

Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica

Judith Cruz Velásquez,¹ Diana M Arcos Fonseca,¹ María S Chávez Jacal,¹ María de la Paz Sánchez Hernández,¹ Diana Margarita Sánchez Martínez,¹ Sol Galicia Guerrero,¹ José Ramiro Espinoza Zamora,² Eduardo E Cervera Ceballos²

RESUMEN

En la última década, el tratamiento contra la leucemia mieloide crónica cromosoma Filadelfia (Ph) positivo se ha modificado debido a la introducción del mesilato de imatinib (Gleevec®, Glivec®, Novartis, Basilea, Suiza). Éste es un potente inhibidor de la actividad de la proteína selectiva tirosina cinasa del gen quimérico BCR/ABL, ya que impide su activación y la fosforilación de residuos de tirosina que participan en la activación de vías de señalización importantes, como la apoptosis, la proliferación y la adhesión celular. El informe más reciente del estudio IRIS (estudio internacional con distribución al azar de imatinib vs interferón alfa), que comparó el interferón alfa con el mesilato de imatinib, demostró respuestas citogenéticas a largo plazo en pacientes con leucemia mieloide en fase crónica tratados con el mesilato. En estudios recientes se encontró una correlación significativa entre el porcentaje de metafases Ph positivas en la médula ósea y las concentraciones de BCR/ABL en la sangre periférica por la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; sin embargo, las respuestas moleculares completas, según lo medido por la reducción de las cifras de transcripción de BCR-ABL por debajo del umbral de las principales repuestas moleculares, sólo se lograron en una pequeña proporción de los pacientes. Durante el tratamiento, se apreciaron en algunos sujetos metafases cromosoma Ph positivo con alteraciones cromosómicas adicionales, que deben monitorearse en el seguimiento. Estos cambios también pueden ocurrir en metafases Ph negativas. La importancia clínica de estas alteraciones aún se desconoce. Estos hallazgos sugieren la optimización del monitoreo citogenético de una médula ósea de tres a seis meses, para mejorar la comprensión de la incidencia y el valor clínico de las anomalías citogenéticas clonales en metafases Ph negativo/Ph positivo.

Palabras clave: leucemia mieloide crónica, citogenética, hibridación *in situ* con fluorescencia, FISH, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, imatinib.

ABSTRACT

In the last decade, therapy for Philadelphia chromosome positive (Ph) has been amended due to global imatinib mesylate (Gleevec™, Glivec™, Novartis, Basel, Switzerland). IM is a potent inhibitor of TK activity (tyrosine kinase) protein-selective chimeric BCR/ABL, preventing their activation and phosphorylation of tyrosine residues involved in the activation of important signaling pathways as apoptosis, proliferation and cell adhesion. The latest report from IRIS (International Randomized Study Imatinib vs interferon alpha) was the first to demonstrate the effectiveness of IM as a first line therapy in patients with Ph positive chronic myeloid leukemia chronic phase; the study indicated that over 90% of patients with IM show improvement and a progression of five years free of disease. Recent studies of patients with IM showed a significant correlation between the percentage of Ph positive metaphases in bone marrow and the levels of BCR/ABL in peripheral blood by quantitative polymerase chain reaction. During therapy, in some patients can be observed additional chromosomal metaphases Ph chromosome positive, which should be monitored during follow-up, however, recognition of these additional changes may also happen in Ph negative metaphases. The clinical significance of these alterations is currently unknown. These findings suggest performing a bone marrow cytogenetic monitoring from 3 to 6 months, in order to obtain a better understanding of the incidence and clinical significance of clonal cytogenetic abnormalities in metaphases Ph-negative/Ph-positive.

Palabras clave: chronic myeloid leukemia, cytogenetics, fluorescence *in situ* hybridization, FISH, quantitative polymerase chain reaction, imatinib.

¹ Laboratorio de Citogenética y Biología Molecular.

² Clínica de Leucemia Mieloide Crónica. Instituto Nacional de Cancerología (INCan), México, DF.

Correspondencia: QC Judith Cruz Velásquez. Laboratorio de Citogenética. Instituto Nacional de Cancerología. Av. San Fernando 22, colonia Belisario Domínguez (Sección XVI), CP 14080, México, DF. Correo electrónico: jcrzuv@incan.edu.mx

Recibido: mayo 2013.

Aceptado: agosto 2013.

Este artículo debe citarse como: Cruz-Velásquez J, Arcos-Fonseca DM, Chávez-Jacal MS, Sánchez-Hernández MP y col. Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica. Rev Esp Méd Quir 2013;18:253-259.

La leucemia mieloide crónica es un trastorno mieloproliferativo crónico maligno de la célula troncal hematopoyética, que se distingue por granulocitosis progresiva, hipercelularidad en la médula ósea y esplenomegalia. La incidencia anual es de $10/10^6$ (de $1/10^6$ de la niñez a $30/10^6$ a los 60 años), la edad media va de 30 a 60 años y la proporción mujer:hombre es de 1.2:1.¹ Este padecimiento tiene un curso bifásico o trifásico y suele diagnosticarse en la fase inicial o crónica, en la que la población de granulocitos se expande y es capaz de mantenerse diferenciada. La fase crónica es relativamente estable y responde al tratamiento, aunque a la larga evoluciona a una fase acelerada hasta llegar a la fase blástica. Esta fase de la enfermedad puede ser indistinguible de la leucemia aguda.^{2,3} El marcador diagnóstico genético de la leucemia mieloide crónica es el cromosoma Filadelfia (Ph), que está en todas las células progenitoras mieloides y de linaje B, pero ausente en el resto de las células constitucionales.⁴

El descubrimiento del marcador cromosómico de la leucemia mieloide crónica se debe a Nowell y Hungerford, quienes, en 1960,⁵ observaron que en células leucémicas de pacientes con leucemia mieloide crónica aparentemente había una pérdida de material en uno de los cromosomas pequeños del grupo G (pares 21 y 22). En 1965, Brown y Doll estudiaron a más de 14,000 pacientes irradiados en British Clinics entre 1935 y 1954, y reportaron alta frecuencia de leucemia mieloide crónica con el pequeño cromosoma (cromosoma Ph). Este estudio demostró que un cambio cromosómico (translocación) sería el mecanismo oncogénico común debido a infecciones virales, químicos o radiaciones ionizantes. Posteriormente, con el hallazgo de Janet Rowley (1973), por medio de las técnicas de bandas con quinacrina y Giemsa, se estableció que el cromosoma Ph era producto de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 (Figura 1).⁶ Pero fue hasta 1984, cuando Prakash y Yunis analizaron los puntos de rotura en 9q34.1 y en 22 22q11.2. Cuando todos los pacientes con leucemia mieloide crónica se analizaron con técnicas de bandeo, se observó que más de 85% portaban la $t(9;22)(q34.1;q11.2)$.⁷ Se confirmó la ya conocida asociación entre el cromosoma Filadelfia y la leucemia mieloide crónica; entonces surgieron nuevas preguntas.

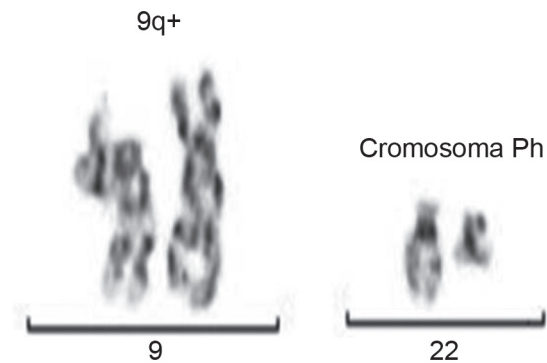


Figura 1. La fotografía muestra una $t(9;22)(q34;q11.2)$ por el método de bandeo GTG.

Los pacientes con leucemia mieloide crónica ocasionalmente experimentan otros cambios en la enfermedad; en casos típicos, el cromosoma Ph permanece durante la fase crónica, pero cuando avanza la enfermedad aparecen en 75 a 80% de ellos alteraciones adicionales, como la trisomía 19 (+19), trisomía del 21 (+21), monosomía del 7 (-7), monosomía del 17 (-17), trisomía del 8 (+8), isocromosoma 17 (i17) o dos copias del cromosoma Filadelfia.⁵⁻⁸ A estos cambios secundarios preceden manifestaciones clínicas que hacen aún más agresiva la enfermedad durante varios meses. Así, el diagnóstico citogenético sirve como indicador de valor pronóstico y predictivo (aunado al de diagnóstico clínico).

CROMOSOMA FILADELFIA

Aproximadamente en 90% de los pacientes con leucemia mieloide crónica se encuentra el cromosoma Ph mediante análisis de citogenética convencional. En el restante 10% es posible demostrar el transcrito BCR/ABL por análisis molecular más sensible (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa).

La alteración estructural citogenética es un intercambio de material entre la sub-banda 1, de la banda 4 en la región 3 del brazo largo (q) del cromosoma 9 donde se localiza el oncogén ABL1 y la sub-banda 2, de la banda 1 en la región 1 del brazo largo (q) del cromosoma 22, donde se localiza el BCR (por sus siglas en inglés de *breakpoint cluster region*; actualmente también se le conoce como PHL [Philadelphia] o BCR1). Este inter-

cambio de material se llama translocación recíproca; ya que estos dos genes están reorganizados en los cromosomas 9 y 22 como genes quiméricos. Específicamente, el BCR/ABL en 22q11.2 puede traducirse en tres tipos de proteínas p190^{BCR-ABL}, p210^{BCR-ABL} y p230^{BCR-ABL} (con diferentes pesos moleculares) que se relacionan con diferentes fenotipos de enfermedad.⁹

ABL1 (v-abl la leucemia murina de Abelson viral homólogo de oncogén 1)

El oncogén c-abl 1 (sinónimos: c-ABL, JTK7, p150) se encuentra en el cromosoma 9q34.2 y mide 12 exones, que corresponden a 230 kilobases (kb); se expresa en un transcrito ARNm de 6-7 kb, con una división en el primer exón (1b-1a). La división es comúnmente 5' al exón 2 (2-11) originando una proteína de 145 kDa o p145^{ABL}. Esta proteína tirosina cinasa se localiza en el núcleo, membrana plasmática y en el citoesqueleto de actina, y es una de las tirosina cinasas que no son receptores de membrana.

Los datos más recientes acerca de sus funciones sugieren que el ABL juega un papel importante en la regulación de la muerte celular después del daño al ADN. El mecanismo exacto de la inducción a la apoptosis por el ABL se desconoce.⁷⁻¹¹

Breakpoint cluster region (BCR)

Se localiza en el cromosoma 22q11.2 (sinónimos: CML, D22S662, PHL) y comprende 23 exones correspondientes a 130 kb; su orientación es 5' hacia el centrómero y 3' hacia el telómero. BCR se transcribe en varios ARNm que van de 4.5 a 7 kb. El BCR codifica proteínas de 130 y 190 kDa, pero principalmente de 160 kDa (p160^{BCR}). Se ubica en el citoplasma; su función es de proteína cinasa (serina-treonina). Se expresa en grandes cantidades en el cerebro y el tejido hematopoyético; también se ha observado en embriones de pollo y en ratones; sin embargo, el efecto del BCR/ABL sólo aparece en células hematopoyéticas.

Se han descrito varios pseudogenes BCR (BCR2, BCR3, BCR4), que no se traducen en proteínas. La orientación de cada uno es diferente, BCR2 se encuentra más hacia el centrómero, seguido por BCR4, BCR1 (gen funcional) y BCR3, BCR2 y BCR4 son retenidos en el cromosoma 22 durante la translocación. Hace poco se determinó que BCR estaba vinculado con la proteína

XPB, que juega un papel importante en la reparación de ADN, en la iniciación transcripcional general y en la regulación de ciclo celular.^{12,13}

Estructura del gen híbrido BCR-ABL y sus transcritos

La translocación añade un segmento 3' del gen ABL en el cromosoma 9q34.1 a la región 5' del gen BCR en el cromosoma 22q11.2, creando un gen híbrido BCR/ABL que se traduce en un ARNm BCR/ABL. El punto de rotura en el gen ABL ocurre generalmente 5' al exón 2, de tal manera que los exones 2 al 11 (a2-a11) son transferidos a la región M-bcr del gen BCR, entre los exones 12 y 16 de éste (b1-b5).

En el gen BCR, los puntos de rotura se localizan bien 5' entre los exones e13/b2 y e14/b3 o 3' entre los exones e14/b3 y e15/b4. El resultado es un gen de fusión que contiene las uniones b2a2 (e13a2) o b3a2 (e14a2) que se transcribe en un ARNm de 8.5 kb y se traduce en una proteína híbrida de 210 kDa (p210^{BCR-ABL}). En la mayor parte de los casos, las células de la leucemia mieloide crónica expresan uno de los dos transcritos (b2a2 o b3a2); sin embargo, 5% de los pacientes tienen ambos tipos de ARNm como resultado de empalmes alternativos (Figura 2). Incluso en 60% de los sujetos con leucemia linfocítica aguda y en casos esporádicos de leucemia mieloide crónica, el punto de rotura en el cromosoma 22 se localiza 5' a la región M-Bcr en un área denominada m-Bcr, y como consecuencia, sólo el exón 1 del gen se yuxtapone al exón 2 ABL, dando lugar a un transcrito e1a2 y a una proteína p190^{BCR-ABL}. Un tercer punto de rotura en el gen BCR se identificó 3' a la región M-Bcr entre los exones e19 y e20 (región μ -Bcr). En estos raros casos, el gen de fusión se transcribe en un ARNm e19a2 y se traduce en una proteína de mayor peso molecular (p230^{BCR-ABL}).¹⁴⁻¹⁹

FENOTIPO DE LA ENFERMEDAD

Con base en la observación de que la parte ABL en la proteína quimérica es casi siempre constante, mientras que la porción BCR varía ampliamente, puede decirse que ABL probablemente aporte el principio transformante, mientras que el diferente tamaño de la secuencia BCR dicta el fenotipo de la enfermedad.¹³ Los transcritos b3a2/b2a2 constituyen los marcadores genéticos de la

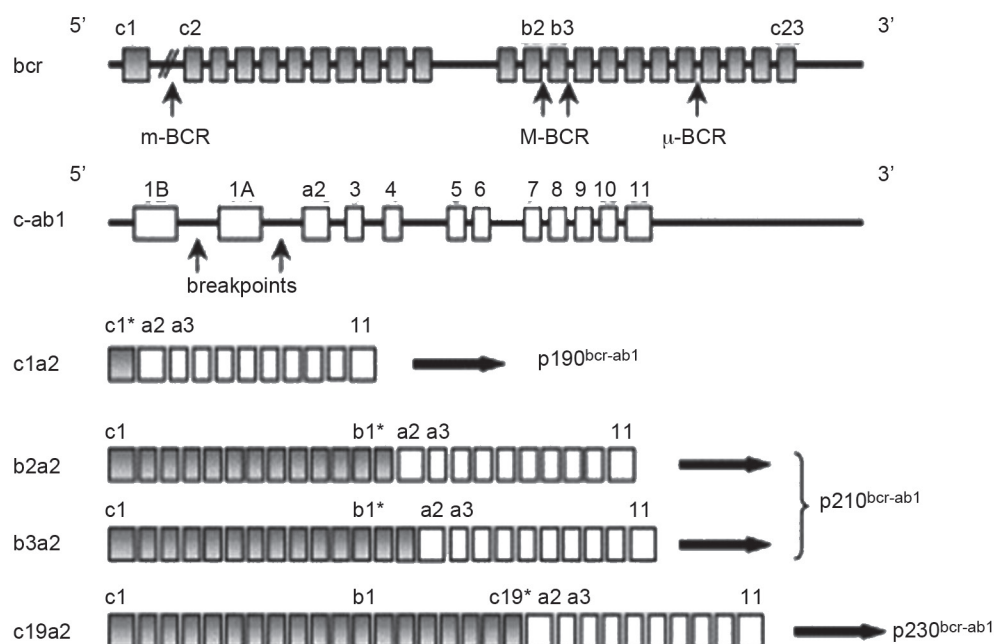


Figura 2. Representación esquemática de los genes BCR y ABL envueltos en la translocación. El rompimiento en m-bcr origina una molécula RNAm BCR-ABL con e1a2, el M-bcr ocurre ya sea entre los exones b2 (e13) y b3 (e14) o entre b3 y b4 (e15), generando un transcrito de fusión con b2a2 o b3a2, respectivamente. El rompimiento en μ-bcr, hacia la región 3, resulta en un transcrito BCR-ABL con una unión e19a2. Modificada de: J Mol Diagn 2004;6:343-347.

leucemia mieloide crónica clásica, que se distingue por una fase crónica de longitud variable que precede a su transformación blástica.¹⁴⁻²¹ Los transcritos b3a2 son más predominantes y codifican una proteína 25 aminoácidos más larga que b2a2; por tanto, se considera que los pacientes que tienen los transcritos b3a2 y b2a2 muestran características clínicas, respuesta al tratamiento y pronósticos similares.

A diferencia de esta enfermedad “clásica”, la leucemia mieloide crónica -p190^{BCR-ABL} se distingue por monocitosis significativa, basofilia variable, ausencia de esplenomegalia y curso agresivo, mientras que la leucemia mieloide crónica -p230^{BCR-ABL} se asocia con una forma mucho más benigna de la enfermedad similar a la leucemia neutrofílica crónica.^{9,14,15}

La razón por la que hay una desigual distribución de frecuencias entre los exones BCR en la fusión BCR/ABL se desconoce. Hace poco se describieron casos esporádicos de leucemia mieloide crónica con tipos únicos de transcritos BCR/ABL;⁹ sin embargo, no se han

determinado el significado biológico y la repercusión clínica de este hallazgo.

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

La enfermedad se identifica mediante un conteo sanguíneo rutinario que revela hiperleucocitosis y glóbulos blancos inmaduros circulantes. Puede haber esplenomegalia. Se requiere aspirado de médula ósea con análisis citogenético (cariotipo por bandas GTG), análisis por hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), así como evaluación molecular para detectar el oncogén BCR-ABL que se cuantificó mediante el cálculo de BCR-ABL/ABL relación por reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

Hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH)

La hibridación *in situ* con fluorescencia es parte de la nueva tecnología aplicada al diagnóstico genético y ofrece una serie de ventajas notables, como: rapidez,

sensibilidad y especificidad.²²⁻²⁴ Esta técnica ha tenido una importante repercusión en la onco-hematología para el diagnóstico y pronóstico de neoplasias.²⁵⁻²⁸

Se fundamenta en la propiedad del ADN desnaturalizado en cadena única de unirse con su ADN complementario sobre preparaciones citológicas, y marca secuencias específicas, como genes, regiones centroméricas, teloméricas o cromosomas enteros, con diferentes fluorocromos.²⁴ Las sondas de los genes BCR y ABL detectan la translocación (9;22)(q34;q11) en metafases o en células en interfase.²⁶ Se utilizan sondas que localizan 5' de la región del punto de rotura en el gen BCR y 3' de la región del punto de rotura en el gen ABL. Estas regiones están marcadas con diferentes colores de fluorocromos, lo que produce una señal en el sitio de los genes BCR y ABL de diferente color cuando la sonda ha hibridado la célula. Las señales de estos genes pueden aparecer separadas (cuatro señales) en células normales, mientras que en las células leucémicas hay una señal fusionada (amarilla) en el sitio del gen híbrido BCR-ABL y dos señales separadas que indican dos genes normales.²⁹

Criterios de positividad de FISH: la sonda de ADN locus específica para el gen BCR/ABL se aplica sobre células, núcleos en interfase y en mitosis. La sonda para la translocación BCR/ABL es una mezcla de secuencias específicas marcadas con fluorocromos: para el locus BCR, la sonda está marcada directamente con un fluoróforo de espectro verde y para el locus ABL, con un fluoróforo de espectro rojo (Figura 3).

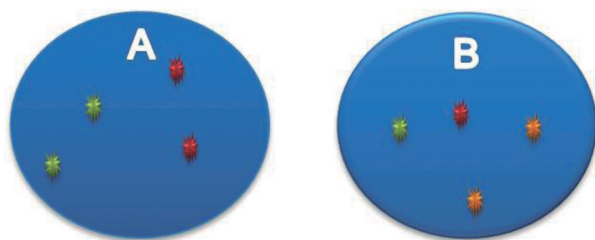


Figura 3. Hibridación *in situ* con fluorescencia: criterios de positividad. En células negativas (A) se visualizan dos señales rojas y dos señales verdes. En células positivas para la t(9;22) se observan dos señales amarillas (señales de fusión) que indican la fusión del BCR con el oncogén ABL, y dos señales separadas de los genes BCR (verde) y ABL (roja).

Citogenética convencional

Todos los pacientes con leucemia mieloide crónica muestran la t(9;22), detección realizada por el método de bandeo GTG, en más de 90% sobre las metafases analizadas. El cromosoma Ph o el gen de fusión ABL-BCR también puede detectarse como un cromosoma Ph o gen de fusión “enmascarado”, donde los cromosomas 9 y 22 parecen ser normales, pero la inserción de 3'ABL dentro de un cromosoma 22 puede demostrarse por FISH y, a su vez, describir las variantes del cromosoma Ph. Éste se encuentra en 5 a 10% de los casos, en los cuales no puede diagnosticarse por un cariotipo convencional debido a las limitantes propias de la técnica: sin embargo, 9q34-3'ABL siempre se une al 22q11-5'BCR en la leucemia mieloide crónica y el tercer cromosoma y el punto de rotura en algunos casos no es al azar.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Los criterios de la eficacia del tratamiento se basan en una respuesta citogenética completa (cromosoma Ph indetectable) seguida por la cuantificación de transcritos BCR/ABL con la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR). Estudios recientes realizados después de la aparición del imatinib demostraron la necesidad de vigilancia molecular mediante métodos cuantitativos una vez que se obtiene una respuesta citogenética. En México, el Instituto Nacional de Cancerología es uno de los principales centros con gran población de pacientes con leucemia mieloide crónica, por lo que es necesario dar seguimiento a los pacientes con respuesta citogenética completa.

Método (actualmente se recomienda que el método se valide previamente en alguno de los centros de referencia internacional para la obtención de la Escala Internacional, con la finalidad de unificar criterios en el protocolo de trabajo e interpretación de los resultados). En el laboratorio de biología molecular de hemato-oncología del Instituto Nacional de Cancerología, los autores se basaron en el siguiente protocolo de trabajo: extracción de muestras de sangre periférica con EDTA; aislamiento manual de células mononucleares con Ficoll; extracción de ácidos nucleicos con el método con TRIZOL; en cuanto a la cuantificación del ARN, se llevó a cabo con Nanodrop 2000c (THERMO). La RT-PCR en tiempo real cuantitativa (AB 7500) y el análisis de BCR/ABL

se realizan siguiendo las condiciones del fabricante de las sondas (MolecularMD). El análisis y los resultados se basan en las recomendaciones del Kit MolecularMD y de la Escala Internacional con previa validación y certificación en un centro de referencia internacional (Adelaida, Australia) para la incorporación a la escala en los resultados de los pacientes con leucemia mieloide crónica.

TRATAMIENTO

El tratamiento de este padecimiento se ha visto revolucionado por la introducción de nuevos fármacos. El primero de ellos fue el mesilato de imatinib, centrado en la actividad de la tirosina cinasa de BCR/ABL. En un ensayo multicéntrico internacional, se comparó el mesilato de imatinib como tratamiento de primera línea con el interferón alfa (ensayo IRIS), y se observaron claramente las ventajas del primero en términos de respuesta hematológica completa, respuesta citogenética completa y respuesta molecular. La actualización más reciente de este ensayo demostró, por primera vez, una reducción de los eventos secundarios (fase acelerada, crisis blástica) con el tiempo, ya que los pacientes no sufren una crisis blástica incluso tras seis años de terapia; sin embargo, quedan por resolver varias preguntas antes de la demostración de la curación: 1) los intentos de interrumpir la terapia con mesilato de imatinib han sido seguidos, en la mayoría de los casos, por una recaída hematológica y citogenética; 2) las células madre más primitivas parecen ser resistentes a esta terapia, al menos *in vitro*; 3) la resistencia al tratamiento, especialmente de los pacientes que lo recibieron como segunda línea, se ha vinculado con la aparición de mutaciones en el dominio ABL-cinasa, lo que impide la unión del fármaco a su objetivo. Algunas de estas mutaciones (T315I) que se producen han conducido a una resistencia total al mesilato de imatinib, lo que hace necesaria la interrupción del fármaco. Si las mutaciones residen fuera del dominio cinasa SH1 del ABL, el aumento de la dosis de mesilato de imatinib podría conducir a respuestas moleculares; por tanto, la detección de mutaciones ABL-cinasa se ha convertido en una prueba molecular clínicamente útil. La mayor parte de las mutaciones ABL-cinasa distintas de T315I han demostrado ser blanco de ataque

de inhibidores de segunda generación, esencialmente dasatinib (Sprycell) y nilotinib (Tasigna). El dasatinib es una combinación de inhibidores SRC y ABL que está indicado como tratamiento de segunda línea en pacientes con leucemia mieloide crónica, en su defecto en el tratamiento con imatinib, o si los pacientes son intolerantes a la terapia. El nilotinib es un inhibidor con alta afinidad por ABL tirosina cinasa. Sigue siendo un importante desafío a futuro encontrar nuevas terapias para eliminar las células madre con la mutación T315I. Los inhibidores de tirosina cinasa han cambiado el pronóstico de la leucemia mieloide crónica, así como su historia natural. Los resultados del ensayo IRIS sugieren que la mayoría de los pacientes con leucemia mieloide en fase crónica alcanzará la remisión citogenética completa y las principales respuestas moleculares; sin embargo, la persistencia de células madre leucémicas residuales mínimas representa para el organismo una amenaza de enfermedad. Aunque es difícil calificar a la leucemia mieloide crónica como un padecimiento indolente, la mediana de supervivencia se estima en 25 años debido a los tratamientos disponibles actualmente.

REFERENCIAS

1. Sans-Sabrafen J. Hematología clínica. 4ª ed. Barcelona: Harcourt, 2001;319-330.
2. Huret JL. Chronic myelogenous leukaemia (CML). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. December 1997. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/CML.html> Turhan A.G. Chronic myelogenous leukaemia (CML). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 2000. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/CML.html>
3. Savage GD, Antman KH. Imatinib mesylate-anem oral targeted therapy. N Engl J Med 2002;346:683-693.
4. Sandberg Avery A. The chromosomes in human cancer and leukemia. 2nd ed. New York: Elsevier, 1990;427-457.
5. Mitelman F, Sverre H. Cancer cytogenetics. New York: Wiley-Liss, 1995;33-68.
6. Rowley JD. The role of chromosome translocations in leukemogenesis. Semin Hematology 1999;36:59-72.
7. Turhan AG. ABL Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. April 2001. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/genes/ABL.html>
8. Alistair R, Gribble MS, Huntly B, Andrews MK, Campbell L. Variant Philadelphia translocations in chronic myeloid leukemia can mimic typical blast crisis chromosome abnormalities or classic t(9;22): a report of two cases. Br J Haematol 2001;113:439-442.

9. Melo Junia V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996;88:2375-2384.
10. Kolomietz E, Al-Maghrabi J, Brennan S, Karaskova J, et al. Primary chromosomal rearrangements of leukemia are frequently accompanied by extensive submicroscopic deletions and may lead to altered prognosis. *Blood* 2001;97:3281-3588.
11. Huret JL. ABL Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 1997 URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/genes/ABL.html>
12. Huret JL. BCR (Breakpoint cluster region). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. October 1997 URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/genes/BCR.html>
13. Turhan AG. BCR (Breakpoint cluster region). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. April 2001. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/genes/BCR.html>
14. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR gene and Philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* 2001;61:2343-2355.
15. Román J, Jiménez A, Saglio G, Rocchi M, et al. Implicación de las alteraciones moleculares en el diagnóstico, tratamiento y monitorización de los pacientes con leucemia mieloide crónica. *Haematologica* 2001;86:115-122.
16. Shet A, Jahagirdar BN, Verfaillie CM. Chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Leukemia* 2002;16:1402-1411.
17. Saglio G, Guerrasio A, Rosso C, Zaccaria A, et al. New type of BCR-ABL junction in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia: mechanisms underlying disease progression. *Blood* 1990;76:1819-1824.
18. Wada H, Mizutani S, Nishimura J, Usuki Y, et al. Establishment and molecular characterization of a novel leukemic cell line with Philadelphia chromosome expressing p230 BCR/ABL fusion protein. *Cancer Res* 1995;55:3192-3196.
19. Pane F, Frigeri F, Sidona M, Luciano L, et al. Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker (BCR-ABL with c3a2 junction). *Blood* 1996;88:2410-2414.
20. Briz M, Vilches C, Cabrera R, Flores R, Fernández M. Typical chronic myelogenous leukemia with e19a2 junction BCR/ABL transcript. *Blood* 1997;90:5024-5025.
21. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosin kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene* 2002;21:3314-3333.
22. Deininger M, Goldman J, Melo Junia V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 2000;96:3343-3356.
23. Sánchez-Izquierdo M, Otero M, Solé F, Gutiérrez NC. Aplicaciones clínicas de las nuevas técnicas de citogenética molecular en Hematología. *Haematologica* 2001;96:180-185.
24. Reuter H, Abbott GmbH and Co. KG. FISH for therapy-molecular technologies. Business Briefing: European Pharmacotherapy 2003:1-3.
25. Swiger R, Tucker JD. FISH: a brief review. *Environ Mol Mutagen* 1996;27:245-254.
26. Cunneo A, Bigoni R, Emmanuel B, Smit E, et al. Fluorescence *in situ* hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* 1998;12:1718-1723.
27. Seong CM. Monitoring the course of chronic myelogenous leukemia by FISH. *Hematology* 2002;76:53-57.
28. Müller C, Hennig E, Franke C, Leiblein S, et al. Letter to the editor. The BCR-ABL extra signal fluorescence *in situ* hybridization system reliably detects deletions upstream of the ABL locus: implications for reporting of results and follow up of chronic myelogenous leukemia patients. *Cancer Genet Cytogen* 2002;136:149-150.
29. Lee DS, Kim EC, Yoon BH, Kim WH, et al. Can minor BCR-ABL translocation in acute leukemia be discriminated from major BCR-ABL by extra signal FISH analysis? *Haematologica* 2001;86:991-992.