	18 (1.5)	9	7	8	
Recidiva	8	42 (5.2)	9 (1.1)	33 (4.1)	8	1	13	
Total	70	275 (3.9)	68 (0.9)	207 (2.9)	56	56	86	

¹Test de Kruskal-Wallis: estadísticamente significativo $p \leq 0.05$, ²Número de cariotipos alterados en cada uno de los estadios, ³Número total de alteraciones encontradas en cada uno de los estadios, ⁴R.C., Remisión a corto plazo, ⁵R.L., Remisión a largo plazo.

Figura 1



Ejemplo de cariotipo aberrante de una muestra obtenida durante el tratamiento en que se observa un gran número de alteraciones, tanto numéricas como estructurales

(Cariotipo: 47,XY,del(1)(p22),t(2;11)(q11;p15),del(6)(q21),-7,+der(7)t(1;7)(q25;p15),+der(7)t(7;17)(p15;p12).

taban especialmente a los cromosomas 2, 5, 7 y 10. Los puntos de rotura más frecuentes fueron (Fig. 3): en el cromosoma 1 las bandas p13 y q25; en el cromosoma 3, y correspondiendo sólo a OS y ES, las bandas p21 y q21-23; en el cromosoma 5 las bandas q11 y q31-35; en el cromosoma 6 las bandas q21-23; en el cromosoma 11 la banda p15, siendo la alteración más frecuente; en el cromosoma 12 la banda q13; en el cromosoma 16 las bandas q22-24 y, por último, en el cromosoma 17 las bandas p13 y q21. Muchos de ellos coinciden con puntos de rotura asociados a puntos frágiles (7/12, 58%) o *loci* de genes de

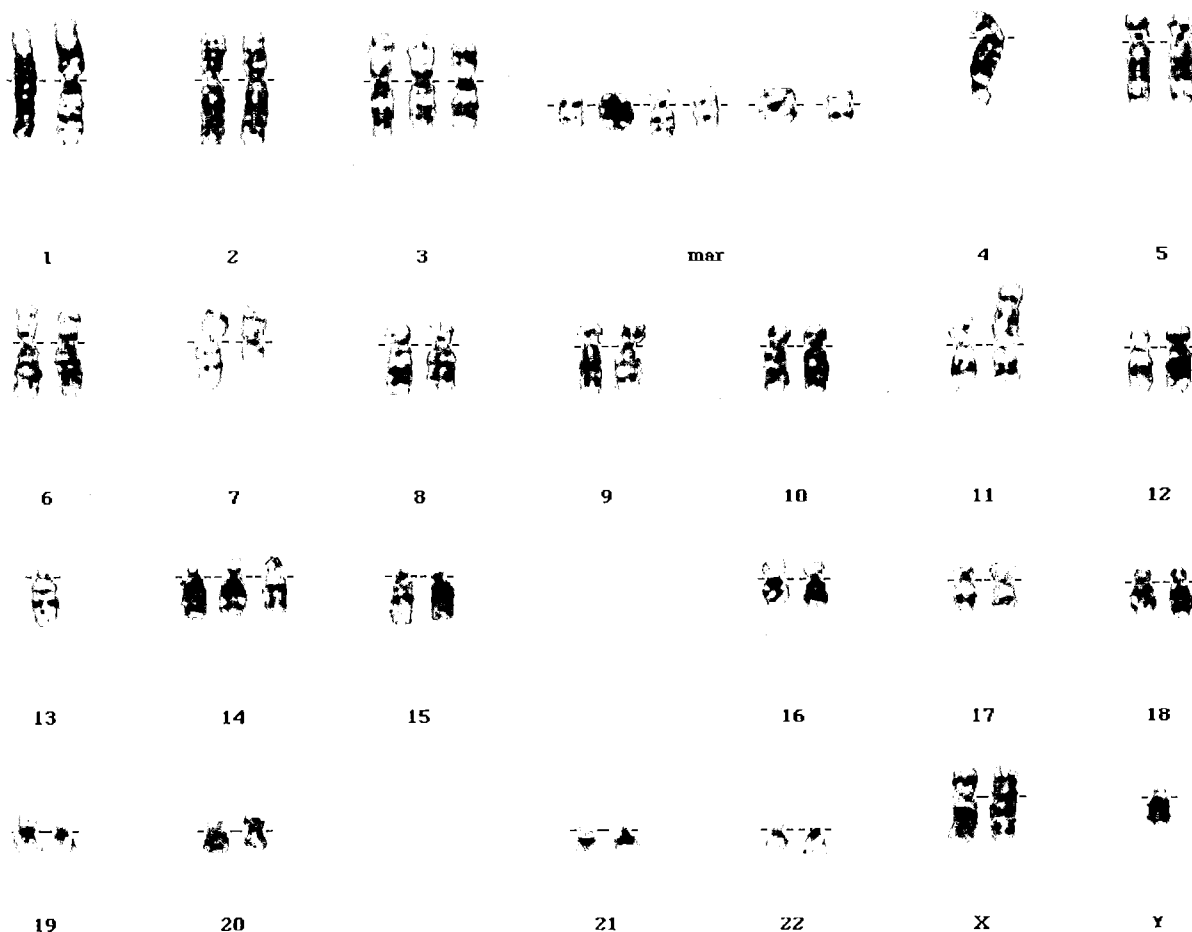
supresión tumoral (4/12, 33%), y especialmente, con *loci* de oncogenes (9/12, 75%)(Tabla IV).

Así mismo, en los 10 pacientes en recidiva (4 ES y 6 OS) 80% presentaban cariotipo alterado. Las alteraciones cromosómicas afectaban principalmente a los cromosomas 1p, 3p21, 5q31-35, 6q, 7q, 9q, 11p13-15 y 12p13, coincidiendo en gran parte con las encontradas en el grupo en tratamiento.

Discusión

Los estudios citogenéticos realizados en PBL en la población general han mostrado que los individuos

Figura 2



Ejemplo de cariotipo aberrante de una muestra obtenida durante el tratamiento en que se observa un gran número de alteraciones, tanto numéricas como estructurales

(Cariotipo: 53,X,+X,+Y,der(3)t(3;?)(p21;?),-4,der(4)dic(4;?)(q35:?),del(7)(q22),der(11)t(11;?)(p15;?)-13,+7mar.

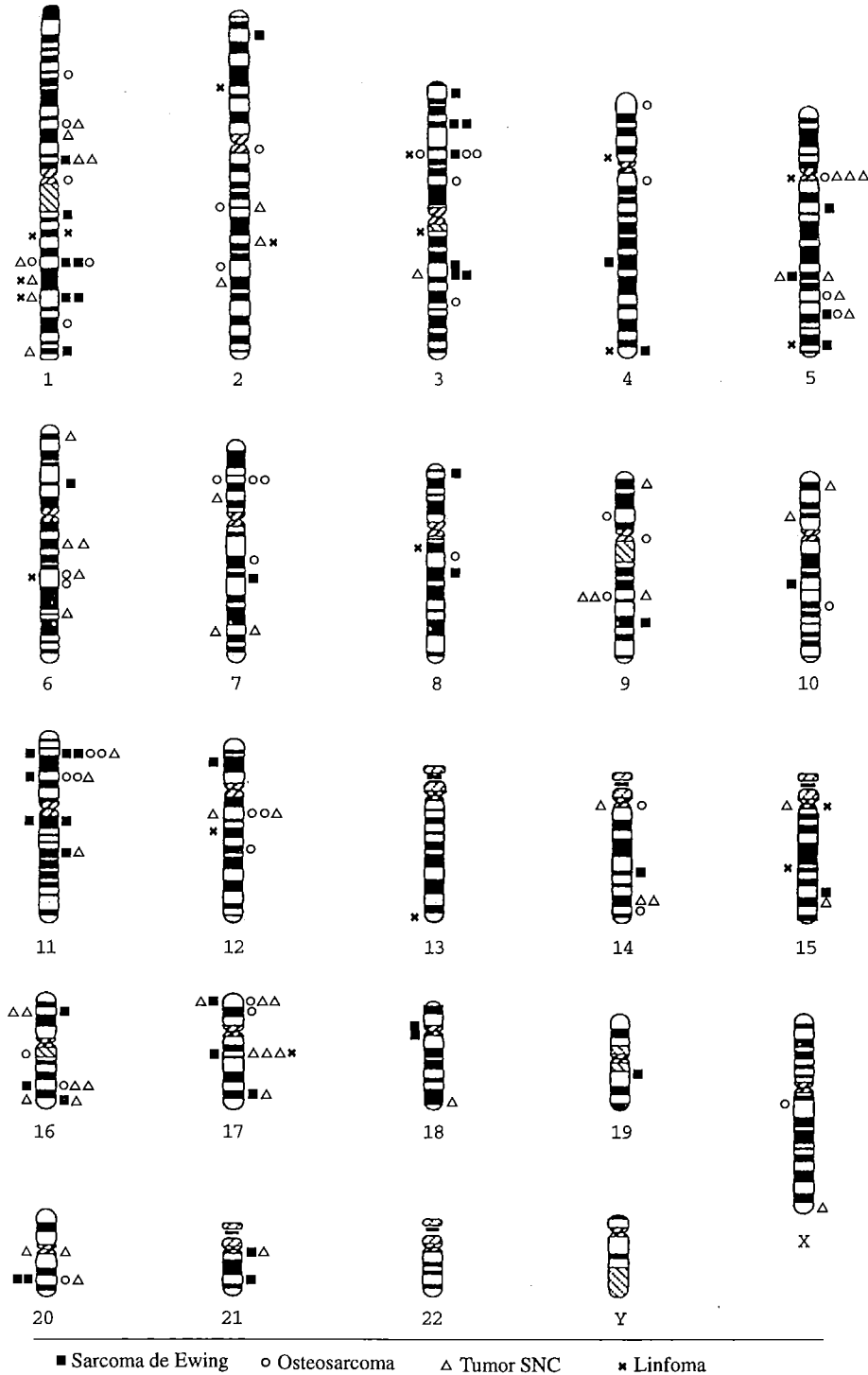
sanos pueden presentar AC en una proporción muy reducida de células, entre 0 y 2% (15). Los datos obtenidos en nuestro estudio muestran que existe una frecuencia incrementada de AC en pacientes pediátricos con tumores respecto a los niños sanos, tanto antes del tratamiento como posteriormente.

Debido a las combinaciones heterogéneas de drogas que se administran en los diferentes tratamientos, no es posible adjudicar el efecto individual de cada una de ellas sobre los cromosomas. Este hecho podría explicar que no se encuentren diferencias significativas, ni en la frecuencia, ni en el tipo de altera-

ciones cromosómicas, entre los cuatro grupos tumorales, aunque parece que los niños afectados de ES tienden a tener mayor número de AC al diagnóstico que los demás tipos tumorales.

El análisis del cariotipo a lo largo del seguimiento muestra diferencias significativas. Al igual que otros autores, encontramos un incremento de alteraciones en el cariotipo al final del tratamiento y una tendencia a normalizarse en los meses siguientes al tratamiento quimioterápico (5, 8, 9). En nuestro estudio, valores similares a los observados antes de los tratamientos se alcanzan en remisión a largo plazo, es

Figura 3



Idiograma en que se representan los puntos de rotura cromosómicos detectados en las muestras obtenidas en remisión a corto plazo (izquierda) y durante los tratamientos de quimioterapia (derecha).

ABERRACIONES CROMOSÓMICAS

Tabla IV

Relación de los puntos de rotura más frecuentes con sitios frágiles, oncogenes y genes de supresión tumoral

Bandas	Sitios frágiles	Oncogenes	¹ GST
1p13	-	NRAS	-
1q25	FRA1G	ARG, ABL2	-
3p21	-	TCTA, CTNNB1, AERB2	MLH1
3q21-23	-	-	-
5q11	-	-	-
5q31-35	FRA5C	IL-3, PDGFRB, CFS1R, NPM, FMS	-
6q21-23	FRA6F	MYB, SYR, FYN, ROS1	-
11p15	FRA11C	HRAS, RBTN1, NUP98, MTACR1	KIP2, H19
12q13	FRA12A	MDM2, INT1, GLI, CHOP, RARG, ERBB3, ATF1	-
16q22-24	FRA16B	CBFB, MAF	-
17p13	FRA17A	-	TP53
17q21	-	CERBB2/NEU, RARA, AF17, NM23, NGL	BRCA1

¹GST, Genes de supresión tumoral.

decir, dos o más años después de finalizar el tratamiento (aunque siempre mayores que los observados en la población general). En el grupo de recidivas, 80% de los pacientes presentan alteraciones en el cariotipo. Estos resultados apoyan la idea de que las aberraciones cromosómicas que encontramos representan la manifestación de un daño genómico subyacente y que, por tanto, aumentan en los momentos de mayor inestabilidad genética (durante el tratamiento y en las recidivas).

No sólo es importante el hecho de que incrementen las aberraciones cromosómicas durante los tratamientos citostáticos, sino también el tipo y la distribución de dichas alteraciones. Las AC inducidas por los agentes mutagénicos que encontramos en nuestras muestras son mayoritariamente de tipo cromátida y siguen un patrón de distribución no aleatorio. Los pacientes muestran cariotipos muy complejos, especialmente durante el tratamiento y en las recidivas, presentando en dichos estadios el doble de AC que al diagnóstico o en remisión.

En los últimos años, se han definido dos patrones diferentes de aberraciones cromosómicas asociadas con el desarrollo de neoplasias (16). Las anomalías cromosómicas primarias se consideran esenciales para el establecimiento del tumor, mientras que las secundarias ocurren asociadas a las primarias y son importantes en la progresión tumoral. Las aberraciones primarias consisten en reordenamientos cromosómicos de tipo estructural y equilibrado, principalmente translocaciones y algunas inversiones, y son más específicas que las secundarias, normalmente reflejadas en alteraciones no equilibradas como deleciones y pérdidas de cromosomas individuales (4, 16). Es interesante resaltar que, en nuestro estudio, existe un incremento significativo de las anomalías no equilibradas, principalmente de las pérdidas de cromosomas, en las muestras al final del tratamiento y en las recidivas, llegando a suponer casi 75% de las AC observadas. Algunos autores (16, 17) sugieren que la quimioterapia puede ser un factor importante a la hora de determinar qué subclones con aberraciones

TRASTORNOS CROMOSÓMICOS

secundarias aparecen en la remisión clínica. A diferencia de las alteraciones equilibradas, las consecuencias moleculares de las alteraciones no equilibradas recurrentes no se conocen con certeza.

Los cromosomas 5 y 7 están preferentemente implicados en casos de Leucemia Mieloide Aguda (AML) secundaria al tratamiento con agentes alquilantes, y la banda 11q23 en AML asociada con tratamientos con inhibidores de la topoisomerasa (6, 18). Las pérdidas de los cromosomas 5 y 7 han sido propuestas como indicadores de daño en el DNA producido por radiación, agentes alquilantes o por exposición laboral. En nuestros pacientes, la pérdida de ambos cromosomas, así como alteraciones del brazo largo del cromosoma 5 (principalmente 5q31-35), son algunas de las AC más frecuentemente observadas. Curiosamente, no encontramos alteraciones en la banda 11q23; probablemente debido al escaso uso de los inhibidores de la topoisomerasa en el grupo de pacientes estudiado. Sin embargo, la banda 11p15 aparece como el punto de rotura más frecuente. Las reordenaciones en 11p15 se han descrito en diversos tumores pediátricos y de adultos, así como de forma no aleatoria en AML secundarias a citostáticos en niños (19). Además, la implicación de la banda 11p15 en OS secundarios a radiación, sugiere que puede existir un punto frágil en esa localización y que el insulto genotóxico (sea quimioterapia o radioterapia) produce la rotura en esa banda concreta (20). Por último, merece la pena destacar que 11p15 ha sido descrito como locus para varios oncogenes y genes de supresión tumoral (11, 13).

El cromosoma 3 se encuentra frecuentemente afectado en nuestra serie. Las bandas más implicadas son 3q21-23 y 3p21, que han sido descritas como puntos de rotura recurrentes asociados a síndromes mielo-displásicos y leucemias mieloides secundarias a tratamientos quimioterápicos (19, 21).

Las reordenaciones de 6q21-23 y 17p13 se han observado en diferentes tipos de tumores sólidos; y los defectos del cromosoma 17 son frecuentes en pacientes que han recibido quimioterapia o radioterapia (18). Todos estos puntos tienen asociados puntos frágiles, oncogenes o genes de supresión tumoral.

Puede parecer que la cromatina contenida en determinadas bandas es especialmente susceptible al daño producido por algunos agentes químicos. La presencia de puntos frágiles puede contribuir a esta peculiar distribución de las AC. Se han descrito individuos con lugares frágiles en linfocitos de sangre periférica que presentaban un punto de rotura coincidente en sus células tumorales (22). En nuestro estudio, existe una marcada relación entre los puntos de rotura observados más frecuentemente y loci para puntos frágiles, oncogenes y genes de supresión tumoral (Tabla IV).

Concluimos que la frecuencia incrementada de AC es un hallazgo típico en linfocitos de niños expuestos a tratamientos antitumorales, reflejando la existencia de una inestabilidad cromosómica subyacente. Este incremento tiende a disminuir en los meses siguientes al tratamiento, alcanzando valores similares al diagnóstico a los 2 años de remisión, aunque siguen siendo superiores a los valores observados en la población general. Las AC inducidas son mayoritariamente de tipo cromátida y no equilibradas, y coinciden frecuentemente con bandas asociadas a puntos frágiles, oncogenes y genes de supresión tumoral.

Aunque existe un incremento significativo de las AC en las recidivas, no hay datos suficientes para deducir si estos daños cromosómicos son predictivos de nuevas recidivas o de segundos tumores. Sin embargo, es lógico pensar que sería útil detectar, en los pacientes sometidos a quimioterapia, individuos con un incremento de inestabilidad cromosómica, y por tanto, de riesgo de cáncer. Las consecuencias moleculares de estas aberraciones cromosómicas y su posible relación con la progresión tumoral están aún por resolver. En la actualidad estamos completando este estudio de inestabilidad cromosómica con otros marcadores citogenéticos.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por una ayuda PIUNA de la Universidad de Navarra y una ayuda del Dpto. de Salud del Gobierno de Navarra. Agradecemos al Dr. Juan Cruz Cigudosa sus valiosas opiniones sobre nuestro trabajo y a Nekane San José y Carmen Ferreira su destreza en las técnicas.

THEYANBYANXOS CORRECCIONNALES

BIBLIOGRAFÍA

1. Hsu TC. Genetic instability in the human population: A working hypothesis. *Hereditas* 1983;98:1-9.
2. Sorsa M, Wilbourn J, Vainio H. Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk. *IARC Sci Pub* 1992;116:543-554.
3. Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, *et al.* Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res* 1994;54:2919-2922.
4. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;643-649.
5. Gebhart E, Lósing J, Wopfner F. Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. *Hum Genet* 1980;55:53-63.
6. Smith MA, McCaffrey RP, Karp JE. The secondary leukemias: challenges and research directions. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:407-417.
7. Ramesh KH, Bhargava MK. Cytogenetic damage in peripheral blood lymphocytes of cancer patients prior to radiotherapy. *Cancer Genet Cytogenet* 1992;60:86-88.
8. Aronson MM, Miller RC, Hill RB, Nichols WW, Meadows AT. Acute and long-term cytogenetic effects of treatment in childhood cancer. Sister-chromatid exchanges and chromosome aberrations. *Mutat Res* 1982;92:291-307.
9. Carbonell E, Demopoulos NA, Stefanou G, Psaraki K, Parry EM, Marcos R. Cytogenetic analysis in peripheral lymphocytes of cancer patients treated with cytostatic drugs: results from an EC Collaborative Study. *Anti-Cancer Drugs* 1996;7:514-519.
10. Mitelman F, Mertens F, Johansson B. A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat Genet* 1997; *Spec Issue* 15:417-474.
11. Verma RS, Triantafillou NG. Oncogenetic map of the human genome. *Cancer Genet Cytogenet* 1998;100:88-89.
12. Berger R, Bloomfield CD, Sutherland GR. Report of the committee on chromosome rearrangements in neoplasia and on fragile sites. *Cytogenet Cell Genet* 1985;40:490-535.
13. Brown MA. Tumor suppressor genes and human cancer. In: Hall JC, Dunlap JC, Friedmann T, Gianelli F, eds. *Advances in Genetics*. Academic Press, 1997:45-107.
14. Mitelman F, ed. *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. S. Karger, Basel, 1995.
15. Carrano AV, Natarajan AT. Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutat Res* 1988;204:379-406.
16. Johansson B, Mertens F, Mitelman F. Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities-balanced rearrangements vs. genomic imbalances?. *Genes Chromosom Cancer* 1996;16:155-163.
17. Kudoh S, Asou H, Kyo T *et al.* Emergence of karyotypically unrelated clone in remission of de novo acute myeloblastic leukaemias. *Br J Haematol* 1995;89:531-534.
18. Whang-Peng J, Young RC, Lee FC, Longo DL, Schechter GP, DeVita VT. Cytogenetic studies in patients with secondary leukemia/dysmyelopoietic syndrome after different treatment modalities. *Blood* 1988;71:403-414.
19. Stark B, Jeison M, Shohat M *et al.* Involvement of 11p15 and 3q21q26 in therapy-related myeloid leukemia (t-ML) in children. Case reports and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 75: 11-22.
20. Ozisik YY, Meloni AM, Peier A *et al.* Cytogenetic findings in 19 malignant bone tumors. *Cancer* 1994;74: 2268-2275.
21. Shi G, Weh HJ, Martensen S, Seeger D, Hossfeld DK. 3p21 is a recurrent treatment-related breakpoint in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cytogenet Cell Genet* 1996;74:295-299.
22. Yunis JJ. The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 1983;221:227-236.