

TRANSCRITOS DEL GEN BCR-ABL, EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA EN VENEZUELA

BCR-ABL GENE TRANSCRIPTS IN VENEZUELAN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

JENNY ZADIS CAÑIZALEZ, ALICIA ROJAS DE ATENCIO, KARELIS URDANETA, RAQUEL ATENCIO ROJAS, RICHARD GONZÁLEZ, MARISOL SOTO, YASMIN VILLALOBOS

*Universidad del Zulia, Instituto de Investigaciones Genéticas, Hospital de Especialidades Pediátricas, Edificio de Investigación y Docencia, Maracaibo, Venezuela
E-mail: arojasa26@gmail.com*

RESUMEN

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es una enfermedad caracterizada citogenéticamente por la t(9;22)(q34;q11), la cual produce el gen híbrido: BCR-ABL en el cromosoma 22q conocido como cromosoma Ph(+). Los principales transcritos identificados corresponden a b2/a2, b3/a2, e2a2 y e19a2, cuyos tamaños dependen del punto de ruptura que ocurre en los cromosomas. El objetivo de este estudio fue determinar los transcritos BCR-ABL presentes en los pacientes venezolanos con LMC. Se analizaron 90 muestras de médula ósea de pacientes con diagnóstico de LMC. Se realizó el análisis cromosómico mediante técnicas citogenéticas convencionales y técnicas de biología molecular (RT-PCR). Se obtuvo que el 96,6% de los casos presentaron el cromosoma Ph(+) y 3,3% cariotipo normal, siendo los transcritos más frecuentes b3a2 (50,0%), b2a2 (40,0%) y la co-expresión de transcritos b3a2/b2a2 y e1a2/b3a2 en (6,6%) y (3,3%), respectivamente. Las variantes de los transcritos b3a2 y b2a2 encontradas en esta investigación fueron similares a lo reportado en la literatura, indicando la similitud de la distribución de los principales transcritos de este reordenamiento encontrada en los pacientes evaluados con la de poblaciones geográficamente cercanas o racialmente similares. Estos resultados apoyan la utilidad de la metodología de biología molecular aplicada al diagnóstico más preciso de LMC, lo cual ha sido señalado como importante en la escogencia de la terapia más adecuada dependiendo del tipo de transcritos hallado y de mejor respuesta al tratamiento. Al mismo tiempo, justifican la realización de estudios adicionales con mayor número de pacientes con LMC.

PALABRAS CLAVE: Enfermedad Mieloproliferativa Crónica, RT-PCR.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) disease is characterized cytogenetically by t(9q,22q)(q34,q11), which produces the hybrid gene: BCR-ABL on chromosome 22q known as Ph (+). The main published transcripts correspond to b2 / a2, b3 / a2, e2a2 and e19a2, whose sizes depend on the breakpoint that occurs in the chromosomes. The objective of this study was to determine the BCR-ABL transcripts present in Venezuelan patients with CML. Ninety bone marrow samples were analyzed from patients diagnosed with CML. Chromosomal analysis was performed by conventional cytogenetic techniques and molecular biology techniques (RT-PCR). It was found that 96.6% of the cases presented the Ph (+) chromosome and 3.3% a normal karyotype, being the most frequent transcripts b3a2 (50.0%), b2a2 (40.0%) and the co-expression of transcripts b3a2 / b2a2 and e1a2 / b3a2 in (6.6%) and (3.3%), respectively. Variants of the transcripts b3a2 and b2a2 found in this study are similar to those reported in the literature, indicating the similarity of the distribution of the major transcripts of this rearrangement found in the patients evaluated with those in populations geographically close or racially similar. These results support the usefulness of the methodology of molecular biology applied to achieve a more accurate diagnosis of CML through the detection of BCR-ABL rearrangement, which has been identified as important in choosing the most appropriate therapy depending on the type of transcripts found and their responsiveness to treatment. At the same time, they justify further studies with larger numbers of patients with chronic myeloid leukemia.

KEY WORDS: Chronic Myeloproliferative Disorder, RT-PCR.

INTRODUCCIÓN

Los desordenes mieloproliferativos crónicos son grupos de enfermedades caracterizadas por la proliferación neoplásica de células madres hematopoyéticas y de su progenie diferenciada en la médula ósea y sitios extramedulares. La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un tipo de desorden clonal mieloproliferativo

que resulta de la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas pluripotenciales comunes a sus tres series, está caracterizada clínicamente por la proliferación excesiva de las células mieloides maduras y de los precursores granulocíticos tanto en sangre periférica como en médula ósea. Representa entre el 15 al 20% de todas las leucemias que se presentan en adultos y tiene una incidencia de 1 a 2 pacientes por cada

100.000 habitantes por año, en edades comprendidas entre los 30 y 70 años (Pavón *et al.* 2005, Chávez-González *et al.* 2009). Se desconoce su etiología, aunque actualmente se investiga el compromiso de una serie de factores que pudieran influir en su etiopatogenia como las radiaciones ionizantes, los agentes químicos o infecciosos y los genéticos. Se le reconoce clínicamente un comportamiento bifásico o trifásico, con una primera fase conocida como fase crónica, una intermedia llamada fase acelerada y una final conocida como crisis blástica. Algunas pasan directamente de la fase crónica a la fase blástica (Goldman y Melo 2003, Pavón *et al.* 2005).

La LMC, fue la primera enfermedad hematológica maligna en la que se demostró una anomalía genética adquirida caracterizada por la presencia de una anomalía específica en el cariotipo, conocida como cromosoma Filadelfia (Ph) (Nowell y Hungerford 1960). Posteriormente (Rowley *et al.* 1973) señalaron que este cromosoma era producto de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, t(9,22)(q34;q11). Poco tiempo después, se reportó que el punto de ruptura en el cromosoma 22 en pacientes con LMC Ph positivo (Ph+) estaba dentro de un segmento de ADN de 5.8 Kb designado como “*Breakpoint Cluster Región*” (BCR) (22q11) y más tarde, que dicha región era parte de un gen que tiene una longitud de 135 kb “*Online Mendelian Inheritance in Man*” (OMIM 2015), este gen llamado BCR, el cual se encuentra fusionado con el gen ABL (Abelson Leukemia Gen) originalmente presente en el cromosoma 9, región q34.1, que codifica una proteína con actividad tirosina quinasa (TQ) con un peso molecular de 145 kDa, a este complejo de fusión molecular se le conoce como oncogen BCR-ABL (Groffen *et al.* 1984, Deininger *et al.* 2000)

El gen BCR está formado por 23 exones, y en él se distinguen la región mayor (M-bcr), entre los exones 12 y 16 de 58 kb, la menor (m-bcr) en el primer intrón del gen BCR, entre los exones 1 y 2, con una longitud de 55kb, y la región micro ubicada en el primer intrón del gen ABL en el cromosoma 9. Los puntos de rupturas más frecuentes en este gen BCR ocurren en los exones: 1(e1), 12(b2), 13(b3) y 19(e19); en cambio el punto de ruptura más común en el gen ABL es el exón 2(a2), generándose los reordenamientos e1a2 de 458pb, b2a2 con un peso molecular 310pb o b3a2 de 385 pb y el e19a2 con 580 pb. La LMC puede resultar del gen híbrido derivado del punto de ruptura menor (mBCR) donde el punto de ruptura 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 BCR se yuxtapone al exón 2 ABL dando

lugar a un transcrito e1a2; del cual resulta una proteína de 190Kd (p190 BCR-ABL) que se observa en el 10% de las Leucemias Linfoides Agudas (LLA) del adulto y en el 5% de las LLA pediátricas (Arana-Trejo *et al.* 2002, Ruiz-Argüelles *et al.* 2004, Hoelit y Mahfouz 2011)

La proteína BCR-ABL estimula la transmisión de señales mediante la liberación de ATP de un grupo fosfato que se une con las diferentes proteínas que le sirven de sustrato. Debido al proceso de auto fosforilación, existe un gran aumento de fosfotirosina en la proteína BCR-ABL anormal, lo que permite crear sitios de unión anómalos para otras proteínas, este gen híbrido codifica una proteína con actividad constitutiva, es decir, tiene la característica de estar siempre activa, sin necesitar la presencia del ligando para la formación de dímeros de membrana y la transmisión de señales intracelulares, que dependiendo del tipo de transcrito quimérico BCR-ABL encontrado es posible detectar diferencias en cuanto a las características clínicas y hematológicas de los pacientes con LMC (Perego *et al.* 2000, Kim *et al.* 2002, Onida *et al.* 2002, Testoni *et al.* 2009)

Estudios en poblaciones latinoamericanas indican que el transcrito más frecuente corresponde al b3a2 (63%) y b2a2 (20%), (Shtalrid *et al.* 1988, Paz y Miño *et al.* 2002, Vigil *et al.* 2012) lo cual concuerda con lo reportado por poblaciones asiáticas como las iraníes, pero difieren de la mexicana donde el más frecuente fue el b2a2 (59%) seguido por b3a2 (28%) (Yaghmaie *et al.* 2008, Hoelit y Mahfouz 2011). La presencia del transcrito BCR-ABL en pacientes leucémicos se ha considerado en varias investigaciones con fines diagnósticos, pronósticos y para la evaluación y seguimiento de la enfermedad (Baccarani *et al.* 2015, Koldehoff 2015). En el caso específico de LMC, las evidencias acumuladas indican que la LMC se define por la presencia del cromosoma Filadelfia y/o la evidencia del transcrito molecular, así mismo han sido señalados aspectos importantes de evolución de la enfermedad dependiendo del tipo de transcrito (Prejzner 2002, Polampalli *et al.* 2008). Debido a que la LMC pertenece a un grupo heterogéneo de trastornos hematopoyéticos clonales de células madres, ocasionalmente su diagnóstico puede ser confuso o difícil. El objetivo de esta investigación fue caracterizar los transcritos del gen BCR-ABL, en pacientes con LMC en Venezuela

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 90 pacientes diagnosticados con LMC, antes del inicio del tratamiento, referidos de

centros públicos y privados de la región. Se suministró a cada paciente un formato con información detallada sobre de las características de la investigación que fue firmada en señal de consentimiento para participar en la misma. En el Laboratorio de Citogenética del Instituto de Investigación Genética, se recibieron las muestras de medula ósea para el análisis citogenético mediante la técnica descrita por Yunis *et al.* (1981), para identificar el cromosoma Filadelfia. Posteriormente, de cada paciente se tomó muestra de sangre periférica para la identificación del tipo de transcrito presente utilizando la técnica de RT-PCR (Yaghmaie *et al.* 2008). Se utilizó el kit de aislamiento y purificación de ARN (Promega), y se obtuvo el ADNc mediante la utilización de la transcriptasa reversa AMV/Tfl (Promega). Posteriormente se realizó la reacción de PCR utilizando una PCR múltiple donde se agregaron 2 μ L de cada primer (e1a2/ b3/b2a2/ e19a2) (Tabla 1). Las condiciones de la PCR aplicadas en resumen correspondieron a una desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, y una extensión final a 72°C. Los productos amplificados se observaron en un gel de agarosa al 2%, apreciándose bandas separadas de los diferentes tipos de transcritos de acuerdo a su peso molecular, el transcrito b2a2 con un peso molecular 310 pb, el b3a2 de 385 pb, e1a2 de 458pb,

y el e19a2 con 580 pb. Los resultados se analizaron con base en porcentajes.

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos cebadores usados en la RT-PCR múltiple para la detección de transcritos de BCR-ABL y transcritos BCR como control interno (Yaghmaie *et al.* 2008).

C5e	5'ATAGGATCCTTTGCAACCGGGTCTGAA 3'
B2B	5'ACAGAATCCGCTGACCATCAATAAG3'
BCR-C	5'ACCGCATGTTCCGGGACAAAAG3'
CA3	5'TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTG G3'

RESULTADOS

Se analizaron 90 muestras de medula ósea de pacientes con diagnóstico de LMC antes de aplicarse el tratamiento. El promedio de edad fue de 42 años con rango entre 24 y 70 años (40% masculino, 60% femenino). El estudio citogenético mostró el cromosoma Ph⁺ en 88/90 de los pacientes; del total, dos resultaron positivos al complejo molecular BCR-ABL. Los cariotipos se reportaron de acuerdo con la nomenclatura mundial ISCN 2010 (Fig. 1).

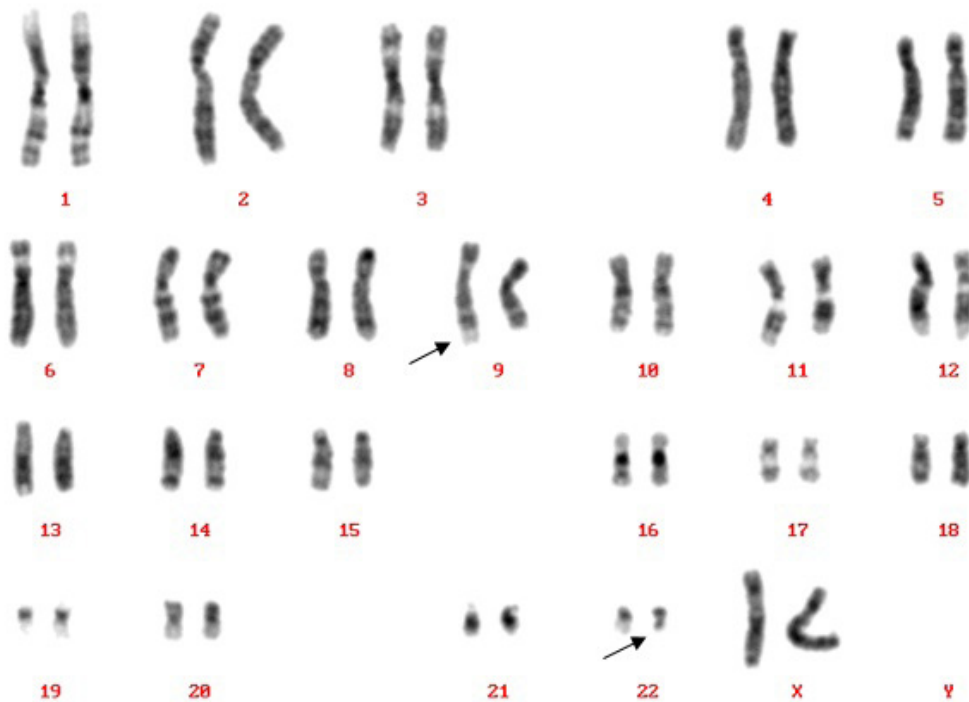


Figura 1. Muestra de cariotipo de paciente con LMC, las flechas indican t(9,22)(q34;q11)

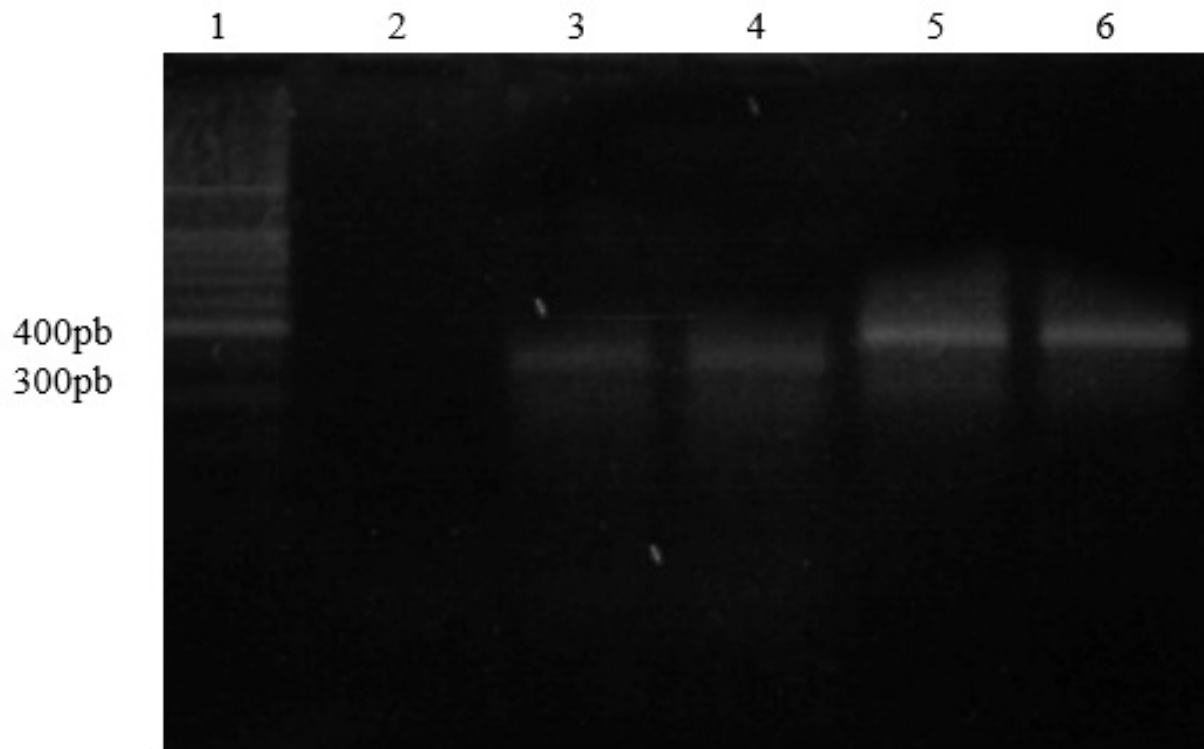


Figura2. Electroforesis en gel de agarosa al 2% muestra productos génicos amplificados b3a2, b2a2. Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, control negativo; carril 3, control positivo b2a2 (310 pb); carril 4, paciente con expresión b2a2 (310 pb); carril 5, control positivo b3a2 (380 pb); carril 6, paciente con expresión b3a2 (380 pb).

La frecuencia de los diferentes tipos de ARN mensajeros o transcritos, encontrados en este estudio fueron producto de diferentes puntos de ruptura y fusión del oncogén BCR-ABL. Las variantes de las isoformas más frecuentes fueron los transcritos b3a2 en 45/90 pacientes representando 50,0%. Así mismo se observó el cromosoma Filadelfia en el análisis cromosómico y el b2a2 se identificó en 40,0% (36/90) de los pacientes; de éstos solo un paciente presentó cariotipo normal. En un caso (3,4%), el transcritos e1a2 no se identificó como isoforma única; sino unida al b2a2. Otra variante fue el rearrreglo encontrado b2a2/b3a2 en 2/90 (2,2%) (Fig. 2). El transcrito e19a2 no se observó.

DISCUSIÓN

La transcripción del complejo BCR-ABL es la clave del diagnóstico y la evaluación y seguimiento molecular, el crecimiento de las células leucémicas es usualmente dependiente de la expresión del BCR-ABL (Prejzner 2002, Quintas-Cardama y Cortes 2006). La sensibilidad de cualquier método de PCR está limitada por el número de células analizadas. Normalmente solo

es evaluada una porción del DNA complementario, pero el análisis de múltiples porciones de DNA en reacciones replicadas incrementa la sensibilidad. Actualmente el método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) es uno de los métodos más sensibles para la detección de bajos números de transcritos del BCR-ABL. Sin embargo, en la práctica, por ser un método cualitativo cuando la prueba resulta negativa, puede haber todavía un millón o más de células residuales Ph(+) en el organismo, por lo cual se han desarrollado métodos de PCR cuantitativos en tiempo real para estimar la presencia o ausencia de estas células en el organismo (Pavón *et al.* 2005).

En otros casos, la prueba puede ser persistentemente positiva a un bajo nivel por muchos años (Wells *et al.* 1996, Prejzner 2002). El método cualitativo es útil para determinar el punto de ruptura del BCR-ABL y para la evaluación de la enfermedad mínima residual, sobre todo cuando los otros métodos indican la ausencia del BCR-ABL. Coincidiendo con algunos reportes (Hoelit y Mahfouz 2011, Vigil *et al.* 2012), en los 90 pacientes positivos al gen híbrido BCR-ABL, se encontró que los

transcritos b3a2 y b2a2 son los que aparecen con mayor frecuencia, a diferencia de los demás transcritos posibles, así como la coexistencia de dos transcritos. La mayoría de los reportes encontrados coinciden en la tendencia a prevalecer el b3a2, pero no siempre la diferencia entre este y el b2a2 se reporta como significativa. Aunque relativamente existen pocos estudios que discutan el significado de manifestar uno u otro tipo de transcripto, algunos sugieren que su conocimiento puede tener implicaciones clínicas o 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 que los que poseían el b2a2 (Testoni *et al.* 2009). Otra información sugiere que los pacientes con el transcrito b3a2 tienen mayor supervivencia que aquellos con el b2a2 (Prejzner 2002). Sin embargo, aún no se llega a conclusiones definitivas y serán necesarios estudios más amplios y detallados para esclarecer estas y otras interrogantes.

De los pacientes positivos, los puntos de corte se ubicaron en la región mayor (b3a2 ó b2a2) lo que coincide con otras investigaciones (Arana-Trejo *et al.* 2002, Ruiz-Argüelles *et al.* 2004). En contraste, a lo antes mencionado sólo en 3,3% de las muestras analizadas, el punto de ruptura observado resultó en la co-expresión de la región menor (e1a2/b2a2), que se observa con mayor frecuencia en pacientes con leucemia linfocítica aguda Ph+ y que aparece en menor cuantía en individuos con LMC típica (Polampalli *et al.* 2008). Al respecto, se han informado ocurrencias variables de la variante e1a2 en pacientes con LMC de varios países con valores desde 0 hasta 5% (Mondal *et al.* 2006). El orden de frecuencia de las variantes corresponde con lo reportado mundialmente en la bibliografía de trabajos similares. Dos estudios realizados en individuos de la India con diagnóstico de LMC reportaron frecuencias de 68 y 62% para b3a2, y de 32 y 29% para b2a2, respectivamente. Uno de ellos mostró una frecuencia de 2% para la variante e1a2 (Goh *et al.* 2006, Mondal *et al.* 2006). Otros estudios separados en caucosidos estadounidenses y mestizos mexicanos con LMC mostraron frecuencias similares de b3a2 y b2a2 (57 y 42%, en los primeros, 21 y 54 y 43%, en los segundos (Shtalrid *et al.* 1988, Hoelit y Mahfouz 2011).

Mientras que un orden de frecuencias opuesto para las isoformas b3a2 y b2a2 se encontró en pacientes ecuatorianos con LMC (5 y 95%,) y en los brasileños se encontró 38 y 62%, respectivamente (Ruiz-Argüelles *et al.* 2004, Bendit 2008). Lo antes expuesto

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, pueden explicar, en parte, la mencionada influencia (Carreño *et al.* 2008).

Así mismo, nuestros resultados se asemejan más a los de estudios en países geográficamente más cercanos. 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 LMC, como el realizado por (Mills *et al.* 1991) donde las variantes b3a2 y b2a2 se encontraron en 55 y 45% de los pacientes analizados, al igual que los encontrados en el trabajo realizado con mestizos mexicanos (Ruiz-Argüelles *et al.* 2004). Sin embargo, la isoforma e19a2 no se observó en nuestro estudio, probablemente debido al escaso número de pacientes o la baja frecuencia encontrada a nivel mundial (Gendron *et al.* 2014, Ferri *et al.* 2015). A semejanza de algunas observaciones encontradas, la frecuencia de la co-expresión en un mismo paciente de más de un tipo de transcrito de fusión, resultó ser baja al igual que en nuestro estudio, donde se observó en tres de los pacientes, (Mills *et al.* 1991, Paz y Miño *et al.* 2002, Yasunaga y Matsuoka 2003, Vigil *et al.* 2012).

El fenómeno de la co-expresión de más de un tipo de transcrito en un paciente puede deberse a la existencia de cortes y empalmes alternativos o a la existencia de varias líneas celulares leucémicas con diferente expresión del gen híbrido BCR-ABL (Vigil *et al.* 2012). El transcrito e19a2 no se encontró en nuestro estudio esto puede deberse al pequeño número de pacientes o su baja frecuencia a nivel mundial que va de 0-5%.

Según se ha visto, acerca de la tendencia de cada transcrito a ser más frecuente en uno u otro sexo, 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 b3a2. (Osman *et al.* 2010, Muddathir *et al.* 2013), siendo similar con los resultados del presente estudio, donde se encontró mayor e igual prevalencia del género masculino en ambos transcritos. 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.

Los resultados obtenidos apoyan la utilidad de la metodología de biología molecular aplicada al diagnóstico más preciso de LMC a través de la identificación del complejo BCR-ABL. Asimismo, indican la similitud de la distribución de los principales transcritos de este complejo molecular encontrada en nuestros pacientes, con la de poblaciones geográficas cercanas o racialmente similares. Al mismo tiempo, justifican la realización de estudios adicionales con mayor número de pacientes con LMC. Finalmente, las técnicas citogenéticas convencionales y moleculares siguen siendo parte fundamental en el diagnóstico, pronóstico y mantenimiento de los pacientes afectados con LMC.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARANA-TREJO RM, RUIZ SANCHEZ E, BARRA-IGNASIO G, BAEZ DE LA FUENTE E 2002. BCR/ABL p210,p190 and p230 fusion genes in 250 patients with Chronic Myeloid Leukaemia (CML). *Clin. Lab. Haematol.* 24(3):145-150.
- BACCARANI M, CASTAGNETTI F, GUGLIOTTA G, ROSTI G. 2015. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann. Hematol.* 94(Suppl 2):S141-147.
- BENDIT I. 2008. Molecular monitoring of Chronic Myeloid Leukemia in the imatinib era. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 30(Supl. 1):20-21.
- CARREÑO F, LOPEZ L, MATA E, CÁRDENAS L, COSTA O, MÉNDEZ C, UTRERA R. 2008. Frequency of BCR/ABL breakpoints in CML Venezuelan patients: contribution to a possible worldwide distribution of BCR/ABL transcripts associated to ethnicity. *Blood.* 112(ASH Annual Meeting Abstracts):4280.
- CHÁVEZ-GONZÁLEZ MA, AYALA-SÁNCHEZ M, MAYANI M. 2009. La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Rev. Invest. Clin.* 61(3):221-232.
- DEININGER MW, GOLDMAN JM, MELO JV. 2000. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 6(10):3343-3356.
- FERRI CA, BIANCHINI M, BENGIÓ RM, MOIRAGHI EB, GONZALEZ MS, NORIEGA MF, LARRIPA IB. 2015. Clinical activity of ponatinib in one patient with chronic myeloid leukemia in chronic phase with e19a2 transcript and T315I mutation. *Eur. J. Haematol.* 94(3):270-272.
- GENDRON N, BELHOUACHI N, MOREL V, AZGUI Z, MALOUM K, NGUYEN-KHAC F, CAYUELA JM, DAVI F, MERLE-BÉRAL H, CHAPIRO E. 2014. Chronic myeloid leukemia with variant e19a2 BCR-ABL1 fusion transcript: interest of the molecular identification at diagnosis for minimal residual disease follow-up. *Ann. Biol. Clin. (Paris).* 72(3):359-366.
- GOH HG, HWANG JY, KIM SH, LEE YH. 2006. Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Transl. Res.* 148(5):249-256.
- GOLDMAN J, MELO J. 2003. Chronic Myeloid Leukemia. *Advances in biology and new approaches to treatment.* *N. Engl. J. Med.* 349(15):1451-1464.
- GROFFEN J, STEPHESON J, HEISTERCAMP N, DE KLEIM A, BARTRAM C, GROSVELD G. 1984. Philadelphia chromosomal breakpoint is clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 36(1):93-99.
- HOELIT R, MAHFOUZ R. 2011. 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.* 15(4):227-229.
- KIM Y, KIM D, LEE S, KIM H, KIM Y, HWANG J, OH I, PARK Y, LEE Y, MIN C, KIM T, HAN T, MIN W, KIM C. 2002. Comprehensive comparison of FISH, RT-PCR, and RQ-PCR for monitoring the BCR-ABL gene after hematopoietic stem cell transplantation in CML. *Eur. J. Haematol.* 68(5):272-280.
- KOLDEHOFF M. 2015 Targeting bcr-abl transcripts with siRNAs in an imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patient: challenges and future directions. *Methods Mol. Biol.* 1218:277-292.

- MILLS KI, BENN P, BIRNIE GD. 1991. 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*. 78(5):1155-1161.
- MONDAL BC, BANDYOPADHYAY A, MAJUMDAR S, MUKHOPADHYAY A. 2006. Molecular profiling of chronic myeloid leukemia in Eastern India. *Am. J. Hematol.* 81(11):845-849.
- MUDDATHIR AM, KORDOFANI AA, FADL-ELMULA IM. 2013. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Sudanese patients with chronic myeloid leukemia using real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Saudi Med. J.* 34(1):29-33.
- NOWELL PC, HUNGERFORD DA. 1960. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*. 142:1497.
- OMIM (ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN). 2015. An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Disponible en línea en: <http://www.omim.org/> (Acceso 14.04.2015),
- ONIDA F, BALL G, KANTARJIAN HM. 2002. Characteristics and outcome of patients with philadelphia chromosome negative, bcr/abl negative chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 95(8):1673-1684.
- OSMAN EA, HAMAD K, ELMULA IM, IBRAHIM ME. 2010. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet. Mol. Biol.* 33(2):229-231.
- PAVÓN V, HERNÁNDEZ P, MARTÍNEZ G, AGRAMANTE O, FACUNDO J, BRAVO J. 2005. Leucemia Mieloide Crónica. Actualización en citogenética y biología molecular. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 21(2):1-10.
- PAZ Y MIÑO C, BURGOS R, MORILLO SA, SANTOS JC. 2002. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genet. Cytogenet.* 132(1):65-67.
- PEREGO R, COSTANTINI M, CORNACCHINI G, GARGANTINI L, BIANCHI C. 2000. The possible influences of b2a2 and b3a2. BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Eur. J. Cancer*. 36(11):1395-1401.
- POLAMPALLI S, CHOUGHULE A, NEGI N, SHINDE S. 2008. Analysis and comparison of clinicohematological parameters and molecular and cytogenetic response of two Bcr/Abl fusion transcripts. *Genet. Mol. Res.* 7(4):1138-1149.
- PREJZNER W. 2002. 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.* 8(5):193-197.
- QUINTAS-CARDAMA A, CORTES JA. 2006. Chronic myeloid leukemia diagnosis and treatment. *Mayo Clin. Proc.* 81(7):973-988.
- ROWLEY JD. 1973. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*. 243(5405):290-300
- RUIZ-ARGÜELLES GJ, GARCÉS-EISELE J, REYES-NÚÑEZ V, RUIZ-DELGADO GJ. 2004. Frequencies of the breakpoint cluster region types of the BCR/ABL fusion gene in Mexican Mestizo patients with chronic myelogenous leukemia. *Rev. Invest. Clin.* 56(5):605-608.
- SHTALRID M, TALPAZ M, KURZROCK R, KANTARJIAN H. 1988. Analysis of breakpoints within the BCR gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*. 72(2):485-490
- TESTONI N, MARZOCCHI G, LUATTI S, AMABILE M. 2009. 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*. 114(24):4939-4943.
- VIGIL AM, GONZÁLEZ Y, CAYADO N, MARTÍNEZ-ANTUÑA G. 2012. Frequency of BCR-ABL transcripts in Cuban patients with chronic myeloid leukemia. *Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.* 28(4): 428-434.
- WELLS SJ, PHILLIPS CN, WINTON EF, FARHI DC. 1996.

- Reverse transcriptase-polymerase chain reaction for bcr/abl fusion in chronic myelogenous leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 105(5):756-760.
- YAGHMAIE M, GHAFARI SH, GHAVAMZADEH A, ALIMOGHADDAM K, JAHANI M, MOUSAVI SA, IRVANI M, BAHAR B, BIBORDI I. 2008. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Arch. Iran Med.* 11(3):247-251.
- YASUNAGA J, MATSUOKA M. 2003. Leukemogenesis of adult T-cell leukemia. *Int. J. Hematol.* 78(4):312-320.
- YUNIS J, BLOOMFIELD C, ENSRUD K. 1981. All patients with Acute Nonlymphocytic Leukemia may have a chromosomal defect. *N. Engl. J. Med.* 305(3):135-139.