

Frecuencia de los transcriptos BCR-ABL en pacientes cubanos con leucemia mieloide crónica

Frequency of BCR-ABL transcripts in Cuban patients with chronic myeloid leukemia

Dra.Cs. Ana María Amor-Vigil, Lic. Yarienis González-Medina, Lic. Niubys Cayado-Gutiérrez, Dra.Cs. Gisela Martínez-Antuña

Instituto de Hematología e Inmunología. La Habana, Cuba.

INTRODUCCIÓN

El cromosoma Filadelfia (Ph) fue la primera anormalidad cromosómica asociada con una enfermedad maligna específica en humanos: la leucemia mieloide crónica (LMC). Este cromosoma es el resultado de una translocación recíproca, la t(9;22)(q34;q11), que da lugar a la formación del gen híbrido BCR-ABL en el cromosoma Ph.¹ Esta es la característica distintiva de los pacientes con LMC y si bien no se reporta en el 100 % de los casos, puede aparecer hasta en el 95 %.²

En dependencia del punto de unión entre los genes BCR y ABL se forman diferentes proteínas híbridas. La p210^{BCR/ABL} es la que aparece con más frecuencia en la LMC y se produce cuando la región conocida en inglés como *major breakpoint cluster region* (M-BCR) del gen BCR, se une con el gen ABL. Esta unión puede ocurrir entre diferentes puntos de la M-BCR y del gen ABL y da lugar a diferentes transcriptos. Al respecto, los transcriptos que con mayor frecuencia se observan son los que se unen por los exones e14 (conocido también como b3) o e13 (conocido también como b2) del gen BCR, y el exón a2 del gen ABL, que dan lugar a los transcriptos e14a2 (b3a2) y e13a2 (b2a2), respectivamente.³ En casos raros de esta enfermedad han sido descritos los transcriptos e14a3 (b3a3) o e13a3 (b2a3), donde el exón a2 del gen ABL ha sido delecionado.⁴⁻⁹

Cuando la unión del gen ABL al BCR ocurre por la región *minor breakpoint cluster region* (m-BCR), específicamente por el exón 1 del gen BCR, se forma la proteína p190^{BCR/ABL} codificada por el transcripto e1a2 que, aunque aparece con mayor frecuencia en la leucemia linfocítica, en escasas ocasiones se ha reportado en pacientes con LMC.^{10,11}

También se reporta esporádicamente la coexistencia de 2 transcriptos donde pueden aparecer simultáneamente, tanto los 2 más frecuentes, como una combinación de uno de ellos con alguno de los menos frecuentes.¹² En muy raras ocasiones se reporta la coexistencia de 3.^{13,14}

Varios han sido los reportes de diferentes países y regiones del mundo acerca de la frecuencia de los transcriptos BCR-ABL. Si bien siempre se reportan el b3a2 y el b2a2 como los de mayor prevalencia, existen tendencias diferentes al predominio de uno u otro.¹³⁻¹⁸

Tras 12 años de estudio del gen híbrido BCR-ABL en los pacientes cubanos con LMC, no ha sido reportado con qué frecuencia aparecen los diferentes tipos de transcriptos que lo caracterizan. En el Instituto de Hematología e Inmunología se estudian pacientes procedentes de todas las regiones de Cuba, por lo que se dispone de una muestra representativa del país. A fin de comparar con informes similares de otros autores, la presente comunicación reporta la frecuencia relativa de los diferentes tipos de transcriptos y su incidencia por género en los pacientes cubanos con LMC.

MÉTODOS

Se colectó sangre medular de pacientes con LMC, atendidos en diversos centros hospitalarios del país, durante el período comprendido entre junio de 1999 y junio de 2011. El estudio molecular se realizó en el Instituto de Hematología e Inmunología de Cuba. La identificación de la presencia del gen híbrido BCR ABL se realizó al inicio de la enfermedad a partir del ARN aislado y la posterior aplicación de la técnica de reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR).

RT-PCR

El ARN total se extrajo de las células mononucleadas presentes en 5 a 8 mL de sangre medular del paciente por el método de tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo.¹⁹ La integridad del ARN se comprobó por electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Toda la técnica de RT-PCR se realizó según el protocolo descrito por van Dongen y otros, que se describe brevemente.²⁰ Se realizó la RT para sintetizar ADN complementario (ADNc). Se amplificó por PCR el gen normal RAR como control de la calidad del ADNc. Con el objetivo de detectar tanto los transcriptos con unión a la región M-BCR como el e1a2 unido con la región m BCR, se utilizaron 7 cebadores para la amplificación del gen híbrido BCR-ABL en reacciones separadas. Tanto para la amplificación de la M-BCR como de la m-BCR se realizó un primer PCR, un PCR anidado o *nested* y un PCR de comprobación o *shifted*. Los productos de PCR se analizaron de manera cualitativa por electroforesis en gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio como marcador de fluorescencia.

RESULTADOS

Este estudio reporta los resultados positivos al gen de fusión BCR-ABL de los pacientes con diagnóstico de LMC confirmado por criterios clínicos y morfológicos que no poseían información de la presencia del cromosoma Ph por estudio

citogenética, y los pacientes que fueron enviados para estudio molecular del gen BCR ABL con el objetivo de definir el diagnóstico de LMC. No están contabilizados los pacientes negativos al gen BCR-ABL; la definición de su diagnóstico dependió del estudio morfológico y citogenético.

En la tabla 1 se muestra la prevalencia de los diferentes transcritos BCR-ABL, así como la relación de géneros por tipo. Los resultados muestran que 252 pacientes fueron positivos a alguno de los transcritos detectables mediante la técnica empleada, 142 del género masculino y 110 del femenino. En cuanto a la distribución por tipo de transcrito: 138 pacientes (54,8 %) presentaron el transcrito b3a2, que resultó ser el mayoritario; 103 pacientes (40,9 %) el b2a2; y solo 11 pacientes presentaron transcritos poco frecuentes o la coexistencia de 2. Por su parte, en la incidencia por género hubo mayoría del sexo masculino en los 2 transcritos más frecuentes. Así, de los 138 pacientes con b3a2, 78 fueron masculinos (56,5 %) y 60 femeninos (43,5 %). En el caso del b2a2, 59 fueron masculinos (57,3 %) y 44 femeninos (42,7 %).

Tabla 1. Prevalencia de transcritos BCR-ABL y relación POR géneros

Transcrito bcr-abl	Número de casos (%)	Género M (%) / F (%)
b3a2	138 (54,7 %)	78 (56,5 %) / 60 (43,5 %)
b2a2	103 (40,9 %)	59 (57,3 %) / 44 (42,7 %)
b2a3	3 (1,2 %)	2 (0,8 %) / 1 (0,4 %)
e1a2	1 (0,4 %)	0 / 1 (0,4 %)
b3a2 + b2a2	2 (0,8 %)	1 (0,4 %) / 1 (0,4 %)
b3a2 + e1a2	4 (1,6 %)	2 (0,8 %) / 2 (0,8 %)
b2a2 + e1a2	1 (0,4 %)	0 / 1 (0,4 %)
Total	252 (100 %)	142 (56,3 %) / 110 (43,7 %)

M: masculino; F: femenino.

Como se mencionó, en 11 pacientes se encontraron transcritos poco frecuentes o la coexistencia de 2. El transcrito b2a3 se encontró en 3 pacientes (1 femenino y 2 masculinos) y el e1a2 en un paciente femenino. Por su parte, la coexistencia de 2 transcritos fue hallada en 7 pacientes: 2 con el b3a2 y el b2a2 (1 de cada género), 1 femenino con el b2a2 y el e1a2, y 4 con el b3a2 y el e1a2 (2 de cada género). Entre estos pacientes que presentaron transcritos raros o la coexistencia de 2, ambos sexos tuvieron proporciones similares. De ellos, 45,4 % (n= 5) fueron masculinos y 54,5 % (n= 6) fueron femeninos.

Una comparación de la prevalencia de los transcritos más frecuentes, b3a2 y b2a2, dentro de cada género, se muestra en la tabla 2. En el género femenino la frecuencia de b3a2 fue del 57,7 % y de 42,3 % para el b2a2, mientras que en el género masculino los porcentajes fueron 56,9 % para el b3a2 y 43,1 % para el b2a2.

En el grupo de pacientes analizados no se observó coexistencia de 3 transcritos.

Tabla 2. Prevalencia de los transcriptos más frecuentes por género

Género	b3a2+b2a2	Relación b3a2 / b2a2
Femenino	104	60 (57,7 %) / 44 (42,3 %)
Masculino	137	78 (56,9 %) / 59 (43,1 %)

DISCUSIÓN

Coincidiendo con todos los estudios que se reportan en el mundo, en los 252 pacientes positivos al gen híbrido BCR-ABL se encontró que los transcritos b3a2 y b2a2 son los que aparecen con mayor frecuencia, mientras que fue poco frecuente la presencia de alguno de los demás transcriptos posibles, así como la coexistencia de 2. El transcripto b3a2 tuvo una tendencia mayor de aparición. Al respecto, casi todos los reportes coinciden en la tendencia a prevalecer de b3a2, pero no siempre la diferencia entre este y el b2a2 se reporta como significativa.

Dos trabajos pioneros que reportan la prevalencia de los transcriptos BCR-ABL y son citados por varios autores de trabajos posteriores, son el de *Eisenberg* y otros en 1988²¹ y el de *Lee* y otros, de 1989.¹² Estos autores reportaron que las frecuencias para los transcriptos b2a2 y b3a2 estaban aproximadamente en el orden del 40 % y 55 %, respectivamente, y que la coexpresión de b3a2 y b2a2 era de alrededor del 5 %. De manera casi idéntica se comporta la presencia de los transcriptos b3a2 y b2a2 en el presente estudio, donde aparece el transcripto b2a2 en el 40,9 % de los pacientes y el b3a2 en el 54,8 %.

Otros 2 colectivos de autores, citados con frecuencia, también encontraron mayor prevalencia del transcripto b3a2 y aunque sus resultados son similares entre sí, difieren ligeramente de los trabajos antes mencionados. Uno de ellos reporta el 31,6 % de b2a2 y el 68,4 % de b3a2, respectivamente.²² Igualmente, el segundo reporta frecuencias muy similares.²³

Después de estos trabajos pioneros, varios han sido los reportes de prevalencia de los transcriptos BCR ABL. Un estudio en pacientes iraníes con LMC reporta que la frecuencia del transcripto b3a2 del 62 % fue casi 3 veces mayor que la del b2a2 que apareció en el 21 % de los pacientes.¹⁴ Sin embargo, el transcripto b3a2 no siempre se reporta como mayoritario. Ejemplo de ello son al menos 3 estudios. En uno de ellos, 43 pacientes sudaneses positivos al BCR ABL fueron el 41,9 % b3a2 y el 53,5 % b2a2.¹³ En otro, con pacientes mexicanos, se encontró mayor prevalencia del transcripto b2a2 con el 52 % con el 48 % para el b3a2, diferencia que no fue significativa.¹⁶ Un tercer estudio realizado en pacientes ecuatorianos, reporta que el 95 % de los pacientes mostraron el transcripto b2a2 mientras que solo el 5,4 % reordenó para el b3a2. En el propio trabajo se comenta que este resultado, diametralmente diferente al que usualmente se reporta, puede deberse a diferencias en la composición étnica, ya que los individuos en estudio pertenecían a un grupo étnico mestizo compuesto por una mezcla de españoles y amerindios, mientras que en el resto de reportes citados prevalece una población mayoritariamente caucásica.¹⁸

De manera similar, en Cuba la composición de la población es mestiza, pero a diferencia de Ecuador y otras naciones americanas, está compuesta en su mayoría por una mezcla de españoles y africanos, situación que es común en la zona del Caribe. Sin embargo, hasta el momento no existen reportes similares de otros

grupos poblaciones del Caribe, lo cual sería de interés a fin de conocer la distribución de los diferentes transcritos BCR-ABL en los pacientes con LMC pertenecientes a la región caribeña.

Acerca de la tendencia de cada transcrito a ser más frecuente en uno u otro sexo y su posible significado, se han reportado pocas referencias. En los pacientes sudaneses, por ejemplo, existió una tendencia del género masculino a manifestar el transcrito b2a2 y del femenino al b3a2.¹³ Ello contrasta con los resultados del presente estudio, donde se encontró mayor prevalencia del género masculino en ambos transcritos, lo que puede estar en correspondencia con la población mayoritariamente masculina que existe en el país. Por otra parte, al analizar dentro de cada género la prevalencia de los transcritos más frecuentes, en ambos se encontró una tendencia prácticamente de igual magnitud a manifestar preferentemente el reordenamiento b3a2. A partir de este resultado se puede inferir que en el grupo de pacientes estudiados no hubo influencia de género en la tendencia a manifestar uno u otro transcrito.

En correspondencia con reportes anteriores, se encontró baja incidencia de pacientes que expresaran más de un tipo de transcrito. En relación con este fenómeno, se señala que la coexpresión de más de un reordenamiento en un paciente puede deberse a la existencia de *splicing* alternativo o a la existencia de varias líneas celulares leucémicas con diferente expresión del gen híbrido BCR-ABL.¹⁴

Aunque existen relativamente pocos estudios que discutan el significado de manifestar uno u otro tipo de transcrito, algunos reportes sugieren que su conocimiento puede tener implicaciones clínicas o puede servir de ayuda para comprender la patobiología de las células leucémicas positivas a la t(9;22). Por ejemplo, en el año 2000, un colectivo de autores reportó que entre sus pacientes, aquellos que manifestaron el transcrito b3a2 tuvieron mayores conteos de plaquetas los que poseían el b2a2.²⁴ Otro reporte sugiere que los pacientes con el transcrito b3a2 tienen mayor supervivencia que aquellos con el b2a2.²⁵ Sin embargo, aún no se llega a conclusiones y serán necesarios estudios más amplios y detallados para esclarecer estas y otras interrogantes.

Realizar en Cuba estudios de correlación entre el tipo de transcrito y otras variables, como el conteo de plaquetas, la supervivencia e incluso la resistencia al tratamiento, sería de interés, para profundizar en la patología de la LMC de los pacientes cubanos, todo lo cual podría llegar a tener implicaciones clínicas beneficiosas para el paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996 Oct;88(7):2375-84.
2. Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 1988 Oct;319(15):990-8.
3. Selleri L, von Linderen M, Hermans A, Meijer D, Torelli G, Grosveld G. Chronic myeloid leukemia may be associated with several bcr/abl transcripts including the acute lymphoid leukemia type 7 kb transcript. *Blood*. 1990 Mar;75(5):1146-53.

4. Van der Plas DC, Soekarman D, van Gent AM, Grosveld G, Hagemeijer A. Bcr-abl mRNA lacking abl exon a2 detected by polymerase chain reaction in a chronic myelogenous leukemia patient. *Leukemia*. 1991 Jun;5(6):457-61.
5. Páldi-Haris P, Barta A, Lengyel L, Bátaí A, Masszi T, Reményi P, et al. Molecular background of a new case of chronic myelogenous leukemia with bcr-abl chimera mRNA lacking the A2 exon. *Leukemia*. 1994 Oct;8(10):1791.
6. Polák J, Zemanová Z, Michalová K, Klamová H, Cermák J, Haskovec C. A new case of chronic myeloid leukemia (CML) in myeloid blast crisis with an atypical (b3/a3) junction of the BCR/ABL gene. *Leukemia*. 1998;12:250.
7. Moravcová J, Rulcová J, Polák J, Zemanová Z, Klamová H, Haskovec C. CML patient with rare b2a3 (e13a3) variant of BCR-ABL transcript: Complete molecular response to imatinib. *Leuk Res* 2005 Nov;29(11):1365-6.
8. Liu L, Tanaka H, Ito K, Kyo T, Ito T, Kimura A. Chronic myelogenous leukemia with e13a3 (b2a3) type of BCR-ABL transcript having a DNA breakpoint between ABL exons a2 and a3. *Am J Hematol*. 2003 Dec;74(4):268-72.
9. Amor AM, Cristo V, González Y, Hernández A, Pavón V, Martínez G. Transcripto BCR-ABL atípico en un paciente con leucemia mieloide crónica. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter*. 2011 Sep;27(3):349-55. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02892011000300011&lng=es
10. Saglio G, Pane F, Gottardi E, Frigeri F, Buonaiuto MR, Guerrasio A, et al. Consistent amounts of acute leukemia-associated P190 bcr/abl transcripts are expressed by chronic myelogenous leukemia patients at diagnosis. *Blood*. 1996 Feb;87(3):1075-80.
11. Van Rhee F, Hochhaus A, Lin F, Melo JV, Goldman JM, Cross NC. p190 BCR/ABL mRNA is expressed at low levels in p210- positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood*. 1996 Jun;87(12):5213-7.
12. Lee MS, LeMaistre A, Kantarjian HM, Talpaz M, Freireich EJ, Trujillo JM, et al. Detection of two alternative bcr/abl mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*. 1989 Jun;73(8):2165-70.
13. Osman EA, Hamad K, Elmula IM, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet Mol Biol*. 2010 Apr;33(2):229-231.
14. Yaghmaie M, Ghaffari SH, Ghavamzadeh A, Alimoghaddam K, Jahani M, Mousavi SA, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcript in Iranian patients with chronic myeloid leucemia. *Arch Iran Med*. 2008 May;11(3):247-51.
15. Rosas-Cabral A, Martínez-Mancilla M, Ayala-Sánchez M, Vela-Ojeda J, Bahena-Reséndiz P, Vadillo-Buenfil M, et al. Análisis del tipo de transcrito bcr-abl y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. *Gac Méd Méx*. 2003 Nov-Dec;139(6):553 9.
16. Meza Espinoza JP, Gutiérrez M, Vázquez A, Delgado JL, Esparza MA, González JR. Prevalence of the BCR/ABL1 transcripts in Mexican patients with chronic myelogenous leucemia. *Rev Invest Clin*. 2007 Sept-Oct;59(5):338 41.

17. Goh HG, Hwang JY, Kim SH, Lee YH, Kim YL, Kim DW. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Transl Res.* 2006 Nov;148(5):249-56.
18. Paz-y-Miño C, Burgos R, Morillo SA, Santos JC, Fiallo BF, Leone PE. BCR ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leucemia and acute lymphoblastic leucemia in Ecuador, South America. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002 Jan;132(1):65-7.
19. Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987 Apr;162(1):156-9.
20. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukaemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 concerted action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999 Dec;13(12):1901-28.
21. Eisenberg A, Silver R, Soper L, Arlin Z, Coleman M, Bernhardt B, et al. The location of breakpoints within the breakpoint cluster region (bcr) of chromosome 22 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia.* 1988 Oct;2(10):642-7.
22. Reiter E, Greinix HT, Brugger S, Keil F, Rabitsch W, Mannhalter C, et al. Long-term follow-up after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1998 Dec;22(suppl 4):S86-8.
23. Verschraegen CF, Kantarjian HM, Hirsch-Ginsberg C, Lee MS, O'Brien S, Rios MB, et al. The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. Clinical, laboratory, and prognostic correlations. *Cancer.* 1995 Sep;76(6):992-7.
24. Perego RA, Costantini M, Cornacchini G, Gargantini L, Bianchi C, Pungolino E, et al. The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Eur J Cancer.* 2000 Jul;36(11):1395-1401.
25. Prejzner W. Relationship of the BCR gene breakpoint and the type of BCR/ABL transcript to clinical course, prognostic indexes, and survival in patients with chronic myeloid leukemia. *Med Sci Monit.* 2002 May;8(5):BR19-7.

Recibido: 15 de agosto de 2012.

Aprobado: 15 de septiembre de 2012.

Dra.Cs. *Ana María Amor-Vigil*. Instituto de Hematología e Inmunología. Apartado 8070, CP 10800. La Habana, Cuba. Tel (537) 643 8695, 8268, Fax (537) 644 2334. Correo electrónico: rchematologia@infomed.sld.cu
Website: <http://www.sld.cu/sitios/ihl>