

Estudio del reordenamiento molecular BCR-ABL en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica

Karina Casanueva-Calero,* Gretta Pantaleón-Florido,* Yeniley Ruiz-Noa,* Jorge Mato-Luis,*
Marlene Quesada-Dorta,* José Carnot-Uria**

RESUMEN

Antecedentes: la leucemia mieloide crónica representa 15% de las leucemias del adulto. Su distinción temprana de otros síndromes mieloproliferativos resulta fundamental para comenzar el tratamiento e incrementar las posibilidades de evolución favorable. La confirmación del diagnóstico requiere detectar el cromosoma Philadelphia o el reordenamiento genético subyacente BCR-ABL, cuya determinación por transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR) resulta un método más sensible.

Objetivo: evaluar el reordenamiento molecular BCR-ABL y determinar la frecuencia de sus principales genes de fusión con RT-PCR cualitativa.

Material y método: estudio transversal, descriptivo, que incluyó a 27 pacientes con diagnóstico clínico-morfológico de leucemia mieloide crónica atendidos en el servicio de Hematología del Hospital CQ Hermanos Ameijeiras entre enero de 2006 y julio de 2011. El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de dicha institución. Para determinar la existencia de BCR-ABL en 27 pacientes con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica se aplicó una variante cualitativa de esa metodología.

Resultados: 93% de los pacientes estudiados resultó positivo a BCR-ABL, lo que confirmó el diagnóstico de leucemia mieloide crónica. Las variantes b3a2, b2a2, y e1a2 de BCR-ABL se detectaron en 60, 32 y 8% de los pacientes positivos, respectivamente. Hubo mayor ocurrencia de b2a2 en mujeres (40%) que en hombres (27%), mientras que e1a2 se detectó exclusivamente en ellos. No se encontraron coexpresiones de los transcritos determinados.

Conclusiones: los resultados apoyan la utilidad diagnóstica de la metodología utilizada y ameritan el estudio de más pacientes con leucemia mieloide crónica para corroborar las frecuencias genéticas obtenidas y valorar su relación con parámetros de interés pronóstico.

Palabras clave: leucemia mieloide crónica, reordenamiento BCR-ABL, transcritos de fusión, transcripción reversa, reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

ABSTRACT

Background: Chronic myeloid leukemia (CML) represents 15% of leukemias in adults. Its early recognition from other myeloproliferative syndromes is fundamental for beginning treatment and increasing chances for a favorable outcome. Detection of Philadelphia chromosome or the subjacent BCR-ABL rearrangement is necessary to confirm the diagnosis of CML. But BCR-ABL determination by reverse transcription and polymerase chain reaction is a more sensitive method.

Material and method: Here we applied a qualitative variant of that methodology for BCR-ABL detection in 27 patients with CML diagnosis.

Results: Out of total patients 93% was positive to BCR-ABL, confirming the diagnosis of CML. BCR-ABL transcripts b3a2, b2a2, and e1a2 were found in 60%, 32% and 8% of positive patients, respectively. Gender analysis revealed a greater presence of b2a2 in women (40%) than in men (27%). Variant e1a2 was exclusively detected in the latter. No co-expression of the transcripts tested was found.

Conclusions: These results support the diagnostic utility of the methodology employed and warrant the evaluation of a higher amount of CML patients for corroborating the genetic frequencies encountered and assessing their relationship with prognostic parameters.

Key words: Chronic myeloid leukemia, BCR-ABL rearrangement, fusion transcripts, reverse transcription, polymerase chain reaction (PCR).

* Departamento de Genética Molecular.

** Servicio de Hematología.

Hospital Hermanos Ameijeiras. La Habana, Cuba.

Correspondencia: Dra. Karina Casanueva Calero. Departamento de Genética Molecular, Hospital Hermanos Ameijeiras, San Lázaro 701, esquina a Belascoain. Centro Habana. La Habana 10700, Cuba.

Correo electrónico: kcasanv@infomed.sld.cu

Recibido: agosto 2011. Aceptado: octubre 2011.

Este artículo debe citarse como: Casanueva-Calero K, Pantaleón-Florido G, Ruiz-Noa Y, Mato-Luis J, Quesada-Dorta M, Carnot-Uria J. Estudio del reordenamiento molecular bcr-abl en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica. Rev Hematol Mex 2011;12(4):243-248.

La leucemia mieloide crónica es un trastorno mieloproliferativo que se origina en una célula madre hematopoyética pluripotencial anormal y representa 15% de las leucemias del adulto, con una incidencia de 1 a 2 casos por 100,000 personas al año.¹ La edad promedio de aparición es entre 45 y 55 años y se describen tres fases evolutivas de la enfermedad: crónica, acelerada y de crisis blástica. Más de 90% de los pacientes se diagnostica en la fase crónica y los síntomas de presentación más frecuentes son: astenia, anorexia, pérdida de peso, sensación de plenitud abdominal y al examen físico se comprueba esplenomegalia en 95% de los casos.¹ Sin embargo, cerca de 40% de los pacientes son asintomáticos y su diagnóstico se establece en el curso de un examen de sangre fortuito, por el hallazgo de una gran leucocitosis. En esta fase crónica, el estudio morfológico de la sangre periférica muestra que el incremento en el número de leucocitos ocurre a expensas de los granulocitos neutrófilos en todos los estadios de maduración, con predominio de los mielocitos y segmentados. La cantidad de mieloblastos, habitualmente no supera 2%, hay basofilia absoluta y la eosinofilia es frecuente.¹ En la médula ósea se evidencia una marcada hiperplasia granulocítica; con un patrón similar a la de la sangre periférica; generalmente, los blastos no superan 5% de las células medulares, los megacariocitos con frecuencia están incrementados y en un tercio de los casos hay un grado variable de fibrosis reticulínica.¹

Esta alteración clonal de las células madres hematopoyéticas es inducida por un gen quimérico como resultado de la fusión del gen ABL en el cromosoma 9 con el gen BCR en el cromosoma 22.² Ambos genes son expresados de manera dispersa en tejidos normales, pero sus funciones precisas no están bien definidas.³ En más de 95% de los casos esta translocación cromosómica está equilibrada y resulta en la formación de un cromosoma 22 pequeño, que fue identificado como cromosoma Philadelphia (Ph). El gen híbrido BCR-ABL resultante codifica una oncoproteína con actividad tirosina cinasa elevada, localizada en el citoplasma y que es responsable del fenotipo leucémico a través de la activación constitutiva de diferentes vías de señalización.² Esta proteína tiene diferentes pesos moleculares en dependencia de la región donde ocurran los cortes.³

El punto de rotura del gen ABL ocurre, generalmente, en el exón a2. En contraste, el gen BCR puede romperse en tres regiones diferentes. Casi siempre ocurre en la re-

gión mayor (M-bcr) ubicada en un área de 5.8 kb entre los exones 12 (b1) y 16 (b5), de lo que resultan los transcritos de fusión e13a2 (b2a2) y e14a2 (b3a2) que codifican una proteína de 210 kDa.⁴ Con menor frecuencia ocurre en la región menor (m-bcr), lo que origina un transcripto de fusión e1a2 que da lugar a una proteína de 190 kDa. Por excepción, se produce en la región conocida como μ -bcr ubicada en el exón 19 y el transcripto de fusión e19a2 codifica una proteína de 230 kDa.⁴ Otros transcritos, como: e2a2, e1a3, e6a2, e13a3 (b2a3) y e14a3 (b3a3) son infrecuentes. A pesar de que se ha estudiado ampliamente la relación del tipo de unión con un grupo de parámetros, que incluye los conteos de leucocitos y plaquetas, la etapa de la enfermedad, el tiempo de supervivencia y la respuesta al tratamiento, las evidencias de su posible significación pronóstica han resultado contradictorias.^{5,6}

En general, la leucemia mieloide crónica reacciona satisfactoriamente a la terapia oportuna con un inhibidor de tirosina cinasa, a diferencia de otros síndromes mieloproliferativos, como la policitemia vera, la mielofibrosis primaria y la trombocitemia esencial, lo que evidencia la importancia de su diagnóstico certero y temprano.⁷ El método cualitativo basado en la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa previa (RT-PCR) detecta bajas concentraciones de transcritos del BCR-ABL, por lo que es de gran utilidad para el diagnóstico molecular del reordenamiento y monitoreo de la enfermedad mínima residual postratamiento, sobre todo cuando la citogenética convencional indica ausencia del cromosoma Ph.⁸

El objetivo de este trabajo es evaluar el reordenamiento molecular BCR-ABL y determinar la frecuencia de sus principales genes de fusión en un grupo de pacientes con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica, mediante RT-PCR cualitativa.

MÉTODO

Estudio transversal, descriptivo, que incluyó a 27 pacientes con diagnóstico clínico-morfológico de leucemia mieloide crónica atendidos en el servicio de Hematología del Hospital CQ Hermanos Ameijeiras entre enero de 2006 y el presente. El estudio molecular se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de dicha institución. De ese total, 12 correspondieron al sexo femenino y 15 al masculino. Los límites de edad fueron 18 y 97 años, con promedio de 49 años.

Extracción y purificación del ARN

La extracción del ARN se realizó a partir de 4 mL de médula ósea obtenida por aspiración de la cresta iliaca con sales de guanidinio y fenol, método descrito por Chomczynski y Sacchhi.⁹

La integridad del ARN obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL), en solución tampón 0.5 X TBE (0.045 M Tris, 0.045 M borato, 1.25 mM EDTA pH 8.2), y posterior visualización bajo luz ultravioleta.

RT-PCR

Se utilizó el método del programa Biomed 1 descrito por Dongen y colaboradores para la RT-PCR¹⁰ con ligeras modificaciones. Para la reacción de reverso transcripción (RT) primeramente se mezclaron 2 µL de ARN total con 9.5 µL de una solución con 50 µg/mL de random hexamers (Promega, Madison, USA) en agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC); esa mezcla se incubó a 70°C durante tres minutos, luego se colocó por el mismo tiempo en hielo, y posteriormente se completó para constituir la mezcla final de reacción en un volumen de 20 µL que incluyó, además, Tris-HCl (50 mM, pH 8,4), KCl (30 mM), MgCl₂ (8 mM), DTT (10 mM), 1mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 20 unidades del inhibidor de ribonucleasas RNasin (Sigma, St. Louis, USA) y 25 unidades de la enzima reverso-transcriptasa AMV (Roche, Mannheim Alemania). Esta mezcla se incubó a 42°C durante 60 minutos, después a 99°C por espacio de 5 minutos y, finalmente, a 4°C durante 5 minutos.

Con el propósito de verificar si el ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) obtenido a partir de la RT se sintetizó correctamente, se amplificó un segmento del exón 2 del gen RARα con los siguientes oligonucleótidos: (en sentido 5' - 3') R2: GCT CTG ACC ACT CTC CAG CA y R5: CCA CTAGTG GTA GCC TGA GGA CT.

Posteriormente, el ADNc se sometió a un sistema de amplificación anidado utilizando por cada etapa de amplificación dos cebadores específicos y uno común para cada región de localización del punto de ruptura. La mezcla de la reacción de amplificación en ambas etapas incluyó Tris-HCl (10 mM, pH 9,0), KCl (50 mM), MgCl₂ (1,5 mM), Triton X-100 (0,1%), 0.2 mM de cada desoxirribonucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0.4 µM de cada cebador, y 1 unidad de la enzima Taq DNA polime-

rasa (Promega, Madison, USA), en un volumen final de 50 µL que se completó con 2 µL de ADNc en la primera amplificación o con 2 µL del producto de esta última en la segunda etapa de amplificación.

Las secuencias en sentido 5' - 3' de los cebadores utilizados en las diferentes reacciones de amplificación del sistema anidado utilizado fueron las siguientes:

B1A: GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C

A3B: GTT TGG GCT TCA CAC CAT TCC

E1A: GAC TGC AGC TCC AAT GAG AAC

B2C: CAG ATG CTG ACC AAC TCG TGT

A3D: TTC CCC ATT GTG ATT ATA GCC TA

E1C: CAG AAC TCG CAA CAG TCC TTC

En la primera amplificación se utilizaron los cebadores B1A y A3B para la región mayor, así como los cebadores E1A y A3B para la región menor. En la segunda amplificación se usaron los pares de cebadores B2C/A3D, y E1C/A3D para las regiones mayor y menor, respectivamente.

Finalmente, para excluir los resultados falsos positivos se realizó una PCR de confirmación que se caracteriza por amplificar un segmento que se inicia dentro de la región blanco de la primera amplificación del sistema de PCR anidado (descrito anteriormente) y se extiende más allá del límite de la región blanco de la segunda amplificación, hacia el extremo 3' del ADN molde. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mismas expuestas anteriormente y se usaron los siguientes pares de cebadores según el punto de corte: B2C/A3E3' (región M-bcr) y E1C/A3E3' (región m-bcr). La secuencia en sentido 5' - 3' del cebador A3E3' es la siguiente: TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TT.

Se utilizó el mismo programa de amplificación para el sistema anidado, la amplificación del gen *RARα* utilizado como control y la reacción de comprobación: desnaturación inicial a 94°C por 1 minuto; 35 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 65°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto.

Todas las reacciones de RT y de PCR se efectuaron en un termociclador programable (MJ Research, Watertown, USA).

La identificación de los fragmentos producidos en las reacciones de amplificación se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% a voltaje constante (3 V/cm) en solución tampón TBE 0,5 X y visualización mediante tinción con bromuro de etidio y exposición a luz ultravioleta.

RESULTADOS

De los 27 pacientes estudiados, 25 (93%) tuvieron el reordenamiento molecular BCR-ABL y 2 (7%) fueron negativos.

Entre los pacientes positivos, la distribución del gen quimérico formado según el punto de corte fue la siguiente: 15 (60%) con b3a2, 8 (32%) con b2a2 y 2 (8%) con e1a2.

En el Cuadro 1 se muestra la distribución de las frecuencias resultantes de la detección de las variantes de BCR-ABL, con respecto al género de los pacientes evaluados. Los 15 pacientes masculinos estudiados resultaron positivos a BCR-ABL, de ellos, 9 (60%) tuvieron el transcrito b3a2, 4 (27%) el b2a2 y 2 (13%) el e1a2. En 10 de 12 pacientes femeninas evaluadas se detectó el reordenamiento BCR-ABL, de los que 6 (60%) resultaron positivos al transcrito b3a2 y 4 (40%) al b2a2. En la subpoblación femenina no encontramos el transcrito e1a2.

Cuadro 1. Distribución por sexo de las frecuencias de los transcritos de fusión BCR-ABL detectados

Sexo	Negativos al BCR-ABL	Positivos al BCR-ABL			Total de pacientes
		b3a2	b2a2	e1a2	
Masculino	-	9 (60%)	4 (27%)	2 (13%)	15
Femenino	2 (17%)	6 (60%)	4 (40%)	-	12

DISCUSIÓN

El diagnóstico concluyente de leucemia mieloide crónica se apoya en las investigaciones citogenéticas y de biología molecular para identificar la t(9;22)(q34.1;q11.21) o el gen híbrido BCR-ABL, que es patognomónico de esta enfermedad.¹ De los 27 pacientes incluidos en nuestro estudio, en 25 (93%) se corroboró el diagnóstico de leucemia mieloide crónica porque fueron positivos al reordenamiento BCR-ABL.

La determinación de la fusión génica BCR-ABL por RT-PCR se considera un método más sensible para el diagnóstico de leucemia mieloide crónica respecto al análisis citogenético convencional basado en la evaluación del cariotipo. Esto porque puede resultar positiva en pacientes negativos al cromosoma Ph en quienes tienen

el reordenamiento cromosómico complejo e, incluso, en pacientes en quienes no se detecta alguna alteración cariotípica.¹¹ Además, este método molecular exhibe adecuada reproducibilidad y tiene una ventaja secundaria: no se afecta en los casos con bajos conteos leucocitarios y de células inmaduras en sangre periférica, a diferencia del análisis cariotípico, por requerir este último de células en fase de división.¹² Además, se ha demostrado que mediante RT-PCR los resultados obtenidos en sangre periférica se correlacionan con los obtenidos en médula ósea.¹²

En 2 (7%) de los pacientes evaluados el resultado de la RT-PCR fue negativo, lo que sugiere que tales pacientes tenían una leucemia mieloide crónica atípica con alguna translocación compleja¹² u otro tipo de síndrome mieloproliferativo. El diagnóstico de certeza de estos casos con síndromes mieloproliferativos negativos a BCR-ABL resulta más difícil, pues su cariotipo es frecuentemente normal y su patogenia molecular es más heterogénea, aunque una minoría presenta, de manera similar al fenómeno BCR-ABL, translocaciones con creación de genes de fusión que involucran, principalmente, a los genes de los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas¹³ y del factor de crecimiento de fibroblastos,¹⁴ cuyos productos tienen actividad de tirosina cinasa.

El 60% de los pacientes positivos al reordenamiento BCR-ABL tuvieron la variante b3a2 y 32% la b2a2; sin embargo, la isoforma e1a2 sólo se observó en dos pacientes (8%). Ello evidenció que en 92% de los pacientes positivos los puntos de corte se ubicaron en la región mayor (positivos a b3a2 o a b2a2) lo que es característico de la leucemia mieloide crónica. En contraste, en sólo 8% el punto de ruptura se ubicó en la región menor (positivos a e1a2) que se observa con mayor frecuencia en pacientes con leucemia linfocítica aguda Ph+ y que aparece en menor cuantía en individuos con leucemia mieloide crónica típica.¹⁵ Al respecto, se han informado ocurrencias variables de la variante e1a2 en pacientes con leucemia mieloide crónica de varios países con valores desde 0 hasta 5%.¹⁶

El orden de frecuencia de las variantes corresponde con lo reportado mayoritariamente en la bibliografía de trabajos similares. Dos estudios realizados en individuos de la India con diagnóstico de leucemia mieloide crónica reportaron frecuencias de 68 y 62% para b3a2, y de 32 y 29% para b2a2, respectivamente.^{17,18} Uno de ellos informó, además, una frecuencia de 2% para la variante e1a2.¹⁸

En otro estudio realizado por Yaghmaie y colaboradores en pacientes iraníes con leucemia mieloide crónica, las frecuencias encontradas para los transcritos b3a2, b2a2 y e1a2 fueron de 63%, 20% y 1% respectivamente.¹⁹ Goh y su grupo encontraron, en pacientes coreanos positivos al cromosoma Ph prevalencias de 67 y 32% para las variantes b3a2 y b2a2, respectivamente.²⁰

Esos resultados evidencian la estabilidad de las proporciones de los principales transcritos en el continente asiático. Por su parte, estudios separados en caucosidos estadounidenses y mestizos mexicanos con leucemia mieloide crónica mostraron frecuencias similares de b3a2 y b2a2 (57 y 42%, en los primeros,²¹ y, 54 y 43%, en los segundos,²² respectivamente). Mientras que un orden de frecuencias opuesto para las isoformas b3a2 y b2a2 se encontró en pacientes con leucemia mieloide crónica ecuatorianos (5 y 95%, respectivamente)²³ y brasileños (38 y 62%, respectivamente),²⁴ lo que evidencia patrones diferentes en las regiones de Asia, Norteamérica y Sudamérica.

Tomados en conjunto, los hallazgos de las investigaciones mencionadas pudieran reflejar la conservación de las prevalencias de estos transcritos dentro de una misma región y su variación interregional, apoyando la influencia del área geográfica en la variabilidad internacional demostrada. De hecho, se ha sugerido que la distribución mundial de agentes infecciosos oncogénicos, como los retrovirus, puede explicar, en parte, la mencionada influencia.²⁵ En correspondencia, nuestros resultados se asemejan más a los de estudios en países más cercanos geográficamente, descritos antes.

De igual forma, el factor racial y las migraciones pudieran ser elementos determinantes de las diferencias globales encontradas. En ese sentido, los hallazgos de este trabajo se asemejan a los de estudios que han evaluado conjuntos multiétnicos de sujetos con leucemia mieloide crónica, como el realizado por Mills y sus colegas donde las variantes b3a2 y b2a2 se encontraron en 55 y 45% de los pacientes analizados, respectivamente,²⁶ así como los comentados del trabajo en mestizos mexicanos,²² lo que es congruente con el marcado carácter multirracial y el mestizaje distintivo de la población cubana.

A diferencia de algunos estudios,^{18,19,20,22} y de manera similar a otros,^{21,23,24,26} no encontramos la coexpresión en un mismo paciente de más de un tipo de transcrito de fusión. Este fenómeno puede originarse debido a cortes

y empalmes alternativos del ARN mensajero.²⁷ Su no detección en este trabajo pudo deberse a diferencias en varios aspectos, como el tamaño de la muestra, el método empleado y su sensibilidad, y la dotación genética de nuestra población.

Respecto a la relación entre las frecuencias encontradas de los genes de fusión y el sexo de los pacientes, nuestros resultados mostraron mayor tendencia de las mujeres a la variante b2a2, comparadas con los hombres, 40 vs 27%, respectivamente. Ello se contrapone con las mayores proporciones de representantes del sexo masculino positivos a b2a2 reportadas por Osman y su grupo en pacientes adultos,²⁷ y por Adler y sus colaboradores en pacientes pediátricos.²⁸ Por su parte, otros estudios no han encontrado diferencias entre los sexos.²⁰ Asimismo, la mayoría de las investigaciones publicadas no ha evidenciado diferencias entre géneros en cuanto a la isoforma e1a2, mientras que nosotros solamente la detectamos en hombres. Las discordancias pudieran ser resultado de las particularidades genéticas de nuestra población. Aunque, dada la probable influencia del tamaño relativamente pequeño de nuestro universo de estudio, este hallazgo debe ser tomado en cuenta como punto de partida para posteriores trabajos más amplios en pacientes cubanos, que demuestren las distribuciones de los transcritos de fusión entre los sexos y su relación con características clínicas, etapas de la enfermedad, pronóstico y respuesta al tratamiento, importantes asociaciones que hasta el momento han exhibido resultados contradictorios a escala mundial.

En conclusión, los resultados obtenidos apoyan la utilidad de la metodología de Biología Molecular aplicada al diagnóstico más preciso de leucemia mieloide crónica a través de la detección del reordenamiento BCR-ABL. Asimismo, indican la similitud de la distribución de los principales transcritos de este reordenamiento encontrada en nuestros pacientes, con la de poblaciones geográficas cercanas o racialmente similares, y alertan de posibles diferencias *in situ* de tal distribución entre los géneros. Al mismo tiempo, justifican la realización de estudios adicionales con mayor número de pacientes con leucemia mieloide crónica que sirvan para descartar el efecto del tamaño de la muestra en los resultados hallados, que deberán ser complementados mediante la exploración en nuestras condiciones de correlaciones entre las frecuencias de los transcritos BCR-ABL y parámetros de importancia

pronóstica y terapéutica para el tratamiento de esta enfermedad.

REFERENCIAS

1. Quintas-Cardama A, Cortes JA. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* 2006;81:973-988.
2. Testoni N, Marzocchi G, Luatti S, Amabile M, et al. Chronic myeloid leukemia: a prospective comparison of interphase fluorescence in situ hybridization and chromosome banding analysis for the definition of complete cytogenetic response: a study of the GIMEMA CML WP. *Blood* 2009;114:4939-4943.
3. Goldman J, Melo J. Chronic myeloid leukemia. *Advances in biology and new approaches to treatment. N Engl J Med* 2003;349:1451-1464.
4. Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* 2009;113:1619-1630.
5. Chávez-González MA, Ayala-Sánchez M, Mayani M. La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Rev Invest Clin* 2009;61:221-232.
6. Verma D, Kantarjian HM, Jones D, Luthra R, Borthakur G, et al. Chronic myeloid leukaemia (CML) with P190BCR-ABL: analysis of characteristics, outcomes, and prognostic significance. *Blood* 2009;114:2232-2235.
7. Sharma P, Kumar L, Mohanty S, Kochupillai V. Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. *Ann Hematol* 2010;89:241-247.
8. Branford S, Hughes T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med* 2006;125:69-92.
9. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159.
10. Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion transcripts from chromosome aberrations in acute leukaemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* 1999;13:1901-1928.
11. Rerkamnuaychoke B, Kangwanpong D, Jootar S, Purnakanittha C. Detection of BCR/ABL fusion gene in CML: a preliminary report. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 1995;26 Suppl 1:197-200.
12. Wells SJ, Phillips CN, Winton EF, Farhi DC. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for bcr/abl fusion in chronic myelogenous leukemia. *Am J Clin Pathol* 1996;105:756-760.
13. David M, Cross NC, Burgstaller S, Chase A, et al. Durable responses to imatinib in patients with PDGFRB fusion gene-positive and BCR-ABL-negative chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2007;109:61-64.
14. Cross NC, Reiter A. Tyrosine kinase fusion genes in chronic myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2002;16:1207-1212.
15. Hoteit R, Mahfouz R. Proposed algorithm for the best detection of different bcr-abl gene fusion transcripts in molecular diagnostics laboratories: experience of a major referral center. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15:227-229.
16. Arana-Trejo RM, Ruiz Sánchez E, Ignacio-Ibarra G, Báez de la Fuente E, et al. BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clin Lab Haematol* 2002;24:145-150.
17. Polampalli S, Choughule A, Negi N, Shinde S, et al. Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. *Genet Mol Res* 2008;7:1138-1149.
18. Mondal BC, Bandyopadhyay A, Majumdar S, Mukhopadhyay A, et al. Molecular profiling of chronic myeloid leukemia in Eastern India. *Am J Hematol* 2006;81:845-849.
19. Yaghmaie M, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Arch Iran Med* 2008;11:247-251.
20. Goh HG, Hwang JY, Kim SH, Lee YH, et al. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Transl Res* 2006;148:249-256.
21. Shtalrid M, Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian H, et al. Analysis of breakpoints within the bcr gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1988;72:485-490.
22. Ruiz-Argüelles GJ, Garcés-Eisele J, Reyes-Núñez V, Ruiz-Delgado GJ. Frequencies of the breakpoint cluster region types of the BCR/ABL fusion gene in Mexican Mestizo patients with chronic myelogenous leukemia. *Rev Invest Clin* 2004;56:605-608.
23. Paz-y-Miño C, Burgos R, Morillo SA, Santos JC, et al. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;132:65-67.
24. Melo RA, Melo FC, Lima DF, Seaffo MH, et al. Lack of clinical relevance of the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia: a study of 90 patients. *Blood* 1997;90:219.
25. Yasunaga J, Matsuoka M. Leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int J Hematol* 2003;78:312-320.
26. Mills KI, Benn P, Birnie GD. Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature. *Blood* 1991;78:1155-1161.
27. Osman EI, Hamad K, Fadl-Elmula IM, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet Mol Biol* 2010;33:229-231.
28. Adler R, Viehmann S, Kuhlisch E, Martiniak Y, et al. Correlation of BCR/ABL transcript variants with patient's characteristics in childhood chronic myeloid leukaemia. *Eur J Haematol* 2009;82:112-118.