

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE LOS TRANSCRITOS DE FUSIÓN DE  
*BCR-ABL (e1a2, b2a2 y b3a2)* POR RT-PCR EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA  
PROCEDENTES DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC) Y  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO B (LLA-B)

Oneida Emperatriz Morales Rodríguez  
Química Bióloga

Guatemala, Agosto de 2012

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA**

DETERMINACION DE LA FRECUENCIA DE LOS TRANSCRITOS DE FUSIÓN DE  
*BCR-ABL (e1a2, b2a2 y b3a2)* POR RT-PCR EN MUESTRAS DE MÉDULA ÓSEA  
PROCEDENTES DE PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC) Y  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO B (LLA-B)

Informe de Tesis

Presentado por  
Oneida Emperatriz Morales Rodríguez

Para optar al Título de

Química Bióloga

Guatemala, Agosto de 2012

**JUNTA DIRECTIVA**

Oscar Cobar Pinto, Ph. D.	Decano
Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M.A.	Secretario
Licda. Liliana Vides de Urizar	Vocal I
Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares	Vocal II
Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli	Vocal III
Br. Fausto René Beber García	Vocal IV
Br. Carlos Francisco Porras López	Vocal V

## **ACTO QUE DEDICO**

### **A DIOS**

Mi amor eterno a quien debo mi vida entera y todo lo que soy hoy en día. A Él que es trono de sabiduría, bondad, amor infinito y el pilar de mi vida entera en el cual descansa y se regocija toda el alma mía.

### **A MARIA SIEMPRE**

#### **VIRGEN**

Por ser el manantial de fortaleza en mi corazón y el consuelo en mis aflicciones.

### **A MI PADRE**

#### **MYNOR MORALES**

Por ser un padre amoroso que con su ejemplo de perseverancia, optimismo, tenacidad y trabajo duro me ha demostrado que con voluntad pueden construirse los sueños que nacen de un corazón sincero.

### **A MI MADRE**

#### **LORENA RODRIGUEZ**

Mi amiga fiel, por brindarme su amor y apoyo incondicional, que con sus sabios consejos sabe dar paz a mi mente y corazón y por ser hoy en día el ejemplo a seguir de mi vida entera.

### **A MI ABUELITA**

#### **FRANCISCA MURALLES**

Mi alma gemela y compañera de toda mi vida que desde el cielo es el ángel que cuida mis pasos.

### **A MI FAMILIA**

Por brindarme su amor, tiempo y palabras llenas de optimismo y superación para culminar esta etapa de mi vida.

### **A NADIA HORNQUIST**

Por ser mas que mi amiga mi hermana del alma, a quien agradezco su apoyo, consejos y cariño.

### **A MI AMIGO DEL CORAZON**

Gracias por las alegrías compartidas, por el amor, consejos y amistad incondicional.

## **AGRADEZCO**

### **A MIS AMIGOS**

Por darme su compañía y apoyo necesarios para alcanzar esta meta y por la alegría compartida al haberlas alcanzado.

### **UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

En especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia por ser mi segunda casa y que es el centro de estudios del cual obtuve los conocimientos necesarios que formaron mi vida profesional.

### **A MIS CATEDRÁTICOS**

Que fueron los bloques estructurales de conocimiento, ejemplo, valores y experiencia que forjaron la profesional que soy en día en especial a Armando Cáceres y Margarita Paz.

### **CLAUDIA CARRANZA**

Por darme su amistad incondicional y desinteresada y brindarme la oportunidad de aprender cada día un poco mas con su ejemplo y dedicación.

### **PATRICIA SARAVIA**

Por creer siempre en mi y por cada palabra de apoyo y cariño que fueron la luz en el camino para la culminación de esta etapa.

### **AL CENTRO DE ESTUDIOS EN SALUD DE LA UVG**

Por haberme abierto las puertas a una nueva experiencia de conocimientos y que hoy en día es la escuela de mi vida profesional.

### **A INVEGEM Y LA FUNDACION ROZAS BOTRAN**

Por todos los conocimientos y apoyo recibido para la culminación de esta investigación en especial a José Botrán y Gabriel Silva.

## INDICE

CONTENIDO	No. PÁGINA
<b>I. Resumen</b>	<b>6</b>
<b>II. Introducción</b>	<b>8</b>
<b>III. Antecedentes</b>	<b>10</b>
A. Gen <i>ABL</i>	10
B. Gen <i>BCR</i>	11
C. Reordenamiento <i>BCR-ABL</i> (Cromosoma Filadelfia positivo)	11
1. Proteínas de fusión <i>BCR-ABL</i>	12
2. Biología de los transcritos <i>p190</i> y <i>p210</i>	14
3. Vías de señalización activadas por <i>BCR-ABL</i>	16
a. Vía RAS	17
b. Vía Fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3)	17
c. Vía Jak-Stat	18
d. Vía MAPK	18
e. Vía ROS	19
D. Características clínicas y demográficas de LMC y LLA-B cromosoma Filadelfia positivo	19
1. LMC cromosoma Filadelfia positivo	19
a. Características demográficas	19
b. Características clínicas	20
2. LLA cromosoma Filadelfia positivo	23
a. Características demográficas	23
b. Características clínicas	24
c. Evaluación del riesgo en pacientes con leucemia	27
d. Tratamiento de pacientes con leucemia	29
<b>IV. Justificación</b>	<b>31</b>
<b>V. Objetivos</b>	<b>33</b>
A. Objetivo General	33
B. Objetivos Específicos	33
<b>VI. Hipótesis</b>	<b>34</b>
<b>VII. Materiales y Métodos</b>	<b>35</b>
A. Población y muestra	35
B. Recursos	36
1. Recursos Humanos	36
2. Recursos Físicos	37
3. Recursos Materiales	37
C. Metodología	42

D. Diseño de la investigación	52
<b>VIII. Resultados</b>	<b>53</b>
<b>IX. Discusión de resultados</b>	<b>59</b>
<b>X. Conclusiones</b>	<b>63</b>
<b>XI. Recomendaciones</b>	<b>64</b>
<b>XII. Referencias</b>	<b>65</b>
<b>XIII. Anexos</b>	<b>80</b>
1. Hoja de consentimiento	80
2. Hoja de asentimiento	81
3. Boleta de recolección de datos clínicos	82
4. Extracción de Linfocitos	83
5. Características clínicas del paciente relacionadas en base al tipo de transcrito de <i>BCR-ABL</i> en pacientes con LLA y LMC por RT-PCR	84

## I. RESUMEN

A nivel molecular la translocación  $t(9;22)(q34;q11)$ , conocida como cromosoma *Philadelphia* (*Ph+*), origina el gen quimérico *BCR-ABL* que codifica para la expresión de tres transcritos de fusión que corresponden a *b2a2*, *b3a2* y *e1a2*. Se ha demostrado que existe relación entre el tipo de transcrito patológico y las características clínico-demográficas de pacientes leucémicos. En Guatemala, no existen datos respecto a la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* en el diagnóstico de leucemias, por lo que actualmente la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca con esta patología ha sido imposible de efectuar. El objetivo principal de este estudio fué determinar la frecuencia de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B) para ayudar a la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca.

La relación entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia asociada a sus características demográficas establece una relación significativa en base al grupo etario el cual presenta una tendencia poblacional que muestra dos picos de incidencia, los cuales corresponden al rango de 30-40 años en la expresión de *b2a2* o *b3a2* en pacientes con LMC y al de 5-10 años en la expresión de *e1a2* en pacientes con LLA-B ( $p=0.022$ ).

La relación entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y las características clínicas demuestra una diferencia significativa respecto a la distribución del recuento plaquetario según el tipo de transcrito patológico expresado ( $p=0.012$ ). La expresión del transcrito *e1a2* se encuentra relacionada a una actividad trombopoyética apreciablemente menor, mientras que el incremento del recuento plaquetario corresponde a la detección del transcrito *b2a2*.

Estudios realizados en diferentes regiones geográficas establecen diferencias significativas entre la frecuencia de expresión de los reordenamientos del gen quimérico *BCR-ABL*. En el presente estudio se determinó que la frecuencia de expresión de los distintos transcritos quiméricos del gen *BCR-ABL* en 35 muestras de médula ósea procedentes de pacientes guatemaltecos con LMC y LLA-B corresponde a una baja frecuencia para el transcrito *e1a2* (11%) con respecto a la frecuencia

de los transcritos *b2a2* (43%) y *b3a2* (43%) y con una frecuencia de coexpresión del 3% representada por los transcritos *b2a2/b3a2*. Pudo identificarse la predominancia del transcrito *e1a2* en pacientes con LLA-B y de los transcritos *b2a2* y *b3a2*, así como su coexpresión (*b2a2/b3a2*) en pacientes con LMC, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de expresión del transcrito *b2a2* comparado con *b3a2* ( $p=0.369$ ).

Se encontró que los hallazgos obtenidos de estudios efectuados en diferentes regiones geográficas del mundo en pacientes con LLA-B coinciden con la frecuencia reportada en la población leucémica guatemalteca con esta patología detectándose en el 100% de pacientes con LLA-B la expresión del transcrito patológico *e1a2*.

Se puede concluir que la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* entre la población guatemalteca con LMC concuerda con la reportada en estudios efectuados en países latinoamericanos, donde la población pertenece a un grupo mayoritariamente mestizo y es inversa a la reportada en países occidentales y orientales en donde existe predominio de poblaciones caucásicas y asiáticas, debido a que en dichos estudios se reporta frecuentemente una diferencia significativa entre la frecuencia de expresión de *b2a2* (30-40%) comparado con la expresión de *b3a2* (50-60%). Esto sugiere que la población leucémica guatemalteca que expresa los transcritos de fusión del gen quimérico *BCR-ABL* presenta una conducta biológica diferente con la reportada en la población asiática y caucásica producto de la variabilidad genética entre poblaciones como posible explicación para las diferencias observadas en este estudio.

## II. INTRODUCCIÓN

La aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio de neoplasias hematológicas ha permitido conocer mejor la patogénesis de estas enfermedades, favoreciendo el análisis cromosómico de las diversas alteraciones numéricas y estructurales con el fin de identificar marcadores genéticos para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad (Herrera, Calbacho, Heras, Ramos, López, & Odriozola, 2006). Dentro de las anomalías cromosómicas estructurales de mayor relevancia clínica está el gen quimérico *BCR-ABL*, que es resultado de la translocación  $t(9;22)(q34;q11)$  que da lugar al cromosoma Philadelphia (*Ph+*) y que constituye la primera anomalía cromosómica identificada en leucemia (Novell, & Hungerford, 1960).

El gen quimérico *BCR-ABL* es el resultado de una fusión cabeza-cola de los genes *BCR* y *ABL*, cuando parte del gen *ABL* localizado en el cromosoma 9 es transferida e insertada dentro del gen *BCR* del cromosoma 22 (Fialkow, Jacobson, & Papayannopoulou, 1977; Olopade, & Pichert, 2001). Este rearrreglo cromosómico *BCR-ABL* codifica una proteína de fusión que aumenta la actividad de tirosina cinasa, activando múltiples señales de transducción celular que desencadenan un elevado potencial neoplásico y por lo cual es asociado a un pronóstico adverso (Hermans, Heisterkamp, von Lindern, van Baal, Meije et al., 1987). Se presenta en niños y adultos con leucemia linfoblástica aguda del tipo B entre 2 a 5% y 10 a 20%, respectivamente y en más del 95% en pacientes con leucemia mieloide crónica (de Klein, Van Kessel, Grosveld, Bartram, Hagemeijer et al., 1982; Heisterkamp, Stam, Groffen, de Klein, & Grosveld, 1985).

Molecularmente es posible distinguir tres transcritos (*b2a2*, *b3a2* y *e1a2*), en donde los puntos de ruptura más frecuentes en el gen *BCR* ocurren en los exones 1(*e1*), 12(*b2*), 13(*b3*) y 19(*e19*) y el punto de ruptura en el gen *ABL* habitualmente se produce en el exón 2(*a2*). Cuando se da la unión de los exones *b3a2* y/o *b2a2* (Región *M-bcr*) se codifica para una proteína de 210kD ( $p210^{BCR-ABL}$ ) la cual se presenta en el 20% a 40% de los pacientes con LLA-B y es característica en más del 95% de pacientes con LMC. Si los exones *e1* y *e2* son removidos por el corte y empalme (Región *m-bcr*) la unión de *e1a2* se transcribe en una proteína de 190kD ( $p190^{BCR-ABL}$ ), la cual se detecta en el 60% a 80% de los pacientes con LLA-B y en menos del 10% para aquellos con LMC. Es posible observar una tercer proteína de fusión próxima a 3' del extremo distal del gen *BCR* denominada  $p230^{BCR-ABL}$ , la cual resulta de la fusión de los exones *e19a2* (Región  $\mu$ -*bcr*), cuya expresión se

encuentra mayormente asociada a leucemias crónicas neutrófilas y trombocitosis (Arana et al., 2002; Jiménez et al., 2008; Pane et al., 1996; Ribera et al., 2006).

El tema tratado en esta investigación fue la determinación de la frecuencia de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* por RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LLA-B y LMC con el fin de contribuir a la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca. La importancia de este estudio fue establecer la relación existente entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia asociada a sus características demográficas y recuento plaquetario.

Para ello se utilizó la técnica molecular de reacción de la cadena de polimerasa (RT-PCR) empleando un PCR anidado en muestras de médula ósea de pacientes con LMC y LLA-B lo que permitió determinar su predominancia o coexistencia en la población leucémica del país. Siendo una de las principales contribuciones del estudio el establecimiento de la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* entre la población leucémica guatemalteca respecto a las frecuencias reportadas en estudios realizados en diferentes regiones geográficas del mundo.

Esto permitió realizar comparaciones con los resultados de estudios similares efectuados en otros países, los cuales reportan diferencias entre la frecuencia de expresión de los reordenamientos de *BCR-ABL* y sus características demográficas. Se logró establecer que la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* entre la población leucémica guatemalteca coincide con la reportada en estudios efectuados en países latinoamericanos y difiere a la reportada en la mayor parte de estudios realizados en países occidentales y orientales, (Shepherd, Suffolk, Halsey, & Allan, 1995; Melo, Hochhaus, Yan, & Goldman, 1996; Bradford, Hughes, & Rudzki, 2002; Goh, Hwang, Kim, Lee, Kim et al., 2006; Ito, Tanaka, Tanaka, Ito, Kyo et al., 2004; Udomsakdi, U-Pratya, Boonmoh, & Vatanavicharn, 2000) lo que sugiere que podría existir una conducta biológica diferente en la población leucémica guatemalteca con esta patología, producto de la variabilidad genética entre poblaciones como posible explicación para las diferencias encontradas.

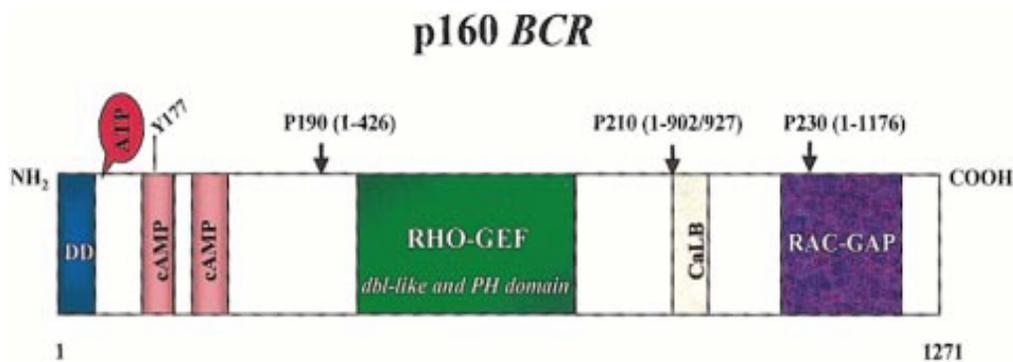


## B. Gen *BCR*

El gen *BCR*, se localiza en el brazo largo q11 del cromosoma 22 (22q11) y está constituido por 23 exones que codifican para dos proteínas. Una de 130 KDa y otra de 160 KDa, cuya expresión disminuye con la maduración mieloide de las células hematopoyéticas y que se encuentran tanto a nivel nuclear como celular (Heisterkamp et al., 1985). La proteína *BCR* posee un dominio de dimerización y un dominio de cinasa, en la región NH<sub>2</sub>-terminal; además de un dominio con actividad de GTPasa hacia la región COOH-terminal (Figura 2) (Deininger et al., 2000; Van Dongen, Macintyre, Gabert, Delabesse, Rossi et al., 1999).

Deininger (2000) afirma que la proteína Bcr es una molécula compleja cuyos rasgos estructurales sugieren que desempeña algún papel en la transducción de señales; sin embargo su verdadero papel permanece sin ser determinado.

Figura 2. Estructura de la proteína Bcr



Fuente: Deininger, M., Goldman, J., & Melo, J. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96, 3343-3345.

## C. Reordenamiento *BCR-ABL*

En la mayoría de las leucemias, las traslocaciones dan lugar a un gen de fusión que produce un ARN mensajero (ARNm) que codifica una proteína quimérica con propiedades estructurales y funcionales distintas de las proteínas constitucionales normales (Deininger et al., 2000).

Estas proteínas pueden activar la transcripción directamente, sin que se requiera la interacción de otras proteínas específicas. Actualmente se han identificado muchos genes de fusión y el caso mejor conocido es el gen quimérico *BCR-ABL*, que es resultado de la translocación t(9;22)(q34;q11) que da lugar al cromosoma Philadelphia (*Ph*) (Bose, Deininger, Gora, Goldman, & Melo, 1998; Deininger et al., 2000).

A nivel molecular la traslocación t(9;22) (q34;q11), conocida como cromosoma Philadelphia (*Ph+*), resulta de la fusión cabeza-cola de los genes *BCR* y *ABL* cuando parte del gen *ABL* localizado en el cromosoma 9 es transferida e insertada dentro del gen *BCR* del cromosoma 22, originando el gen quimérico *BCR-ABL*. Dicho transcrito codifica para una proteína que aumenta la actividad de tirosina cinasa activando múltiples señales de transducción celular que desencadenan un elevado potencial neoplásico y por lo cual es asociado a un pronóstico adverso (de Klein et al., 1982; Hermans et al., 1987; Pane, Frigeri, Sindona, Luciano, Ferrara et al., 1996).

#### 1. Proteínas de fusión *BCR-ABL*

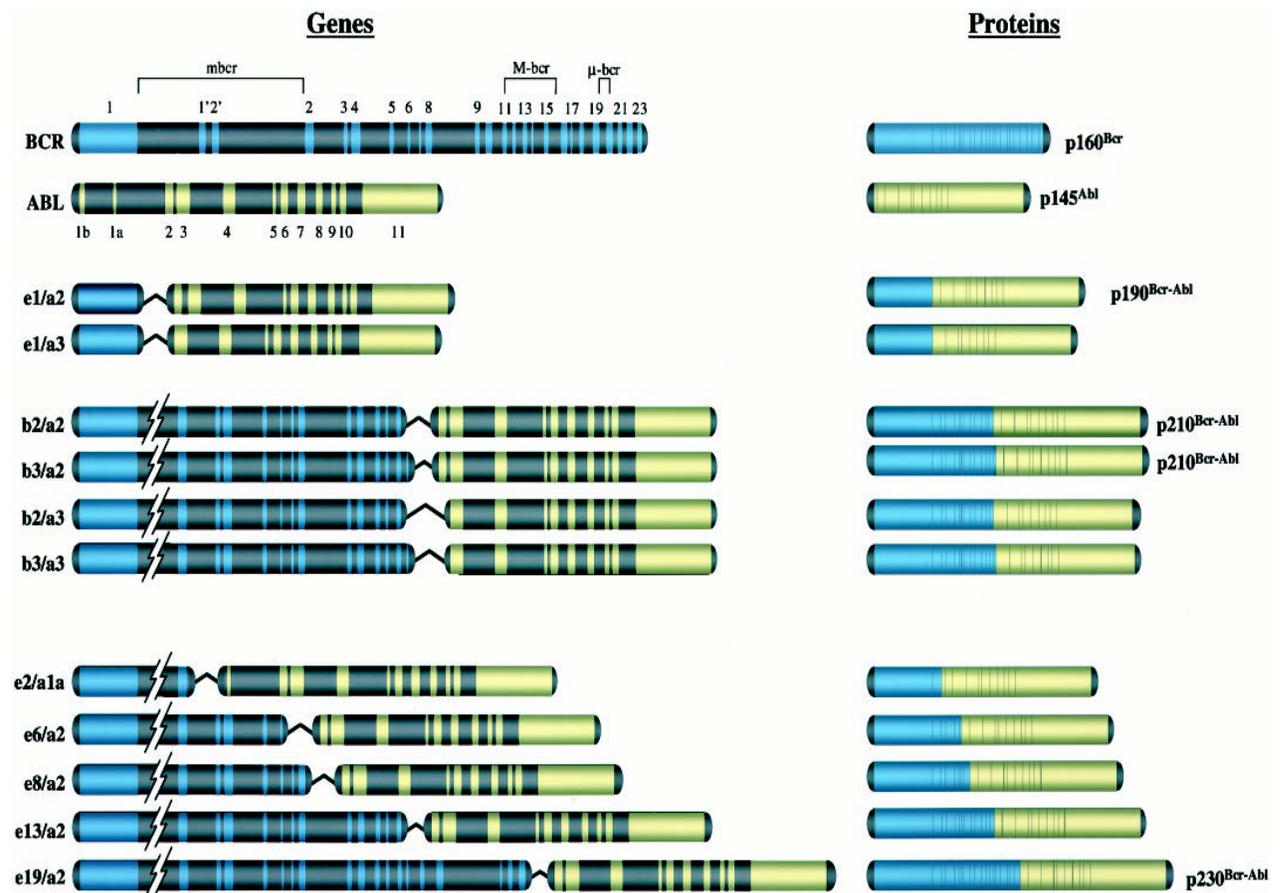
El oncogén quimérico *BCR-ABL* lleva a la síntesis de proteínas de diferente peso molecular dependiendo de la localización del punto de rotura. Molecularmente es posible distinguir tres nuevas proteínas de fusión (p190<sup>*BCR-ABL*</sup>, p210<sup>*BCR-ABL*</sup> y p230<sup>*BCR-ABL*</sup>) (de Klein et al., 1982; Pane et al., 1996) (Figura 3).

Los puntos de rotura en el gen *ABL* encontrados son heterogéneos y se pueden observar en una amplia región de 300 kb (kilobases), generalmente en los exones alternativos Ib y Ia, o más frecuentemente entre ambos; también se han encontrado puntos de rotura cercanos al exón 2 (a2) (Martinelli, Testoni, Montefusco, Amabile, Saglio et al., 1998; Radich et al., 1997).

En contraste con el gen *ABL*, los puntos de rotura más frecuentes dentro del gen *BCR* se localizan en los exones 1(*e1*), 12(*b2*), 13(*b3*) y 19(*e19*). Cuando se da la unión de los exones b3a2 y/o b2a2 (Región *M-bcr*) se codifica para una proteína de 210kD (p210<sup>*BCR-ABL*</sup>) la cual se presenta en el 20% a 40% de los pacientes con LLA y es característica en más del 95% de pacientes con LMC (Arana et al., 2002; Pane et al., 1996).

Si los exones e1 y e2 son removidos por el corte y empalme (Región *m-bcr*) la unión de e1a2 se transcribe en una proteína de 190kD ( $p190^{BCR-ABL}$ ), la cual se detecta en el 60% a 80% de los pacientes con LLA y en menos del 10% para aquellos con LMC. Es posible observar una tercer proteína de fusión próxima a 3' del extremo distal del gen *BCR* denominada  $p230^{BCR-ABL}$ , la cual resulta de la fusión de los exones e19a2 (Región *μ-bcr*), cuya expresión se encuentra mayormente asociada a leucemias crónicas neutrófilas y trombocitosis (Figura 3). Por consiguiente dependiendo del punto de rotura se pueden obtener cuatro transcritos diferentes: *b2a2*, *b3a2*, *e1a2* y *e19a2*, siendo su hallazgo indicador de muy mal pronóstico (Arana et al., 2002; Jiménez, Carrillo, Chaves, Jiménez, Vargas et al., 2008; Pane et al., 1996; Ribera, Oriol, González, Vidriales, Brunet et al., 2006).

Figura 3. Proteínas de fusión *BCR-ABL*



Fuente: Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., & Kurzrock R. (2001). The *BCR* gene and Philadelphia chromosome positive leukemogenesis. *Cancer Research*, 61, 2343 -2355.

## 2. Biología de las proteínas p190<sup>BCR-ABL</sup> y p210<sup>BCR-ABL</sup>

Las diferencias en el reordenamiento genético de las proteínas de fusión de *BCR-ABL* determinan diferencias funcionales respecto al potencial neoplásico y la actividad de tirosina cinasa. Estudios *in vitro*, han demostrado que p190 posee mayor actividad de tirosina cinasa que p210 sugiriendo que la expresión de ambos rearrreglos genéticos son diferentes en la generación de su puntos de rotura, aunque aun se desconoce el mecanismo que da origen a este proceso (Kantarjian, Talpaz, Dhingra, Estey, Keating et al., 1991; Secker, Craig, Hawkins, & Hoffbrand, 1991; Secker, & Craig, 1993).

Las proteínas p190<sup>BCR-ABL</sup> y p210<sup>BCR-ABL</sup> son moléculas de ARNm pleiotrópicas (que afectan múltiples características fenotípicas) y poseen cualitativamente muchas actividades similares (Tabla 1).

Se ha determinado que la proteína de fusión de *BCR-ABL* p190 (cuya frecuencia es mayor en leucemias linfoblásticas agudas), incrementa la actividad de tirosina cinasa a través de la activación de múltiples señales de transducción celular que desencadenan un elevado potencial neoplásico en células hematopoyéticas al alterar propiedades celulares como la adhesión, proliferación y apoptosis. Este mecanismo provoca una mayor agresividad biológica comparada con la expresión de la proteína p210 (cuya frecuencia es mayor en leucemias mieloides crónicas) lo cual se manifiesta en la presentación clínica de las leucemias y en la terapéutica a seguir, razón por la cual es importante el estudio de los diferentes reordenamientos genéticos (Lugo, Pendergast, Muller, & Witre, 1990).

Estudios moleculares en LMC señalan algunas evidencias a favor y otras en contra de que el tipo de transcrito de fusión *b3a2* o *b2a2*, influye en el curso de la enfermedad. Mills (1991) y Dobrovic (1990) sugirieron una asociación entre el ARNm *b3a2* y una fase crónica más corta con menor sobrevida; sin embargo, estudios prospectivos más recientes no confirman estos resultados (Deininger et al., 2000; Prejzner, 2002; Rozman, Urbano, Cervantes, Rozman, Colomer et al., 1995; Stiepherd, Suffolk, Halsey, & Allan, 1995).

Por el contrario, otros estudios establecen la fuerte asociación entre el hallazgo del transcrito de fusión *b3a2* y un recuento elevado de plaquetas, siendo esta la única diferencia significativa encontrada a la fecha. Sin embargo su valor pronóstico aun es controversial (Balatzenko, Vundinti, & Guenova, 2011; Bianchi, Cairoli, Marengo, Muti, Del Monte et al., 1995; Inokuchi, Inoue, Tojo, Futaki, Miyake et al., 1991; Perego, Costantini, Cornacchini, Gargantini, Bianchi et al., 2000; Rosas, Martinez, Ayala, Vela, Bahena et al., 2003; Shaefer et al., 1987; Shatalrid, Talpaz, Kuerzrock, Kantarjian, Trujillo et al., 1988).

La coexpresión de ambos transcritos *b2a2* y *b3a2* puede originarse ya sea por corte alterativo o variaciones fenotípicas poco comunes, que se originan de la existencia de varias líneas celulares leucémicas con diferentes transcritos de expresión *BCR-ABL*. Esta coexpresión es detectable en un porcentaje minoritario de pacientes leucémicos correspondiendo del 1.4 al 11%. (Henegariu, Heerema, Dlouhy, Vance, & Vogt, 1997).

La coexpresión se encuentra ligada a dos polimorfismos, el primero corresponde al polimorfismo de timina (T) a citosina (C) en el exón 14 del gen BCR, alterando el tercer nucleótido del codón relevante; y el segundo, al cambio de adenina (A) a guanosina (G) entre el intrón 13 arriba de la posición 3' (Branford, Hughes, & Rudzki, 2002; Meissner, Dias, Covas, Job, Leite et al., 1998).

En el caso de LMC, es posible observar el hallazgo de coexpresión de p210 y p190, que de acuerdo a la literatura es posible detectarlo en la mayoría de los pacientes con LMC y hasta en un 30% con LLA *Ph+*, situación que se presenta por el “*splicing*” o empalme alternativo del ARNm (van Rhee, Hochhaus, Lin, Melo, Goldman et al., 1996).

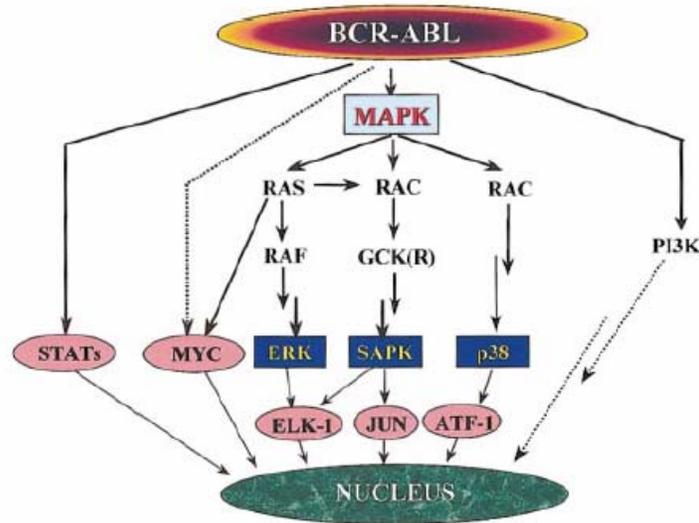
Tabla 1. Propiedades biológicas de las proteínas p210<sup>BCR-ABL</sup> y p190<sup>BCR-ABL</sup>

p210 <sup>BCR-ABL</sup>	p190 <sup>BCR-ABL</sup>
- Constitutivamente activa la enzima tirosina cinasa	- Constitutivamente activa la enzima tirosina cinasa
- Forma bloques de actina en el citoesqueleto	- Atenúan la muerte celular programada
- Su expresión disminuye con la diferenciación mieloide	- Está vinculada a las vías de señalización Jak-Stat (principalmente Stat 5)
- Atenúa la muerte celular programada	- Está vinculada a la vía de señalización 3-cinasa fosfatidil inositol
- Está vinculada a las vías de señalización Jak-Stat (principalmente Stat 5)	- Ha transformado la actividad mediada por la vía de señalización RAS
- Está vinculada a la vía de señalización 3-cinasa fosfatidil inositol	- Induce la degradación de la tirosina cinasa <i>Abl</i>
- Activa las Jun cinasas	- Inhibidor de la interacción proteína <i>Abelson</i>
- Interactúa y regula las proteínas de reparación del ADN	- Puede provocar alteraciones en las propiedades de adherencia
- Tiene actividad mediada por vías de señalización RAS	
- Induce alteraciones en las propiedades de adherencia	
- Altera la expresión y la protección de los bucles de la fosforilación de proteínas (involucrados en la mielopoyesis)	

**Fuente:** Razelle, K., MD., Hagop, M., MD., Brian, J., MD., & Moshe, T., MD. (2003). Philadelphia chromosome positive leukemias: From basic mechanisms to molecular therapeutics. *Annals Internal Medicine*, 138, 819-830.

### 3. Vías de señalización activadas por *BCR-ABL*

Una consecuencia del incremento de la actividad de tirosina cinasa radica en que el gen *BCR-ABL* puede fosforilar diferentes sustratos, activando múltiples señales de transducción en las células. Las vías activadas son: RAS, vía fosfatidilinositol-3-cinasa, Jak-Stat, MAPK y ROS (Figura 4).

Figura 4. Vías de señalización de *BCR-ABL*

Fuente: Deininger, M., Goldman, J., & Melo, J. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96, 3343-3345.

a. Vía RAS

La activación de esta vía se produce por transducción de señales mediadas por receptores con actividad tirosina cinasas. Una vez realizada la unión al ligando y dimerización, los receptores tirosina cinasas activados, se unen a moléculas adaptadoras que contiene los dominios SH2 y SH3 como son Grb-2 y SHC formando complejos de señalización con factores intercambiadores *RAS* en la membrana celular. Estos complejos desencadenan una acumulación de la forma *RAS* e inducen un efecto antiapoptótico resultando en la proliferación y transformación maligna de los tumores que, aunque sea insuficiente, es necesario para la transformación celular derivada de *BCR-ABL*. (Cortez, Kadlec, & Perdergast, 1995).

b. Vía fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3)

Esta vía funciona en la regulación del metabolismo lipídico fosfoinositídico y en la generación de segundos mensajeros lipídicos relacionados con la transducción de señales. Se ha visto que una subunidad de esta proteína se fosforila en residuos tirosina en células que expresan *BCR-ABL* y forma complejos con *cbl* y moléculas adaptadas *crk* y *crkl*. *PI3* está activado de forma

constitutiva por la translocación *BCR-ABL* jugando un papel importante en su transformación (Rameh, & Cantley, 1999; Slorski, Kamakaraj, Nieborowska, Ratajczak, Shau et al., 1995).

c. Vía Jak-Stat

Ihle (1998), afirma que las funciones celulares de crecimiento, diferenciación o activación están finamente reguladas por factores solubles como citocinas, factores de crecimiento y hormonas. En cuanto al crecimiento de las células hematopoyéticas normales, éste se controla por citocinas, cuyos receptores traducen señales mediante la activación de proteínas denominadas genéricamente *Jak* (*Janus tyrosine kinases*), que es una familia de cinasas citoplasmáticas que fosforilan y activan los factores de transcripción *STAT* (*Signal Transducer and Activators of Transcription*).

*BCR-ABL* activa constitutivamente las vías de señalización de *JAK* y *STAT* en células hematopoyéticas, siendo *STAT 1* y *STAT 5* las tirosin-cinasa fosforiladas más importantes. En contraste con la activación de la vía *Jak-Stat* la cual es activada por medio de estímulos fisiológicos, *BCR-ABL* activa directamente *STAT 1* y *STAT 5* sin previa fosforilación de proteínas *Jak* (Carlesso, Frank, & Griffin, 1996)

d. Vía MAPK

La activación de la vía de señalización de proteínas activadoras de mitogénesis con actividad cinasa (*MAPK*) se encuentra constituida por tres rutas bioquímicas: la cinasa regulada extracelularmente (*ERK*), la vía de las *Jun* cinasas o cinasas activadas por estrés (*SAPK*) y la vía de transcripción (Rousell, 1998).

*BCR-ABL* y *v-ABL* activan la vía *SAPK* en fibroblastos y células hematopoyéticas. Así mismo activan promotores dependientes de *Jun* de manera dependiente de *RAS*, *MEPK* y *SAPK*. Mientras que los efectos de *BCR-ABL* en la vía *JNK* parecen ser claros, estudios de la vía *ERK* muestran que la *BCR-ABL* funciona de manera distinta a la mayoría de los receptores con actividad tirosincinasa (Rousell, 1998).

e. Vía ROS

La transformación de las líneas celulares con *BCR-ABL* presenta un incremento de *ROS*, comparado con las líneas celulares no *BCR-ABL* (Satler, Verma, Shrikhande, Byrne, Pride et al., 2000).

Se ha sugerido que *ROS* podría actuar como segundo mensajero en la regulación de la actividad de las enzimas sensibles a la acción de oxidorreducción (redox), como son las cinasas y fosfatasas. La inhibición de la proteína tirosin fosfatasa (PTPasa) mediante la modulación redox explicaría el amplio espectro de las actividades biológicas de *ROS*. Un incremento de *ROS* amplifica las señales de *BCR-ABL*, posiblemente regulando las proteínas redox-sensibles, como es la PTPasa celular, la cual a su vez se encuentra incrementada (Denu, & Tanner, 1998).

Los niveles de *ROS* no sólo son modulados por enzimas, antioxidantes y grupos sulfhidrilos, sino también reaccionados con las bases del ADN. Aunque las modificaciones pueden ser corregidas eficientemente por los mecanismos de reparación de ADN, un incremento persistente de *ROS* podría inducir la acumulación de mutaciones en las células leucémias, que podría contribuir a la progresión de la enfermedad (Dreher, & Junod, 1996).

**D. Características demográficas y clínicas de LMC y LLA-B cromosoma Filadelfia positivo**

1. LMC cromosoma Filadelfia positivo

a. Características demográficas

La LMC es un síndrome mieloproliferativo crónico con origen en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas. Representa entre el 15% y el 20% del total de leucemias y su incidencia en los países occidentales se ha estimado en 1,2 casos por cada 100,000 habitantes/año. La edad media de presentación es de 53 años cuya incidencia máxima se encuentra entre los 40 y los 60 años y predomina ligeramente en varones, con una relación de 1,4:1. La mortalidad ajustada por edad es de 0,6 por cada 100,000 habitantes/año y alrededor de la mitad de los pacientes son asintomáticos al momento del diagnóstico con una mediana de supervivencia global después de éste de 4 a 6 años (Greenlee, Hill, Murria, & Thun, 2007).

Se han reportado diferentes porcentajes de los rearrreglos *b3a2* y *b2a2* en diversos estudios realizados en diversas regiones geográficas en pacientes con LMC, pudiéndose observar diferencias en la expresión de los diferentes transcritos patológicos de *BCR-ABL* (Tabla 2).

Tabla 2. Reportes de la distribución de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* en niños y adolescentes (A) y adultos (B) con LMC

Referencia	País	Pacientes n (%)	Tipo de transcrito de <i>BCR-ABL</i>		
			<i>b2a2</i> n (%)	<i>b3a2</i> n (%)	<i>b2a2+ b3a2</i> n (%)
<b>(A)</b>					
Aurer, Butturini, & Gale (1991)	Italia	12 (100)	10 (84)	1 (8)	1 (8)
Millot, Traore, Guilhot, Nelken, Leblanc, Leverger et al. (2005)	Francia	16 (100)	6 (37)	10 (63)	0 (0)
Hasan, Sazawal, Kumar, Chaubey, Mishra, Mirm et al. (2006)	India	47 (100)	32 (68)	15 (32)	0 (0)
<b>(B)</b>					
Bradford, Hughes, & Rudzki (2002)	Australia	105 (100)	36 (34)	45 (43)	24 (23)
Shepherd, Suffolk, Halsey, & Allan (1995)	Inglaterra	119 (100)	41 (34)	72 (61)	6 (5)
Melo, Hochhaus, Yan, & Goldman (1996)	Inglaterra	209 (100)	90 (43)	106 (51)	13 (6)
Paz, Burgo, Morillo, Santos, Fiallo et al. (2002)	Ecuador	37 (100)	35 (95)	2 (5)	0 (0)
Arana, Sánchez, Ignacio, De La Fuente, Garcés et al. (2002)	México	226 (100)	120 (53)	88 (39)	18 (8)
Ruiz-Arguelles, Garcés, Reyes, & Ruiz (2004)	México	238 (100)	103 (43)	129 (54)	6 (3)
Meza, Gutiérrez, Vásquez, Delgado, Esparza et al. (2007)	México	93 (100)	37 (40)	45 (48)	11 (12)
Rosas, Martínez, Ayala, Vela, Bahena et al. (2003)	México	97 (100)	57 (59)	27 (28)	13(13)
Goh, Hwang, Kim, Lee, Kim et al. (2006)	Korea	538 (100)	174 (32)	364 (68)	0 (0)
Ito, Tanaka, Tanaka, Ito, Kyo et al. (2004)	Japón	126 (100)	38 (30)	85 (68)	2 (2)
Udomsakdi, U-Pratya, Boonmoh, & Vatanavicharn (2000)	Tailandia	99 (100)	31 (31)	60 (61)	8 (8)
Mondal, Bandyopadhyay, Majumdar, Mukhopadhyay, Chandra et al. (2006)	India	108 (96)	33 (29)	69 (62)	6 (5)
Yaghmaie, Ghaffari, Ghavamzadeh, Alimoghaddam, Jahani et al. (2008)	Irán	64 (86)	15 (20)	47 (63)	2 (3)
Emad, Osman, & Kamal (2010)	Sudan	43 (100)	23 (54)	18 (42)	2 (4)

#### b. Características clínicas

La enfermedad se presenta constituida por tres fases caracterizadas por su presentación clínica y morfológica, las cuales son: fase crónica, fase acelerada y crisis blástica (Tabla 3). La fase crónica, es un estado indolente en el que se diagnostica a 90% de los pacientes. En esta etapa, que

puede durar entre tres y ocho años, las células sanguíneas retienen su capacidad de diferenciarse de manera normal, hasta que el padecimiento progresa a la fase acelerada, en la que se comienzan a detectar células inmaduras en la circulación sanguínea. Los criterios diagnósticos de la fase acelerada son variables y su duración puede ser de unas cuantas semanas hasta años. Finalmente, la enfermedad progresa a la crisis blástica (CB), caracterizada por 30% o más células inmaduras (blastos) en circulación e incluso en infiltrados extramedulares, asociados con un incremento de la esplenomegalia. La crisis blástica es mieloide en dos de cada tres casos y durante esta fase la supervivencia de los pacientes se reduce a meses e incluso semanas (Deininger et al., 2000; Jorgensen, & Holyoake, 2001; Sawyers, 1990).

Tabla 3. Fases clínicas de la LMC

<b>Fase Crónica</b>
< 15% de blastos en sangre periférica o médula ósea
<b>Fase Acelerada</b>
Evolución clonal citogenética
Sangre periférica con $\geq 15\%$ de blastos, o $\geq 30\%$ de blastos con promielocitos
Trombocitopenia $< 100 \times 10^3/\mu\text{l}$ no relacionada a terapia
Basofilia $\geq 20\%$
<b>Fase Blástica</b>
$\geq 30\%$ de blastos en médula ósea o sangre periférica
Compromiso extramedular con blastos localizados

**Fuente:** Kantarjian, H., Deisseroth, A., Kurzrock, R. et al. (1993). Chronic myelogenous leukemia: A concise up date. *Blood* 82(3), 2975-2984.

El cromosoma Filadelfia se encuentra en el 95% de los pacientes con LMC, por lo cual se considera marcador genético de la misma (John, Goldman, Junia, & Melo, 2003). Sin embargo, a pesar de que el cromosoma Filadelfia existe como única anormalidad cromosómica a través de la fase crónica de la enfermedad, entre el 70 y 80% de los pacientes adquieren anormalidades cromosómicas adicionales durante el desarrollo a la fase acelerada y crisis blástica como: extra cromosoma Filadelfia, trisomía 18, trisomía 19 e isocromosoma 17q, con lo que desarrollan cariotipos complejos. Mientras que en otros pacientes se detectan cambios que involucran a los cromosomas 8, 17, 9 y 22 (Cortez, Talpaz, Giles, O'Brien, Rios et al., 2003; Faderl, Talpaz, Estrov, O'Brien, Kurzrock et al., 1999; Shet, Jahagirdar, & Verfaillie, 2002).

A nivel molecular la mayoría de los pacientes con LMC exhiben rupturas que resultan en un ARN mensajero de fusión, en el cual el exón *b2* o *b3* del gen *BCR* es fusionado al exón *a2* del gen *ABL* (transcritos *b2a2* o *b3a2*). Ambos transcritos dan lugar a una proteína de fusión *BCR-ABL* de 210 kd considerada central en la patogénesis de la LMC (Daley, Van Etten, & Baltimore, 1990; Wetzler, Talpaz, Estrov, & Kurzrock, 1993)

Los síntomas más frecuentes referidos por los pacientes con leucemia mieloide crónica Filadelfia positivo por orden de frecuencia son: astenia, anorexia o pérdida de peso, sudoración, fiebre, dolores óseos, cefalea, dolor esternal, hepatomegalia y esplenomegalia, entre otros (presentes entre el 80% y 20% de los casos). Pacientes con alto conteo de glóbulos blancos, pueden tener manifestaciones de hiperviscosidad, incluyendo priapismo, tinnitus, estupor, cambios visuales por hemorragias retinianas y accidentes cerebrovasculares (Lithman, Heal, & Rowe, 1987).

En la evaluación de sangre periférica, la LMC presenta como rasgos más comunes un elevado conteo de glóbulos blancos, usualmente  $>25 \times 10^9/L$  y frecuentemente de  $>100 \times 10^9/L$ , ocasionalmente con algunas variaciones cíclicas. Los hallazgos de inexplicable persistencia de leucocitosis ( $> 12-15 \times 10^9/L$ ) en la ausencia de infección o de otras causas de elevación de glóbulos blancos deben ser de alta sospecha para el diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica (Cortes, & Kantarjian, 2004).

El conteo de glóbulos blancos usualmente muestra granulocitos en todos los estados de maduración desde blastos a células maduras y granulocitos morfológicamente normales. El recuento de basófilos es elevado, pero solo entre el 10 y 15% de los pacientes tienen  $\geq 7\%$  basófilos en sangre periférica frecuentemente. Los eosinófilos se encuentran moderadamente elevados, mientras que el conteo absoluto de linfocitos es elevado a expensas de los linfocitos T (Cortes, & Kantarjian, 2004).

El conteo plaquetario se eleva entre el 30 y 50% de los pacientes y es  $>1,000 \times 10^9/L$  en un pequeño porcentaje de pacientes con leucemia mieloide crónica. Cuando la trombocitopenia ocurre es usualmente signo de aceleración de la enfermedad, no obstante algunos pacientes tienen anemia leve al diagnóstico. La función de los neutrófilos es usualmente normal o levemente dañada, pero la actividad celular de las células NK (natural killer) está dañada. En términos generales la función plaquetaria es frecuentemente anormal pero usualmente no tiene mayor significación clínica (Cortes, & Kantarjian, 2004).

La médula ósea es hipercelular, con celularidad entre el 75 y 90%. La relación mielóide:eritroide es usualmente del 10 al 30% respectivamente. Es posible observar todos los estados de maduración de glóbulos blancos al efectuar la evaluación microscópica de sangre periférica, encontrando un ligero predominio de mielocitos. Los megacariocitos están incrementados en número en fases tempranas de la enfermedad y pueden mostrar rasgos displásicos. La fibrosis reticulínica puede ser evidente al diagnóstico pero incrementa con la progresión de la enfermedad y es usualmente un hallazgo de pronóstico adverso (Cortes, & Kantarjian, 2004).

## 2. LLA cromosoma Filadelfia positivo

### a. Características demográficas

La LLA es una enfermedad de naturaleza monoclonal que se originan principalmente en la médula ósea caracterizada por el crecimiento incontrolado de formas celulares inmaduras de la serie linfóide (Greaves, 1996). La LLA-B representa el 85% de los casos de leucemia aguda en niños entre 2 y 15 años con una incidencia que se incrementa de 0,39 por millón en adultos de 35 a 39 años a 2,1 por millón en pacientes mayores de 85 años. Entre el 16% y el 31% de los pacientes adultos con LLA tiene más de 60 años (Mejía, Fajardo, Bernáldez, Farfan, Ortiz et al., 1996; Taylor, Reid, & Proctor, 1994).

Existe una leve preponderancia de los hombres sobre las mujeres, con una relación de 1.4:1.0, así mismo, en la raza blanca se observa una mayor frecuencia que en la raza negra, lo cual podría reflejar una diferente susceptibilidad genética. Se ha descrito que a nivel mundial la letalidad media anual de las leucemias agudas es de 3 a 5 casos por cada 100,000 habitantes y hay una tendencia notable al aumento del padecimiento (Pui, & Crist, 1999; Hoelzer, Thiel, Löffler, Buchner, Ganser et al., 1998).

Estudios efectuados respecto a la frecuencia de los diferentes transcritos de fusión de *BCR-ABL* revelan que en el 60% de las LLA el punto de ruptura de *BCR* corresponde a la región menor (m-bcr) y que el transcrito expresado corresponde a *e1a2*, el cual codifica para una proteína de fusión de 190kDa (p190<sup>BCR-ABL</sup>), mientras que en el 40% restante de los casos el punto de rotura se

origina en la región *M-bcr* (Chissoe, Bodenteich, Fang, Wang, Burian et al., 1995; Hermans et al., 1987; Melo, 1996; Van Dongen et al., 1999).

Un estudio efectuado en la población ecuatoriana, cuya población predominante es mestiza, revela que del total de casos analizados para los diferentes transcritos, el 100% de los mismos correspondían al transcrito *e1a2*. Dicha variación respecto a otros reportes efectuados, no muestra diferencias significativas, ya que en otras poblaciones los resultados son equivalentes al 95% para dicho transcrito, siendo probable que la diferencia se deba al hecho de que estos estudios fueran efectuados en poblaciones caucásicas cuyo linaje ancestral puede diferir entre poblaciones (Paz et al., 2002; Melo, 1996; Hermans et al., 1987).

b. Características clínicas

La LLA se clasifica por criterios citomorfológicos e inmunológicos de las células blásticas. El grupo de trabajo franco americano británico (FAB) ha propuesto una clasificación basándose en la morfología de las células leucémicas en el momento del diagnóstico, reconociendo tres tipos morfológicos: L1, L2 y L3. En el subtipo L1 se evidencia un tamaño celular pequeño, núcleo regular, nucléolos ausentes y es reconocida como la leucemia linfocítica infantil presente en el 85% de los casos reportados. En el subtipo L2 la población celular es más heterogénea con una morfología irregular, también es denominada leucemia linfocítica del adulto y se evidencia en un 14% de la población. Como leucemia tipo Burkitt es identificado el subtipo L3 que se caracteriza por la presencia de células grandes, homogéneas, con núcleo redondo, cromatina dispersa, citoplasma basófilo y vacuolado, cuya población celular se evidencia en menos del 3% de pacientes con leucemia (Tabla 4) (Bennett, Catovsky, Daniel, Flandrin, Galton et al., 1981).

Dentro de las manifestaciones clínicas sintomáticas de las LLA cromosoma Filadelfia positivo tenemos malestar general, pérdida de apetito, fiebre, palidez, anemia y trombocitopenia, entre otros. La translocación *BCR-ABL* se presenta de forma casi exclusiva en la leucemia linfoblástica aguda de precursores B, siendo especialmente frecuente en casos con inmunofenotipo común o pre B con expresión de CD19, CD20 y CD34 y coexpresión de marcadores mieloides (Scott, & Look, 2005).

Tabla 4. Clasificación citomorfológica de LLA de acuerdo al grupo cooperativo franco americano británico (FAB)

Rasgos citológicos	L1	L2	L3
Tamaño celular	Pequeño	Grande heterogéneo	Grande homogéneo
Cromatina nuclear	Homogénea	Variable heterogénea	Finamente homogénea
Forma nuclear	Regular	Irregular	Regular redondo u oval
Nucléolos	Ausentes o escasos	Visibles	Prominentes uno o más
Citoplasma	Escaso, poco intenso, vacuolización variable	Moderada cantidad, débilmente basófilo, vacuolización variable	Moderada cantidad fuertemente basófilo, vacuolización prominente
Frecuencia	85%	14%	1-3%

**Fuente:** Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H., & Sultan, C. (1981). The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: Concordance among observers and clinical correlations. *British Journal of Haematology*, 47, 553-561.

Entre los pacientes con LLA aproximadamente del 60 al 85% presentan un cariotipo anormal con alteraciones numéricas y/o estructurales estas alteraciones tienen gran importancia debido a que tienen un valor pronóstico. Las alteraciones numéricas se pueden presentar tanto de forma aislada como en asociación con alteraciones estructurales (Ankathil, Geetha, Remani, Gangadharan, Rajasekharan et al., 1996). Las alteraciones numéricas, comprenden la pérdida o ganancia de cromosomas e incluyen los siguientes tipos:

- Hiperdiploidía: es la presencia de 47 o más cromosomas, se presenta en aproximadamente el 7% de los pacientes adultos con LLA y en un 25% en niños, la presencia de más de 50 cromosomas se denomina como hiperdiploidía masiva y es representativa de un excelente pronóstico, a diferencia de la hiperdiploidía de 47 a 50 cromosomas cuyo pronóstico es moderado (Ankathil et al. 1996; Scott et al., 2005).

- Hipodiploidía: es la presencia de 45 o menor cantidad de cromosomas, se presenta en aproximadamente el 1% de los pacientes adultos y en un 2% en niños con LLA, debido a la existencia de sólo un cromosoma del par correspondiente (monosomía). Se han identificado monosomías en pacientes hipodiploides con LLA en los cromosomas: 1, 5, 6, 10, 11, 18, 19, 21 y

22. La hipodiploidía presenta un valor pronóstico individual a variables relevantes, como lo es la combinación con el sexo o edad del paciente, representando un mal pronóstico (Campbell, Michael, White, & Matthews, 1995; Scott et al., 2005; Stefan, Hagop, Kantarjian, Talpaz, & Estrov, 1998).

Otro tipo de alteraciones presentes en los pacientes con LLA, son de tipo estructural, que pueden llegar a ser hasta 30 diferentes alteraciones abarcando incluso el 78% de las anormalidades en pacientes con LLA. Las traslocaciones constituyen el grupo más común, con un 30 a 39%. La translocación se origina por el intercambio de material genético entre cromosomas, generando dímeros que se traducen en proteínas diméricas que alteran la actividad celular (Benjamin, Ebert, & Todd, 2004; Stefan et al., 1998). Entre las traslocaciones más importantes presentadas en pacientes con LLA se encuentran:

- Traslocación  $t(9;22)(q34;q11)$ : a esta translocación se le conoce con el nombre de cromosoma Filadelfia, se presenta en aproximadamente el 30% de los pacientes adultos con LLA y un 4% en niños, la alteración genera la producción del dímero *BCR-ABL* que corresponde a un marcador de muy mal pronóstico. Entre características asociadas a su presencia se encuentra elevado conteo de leucocitos y pacientes de edad avanzada (Scott et al., 2005; Ching, 1995).

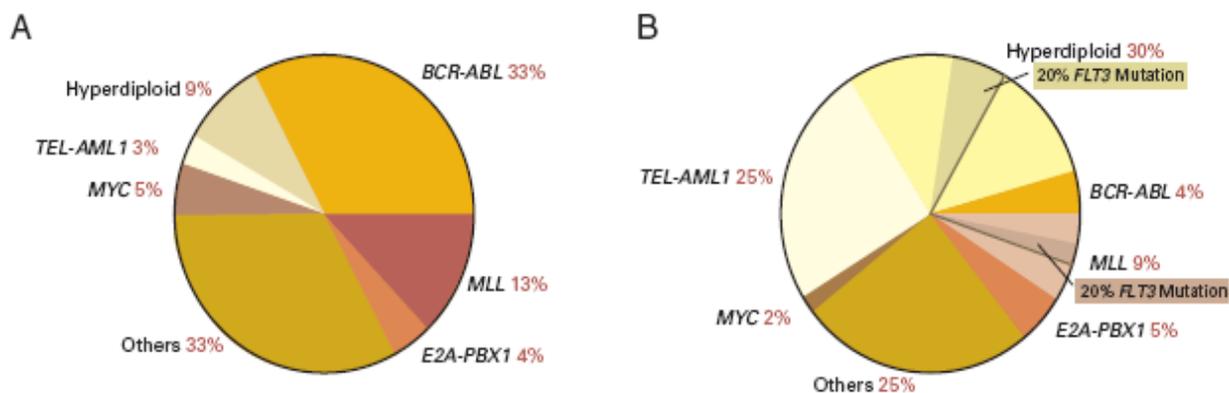
- Traslocación  $t(1;19)(q23;p13.3)$ : la alteración genética producida como consecuencia de la translocación es la fusión de los genes *E2A-PBX1*, representando un 4% en adultos y en un 5% en niños con LLA, dicha translocación representa un mal pronóstico en los pacientes ante la terapia con antimetabolitos, y su presencia se asocia a elevados conteos de leucocitos (Ching, 1995; Scott et al., 2005).

- Traslocación  $t(12;21)$ : la alteración genética producida es la fusión de genes *TEL-AML1*, se presenta en cerca del 3% en adultos y en un 25% en niños con LLA, este marcador representa a diferencia de los anteriores un pronóstico favorable al diagnóstico (Ching, 1995; Scott et al., 2005).

- Traslocación  $t(4;11)(q21;q23)$ : la alteración genética producida es la fusión de genes *MLL-AF4*, se presenta en el 13% en adultos y en un 9% en niños con LLA, este marcador se encuentra asociado a conteos elevados de leucocitos, y conlleva un mal pronóstico para el paciente (Ching, 1995; Scott et al., 2005).

Existen otras anomalías estructurales en pacientes con LLA pero se presentan en porcentajes menores, siendo las principales, mencionadas anteriormente. A continuación es posible observar la frecuencia de las principales alteraciones genéticas en niños(as) y adultos (as) con LLA (Figura 5). En el esquema A se muestran las principales alteraciones genéticas encontradas en LLA en adultos. En el esquema B se muestran las principales alteraciones genéticas en leucemia linfoblástica infantil (Radich, Dai, Mao, Oehler, Schelter et al., 2006; Pui, & Evans, 2006).

Figura 5. Frecuencia de las alteraciones genéticas en adultos y niños con LLA



Fuente: Scott, A., & Look, T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 6306-6313.

## E. Evaluación del riesgo en pacientes con leucemia

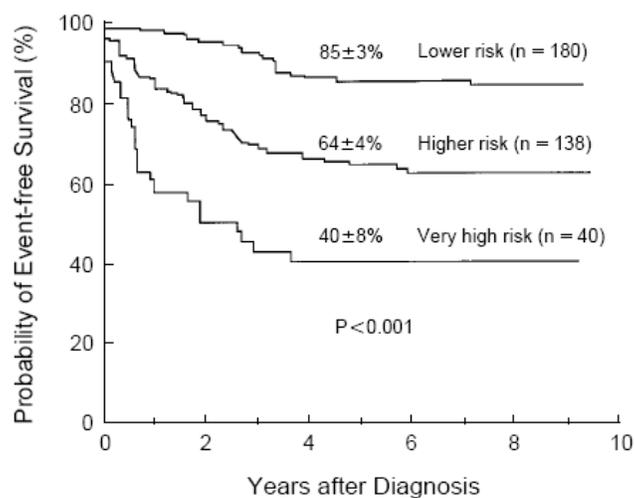
La evaluación rigurosa del riesgo o posibilidad de recaída en un paciente con leucemia es necesaria en el momento del diagnóstico para evitar un tratamiento inefectivo. Existe un notable desacuerdo para definir los subgrupos de riesgo, sin embargo de forma común se dividen en tres categorías: riesgo bajo, riesgo moderado y alto riesgo (Annino, Goekbuget, & Delannoy, 2002; Benjamín et al., 2004; John et al., 2003; Pui et al., 2006; Sallan, 2006).

La edad y el número de leucocitos al diagnóstico, el genotipo de las células leucémicas y la respuesta inicial al tratamiento son parámetros mayormente aceptados y utilizados en la configuración de los grupos de riesgo. De acuerdo con los criterios de definición, el riesgo bajo se presenta en pacientes con edad entre los 1 y 9 años, con un recuento de leucocitos menor a  $50,000/\text{mm}^3$  cuyo pronóstico resulta favorable al diagnóstico, por el contrario pacientes mayores de 35 años con conteos por arriba de  $50,000$  leucocitos/ $\text{mm}^3$  se encuentran en un riesgo alto.

Una mejor clasificación para el riesgo se basa en marcadores genéticos, se ha observado que pacientes con reordenamientos en el gen *MLL t(4;11)(q21;q23)* y con el reordenamiento *BCR-ABL t(9;22)(q34;q11)* se presentan con frecuencia en adultos colocándolos en un riesgo alto, a diferencia de marcadores como la hiperdiploidía masiva y el reareglo *TEL-AML1 t(12;21)* los cuales se presentan con una frecuencia mayor en niños y en donde ambos marcadores son de muy buen pronóstico, lo cual coloca a pacientes con dichos rearrreglos como pacientes de bajo riesgo. En el caso de pacientes con riesgo moderado son considerados aquellos con edad inferior a un año o mayores a 10 años y un recuento superior a 50,000 leucocitos/mm<sup>3</sup> que no presenten marcadores genéticos favorables o desfavorables (Behm, Raimondi, Frestedt, Liu, Crist et al., 1996; Pui, Kane, & Crist, 1995; Rubnitz, Downing, Pui, Shuetleff, Raimondi et al., 1997; Smith, Arthur, Camitta, Carroll, Crist et al., 1995).

La determinación del riesgo, permite identificar la probabilidad de supervivencia libre de eventos (recaídas y/o muerte) años después del diagnóstico; es decir, para pacientes con un riesgo alto se espera que el 40% sobrevivan un promedio de 10 años posteriores al diagnóstico. Por el contrario, pacientes identificados con un riesgo bajo se espera que el 80% presente una supervivencia libre de eventos de 10 años (Figura 6) (Gayno, Chapman, Little, McKenzie, Miller et al., 1988; Hoelzer et al., 1988).

Figura 6. Gráfica de *Kaplan-meier*: Probabilidad de supervivencia libre de eventos (SLE) según el riesgo



Fuente: Ching-Hon, P. (1995). Medical Progress: Childhood leukemias. *The New England Journal of Medicine*, 332, 24.

## **F. Tratamiento de pacientes con leucemia**

La tendencia actual para instaurar el tratamiento de los pacientes con leucemia esta adaptado a su clasificación de riesgo y diagnóstico, cuya duración global es de un mínimo de dos años y comprende por lo general tres fases: inducción, intensificación (consolidación) y mantenimiento.

- **Inducción a la remisión:** el primer objetivo de la terapia en pacientes con leucemia es inducir la remisión completa con una recuperación de la hematopoyesis normal. Un paciente está en remisión completa cuando no existe evidencia de leucemia ni en su exploración física, ni en el examen de sangre periférica o de médula ósea. Los valores en sangre periférica deben ajustarse a los normales para la edad del paciente y la médula ósea debe tener una celularidad normal, con menos del 5% de blastos. La remisión completa incluye también la ausencia de afectación del SNC o de afección extramedular. Obtener la remisión completa es la base del tratamiento y un requisito imprescindible para tener una supervivencia prolongada. Con la mejoría de los tratamientos de soporte y agentes quimioterápicos, la tasa de remisión completa alcanzada se aproxima entre el 96 y 99% (Benjamin et al., 2004; Hilden, Frestedt, Moore, Heerema, Arthur et al., 2005; Pui et al., 2006; Stefan et al., 1998).

- **Intensificación de la terapia o consolidación:** Los pacientes que logren la recuperación normal de la hematopoyesis pueden seguir a la fase de consolidación. La fase de intensificación es la administración de un tratamiento intensivo inmediatamente tras finalizar la inducción. Posteriormente, se realiza una reinducción, que consiste en la repetición del tratamiento de inducción con ligeras modificaciones a los tres meses de adquirir la remisión completa (Annino et al., 2002; Benjamín et al., 2004; Hilden et al., 2005; Pui et al., 2006; Stefan et al., 1998).

- **Mantenimiento:** es una prolongación en el tratamiento para eliminar cualquier posibilidad de que existan células malignas en el post tratamiento. Se ha comprobado que en algunos pacientes que están en aparente remisión completa al analizar sus células con técnicas de biología molecular, nos encontramos enfermedad mínima residual. Es por ello que los tratamientos de mantenimiento se mantienen por lo menos durante dos años, con reevaluaciones frecuentes para la evaluación de recaídas. Los pacientes realizan el tratamiento de forma ambulatoria, acudiendo a

sus revisiones cada 2-4 semanas (Annino et al., 2002; Benjamín et al., 2004; Hilden et al., 2005; Pui et al., 2006; Stefan et al., 1998).

Los pacientes con reordenamiento *BCR-ABL* requieren de regímenes más agresivos, en la actualidad en el caso de pacientes con LLA se recomienda el trasplante de médula ósea que provee de un 30% de remisión, el mesilato de imatinib (Gleevec), el cual es un inhibidor de la actividad tirosina cinasa (que genera la fusión *BCR-ABL*), se ha incorporado en los regímenes de mantenimiento de pacientes con LLA positiva al cromosoma Filadelfia (Benjamin et al., 2004; Hilden et al., 2005; Stefan et al., 1998).

En el caso de la LMC, el objetivo del tratamiento es la prevención de la crisis blástica, ya que cuando ocurre el pronóstico es poco favorable. El interferón alfa (IFN) fue el primer agente en modificar la historia natural de la LMC prolongando la sobrevida en pacientes con una remisión hematológica completa (<35% de células cromosoma filadelfia positivas). El trasplante de médula ósea constituye el segundo método electivo para tratamiento de LMC, logrando una supervivencia libre de eventos en un plazo de 5 años entre el 60 y 80%; sin embargo, el INF y el trasplante de médula ósea son considerados como posibles inductores de toxicidad debido a la mielosupresión que suelen ocasionar. Actualmente el tratamiento con mesilato de imatinib (Gleevec) presenta una tasa de remisión hematológica completa siendo el tratamiento electivo para pacientes con LMC cromosoma Filadelfia positiva (Pui et al., 2006; Biondi, Cimino, Pieters, & Pui, 2000).

## IV. JUSTIFICACIÓN

En Guatemala no existen datos respecto a la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* en el diagnóstico de LLA-B o LMC, por lo que actualmente la caracterización genética de la población leucémica con esta patología ha sido imposible de efectuar.

Estudios *in vitro* demuestran diferencias en el reordenamiento genético de las proteínas de fusión de *BCR-ABL* que determinan diferencias funcionales respecto al potencial neoplásico y la actividad de tirosina cinasa. Se ha encontrado que p190<sup>BCR-ABL</sup> posee mayor actividad de tirosina cinasa que p210<sup>BCR-ABL</sup> sugiriendo que la expresión de ambos rearrreglos genéticos es diferente en la generación de sus puntos de rotura. Se desconoce el mecanismo que da origen a este proceso; sin embargo, este mecanismo incrementa la actividad de tirosina cinasa a través de la activación de múltiples señales de transducción celular desencadenando un elevado potencial neoplásico en células hematopoyéticas al alterar propiedades celulares como la adhesión, proliferación y apoptosis, manifestándose en la presentación clínica de las leucemias, así como en la terapéutica a seguir. Por ello es importante el estudio de los diferentes reordenamientos genéticos que dan origen a las proteínas de fusión de *BCR-ABL* (Kantarjian et al., 1991; Lugo et al. 1990; Secker, & Craig, 1993; Secker et al., 1991).

Así también, se ha descrito que el tipo de transcrito de fusión de *BCR-ABL* (*b3a2*, *b2a2* y *e1a2*) influye en el curso de la enfermedad, encontrando una fuerte asociación entre el hallazgo del transcrito y algunas características clínicas ligadas al pronóstico de los pacientes leucémicos. Sin embargo su valor pronóstico aun es controversial, por lo que se hace necesario el estudio de la relación existente entre el tipo de transcrito expresado y las características clínicas del paciente para la determinación de la presencia o ausencia de alguna asociación significativa entre ambas variables de interés (Balatzenko et al., 2011; Bianchi et al., 1995; Inokuchi, 1991; Perego et al., 2000; Rosas et al., 2003; Shaefer et al., 1987; Shtalrid et al., 1988).

El presente estudio utilizó la técnica de RT-PCR para la determinación de la frecuencia de los distintos transcritos quiméricos del gen *BCR-ABL* (*e1a2*, *b2a2* y *b3a2*) en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LMC y LLA-B y estableció con ello su predominancia o coexpresión en la población leucémica guatemalteca.

La importancia de esta investigación fue la determinación de las frecuencias de los transcritos de *BCR-ABL* de la población guatemalteca respecto a las frecuencias reportadas en estudios realizados en diferentes regiones geográficas del mundo, los cuales demuestran diferencias entre la frecuencia de los reordenamientos de *BCR-ABL* y sus características demográficas. Esta investigación contribuyó al establecimiento de la relación existente entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia expresado asociado a sus características demográficas: género, procedencia, grupo étnico, así como el recuento plaquetario, el cual según estudios efectuados es identificado como factor de riesgo hematológico. Lo anterior permitió contribuir a la realización de la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca con esta patología (Arana et al., 2002; Emad et al. 2010; Eisenberg et al., 1988; Hermans et al., 1987; Lee et al., 1989; Melo, 1996; Paz et al., 2002).

## V. OBJETIVOS

### A. Objetivo general

Determinar la frecuencia de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* (*e1a2*, *b2a2* y *b3a2*) por medio de la técnica de RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LMC y LLA-B para ayudar a la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca.

### B. Objetivos específicos

- a. Establecer la expresión de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* (*e1a2*, *b2a2* y *b3a2*) por medio de la técnica molecular RT-PCR en pacientes con LMC y LLA-B para determinar su predominancia o coexistencia en la población leucémica del país.
- b. Establecer la relación existente entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia expresada asociados a sus características demográficas y recuento plaquetario.

## **VI. HIPOTESIS**

Por ser este un estudio de tipo descriptivo no aplica la elaboración de hipótesis en el estudio

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Población y muestras

#### 1. Población

El grupo de estudio se conformó de pacientes con LMC o LLA tipo B *BCR-ABL* positivos originarios de Guatemala referidos al Instituto de Investigación y Educación para las Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM).

#### 2. Muestra

Se tomó por conveniencia en función de la investigación, pacientes con diagnóstico de LMC o LLA-B *BCR-ABL* positivos, originarios de Guatemala referidos al Instituto de Investigación y Educación para las Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM) hasta completar la cuota de 40 pacientes. Para la selección de la muestra se realizó un tamizaje previo de pacientes con LLA-B o LMC tomando en cuenta para la investigación aquellos quienes cumplieran con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

##### a. Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico clínico de LMC o LLA tipo B de 1 a 70 años
- Aceptación de participar en la investigación mediante consentimiento informado aprobado del paciente y/o tutor
- Pacientes con hoja de datos clínica recolectada
- Pacientes que en evaluación molecular resulten cromosoma Filadelfia positivos (*Ph +*)

##### b. Criterios de exclusión

- Pacientes con un diagnóstico clínico que incluya otro tipo de leucemias diferente a LMC y LLA tipo B en el rango de edad establecido
- Negativa de participación en la investigación sin consentimiento informado aprobado

- Pacientes sin hoja de datos clínica recolectada
- Pacientes que en evaluación molecular resulten con cromosoma Filadelfia negativo (*Ph-*)
- Pacientes que cursan embarazo o lactancia

## **B. Recursos**

### **1. Recursos humanos**

#### a. Autor

- Oneida Emperatriz Morales Rodríguez

#### b. Asesoras

- Patricia Saravia, Ph.D.
- Claudia Carranza, Ph.D.

#### c. Revisores

- Margarita Paz, M.A.
- Armando Cáceres, Lic.

#### d. Colaboradores

- Mauricio Villegas, M. D.
- Silvana Torselli, M.D.
- Marta Julia López, M.D.
- Pedro Alvarado, M.D.
- Federico Antillón, M.D.

## 2. Recursos físicos

### a. Institucionales

- Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Investigación y Educación para las Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM)
- Departamento de Bioquímica, Universidad de San Carlos de Guatemala

## 3. Recursos Materiales

### a. Consentimiento informado

#### i. Materiales:

- Hoja de consentimiento informado (Anexo 1) y/o asentimiento (Anexo 2)

### b. Recolección de datos clínicos

#### i. Materiales:

- Hoja de datos clínicos (Anexo 3)
- Historial clínico del paciente

### c. Obtención de muestras de pacientes

#### i. Materiales:

- Tubo *Vacutainer*® con anticoagulante EDTA
- Aguja de biopsia de médula ósea de 0.8 mm de diámetro

### d. Extracción de linfocitos (Ficoll-Paque Premium® GE Healthcare Bio Sciences AB Bjorgatan, Sweden)

#### i. Materiales:

- Espécimen de médula ósea recolectado en tubo *Vacutainer*® con anticoagulante EDTA

- Kit para extracción de linfocitos de médula ósea Ficoll-Paque Premium® GE Healthcare Bio Sciences AB Bjorgatan , Sweden
  - Solución salina tamponada de fosfatos (PBS) 1X pH 7.4
  - Kit para conservación de muestras RNA Later® Qiagen Ambion
- ii. Equipo:
- Centrífuga *Dynac II Centrifuge Clay Adams Becton®*, *Dickinson and Company*
  - Tubo de plástico cónico de 15 ml para centrífuga Brand®
  - Microtubo plástico de 1.5 ml Life Science products , Brand®
  - Pipetas Pasteur plásticas, Brand®
  - Congelador Isotemp Fisher Scientific®
- e. Extracción de ARN partir de médula ósea (Kit de extracción de ARN RNAqueous® 4PCR Applied Biosystems, Ambion)
- i. Materiales:
- Kit de extracción de ARN RNAqueous® 4PCR Applied Biosystems, Ambion
  - Amortiguador 10X DNase (100 mM Tris /25 mM MgCl<sub>2</sub>/ 1mM CaCl<sub>2</sub>)
  - DNasa 2 U/μl
  - Reactivo inactivador de DNasa
  - Solución de lisis
  - Solución de etanol al 64%
  - Solución de lavado # 1
  - Solución de lavado #2/3
  - Solución de elución (0.1 mM EDTA)
  - H<sub>2</sub>O-DEPC (Dietilpirocarbonato, inhibidor de ribonucleasas)
  - Alcohol al 5%
  - Etanol al 98%
  - Solución inhibidora de RNasas RNase Zap® Applied Biosystems, AB(Design), Ambion

- ii. Equipo:
  - Kit de extracción de ARN RNAsqueous® 4PCR Applied Biosystems, Ambion
  - Tubos colectores plásticos RNAsa free de 1.5 ml
  - Filtro contenedor
  - Microcentrifuga minispin Eppendorf®
  - Vórtex Turbo Scientific Inc®
  - Puntas de pipetas estériles Brand®
  - Microtubos plásticos RNAsa free de 0.2 ml Life Science Products, Brand®
  - Micropipetas con volumen graduable de 10 µl y 1000 µl Eppendorf®
  
- f. RT-PCR tipo cualitativo (Kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems®)
  
- i. Materiales:
  - Kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems®
  - Amortiguador RT 10X
  - 10X RT Random Primers
  - 25X dNTPs (100 mM)
  - MultiScribe™ Reverse Transcriptase (50 U/L)
  - H<sub>2</sub>O-DEPC (Dietilpirocarbonato, inhibidor de ribonucleasas)
  
- ii. Equipo:
  - Microcentrífuga minispin Eppendorf®
  - Vórtex, VWR®
  - Puntas de pipetas estériles Brand®
  - Microtubos plásticos libres de RNAsa de 0.2 ml Life Scientis Products, Brand®
  - Micropipetas con volumen graduable de 10 µl y 100 µl Eppendorf®
  - Termociclador Mastercycle gradient Eppendorf®

- g. PCR para la detección del control interno gen *ABL-1* tipo cualitativo (Kit de PCR Novagen®)
- i. Materiales:
- Kit de PCR Novagen®
  - Amortiguador 10X
  - dNTPs (10 mM)
  - Taq Gold (5 U/μl) NovaTaq Hot Start™ DNA Polymerase
  - MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
  - H<sub>2</sub>O-DEPC (Dietilpirocarbonato, inhibidor de ribonucleasas)
  - Inhibidor de ADNasa DNA Away® Molecular BioProducts, Inc.(MBP®)
  - Alcohol al 5%
  - Etanol al 98%
  - Cebadores Sigma-Aldrich™

Tabla 6. **Secuencia de cebadores control interno gen *ABL-1***

Cebador	Secuencia
ABL-F	5'-TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G-3'
ABL-R	5'-TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT-3'

**Fuente:** Artigas, C., Melo, A., Roa, J., Páez, E. Vittini, C., Arriagada, M. et al., (2002). Detección de secuencias del gen *BCR-ABL* mediante RT-PCR en pacientes con leucemia en la IX Región: Chile. Revista Médica de Chile, 130(6), 623-630.

- Gel de Agarosa, Promega®
  - Solución de TAE 10X (Tris base-ácido acético glacial-EDTA)
  - Solucion de Carga Loading buffer 6X Novagen®
  - Escalera de 100 pb Perfect DNA Novagen®
- ii. Equipo:
- Microcentrífuga minispin Eppendorf®
  - Vórtex VWR®
  - Espátula

- Puntas de pipetas estériles Brand®
  - Microtubos plásticos RNAsa free de 0.5 y 1.5 ml Life Science Products, Brand®
  - Micropipetas con volumen graduable de 1µl y 10 µl Eppendorf®
  - Termociclador Mastercycle gradient Eppendorf®
  - Transiluminador Benchtop UVP®, BioDoc-It 210
- h. PCR para la detección de la traslocación *BCR-ABL* tipo cualitativo (Kit de PCR Novagen®)
- i. Materiales:
- Kit de PCR Novagen®
  - Amortiguador 10X
  - dNTPs (10 mM)
  - Taq Gold (5 U/µl) NovaTaq Hot Start™ DNA Polymerase
  - MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
  - H<sub>2</sub>O-DEPC (Dietilpirocarbonato, inhibidor de ribonucleasas)
  - DNA Away® Molecular BioProducts, Inc.(MBP®)
  - Alcohol al 5%
  - Etanol al 98%
  - Cebadores (Integrated DNA Technologies -IDT-)

Tabla 7. **Secuencia de cebadores traslocación *BCR-ABL***

Cebadores	Secuencia
CML-C	5'- GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C-3'
CML-D	5'- TGA TTA TAG CCT AAG ACC CGG A-3'
ALL-C	5'- ACC ATC GTG GGC GTC CGC AAG A-3'
CML-A	5'-TGG AGC TGC AGA TGC TGA CCA ACT CG-3'
CML-B	5'-ATC TCC ACT GGC CAC AAA ATC ATA CA-3'
ALL-A	5'- AGA TCT GGC CCA ACG ATG GCG AGG GC-3'

**Fuente:** Edmans, Kirk, Lee & Radich, 1994; Lee, Kirk, Edmans & Radich, 1995; Cerveira, Ferreira, Dória, Veiga, Ferreira, Mariz et al., 2000)

- Gel de Agarosa, Promega®
  - Solución de TAE 10X (Tris base-ácido acético glacial-EDTA)
  - Solucion de Carga Loading buffer 6X Novagen®
  - Escalera de 100 pb Perfect DNA Novagen®
- ii. Equipo:
- Microcentrífuga minispin Eppendorf®
  - Vórtex VWR®
  - Espátula
  - Puntas de pipetas estériles Brand®
  - Microtubos plásticos libres de RNAsa de 0.5 y 1.5 ml Eppendorf®
  - Micropipetas con volumen graduable de 10 µl y 100 µl Eppendorf®
  - Termociclador Mastercycle gradient eppendorf®
  - Transiluminador Benchtop UVP®, BioDoc-It 210

### **C. Metodología**

1. Consentimiento informado
  - a. Metodología:
    - i. Se explicó a los participantes el objetivo, ventajas y/o desventajas de la investigación.
    - ii. Se solicitó mediante un consentimiento escrito informado la aceptación expresa de los pacientes de participar en el estudio y proporcionar los datos necesarios para su ejecución.
    - iii. En caso de menores de edad (menores de 18 años) , el tutor responsable del paciente firmó la hoja de asentimiento para poder participar en el estudio.
2. Recolección de datos clínicos
  - a. Metodología:
    - i. Se recolectaron los datos de importancia en la boleta de recolección de datos (Anexo 3) a partir del expediente clínico del paciente tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión evaluados anteriormente. El instrumento de recolección de datos se encontró

conformado de tres secciones, siendo estas: identificación del paciente, datos demográficos (edad, género y procedencia), así como información clínica que abarca factores de riesgo hematológico (recuento plaquetario) y tipo de leucemia, los cuales se utilizaron posteriormente para efectuar la estadística descriptiva del estudio.

3. Obtención de muestras de pacientes
  - a. Metodología:
    - i. Recolectar mediante punción aspirativa 3 cm<sup>3</sup> de sangre medular con aguja de 0.8 mm de diámetro, empleando técnica aséptica en cresta ilíaca posterosuperior o en esternón.
    - ii. Colocar muestra de médula ósea en tubos Vacutainer® con EDTA (mantener a 4° C hasta su traslado al laboratorio de referencia) y mezclar por inversión suave.
    - iii. El tiempo transcurrido desde la extracción de las muestras hasta su procesamiento en el laboratorio no debe ser superior a un día.
  
4. Extracción de linfocitos (Ficoll-Paque Premium®, GE Healthcare Bio Sciences AB Bjorgatan, Sweden)
  - a. Metodología:
    - i. En otro tubo de plástico cónico de 15 ml para centrifuga colocar 2 ml de PBS 1X y transferir 2 ml de sangre de médula ósea con anticoagulante EDTA.
    - ii. Mezclar por inversión hasta homogenizar la suspensión.
    - iii. Preparar tubo de plástico cónico de 15 ml para centrifuga con 3 ml de Ficoll-Paque Premium®.
    - iv. Agregar la suspensión con Ficoll-Paque Premium® al tubo de plástico cónico de 15 ml para centrifuga deslizándola lentamente por las paredes del tubo.
    - v. Sin mezclar, centrifugar a 2,400 rpm. durante 35 minutos a temperatura ambiente.
    - vi. Eliminar el sobrenadante con ayuda de una pipeta Pasteur hasta la zona opaca que contiene las células mononucleares (Anexo 4).
    - vii. Transferir con cuidado la zona opaca de células mononucleares a un microtubo plástico de 1.5 ml limpio.
    - viii. En caso de no procesar la muestra de forma inmediata añadir 1000 µl de RNA later® por cada 100 µl de muestra obtenida.

- ix. Mezclar por inversión suave y almacenar a  $-20^{\circ}$  C hasta su utilización.
  
5. Extracción de ARN a partir de médula ósea (Kit de extracción de ARN RNAqueous® 4PCR Applied Biosystems, Ambion)
  - a. Metodología:
    - i. Efectuar descontaminación de superficies, materiales y equipo a utilizar con alcohol al 5% seguido de etanol al 98% y posteriormente RNaseZap®.
    - ii. Centrifugar a 13,400 rpm por 5 minutos y remover todo el sobrenadante de la suspensión anterior por aspiración lenta.
    - iii. Adicionar de 100-500  $\mu$ l de solución de lisis. Tomando en cuenta las siguientes consideraciones:
      - Mínimo 100  $\mu$ l para 100 y 1000 células,
      - 200  $\mu$ l para 10,000 células,
      - 300  $\mu$ l para 100,000 células y
      - 400  $\mu$ l para 1,000,000 células
      - Máximo 500  $\mu$ l para  $1 \times 10^7$  células
    - iv. Agitar vigorosamente en un vórtex para lisar células hasta que el lisado este homogéneo.

NOTA: sólo si la muestra es cercana a  $1 \times 10^7$  células hay que centrifugar 3 minutos a 13,400 rpm. para lograr completa homogenización.

- v. Añadir igual volumen de etanol 64% al lisado y mezclar por vórtex.
- vi. Colocar filtro contenedor en el tubo colector y añadir la mezcla de lisado con etanol al 64%.

NOTA: agregar un máximo de 700 $\mu$ l de volumen de la suspensión al filtro

- vii. Centrifugar de 13,400 rpm. por 1 minuto o hasta que la mezcla haya pasado por el filtro.
- viii. Descartar el líquido que quede en el tubo de colección y reutilizar tubo para pasos de lavado.

NOTA: si volumen es mayor a 700  $\mu$ l, entonces utilizar mismo filtro y tubo de colección para colectar en el filtro el resto de lisado.

- ix. Aplicar 700  $\mu$ l de solución de lavado #1 al filtro.
  - x. Centrifugar a 13,400 rpm por 30 segundos o hasta que la mezcla haya pasado por el filtro.
  - xi. Descartar líquido en tubo de colección.
  - xii. Añadir 500 $\mu$ l de solución de lavado #2/3.
  - xiii. Centrifugar a 13,400 rpm. por 30 segundos hasta que la mezcla haya pasado por el filtro.
  - xiv. Descartar líquido en tubo de colección.
  - xv. Repetir paso 12-13, pero centrifugar 1 minuto.
  - xvi. Centrifugar hasta que no quede solución de lavado (realizando minispining).
  - xvii. Poner filtro en nuevo tubo de colección.
  - xviii. Pipetear 40  $\mu$ l de la solución de elución (75°C) en el centro del filtro.
  - xix. Centrifugar 30 segundos a 13,400 rpm.
  - xx. Añadir 10  $\mu$ l de solución de elución (75°C) en centro del filtro.
  - xxi. Centrifugar 1 min a máxima velocidad.
  - xxii. NO tirar eluido, ya que esta mezcla contiene ARN.
  - xxiii. Añadir 0.1 volumen de buffer ADNasa 10X al eluido y mezclar en vórtex
  - xxiv. Añadir 1  $\mu$ l de ADNasa por cada 100  $\mu$ l de ARN eluido o menor cantidad.
  - xxv. Incubar por 25 minutos a 37 °C.
  - xxvi. Para eliminar la actividad de la ADNasa, agregar 0.1 volumen del reactivo de inactivación del ADNasa.
  - xxvii. Mezclar e incubar 2 minutos a temperatura ambiente.
  - xxviii. Centrifugar el tubo a 13,400 rpm. por 1 minuto.
  - xxix. Pasar sobrenadante a un tubo 0.2 ml libre de ADNasa.
6. RT-PCR tipo cualitativo (Kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit ®, Applied Biosystems)
- a. Metodología:
    - i. Colocar los componentes para que se descongelen en hielo.
    - ii. Preparar master mix 2X
    - iii. Mezclar master mix y colocar en hielo.

Cuadro 1. **Receta para RT-PCR**

<b>Reactivos</b>	<b>1X</b>	<b>2X</b>
Amortiguador 10X RT	2	4
25X dNTP mix (100 mM)	0.8	1.6
10X RT Random Primers	2.0	4
MultiScribe™ Transcriptasa reversa (50 U/L) ♣	1.0	2
H <sub>2</sub> O-DEPC	4.2	8.4
Muestra ARN *	10	20
<b>Volumen total por reacción</b>	<b>20 µl</b>	<b>40 µl</b>

♣ Debe mantenerse en hielo hasta su utilización

\* La muestra de ARN se adicionara posteriormente

NOTA: es importante calcular un exceso de master mix para el volumen que se pierde por las transferencias

- iv. Adicionar los 20 µl de muestra de ARN a cada microtubo.
- v. Pipetear 20 µl de master mix por cada uno de los microtubos a utilizar.
- vi. Tapar bien los tubos y dar un minispin a los microtubos.
- vii. Colocar los microtubos en hielo antes de colocarlos en el termociclador.
- viii. Preparar termociclador Mastercycle gradient Eppendorf® con los parámetros siguientes:

Cuadro 2. **Programa de PCR para RT-PCR**

<b>Procesos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Paso 1	25 °C	10 minutos
Paso 2	37 °C	2 horas
Paso 3	85 °C	5 minutos
Paso 4	4 °C	1 minuto

7. PCR para la detección del control interno gen *ABL-1* tipo cualitativo (Kit de PCR Novagen®)
  - a. Metodología:
    - i. Efectuar descontaminación de superficies, materiales y equipo a utilizar con alcohol al 5% seguido de etanol al 98% y posteriormente con DNA Away® Molecular BioProducts, Inc. (MBP®)
    - ii. Colocar los componentes para que se descongelen en hielo.
    - iii. Preparar master mix 1X

Cuadro 3. Receta para determinación del control interno gen *ABL-1*

Reactivos	Ci	Cf	1X
H <sub>2</sub> O-DEPC	-----	----	6.9
Amortiguador 10X	10X	1X	1.25
dNTP mix (10 mM)	2.5 mM	0.2 mM	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	25 mM	2.5 mM	1.25
PF	5 μM	0.2 μM	0.5
PR	5 μM	0.2 μM	0.5
Taq Gold (5U/μL)♣	5U/μL	0.5 U	0.1
ADNc	-----	-----	1
<b>Volumen total por reacción</b>			<b>12.5 μl</b>

♣ Debe mantenerse en hielo hasta su utilización

NOTA: es importante calcular un exceso de master mix para el volumen que se pierde por las transferencias.

- iv. Mezclar master mix y colocar en hielo.
- v. Preparar termociclador (Mastercycle gradient Eppendorf®) con los parámetros siguientes:

Cuadro 4. Programa de PCR para control interno gen *ABL-1*

Procesos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	9 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
Hibridación	60.5 °C	1 minuto	30
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión Final	72 °C	5 minutos	1

- vi. Colocar en termociclador e iniciar ciclos de incubación.
- vii. Preparar gel de agarosa al 1.5%.
- viii. Mezclar 8 ml del producto de PCR con 1 µl de solución de carga (Load Dye)
- ix. Correr en gel de agarosa al 1.5% en solución TAE 10X de forma paralela a un marcador de 100 bp (pares de bases) por 1 hora a 85 V (Voltios).
- x. Visualizar gel en transiluminador y tomar fotografía de la corrida.
- xi. Se evaluarán los resultados según los siguientes hallazgos:

Tabla 8. Productos de PCR del control interno gen *ABL-1*

Producto	Hallazgo
ADNg	~800pb
ADNc	~270pb

En donde el producto de interés corresponde al ADNc

**Fuente:** Artigas, C., Melo, A., Roa, J., Páez, E. Vittini, C., Arriagada, M. et al., (2002). Detección de secuencias del gen *BCR-ABL* mediante RT-PCR en pacientes con leucemia en la IX Región: Chile. Revista Médica de Chile, 130(6), 623-630.

8. PCR para la detección de la traslocación *BCR-ABL* tipo cualitativo (Kit de PCR Novagen®)
  - a. Metodología:
    - i. Efectuar descontaminación de superficies, materiales y equipo a utilizar con alcohol al 5% seguido de etanol al 98% y posteriormente con DNA Away® Molecular BioProducts, Inc. (MBP®)
    - ii. Colocar los componentes para que se descongelen en hielo.

- iii. Preparar master mix 1X

**Cuadro 5. Receta de la primera fase de PCR para determinación de translocación  
*BCR-ABL***

<b>Reactivos</b>	<b>Ci</b>	<b>Cf</b>	<b>1X</b>
H <sub>2</sub> O-DEPC	-----	----	14.3
10X Buffer	10X	1X	2.5
dNTP mix (10 mM)	2.5 mM	1 mM	1
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	25 mM	0.1 mM	1
CML-C	5 μM	0.3 μM	1.5
CML-D	5 μM	0.4 μM	2
ALL-C	5 μM	0.1 μM	0.5
Taq Gold (5 U/μL)♣	5U/μL	1 U	0.2
ADN	-----	-----	2
<b>Volumen total por reacción</b>			<b>25 μl</b>

♣ Debe mantenerse en hielo hasta su utilización

NOTA: es importante calcular un exceso de master mix para el volumen que se pierde por las transferencias.

- xii. Mezclar master mix y colocar en hielo.  
xiii. Preparar termociclador Mastercycle gradient Eppendorf® con los parámetros siguientes:

**Cuadro 6. Programa de la primera fase de PCR para determinación de translocación  
*BCR-ABL***

<b>Procesos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización Inicial	94 °C	6 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
Hibridación	60 °C	1 minuto	30
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión Final	72 °C	5 minutos	1

- xiv. Colocar en termociclador e iniciar ciclos de incubación.
- xv. De la muestra obtenida en la primera fase efectuar dilución 1:100 tomando 25  $\mu\text{L}$  de muestra de la primera fase y 24.75  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O-DEPC}$ .
- xvi. Iniciar segunda reacción de PCR, preparando master mix 1X siguiente:

Cuadro 7. Receta de la segunda fase de PCR para la determinación de translocación

***BCR-ABL***

Reactivos	Ci	Cf	1X
$\text{H}_2\text{O-DEPC}$	-----	----	10.75
10X Buffer	10X	1X	2.5
dNTP mix (10 mM)	2.5 mM	1.35 mM	1.35
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	25 mM	0.15 mM	1.5
CML-A	5 $\mu\text{M}$	0.5 $\mu\text{M}$	2.5
CML-B	5 $\mu\text{M}$	0.67 $\mu\text{M}$	3.35
ALL-A	5 $\mu\text{M}$	0.17 $\mu\text{M}$	0.85
Taq Gold (5 U/ $\mu\text{L}$ )♣	5U/ $\mu\text{L}$	1 U	0.2
ADN	-----	-----	2
<b>Volumen total por reacción</b>			<b>25 <math>\mu\text{l}</math></b>

♣ Debe mantenerse en hielo hasta su utilización

NOTA: es importante calcular un exceso de master mix para el volumen que se pierde por las transferencias.

- xvii. Mezclar master mix y colocar en hielo.
- xviii. Preparar termociclador Mastercycle gradient Eppendorf® con los parámetros siguientes:

Cuadro 8. Programa de la segunda fase de PCR para la determinación de translocación

***BCR-ABL***

Procesos	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización Inicial	95 °C	5 minutos	1
Desnaturalización	94 °C	30 segundos	
Hibridación	55 °C	1 minuto	30
Extensión	72 °C	1 minuto	
Extensión Final	72 °C	7 minutos	1

- xix. Preparar gel de agarosa al 2%.
- xx. Mezclar 8 µl del producto de PCR con 1 µl de solución de carga (Load Dye)
- xxi. Correr en gel de agarosa al 1.5% en solución TAE 10X de forma paralela a un marcador de 100bp (pares de bases) por 1 hora a 85V (Voltios).
- xxii. Visualizar gel en transiluminador y tomar fotografía de la corrida
- xxiii. Se evaluarán los resultados según los siguientes hallazgos:

Tabla 9. **Productos de PCR de la translocación *BCR-ABL***

<b>Traslocación</b>	<b>Transcrito</b>	<b>Peso molecular (bp)</b>
t(9;22)	p210 (b3:a2)	304
	p210 (b2:a2)	234
	p190 (e1:a2)	196

**Fuente:** Cerveira, Ferreira, Dória, Veiga, Mariz et al., 2000

Figura 7. **Productos de reacción de RT-PCR para la determinación de los transcritos de *BCR-ABL***

**Fuente:** Datos experimentales

## **D. Diseño de investigación**

### **1. Tipo de estudio**

- Descriptivo de corte transversal

### **2. Tipo de Muestreo**

- No probabilístico, por conveniencia.

Se seleccionó por conveniencia en función de la investigación pacientes con diagnóstico de LMC o LLA-B *BCR-ABL* positivos, originarios de Guatemala referidos a INVEGEM hasta completar la cuota de 40 pacientes. La selección de pacientes se efectuó en dos fases. En la fase primaria se delimitó el universo de trabajo seleccionando pacientes con LMC o LLA-B que por técnicas moleculares resultaran ser *BCR-ABL* positivos. La fase secundaria comprendió la selección de la muestra para la investigación, tomando en cuenta los criterios de inclusión y exclusión presentados en el estudio.

### **3. Análisis de datos**

El análisis se realizó de forma descriptiva. Todas las variables clínico demográficas del estudio se clasificaron en variables cualitativas (aquellas a las que se les expresa un valor que no es cantidad) y cuantitativas (aquellas a las que pueden medirse numéricamente). Al término de la fase de captura de datos, los mismos fueron ingresados y analizados por el software de gestión estadística *SPSS versión 14.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para su análisis bajo un enfoque simple univariado para las cuales se determinó la frecuencia, porcentajes y cruce de variables de interés haciendo uso de tablas de contingencia (como género, grupo étnico, procedencia y recuento plaquetario) en base al tipo de leucemia y tipo de transcrito patológico expresado. Se determinó la relación entre variables de interés empleando la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* y se efectuaron comparaciones pareadas con la prueba de *Mann Whitney* para establecer la significancia estadística entre ambas. Resultados con un  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## VIII. RESULTADOS

La determinación de los transcritos de fusión del gen quimérico *BCR-ABL* en muestras de médula ósea de pacientes con LMC y LLA-B analizadas por la técnica de RT-PCR permitió la detección y diferenciación de los transcritos *b3a2* (304 pb), *b2a2* (234 pb) y *e1a2* (190 pb) (Figura 7). La frecuencia de expresión del gen quimérico *BCR-ABL* en 35 muestras de médula ósea es de 10 (29%) en pacientes con LLA-B y de 25 (71%) en pacientes con LMC, mientras que la frecuencia de expresión de los diferentes transcritos de fusión en ambos tipos de leucemia es de 4 (11%) para la expresión de *e1a2*, 15 (43%) para *b2a2* y 15 (43%) para *b3a2*, con una frecuencia de coexpresión representada por el transcrito *b2a2/b3a2* en uno de los casos (3%) (Anexo 5).

De los 40 pacientes reclutados en el presente estudio, cinco fueron eliminados debido a que los pacientes se encontraban en farmacoterapia con mesilato de imatinib (inhibidor de la expresión del gen de *BCR-ABL*) al momento de la toma de muestra, lo cual afectó la sensibilidad del PCR cualitativo para la detección de los transcritos del gen *BCR-ABL* imposibilitando el establecimiento de la frecuencia del tipo de transcrito debido a las metodología empleada.

Se estableció la relación entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia asociada a sus características demográficas y recuento plaquetario, encontrando como principales características en la población de estudio las descritas a continuación.

La relación LMC/LLA fue de 2.5:1 (25 pacientes con LMC y 10 con LLA-B) respecto a la expresión del gen quimérico *BCR-ABL*. En cuanto al tipo de leucemia se encontró predominio del transcrito de fusión *e1a2* en muestras con LLA-B contrario a las muestras con LMC las cuales presentan mayor heterogeneidad expresándose con mayor frecuencia los transcritos *b2a2* (31%) y *b3a2* (37.3%) (Cuadro 9).

La distribución de la frecuencia en base al género demuestra una relación masculino/femenino de 1.9:1 (23 hombres y 12 mujeres), observándose predominancia del género masculino respecto al femenino en la expresión del gen quimérico *BCR-ABL*. No se observó diferencia significativa ( $p=0.612$ ) en la expresión del tipo de transcrito respecto a la variable de género (Cuadro 9 y Anexo 5)

Cuadro 9. Frecuencia de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* en base al género en pacientes con LLA y LMC por RT-PCR

Parámetro	LLA		LMC		Total de Casos
	<i>n</i> * (M/F)	M/F %	<i>n</i> * (M/F)	M/F %	
<i>e1a2</i>	4 (2/2)	5.5/5.5	0 (0/0)	0/0	4 (11%)
<i>b2a2</i>	4 (4/0)	12/0	11 (5/6)	14/17	15 (43%)
<i>b3a2</i>	2 (1/1)	2.9/2.9	13(10/3)	28.7/8.6	15 (43%)
<i>b2a2/b3a2</i>	0 (0/0)	0/0	1 (1/0)	3/0	1 (3%)
<b>Total</b>	10 (7/3)	20.4/8.4	25(16/9)	45.7/25.6	35 (100%)

\* =Numero de Casos, M= Masculino, F = Femenino

Fuente: Datos experimentales

El promedio de edad es de  $14 \pm 15.83$  años para LLA y de  $40 \pm 18.05$  años para LMC con una media global que corresponde a  $33 \pm 21.05$  años. Respecto al tipo de transcrito es posible observar una diferencia significativa ( $p=0.022$ ) en la expresión del gen quimérico de *BCR-ABL* en relación al grupo etario, mostrando un incremento en la incidencia del transcrito *e1a2* en pacientes menores de 18 años ( $7 \pm 0.82$  años), contraria a pacientes que exhiben el transcrito *b2a2* ( $40 \pm 24.24$  años), *b3a2* ( $32 \pm 15.46$ ) y la coexpresión de *b2a2/b3a2*, los cuales muestran un pico de incidencia en el grupo etáreo de los 30 a los 40 años (Gráficas 1 y 2).

Gráfica 1. Pirámide poblacional de pacientes positivos para el gen quimérico *BCR-ABL*

Fuente: Datos experimentales

Gráfica 2. Distribución del grupo etario en base al tipo de transcrito de *BCR-ABL* en pacientes con LLA y LMC

Fuente: Datos experimentales

La distribución del recuento plaquetario demuestra una diferencia significativa según el tipo de transcrito patológico expresado ( $p= 0.012$ ). Se encontraron recuentos plaquetarios por debajo del recuento normal (150,000-400,000 cel/mm<sup>3</sup>) para el transcrito *e1a2* (8,895±6,641 cel/mm<sup>3</sup>) en relación a los transcritos *b2a2* (199,806±163,437 cel/mm<sup>3</sup>) y *b3a2* (16,2267±91,257 cel/mm<sup>3</sup>) los cuales se encuentran dentro del rango de normalidad (Almaguer, 2003). Así mismo se establecieron comparaciones pareadas entre ambos tipos de transcritos no encontrando diferencias significativas entre *b2a2* y *b3a2* ( $p=0.604$ ), a diferencia de las comparaciones realizadas entre *e1a2* y *b2a2* ( $p=0.009$ ) o *e1a2* y *b3a2* ( $p=0.004$ ) los cuales presentan una diferencia estadísticamente significativa (Anexo 5). Se detectaron recuentos plaquetarios elevados en LMC en comparación a los recuentos detectados en LLA-B, cuyos recuentos se encuentran por debajo del límite inferior normal (Gráfica 3).

Referente al paciente con LMC que presentó coexpresión de los transcritos *b2a2/b3a2*, la cuenta plaquetaria se encontró por encima del rango normal (1,108,000 cel/mm<sup>3</sup>) y el porcentaje de leucocitos fue de 32,900 cel/mm<sup>3</sup> con 10.7 g/dl de hemoglobina (Anexo 5).

**Gráfica 3. Distribución del recuento plaquetario en base al tipo de transcrito de *BCR-ABL* y tipo de leucemia expresado**

----- Limite superior e inferior normal (150,000-400,000/mm<sup>3</sup>)

**Fuente:** Datos experimentales

En relación a la distribución de *BCR-ABL* respecto a las regiones geográficas metropolitana, norte, nororiente, suroriente, central, suroccidental, noroccidental y Petén se observó que la zona suroccidental presenta la mayor frecuencia de expresión en ambos tipos de leucemia (LLA-B =40% y para LMC=24%) seguida de la región metropolitana con una frecuencia que corresponde al 10% en LLA-B y del 28% en LMC (Gráfica 4).

Para la LLA-B el transcrito *b2a2* y *e1a2* representan la mayoría de casos evaluados perteneciendo a las regiones nor y suroccidentales, no encontrando ningún caso de estudio en las regiones norte, nororiente, suroriente y Petén. Por el contrario para las LMC el transcrito *b2a3* y *b3a2* representan la totalidad de los casos como se mencionaba anteriormente predominando su expresión en la región metropolitana y suroccidental sin ningún hallazgo en la región nororiental y con una baja frecuencia en las demás regiones geográficas de Guatemala (Gráfica 5 y 6).

**Gráfica 4. Porcentaje de expresión del gen quimérico *BCR-ABL* en pacientes con LLA y LMC por región geográfica de Guatemala**

**Fuente:** Datos experimentales

**Gráfica 5. Frecuencia de los distintos tipos de transcritos de *BCR-ABL* en pacientes con LLA en relación a la región geográfica de Guatemala**

**Fuente:** Datos experimentales

**Gráfica 6. Frecuencia de los distintos tipos de transcritos de *BCR-ABL* en pacientes con LMC en relación a la región geográfica de Guatemala**

**Fuente:** Datos experimentales

## **IX. DISCUSION DE RESULTADOS**

Existe una fuerte relación entre el tipo de transcrito de fusión del gen *BCR-ABL* y el fenotipo de leucemia. El transcrito *e1a2* que transcribe una proteína de 190kD ( $p190^{BCR-ABL}$ ) es característico de pacientes con LLA-B, mientras que los transcritos *b3a2* y/o *b2a2* que codifican

para una proteína de 210kD (p210<sup>BCR-ABL</sup>) son considerados marcadores genéticos de la LMC (van Rhee et al., 1996).

El presente estudio permitió establecer en la población leucémica guatemalteca la predominancia del transcrito *e1a2* en pacientes con LLA-B y de *b2a2* o *b3a2*, así como su coexpresión (*b2a2/b3a2*) en pacientes con LMC.

De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó la frecuencia de expresión del gen quimérico *BCR-ABL* es de 10 (29%) en pacientes con LLA-B y de 25 (71%) en pacientes con LMC, mientras que la frecuencia de expresión de los distintos transcritos en ambos tipos de leucemia presentan una baja frecuencia en la expresión del transcrito *e1a2* (11%) respecto a la frecuencia de expresión de los transcritos *b2a2* (43%) y *b3a2* (43%).

La coexpresión de ambos transcritos *b2a2* y *b3a2* es detectable únicamente en un porcentaje minoritario de pacientes leucémicos, siendo reportados en otros estudios del 1.4% al 11% de la población leucémica (Henegariu et al., 1997). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la presente investigación, en la cual la frecuencia de coexpresión de *b2a2/b3a2* fue del 3%.

No se reporto ningún caso de coexpresión entre p190 (*e1a2*) y p210 (*b2a2* y *b3a2*). No obstante, otros estudios demuestran que p190 no esta restringida únicamente a pacientes con LLA y existen reportes de pacientes con LMC en crisis blástica en los cuales se reporta la coexpresión de p190 y p210 en mas del 70% de los casos, la cual se explica debido a la presencia de múltiples líneas celulares con diferente expresión de los transcritos de fusión del gen *BCR-ABL* y/o debido al mecanismo de corte y empalme alternativo durante su formación transcripcional (Adler et al., 2009; Balatzenko et al., 2001; van Rhee et al., 1996; Lichty, Keating, Callum, Yee, Croxford et al., 1998; Perego et al., 2000).

La distribución de la frecuencia de *BCR-ABL* respecto a la variable de género muestra un mayor grado de expresión en el género masculino sin diferencia significativa ( $P=0.612$ ) respecto al tipo de transcrito. Referente al grupo etáreo se observa una tendencia poblacional que muestra dos picos de incidencia, los cuales corresponden de los 30 a 40 años en pacientes con LMC que expresan los transcritos *b2a2* y *b3a2* y de los 5 a los 10 años en pacientes con LLA-B que expresan

el transcrito *e1a2*. Estas características demográficas se presentan acorde al fenotipo de leucemia que se exhibe y son similares a resultados obtenidos en otros estudios (van Rhee et al., 1996).

Es importante establecer la relación existente entre la expresión del tipo de transcrito del gen quimérico *BCR-ABL* y la actividad trombopoyética, debido a que el incremento de la actividad plaquetaria influye en el curso de la enfermedad y se asocia clínicamente a una menor sobrevida. Así mismo se ha encontrado que la expresión de los transcritos *b3a2* y *b2a2* presentan un comportamiento biológico diferente producto de la generación de sus puntos de rotura (Mills et al., 1991; Dobrovic et al., 1990). El análisis de la relación existente entre la frecuencia de expresión de los transcritos patológicos del gen quimérico *BCR-ABL* y los recuentos plaquetarios demostró una diferencia significativa ( $p= 0.012$ ). Según lo esperado, se encontró que los recuentos plaquetarios con LMC son más altos en comparación con recuentos de pacientes con LLA-B.

La expresión del transcrito *e1a2* se encuentra relacionada a una actividad trombopoyética apreciablemente menor ( $8895\pm 6641$  cel/mm<sup>3</sup>) respecto al rango normal esperado, mientras que la expresión del transcrito *b2a2* se encontró asociada a valores superiores ( $199806\pm 163437$  cel/mm<sup>3</sup>) con respecto al rango normal (150,000-400,000 cel/mm<sup>3</sup>) (Almaguer, 2003). Los datos reportados difieren de aquellos obtenidos en otros estudios, en los cuales pacientes con el transcrito *b3a2* poseen conteos plaquetarios elevados en comparación con los presentados por pacientes con *b2a2* (Balatzenko et al., 2011; Bianchi et al., 1995; de Lemos et al., 2005; Martita et al., 1989; Perego et al., 2000). Sin embargo, otros estudios no establecen una relación significativa entre el recuento plaquetario y el tipo de transcrito patológico del gen quimérico *BCR-ABL* (Shepherd et al., 1992; Rozman et al., 1995)

Una de las razones por las cuales podría explicarse la diferencia entre los resultados obtenidos en esta investigación respecto a otros estudios efectuados, es la selección de la muestra. En el presente estudio el tamaño de la población leucémica guatemalteca con esta patología es poco significativo en comparación a estudios efectuados en otros países, los cuales poseen muestras poblacionales estadísticamente representativas. Esto les permitió la utilización de pruebas estadísticas más robustas para establecer la relación causal entre el tipo de transcrito patológico expresado y el incremento de la actividad trombopoyética.

Al igual que otros estudios efectuados no existe diferencia significativa entre el tipo de transcrito y el nivel de hemoglobina ( $p=0.135$ ) (Opalka et al., 1992; Perego et al., 2000; Rozman et al., 1995; Shepherd et al., 1992). Sin embargo, los valores obtenidos se encuentran por debajo del recuento de normalidad hemoglobínica establecida tanto para hombres como para mujeres (12 a 16 g/d para el género femenino y de 14 a 18 g/dl en el masculino) (Almaguer, 2003). Se ha observado que la disminución del recuento de hemoglobina en pacientes leucémicos se debe al incremento descontrolado de células sanguíneas inmaduras que originan descensos en los recuentos de las líneas celulares hematopoyéticas encargadas de la producción de células maduras, siendo esta la posible explicación de la anemia encontrada en los pacientes leucémicos evaluados (Benjamin et al., 2004).

No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de expresión de los diferentes transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y su hallazgo en las diversas regiones geográficas de Guatemala (metropolitana, norte, nororiente, suroriente, central, suroccidental, noroccidental y Petén) ( $p=0.798$ ). Sin embargo se observó que la región suroccidental presenta la mayor frecuencia de aparición en ambos tipos de leucemia (LLA-B= 40% y para LMC= 24%) seguida de la región metropolitana (LLA-B= 10% y en LMC= 28%).

Estudios efectuados en diferentes regiones geográficas establecen diferencias significativas entre la frecuencia de expresión de los reordenamientos del gen quimérico *BCR-ABL*. Se han reportado diferentes porcentajes de expresión de las frecuencias de *b3a2* en comparación con *b2a2* en diversos estudios realizados en pacientes con LMC. Según lo reportado en estos estudios, la distribución de la frecuencia del tipo de transcrito patológico expresado de *BCR-ABL* en poblaciones occidentales es del 40% para la expresión de *b2a2* y del 60% para la expresión de *b3a2*, con una coexpresión de *b2a2/b3a2* del 5% al 10%. Así mismo, estudios efectuados en poblaciones orientales revelan frecuencias de expresión del 60% para *b3a2* y del 30% para *b2a2*, con una coexpresión de *b2a2/b3a2* del 2% al 5%, observándose diferencias significativas en la expresión de *b3a2* respecto a *b2a2* en ambos grupos poblacionales (Tabla 2) y un incremento de la frecuencia de la expresión de *b3a2* respecto a la frecuencia de expresión de *b2a2*. Comparativamente podemos observar que la población leucémica guatemalteca con esta patología no presenta diferencias entre la frecuencia de expresión de los transcritos *b2a2* con respecto a *b3a2* (Cuadro 9 y 10).

Se detectó que la frecuencia de expresión de los transcritos patológicos de *BCR-ABL* en la población leucémica guatemalteca concuerda a la reportada en países latinoamericanos como México (Arana et al., 2002; Rosas et al., 2003; Meza et al., 2007; Ruiz-Arguelles et al., 2004), para los cuales la distribución de la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* se encuentra en el rango de 40% al 50% tanto para la expresión de *b2a2* como para *b3a2* y con una coexpresión de *b2a2/b3a2* del 5% al 10% (Tabla 2). No obstante existen diferencias en la frecuencia de expresión con otros reportes tales como los obtenidos en Ecuador, donde la frecuencia reportada para el transcrito *b2a2* es del 95% mientras que se detecta un 5% para el transcrito *b3a2* (Paz et al., 2002).

Se encontró que estudios efectuados en diferentes regiones geográficas del mundo en pacientes con LLA-B coinciden con la frecuencia reportada en la población leucémica guatemalteca con esta patología detectándose en el 100% de pacientes con LLA-B la expresión del transcrito patológico *e1a2* (Paz et al., 2002; Melo, 1996; Hermans et al., 1987).

El presente estudio permitió la determinación de la frecuencia de los distintos transcritos del gen quimérico *BCR-ABL*, encontrándose que la población guatemalteca con esta patología manifiesta una expresión similar a la encontrada en poblaciones latinoamericanas (*b2a2* y *b3a2*= 40-50%) la cual difiere a las reportadas en poblaciones occidentales y orientales (caucásicos y asiáticos) debido a que en dichos estudios se reporta frecuentemente una diferencia significativa entre la frecuencia de expresión de *b2a2* comparado con la expresión de *b3a2* en pacientes con LMC. Así mismo, dichos estudios reportan que la frecuencia de la expresión de *b3a2* es apreciablemente mayor respecto a la frecuencia de expresión del transcrito *b2a2*. Esto sugiere que la población leucémica guatemalteca con esta patología presenta una conducta biológica diferente a las poblaciones asiáticas y caucásicas producto de la variabilidad genética entre poblaciones como posible explicación para las diferencias observadas entre los pacientes guatemaltecos y los estudios realizados en otras regiones geográficas del mundo (Eisenberg et al., 1988; Lee et al., 1989; Paz-y-Mino et al., 2002; Emad et al., 2010; Arana- Trejo et al., 2002; Melo, 1996; Hermans et al., 1987). Esta información es una contribución importante para la realización de la caracterización genética de la población leucémica del país con esta patología.

## X. CONCLUSIONES

- A. La frecuencia de expresión del gen quimérico *BCR-ABL* encontrada en Guatemala es de 29% en pacientes con LLA-B y de 71% en pacientes con LMC.
- B. La frecuencia de expresión de los distintos transcritos del gen quimérico de *BCR-ABL* en pacientes guatemaltecos con LMC y LLA-B es de 11% en pacientes que expresan el transcrito *e1a2* y de 43% en pacientes que presentaron el transcrito *b2a2* y *b3a2*, con una frecuencia de coexpresión del 3% representada por los transcritos *b2a2/b3a2*.
- C. La frecuencia de expresión de los transcritos de *BCR-ABL* en pacientes guatemaltecos con LMC concuerda con la reportada en estudios efectuados en países latinoamericanos cuya población es mayoritariamente mestiza (*b2a2* y *b3a2*= 40-50%) y difiere a la reportada en poblaciones caucásicas y asiáticas en las cuales se reportan diferencias significativas entre la frecuencia de expresión del transcrito *b2a2* (30-40%) comparado con la expresión de *b3a2* (50-60%).
- D. El grupo etario al cual corresponde la expresión de los diferentes transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* en pacientes con LMC (*b2a2* y *b3a2*) se encuentran en el rango de edad de los 30 a los 40 años mientras que pacientes con LLA-B (*e1a2*) pertenecen a las edades de los 5 a los 10 años.
- E. La presencia de los transcritos de fusión del gen quimérico *BCR-ABL* incrementa la actividad trombopoyética en pacientes con LMC.

## XI. RECOMENDACIONES

- A. Establecer en la población leucémica guatemalteca la expresión de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* por medio de la técnica molecular *qRT-PCR* con el fin de determinar la frecuencia de su expresión en pacientes con LMC y LLA-B que presenten recuentos de cromosoma Filadelfia no detectables por metodologías convencionales.
- B. Investigar el impacto del tipo de transcrito de *BCR-ABL* expresado en la sobrevida de pacientes guatemaltecos con LLA-B y LMC para el monitoreo de la enfermedad mínima residual.
- C. Evaluar la correlación de *BCR-ABL* respecto a las regiones geográficas de Guatemala para poder determinar si existe alguna relación causal entre su expresión y sus factores desencadenantes.

## XII. REFERENCIAS

- Adler, R., Vielhmann, D., Kuhlisch, E., Martiniak, Y., Rottgers, S., Harbott, J., et al. (2009). Correlation of *BCR-ABL* transcript variants with patients characteristics in childhood chronic myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*, 82, 112-118.
- Almaguer, C. (2003). Interpretación clínica de la biometría hemática. *Medicina Universitaria*, 5, 35-40.
- Ankathil, R., Geetha, N., Remani, P., Gangadharan, V., Rajasekharan, G., & Krishnan, N. (1996). Clinical implications of cytogenetic classification in adult acute lymphoblastic leukemia patients. *Journal of Cancer Research & Clinical Oncology*, 122, 370-373.
- Annino, L., Goekbuget, N., & Delannoy, A. (2002). Acute lymphoblastic leukemia in the elderly. *The Hematology Journal*, 3, 219-223.
- Arana, R., Sánchez, E., Ignacio, G., De La Fuente, E., Garces, O., Morales, E., et al. (2002). *BCR-ABL* p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Clinical & Laboratory Haematology*, 24, 145-150.
- Aurer, I., Butturini, A., & Gale, R. (1991). *BCR-ABL* rearrangements in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leucemia. *Blood*, 78, 2407-10.
- Balatzenko, G., Vundinti, B., & Guenova, M. (2001). Correlation between the type of *BCR-ABL* transcripts and blood cell counts in chronic myeloid leukemia: a possible influence of *mdr1* gene expression. *Hematology Reports*, 3:e3, 5-8.

- Behm, F., Raimondi, S., Frestedt, J., Liu, Q., Crist, W., Downing, J., et al. (1996). Rearrangement of the *MLL* gene confers a poor prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia, regardless of presenting age. *Blood*, *87*, 2870-2877.
- Benjamin, L., Ebert, A., & Todd, R. (2004). Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood*, *104*, 923-932.
- Bennett, J., Catovsky, D., Daniel, M., Flandrin, G., Galton, D., Gralnick, H., et al. (1981). The morphological classification of acute lymphoblastic leukemia: Concordance among observers and clinical correlations. *British Journal of Haematology*, *47*, 553-561.
- Bianchi, C., Cairoli, R., Marengo, P., Muti, G., Del Monte, U. & Perego, R. (1995). Detection by polymerase chain reaction of *BCR-ABL* transcripts in myeloproliferative diseases at time of diagnosis and for monitoring chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation. *European Journal of Cancer*, *31A*, 197–201.
- Biondi, A., Cimino, G., Pieters, R., & Pui CH. (2000). Biological and therapeutic aspects of infant leukemia. *Blood*, *96*, 24-33.
- Bose, S., Deininger, M., Gora, J., Goldman, J., & Melo, J. (1998). The presence of typical or atypical *BCR-ABL* fusion genes in leucocytes or normal individuals: Biological significance and implications for the assessment of minimal residual disease. *Blood*, *92*, 3362-3367.
- Branford, S., Hughes, T., & Rudzki, Z. (2002). Dual transcription of *b2a2* and *b3a2* *BCR-ABL* transcripts in chronic myeloid leukaemia is confined to patients with a linked polymorphism within the BCR gene. *British Journal of Haematology*, *117*, 875-877.

- Campbell, L., Michael, P., White, J., & Matthews, J. (1995). Prognostic implications of karyotypes in 159 newly diagnosed adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, *86*, 678a.
- Carlesso, N., Frank, D., & Griffin, J. (1996). Tyrosyl phosphorylation and DNA binding activity of signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins in hematopoietic cell lines transformed by *BCR-ABL*. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*, 811-820.
- Cerveira, N., Ferreira, S., Dória, S., Veiga, I., Ferreira, F., Mariz, J., et al. (2000). Detection of prognostic significant translocation in childhood acute lymphoblastic leukemia by one-step multiplex reverse transcription polymerase chain reaction, *British Journal of Haematology*, *109*, 638-640.
- Ching Hon, P. (1995). Medical Progress: Childhood leukemias. *The New England Journal of Medicine*, *332*, 1618-1630.
- Chissoe, S., Bodenteich, A., Fang, Y., Wang, Y., Burian, D., Clifton, S., et al. (1995). Sequence and analysis of the human *ABL* gene, the *BCR* gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics*, *27*, 67-82.
- Cortes, J., & Kantarjian, H. (2004). Beyond chronic myelogenous leucemia. *Cancer*, *100*, 2064-2078.
- Cortes, J., Talpaz, M., Giles, F., O'Brien, S., Rios, M., Shan, J., et al. (2003). Prognostic significance of cytogenetic clonal evolution in patients with chronic myelogenous leukemia on imatinib mesylate therapy. *Blood*, *101*, 3794-3799.
- Cortez, D., Kadlec, L., & Perdergast, A. (1995). Structural and signaling requirements for *BCR-ABL* mediated transformation and inhibition of apoptosis. *Molecular and Cellular Biology*, *15*, 5531-5541.

- Daley, G., Van Etten, R., & Baltimore, D. (1990). Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 *BCR-ABL* gene of the Philadelphia chromosome. *Science*, *247*, 824-830.
- de Klein, A., Van Kessel, A., Grosveld, G., Bartram C., Hagemeijer, A., Bootsma, D., et al. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature*, *300*, 765-767.
- de Lemos, J., de Oliveira, C., Scerni, A., Bentes, A., et al. (2005). Differential molecular response of the transcripts *B2A2* and *B3A2* to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genetical Molecular Research*, *4*, 803-811.
- Deininger, M., Goldman, J., & Melo, J. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, *96*, 3343-3345.
- Denu, J., & Tanner, K. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: Evidence for a sulfenic and intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry*, *37*, 5633-5642.
- Dobrovic, A., Trainor, K., & Morley, A. (1988). Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood*, *72*, 2063-2065.
- Dreher, D., & Junod, A. (1996). Role of oxygen free radicals in cancer development. *European Journal of Cancer*, *32(A)*, 30-38.
- Edmans, S., Kirk, J., Lee, A. & Radich, J. (1994). Rapid RT-PCR Amplification from limited cell numbers, *Genome Research*, *3*, 317-319.

- Eisenberg, A., Silver, R., Soper, L., Arlin, Z., Coleman, M., Bernhardt, B., et al. (1988). The location of breakpoints within the breakpoint cluster region (bcr) of chromosome 22 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2, 642-647.
- Emad I., Osman, & Kamal, H. (2010). Frequencies of *BCR-ABL* fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukemia patients. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 229-231.
- Faderl, S., Talpaz, M., Estrov, Z., O'Brien, S., Kurzrock, R., & Kantarjian, H. (1999). The biology of chronic myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 341, 164-172.
- Fialkow, P., Jacobson, R., & Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *American Journal of Medicine*, 63, 125-130.
- Gayno, J., Chapman, D., Little, C., McKenzie, S., Miller, W., Andreeff, M., et al. (1988). A cause specific hazard rate analysis of prognostic factors among 199 adults with acute lymphoblastic leukemia: The memorial hospital experience since 1969. *Journal of Clinical Oncology*, 6, 1014-1030.
- Greaves, M. (1996a). The new biology of leukemia. In *Leukemia*, Henderson, E., Lister, T., Greaves, M. (eds. ) (p. 34-45), Philadelphia: WB Saunders Company.
- Greenlee, R., Hill-Harmon M., Murray, T., & Thun, M. (2007). Cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 51, 15-36.

- Goh, H., Hwang, J., Kim, S., Lee, Y., Kim, Y., & Kim, D. (2006). Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Translational Research*, 248, 249-56
- Hasan, SK., Sazawal, S., Kumar, B., Chaubey, R., Mishra, P., Mir, R. et al. (2006). Childhood CML in India: b2a2 transcript is more common than b3a2. *Cancer genetic Cytogenetic*, 169, 76-7.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., & Grosveld, G. (1985). Structural organization of the *BCR* gene and its role in the Ph translocation. *Nature*, 315, 758-761.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Biotechniques*, 23, 504-511.
- Hermans, A. Heisterkamp, N., von Lindern, M., van Baal, S., Meije, D., van der Plas, D., et al. (1987). Unique fusion of *BCR* and *ABL* genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, 51, 33-44.
- Herrera, P., Calbacho, M., Heras, C., Ramos, M., López, J., & Odriozola, J. (2006). Monitorización de la enfermedad mínima residual en la leucemia mieloide crónica mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 28, 47-54.
- Hilden, J., Frestedt, J., Moore, R., Heerema, N., Arthur, D., Reaman, G., et al. (1995). Molecular analysis in acute lymphoblastic leukemia: MLL rearrangement and reverse transcriptase reaction chain for t(4;11) (q21;q23). *Blood*, 86, 3876-3882.

- Hoelzer, D., Thiel, E., Löffler, H., Buchner, T., Ganser, A., Heil, G., et al. (1988). Prognostic factors in a multicenter study for treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*, *71*, 123-131.
- Ihle, J., Thierfelder, W., Teglund, S., Stravapodis, D., Wang, D., Feng, J., et al. (1998). Signaling by the cytokine receptor superfamily. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *865*, 1-9.
- Inokuchi, K., Futaki, M., Yamada, T., Tanabe, Y., et al. (1991b). The relationship between the site of breakpoints within the bcr gene and thrombopoiesis of Philadelphia-positive chronic myelocytic leukemia. *Leukemia*, *15*, 1067-1073.
- Inokuchi, K., Inoue, T., Tojo, A., Futaki, M., Miyake, K., Yamada, T., et al. (1991a). A possible correlation between the type of *BCR-ABL* hybrid messenger RNA and platelet counting Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, *78*, 3125-3127.
- Ito, T., Tanaka, H., Tanaka, K., Ito, K., Kyo, T., Dohy, H. et al. (2004). Insertion of a genomic fragment of chromosome 19 between *BCR* intron 19 and *ABL* intron 1a in a chronic myeloid leukaemia patient with *BCR-ABL (e19a2)* transcript, *British Journal of Haematology*, *126*, 750-5.
- Jiménez, G., Carrillo, J., Chaves, M., Jiménez, R., Vargas, M., Campos, L., et al. (2008). Detección molecular del gen *BCR-ABL* por RT-PCR en niños costarricenses con leucemia. *Revista de Biología Tropical*, *56*, 1613-1618.
- John, M., Goldman, F., Junia, V., & Melo, M. (2003). Chronic myeloid leukemia: Advances in biology and new approaches to treatment. *The New England Journal of Medicine*, *15*, 349.

- Jorgensen, H., & Holyoake, T. (2001). A comparison of normal and leukemic stem cell biology in chronic myeloid leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 19, 89-106.
- Kantarjian, H., Deisseroth, A., Kurzrock, R. et al. (1993). Chronic myelogenous leukemia: a concise up date. *Blood*, 82, 2975-2984.
- Kantarjian, H., Talpaz, M., Dhingra, K., Estey, E., Keating, M., Ku, S., et al. (1991) Significance of the p210 versus p190 molecular abnormalities in adults with Philadelphia chromosome positive acute leukemia. *Blood*, 78, 2411.
- Lee, A., Kirk, J., Edmans, S. & Radich, J. (1995) Multiplex PCR of BCR/ABL fusion transcripts in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia, *Genome Research*, 4, 283-287.
- Lee, M., Le Maistre, A., Kantarjian, H., Talpaz, M., Freireich, E., Trujillo, J., et al. (1989) Detection of two alternative *BCR-ABL* mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*, 73, 2165-2170.
- Lithman, M., Heal, T., & Rowe, J. (1987). Hyperleukocyte leukemia. *Bailleres Clinical Haematology*, 1, 725.
- Lichty, B., Keating, A., Callum, J., Yee, K., Croxford, R., Corpus, G., et al. (1998). Expression of p210 and p190 BCR-ABL due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, 103, 711-715.
- Look, T. (2001). Genes altered by chromosomal translocations in leukemias and lymphomas. In Scriver, C., Beaudet, A., Sly, W., Valle, D. (eds.). *The metabolic & molecular bases of inherited disease* (p. 539-574) 8<sup>a</sup> Ed. McGraw-Hill, NY.

- Lugo, T., Pendergast, A., Muller, A., & Witre, O. (1990) Tyrosine kinase activity and transformation potency of *BCR-ABL* oncogene products. *Science*, 1079-1082.
- Martiat, P., Ifrah, N., Rassool, F., Morgan, G., et al. (1989). Molecular analysis of Philadelphia positive essential thrombocythemia. *Leukemia*, 3,563-565.
- Martinelli, G., Testoni, N., Montefusco, V., Amabile, M., Saglio, G., Ottaviani, E., et al. (1998) Detection of *BCR-ABL* transcript chronic myelogenous leukemia patients by reverse transcription polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Haematologica*, 83, 593-601.
- Meissner, R., Dias, P., Covas, D., Job, F., Leite, M. & Nardi, N. (1998) A polymorphism in exon b2 of the major breakpoint cluster region (M-bcr) identified in chronic myeloid leukemia patients. *British Journal of Haematology*, 103, 224-226.
- Mejía, J., Fajardo, A., Bernáldez, R., Farfan, J., Ortiz, A., & Martínez, M. (1996). Incidence trends of acute leukemia among the children of Mexico city: 1982- 1991. *Archives of Medical Research*, 27, 223-227.
- Melo, J. (1996). The diversity of *BCR-ABL* fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88, 2375.
- Melo, J., Hochhaus, A., Yan XH., & Goldman, J. (1996). Lack of correlation between *BCR-ABL* expression and response to interferon-alpha in chronic myeloid leukaemia, *British Journal of Haematology*, 92, 684-6.
- Meza-Espinoza, J., Gutiérrez, M., Vásquez, A., Delgado, J., Esparza, M., González, J. et al. (2007) Prevalence of the *BCR-ABL1* transcripts in Mexican patients with chronic myelogenous leucemia. *Review of Clinical Investigation*, 59, 338-341.

- Milis, K., Benn, P., & Birnie, G. (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, 1155-1161.
- Millot, F., Traore, P., Guilhot, J., Nelken, B., Leblanc, T., Leverger, G. et al. (2005). Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics*, 116, 140-3.
- Morris, S., Daniel, L., Ahmed, C., Elias, A., et al. (1990). Relationship of bcr breakpoint to chronic phase duration, survival, and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase. *Blood*, 75, 2035-2041.
- Mondal, B., Bandyopadhyay, A., Majumdar, S., Mukhopadhyay, A., Chandra, S., Chaudhuri, U. et al., (2006). Molecular Profiling of Chronic Myeloid Leukemia in Eastern India, *American Journal of Hematology*, 81, 845–849
- Nowell, P., & Hungerford, D. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497.
- Olopade, I., & Pichert G. (2001). Cancer genetics in oncology practice. *Annals of Oncology*, 12, 895-908.
- Opalka, B., Wandl, U., Stutenkemper, R., Kloke, O., et al. (1992). No correlation between the type of *Bcr-Abl* hybrid messenger RNA and platelet counts in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 80, 1854-1855.
- Pane, F., Frigeri, F., Sindona, M., Luciano, L., Ferrara, F., Cimino, R., et al. (1996). Neutrophilic chronic myelogenous leukemia: A distinct disease with a specific molecular marker (*BCR-ABL* with c3a2 junction). *Blood*, 88, 2410-2414.

- Paz, C., Burgo, R., Morillo, S., Santos, J., Fiallo, B., & Leone, P. (2002). *BCR-ABL* rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genetics & Cytogenetics*, *132*, 65-67.
- Perego, R., Costantini, M., Cornacchini, G., Gargantini, L., Bianchi, C., Pungolino, E., et al. (2000). The possible influences of b2a2 and b3a2 *BCR-ABL* protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukemia. *European Journal of Cancer*, *36*, 1395–1401.
- 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. *Journal Medical Science Monitor*, *8*, 191–197.
- Pui, CH., & Crist, W. (1999). Acute lymphoblastic leukemia. In Pui, CH. (ed.) *Childhood leukemias*. (p. 288-312). Cambridge University Press, U.S.A.
- Pui, CH., & Evans, W. (2006). Treatment of acute lymphoblastic leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *354*, 166-178.
- Pui, CH., Kane, J., & Crist, W. (1995). Biology and treatment of infant leukemias *Review Leukemia*, *9*, 762-769.
- Radich J. (1997). Detection of *BCR-ABL* transcripts in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia after marrow transplantation. *Blood*, *89*, 2602-2609.
- Radich, J., Dai, H., Mao, M., Oehler, V., Schelter, J., Drunker, B., et al. (2006). Gene expression changes associated with progression and response in chronic myeloid leukemia. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States*, *103*, 2794-2799.

- Rameh, L., & Cantley, L. (1999). The role of phosphoinositide-3-kinase lipid products in cell function. *Biological and Chemical Journal*, 274, 8347-8350.
- Razelle, K. MD, Hagop, M. MD, Brian, J. MD, & Moshe, T. MD. (2003). Philadelphia Chromosome positive leukemias: From Basic Mechanisms to Molecular Therapeutics. *Annals of Internal Medicine*, 138, 819-830.
- Ribera, J., Oriol, A., González, M., Vidriales, M., Brunet, S., Hernández, J., et al. (2006). Tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda con Reordenamiento *BCR-ABL*. *Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 28, 67-62.
- Rosas, A., Martinez, M., Ayala, M., Vela, J., Bahena, P., Vadillo, M., et al. (2003). Análisis del tipo de transcrito *BCR-ABL* y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. *Gaceta Médica de México*, 139, 553-559.
- Rousell, M. (1998). Key effectors of signal transduction and G1 progression. *Advances in Cancer Research*, 74, 1-24.
- Rozman, C., Urbano, A., Cervantes, F., Rozman, M., Colomer, D., Féliz, P., et al. (1995). Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within *M-bcr* and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, 9, 1104-1107.
- Rubnitz, J., Downing, J., Pui, CH, Shuetleff, S., Raimondi, S., Evans, W., et al. (1997). *TEL* gene rearrangement in acute lymphoblastic leukemia: A new genetic marker with prognostic significance. *Journal of Clinical Oncology*, 15, 1150-1157.
- Ruiz, G., Garcés, J., Reyes, V., & Ruiz, G. (2004). Frequencies of the breakpoint cluster region types of the *BCR-ABL* fusion gene in Mexican Mestizo patients with chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Research*, 56, 605-8

- Sallan, E. (2006). Myths and lessons from the adult pediatric interface in acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 2006, 128-132.
- Satler, M., Verma, S., Shrikhande, G., Byrne, C., Pride, Y., Winkler, T., et al. (2000). The *BCR-ABL* tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *Journal of Biology & Chemical*, 275, 24273-24278.
- Sawyers, C. (1999). Chronic Myeloid Leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 340, 1330-1340.
- Scott, A., & Look, T. (2005). Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Cancer Oncology*, 23, 6306-6313.
- Secker, L., & Craig, J. (1993). Prognostic implications of breakpoint and lineage heterogeneity in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 7, 147.
- Secker, L., Craig, J., Hawkins, J., & Hoffbrand, A. (1991). Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia in adults: Age distribution, *BCR* breakpoint and prognostic significance. *Leukemia*, 5, 196.
- Shaefer, R., Dudek, M., & Popenoe, D. (1987). CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of *BCR*. *Blood*, 70, 48-455.
- Shatalrid, M., Talpaz, M., Kuerzrock, R., Kantarjian, H., Trujillo, J., Gutterman, J., et al. (1988). Analysis of breakpoints within the *BCR* gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 72, 485-490.

- Shepherd, P., Bond, C. & Allan, N. (1992). Molecular breakpoints and platelet counts in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 80, 556-557.
- Shepherd, P., Suffolk, R., Halsey, J., & Allan, N. (1995). Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcript in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival, *British Journal of Haematology*, 89, 546-54.
- Shet, A., Jahagirdar, B., & Verfaillie, C. (2002) Chronic myelogenous leukemia: Mechanisms underlying disease progression. *Leukemia*, 8, 1402-1411.
- Slorski, T., Kamakaraj, P., Nieborowska, M., Ratajczak, M., Shau, W., Zon, G., et al. (1995). Phosphatidylinositol-3-kinase activity is regulated by *BCR-ABL* and is required for the grow of Philadelphia chromosome positive cells. *Blood*, 86, 726-736.
- Smith, M., Arthur, D., Camitta, B Carroll, A., Crist, W., Gaynon, P., et al. (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Clinical Oncology*, 14,18-24.
- Stefan, F., Hagop, M. Kantarjian, H., Talpaz, M., & Estrov, Z. (1998). Clinical significance of cytogenetic abnormalities in adult acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 91, 3995-4019.
- Stiepherd, P., Sufffolk, R., Halsey, J., & Allan, N. (1995) Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukemia. No correlation with clinical features, cytogenesis response, duration of chronic please, or survival. *British Journal of Haematology*, 89, 546-554.

- Taylor, P., Reid, M., & Proctor, S. (1994). Acute lymphoblastic leukemia in the elderly. *Leukemia & Lymphoma*, *12*, 373-80.
- Udomsakdi-Auewarakul, C., U-Pratya, Y., Boonmoh, S. , & Vatanavicharn, S. (2000). Detection of molecular variants of BCR-ABL gene in bone marrow and blood of patients with chronic myeloid leukemia by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Journal of the Medicine Association of Thailand*, *83*, 928 –35.
- Van Dongen, J., Macintyre, E., Gabert, J., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., et al. (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: Investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*, *13*, 1901-1928.
- van Rhee, F., Hochhaus, A., Lin, F., Melo, J., Goldman, J., & Cross, N. (1996) p190 *BCR-ABL* mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, *87*, 5213–5217.
- Wetzler, M., Talpaz, M., Estrov, Z., & Kurzrock, R. (1993) CML: mechanisms of disease initiation and progression. *Leukemia & Lymphoma*, *11*, 47-50.
- Yaghmaie, M., Ghaffari, S., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Jahani, M., Mousavi, S., et al. (2008). Frequency of *BCR-ABL* Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Iranian Archive of Medicine*, *11*, 247 – 251

### XIII. ANEXOS

#### Anexo 1. Hoja de Consentimiento

Señores

**Instituto Nacional de Genética y Enfermedades Metabólicas- INVEGEM-**  
Fundación Rozas Botrán

Estimados Señores:

Por \_\_\_\_\_ este \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ yo,

\_\_\_\_\_  
(Nombres y apellidos) con cédula de vecindad No. de Orden: \_\_\_\_\_ y de Registro: \_\_\_\_\_ informo que recibí información por el médico de la realización del examen de médula ósea y de los procedimientos que se realizarán para la obtención y procesamiento de mi muestra. Autorizando que se realicen las pruebas genéticas que el médico considere pertinentes para la detección del gen *BCR-ABL* como parte del proyecto de investigación “**Detección de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* (*e1a2*, *b2a2* y *b3a2*) por RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B)**” a fin de que se diagnostique la presencia o ausencia de dicho gen.

Sin otro particular quedo de ustedes atentamente

Firma del paciente: \_\_\_\_\_

Firma del médico: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## Anexo 2. Hoja de Asentimiento

Señores

**Instituto Nacional de Genética y Enfermedades Metabólicas- INVEGEM-**  
Fundación Rozas Botrán

Estimados Señores:

Por \_\_\_\_\_ este \_\_\_\_\_ medio \_\_\_\_\_ yo,

\_\_\_\_\_  
(Nombres y apellidos) con cédula de vecindad No. de Orden: \_\_\_\_\_ y de Registro: \_\_\_\_\_ informo que recibí información por el médico de la realización del examen de médula ósea y de los procedimientos que se realizarán para la obtención y procesamiento de la muestra, para establecer el diagnóstico del paciente. Autorizando que se realicen las pruebas genéticas que el médico considere pertinentes a mi hijo(a): \_\_\_\_\_ para la detección del gen *BCR-ABL* como parte del proyecto de investigación **“Detección de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* (*e1a2*, *b2a2* y *b3a2*) por RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B)”** a fin de que se le diagnostique si tiene o no dicho gen.

Sin otro particular quedo de ustedes atentamente

Firma de los padres y/o responsable: \_\_\_\_\_

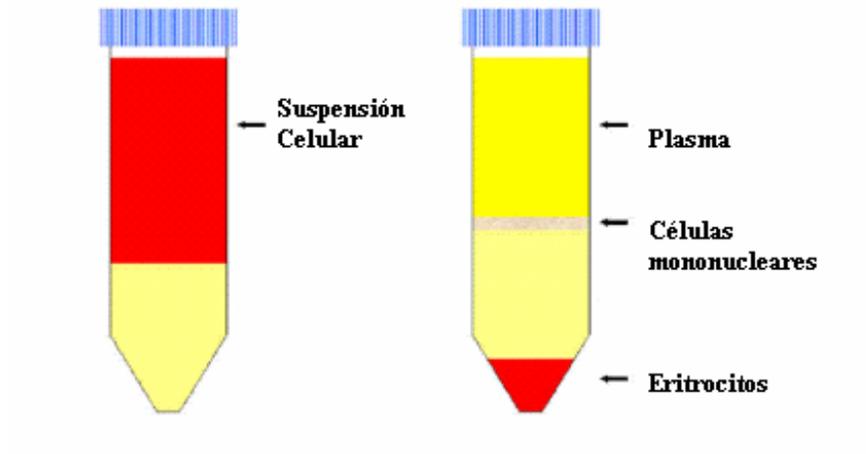
Firma del médico: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_\_

## Anexo 3. Boleta de Recolección de datos clínicos

Section 1.01 IDENTIFICACION DEL PACIENTE					
Nombre de paciente					
Iniciales del paciente					
Código del paciente					
Fecha de toma de muestra					
Section 1.02 DATOS DEMOGRÁFICOS					
Edad					
Género	Masculino	<input type="checkbox"/>	Femenino	<input type="checkbox"/>	
Lugar de Nacimiento (Procedencia)					
Section 1.03 INFORMACION CLINICA					
Antecedentes Clínicos Familiares					
Clasificación de leucemias según FAB	<input type="checkbox"/>	LLA-B <sup>1</sup>	LMC <sup>2</sup>	<input type="checkbox"/>	
Estado de la Enfermedad	Nuevo	Seguimiento	Recaída	Remisión	
Fecha de diagnostico	/ /	/ /	/ /	/ /	
<b>DATOS HEMATOLOGICOS ACTUALES</b>	Recuento de Leucocitos:				
	Recuento de Plaquetas:				
	Nivel de Hemoglobina:				
<b>MARCADORES GENÉTICOS</b>	LLA <sup>1</sup>		LMC <sup>2</sup>		
	BCR-ABL, t(9;22)(q34;q11)		BCR-ABL, t(9;22)(q34;q11)		
	Tipo de transcrito patológico	e1:a2		Tipo de transcrito patológico	e1:a2
		b2:a2			b2:a2
b3:a2			b3:a2		
<b>INTERPRETACION DE LOS MARCADORES GENÉTICOS</b>					
CLAVE	1: Leucemia linfoblástica aguda 2: Leucemia mieloide crónica				

Anexo 4. Extracción de linfocitos (*Ficoll-Paque Premium*®- *GE Healthcare Bio Sciences AB Bjorgatan , Sweden*)



**Anexo 5. Características clínicas del paciente relacionadas en base al tipo de transcrito de BCR-ABL en pacientes con LLA y LMC por RT-PCR**

<b>Parámetro</b>	<b>e1a2</b>	<b>b2a2</b>	<b>b3a2</b>	<b>P ♣</b>
<b>Numero de Casos n (%)</b>	4 (11%)	15 (43%)	15 (43%)	
	♦e1a2 y b2a2 P= 0.010 <sup>1</sup>	♦b2a2 y b3a3 P= 0.369 <sup>2</sup>	♦e1a2 y b3a2 P= 0.001 <sup>1</sup>	0.004 <sup>1</sup>
<b>Género</b>				0.612 <sup>2</sup>
<b>Femenino (F)</b>	2 (5.5%)	6 (17%)	4 (11.5%)	
<b>Masculino (M)</b>	2 (5.5%)	9 (26%)	11(31.6%)	
<b>Edad (años)</b>	♦e1a2 y b2a2 P= 0.028 <sup>1</sup>	♦b2a2 y b3a3 P= 0.221 <sup>2</sup>	♦e1a2 y b3a2 P= 0.009 <sup>1</sup>	0.022 <sup>1</sup>
<b>Media ± SD</b>	7 ± 0.82	40 ± 24.24	32 ± 15.46	
<b>Mediana (rango)</b>	7 (6-8)	46 (4-81)	34 (4-64)	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.12	0.61	0.48	
<b>Plaquetas (150,000-400,000 cel/mm<sup>3</sup>)</b>	♦e1a2 y b2a2 P= 0.009 <sup>1</sup>	♦b2a2 y b3a3 P= 0.604 <sup>2</sup>	♦e1a2 y b3a2 P= 0.004 <sup>1</sup>	0.012 <sup>1</sup>
<b>Media ± SD</b>	8,895 ± 6,641	199,806 ± 163,437	162,267 ± 91,257	
<b>Mediana (rango)</b>	7,970 (2,000-18,000)	184,000 (1,069-516,000)	143,000 (10,000-316,000)	
<b>Q1 (25)</b>	3,415	430,000	109,000	
<b>Q2 (50)</b>	7,970	184,000	143,000	
<b>Q3 (75)</b>	15,570	342,000	234,000	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.74	0.82	0.56	
<b>Leucocitos (4,500-10,500 cel/mm<sup>3</sup>)</b>				0.079 <sup>2</sup>
<b>Media ± SD</b>	119,423 ± 37,043	124,073 ± 158,099	22,384 ± 48,534	
<b>Mediana (rango)</b>	124,845 (73,000-155,000)	60,310 (1,050-567,740)	6,170 (1,500-185,000)	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.31	1.27	2.17	
<b>Hemoglobina (F=12-16 y M=14-18 g/dl)</b>				0.135 <sup>2</sup>
<b>Media ± SD</b>	8.20 ± 4.00	9.95 ± 2.85	11.96 ± 3.36	
<b>Mediana (rango)</b>	8.95 (2.7-12.2)	10.3 (5.6-15.8)	11.6 (5.8-19.1)	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.49	0.29	0.28	

♦ = Prueba Mann Whitney ♣ = Prueba Kruskal Wallis 1 = Diferencia Significativa 2 = Diferencia no significativa

**Fuente:** Datos experimentales