

Universidad Nacional de Asunción
Dirección General de Postgrado
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

DETECCIÓN MOLECULAR Y CUANTIFICACIÓN DEL TRANSCRIPTO *BCR-ABL1*
EN PACIENTES PARAGUAYOS CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

Trabajo de tesis para optar por el título de Magíster en Ciencias Biomédicas

Autor: Silvia Elena Sánchez Mendoza

Directora de tesis: Prof. Dra. (Ph. D., M. Sc.) Ana Ilda Ayala Lugo

ASUNCIÓN – PARAGUAY

Febrero – 2013

Universidad Nacional de Asunción
Dirección General de Postgrado
Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica
Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud

DETECCIÓN MOLECULAR Y CUANTIFICACIÓN DEL TRANSCRIPTO *BCR-ABL1*
EN PACIENTES PARAGUAYOS CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

**Lic. Silvia Elena Sánchez Mendoza¹, Lic. Valerie Annel Jolly González¹, Dra. Stella Rodríguez²,
Dr. José Ferreira Nizza³, Dra. Imelda Martínez³, Dra. Carolina Molas⁴, Dr. Alfredo Quiroz⁴,
Prof. Dra. Ana Ilda Ayala Lugo^{1,*}**

¹Laboratorio de Genética Molecular. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.

² Laboratorio de Citogenética. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay.

³ Departamento de Hematología. Hospital de Clínicas de la Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Asunción. Paraguay

⁴Hospital Central del Instituto de Previsión Social. Asunción. Paraguay.

*E-mail: anaayalalugo@gmail.com

**DETECCIÓN MOLECULAR Y CUANTIFICACIÓN DEL TRANSCRIPTO *BCR-ABL1*
EN PACIENTES PARAGUAYOS CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

SILVIA ELENA SÁNCHEZ MENDOZA

Aprobado en fecha 19 de febrero de 2013.

Tribunal examinador.

Prof. Dra. (Ph. D., M. Sc.) María del Rosario Uriarte

AEPSM-Uy

Prof. Dra. (Ph. D.) Graciela Russomando

IICS/UNA-Py

Prof. Dr. (Ph. D.) José Javier Zarza Ortíz

FCM/UNA-Py

Prof. Dra. (Ph. D., M. Sc.) Ana Ilda Ayala Lugo

Directora de tesis

Agradecimientos

A mi familia, por enseñarme que la única herencia valdadera en esta vida es el conocimiento.

A mi novio Hugo, por su respaldo tanto de cerca como en la distancia.

A mi directora de tesis Dra. Ana Ilda Ayala Lugo, por compartir sus experiencias y enseñanzas con sencillez y entusiasmo.

A Valerie y Nathalia, por su colaboración y compañía en el día a día.

A la jefa del departamento de Biología Molecular y Genética del IICS, Dra. Graciela Russomando por haber abierto las puertas de su laboratorio y evaluado la tesis.

A mis compañeras de maestría, por su apoyo y compañerismo.

A la Dra. Rosario Uriarte y su equipo de trabajo, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, brindado su experiencia y su participación como evaluadora de este trabajo.

A los demás evaluadores de la tesis: la Dra. Irene Larripa, la Dra. Rosa Guillén, el Dr. José Zarza y el Dr. José Ferreira Nizza, por su tiempo y dedicación.

A la Dra. Nathalia Casal, a la Dra. María Élica Centurión, al Dr. Victor Salinas y al Dr. Adolfo Gaona, por su colaboración en el acceso a datos clínicos.

A los médicos hematólogos, que brindaron su apoyo para que este proyecto surgiese.

A los pacientes, por su estrecha colaboración.

A Lic. Felicita Torales y a los colegas Danilo Fernández y Lourdes Valdez por su amable colaboración en la búsqueda de material bibliográfico.

A los miembros de Coordinación de Postgrado y profesores, por la dedicación y tiempo otorgados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, al Rectorado de la Universidad Nacional de Asunción y a Casa Boller por el apoyo financiero gracias al cual se realizó este proyecto.

A todos aquellos que de una u otra forma contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

	Pág.
TÍTULO	1
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 Generalidades.....	5
1.2 Clasificación de la leucemia mieloide crónica.....	6
1.3 Epidemiología y etiología de la LMC.....	7
1.4 Clínica de la leucemia mieloide crónica.....	8
1.5 Citogenética de la leucemia mieloide crónica.....	9
1.6 Biología molecular de la leucemia mieloide crónica.....	10
1.7 Diagnóstico de la leucemia mieloide crónica.....	16
1.8 Tratamiento de la leucemia mieloide crónica.....	18
1.9 Evaluación de la respuesta al tratamiento en la Leucemia Mieloide Crónica.....	21
2. OBJETIVOS	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	31
3.1 Diseño del estudio.....	32
3.2 Toma de muestra.....	33
3.3 Determinación de la presencia e identificación del tipo de transcrito <i>BCR-ABL1</i>	33
3.4 Prueba de sensibilidad de la PCR.....	37
3.5 Cuantificación del transcrito <i>BCR-ABL1</i>	38
3.6 Aspectos Éticos.....	39
3.7 Asuntos estadísticos.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 Características demográficas de los pacientes participantes del estudio.....	42
4.2 Características de los pacientes al momento del diagnóstico.....	46
4.3 Detección y determinación de la frecuencia de los diferentes tipos de transcrito <i>BCR-ABL1</i>	49
4.4 Prueba de sensibilidad de las reacciones de PCR.....	51
4.5 Cuantificación del transcrito <i>BCR-ABL1</i>	52
4.6 Determinación de la repuesta molecular a partir de la cuantificación del transcrito <i>BCR-ABL1</i> en pacientes en tratamiento.....	58
4.7 Medición de la disminución del transcrito <i>BCR-ABL1</i> en pacientes bajo tratamiento con inhibidor de tirosinquinasa.....	61
4.8 Correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el % <i>BCR-ABL/ABL</i> en Sangre Periférica.....	63
5. DISCUSIÓN	64
6. CONCLUSIONES	81
7. ANEXOS	83
8. BIBLIOGRAFÍA	89

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Criterios de respuesta hematológica, citogenética y molecular.....	22
Tabla 2. Criterios de respuesta óptima, subóptima y falla al tratamiento.....	23
Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR para la detección de los transcritos b3a2 y b2a2 con sus respectivos tamaños de producto.....	36
Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR para la detección del transcrito <i>ABL1</i>	37
Tabla 5. Procedencia según departamentos de los 69 pacientes incluidos en este estudio.....	45
Tabla 6. Datos de edad, conteo de glóbulos blancos, conteo de plaquetas y hemoglobina en 39 pacientes al diagnóstico.....	47
Tabla 7. Cariotipos al diagnóstico de 4 pacientes: 2 con anomalías cromosómicas adicionales y 2 Ph-.....	49
Tabla 8. Valores de pendiente y coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) obtenidos para las curvas de calibración.....	54
Tabla 9. Análisis de las curvas de calibración para los transcritos <i>BCR-ABL1</i> y <i>ABL1</i>	55
Tabla 10. % <i>BCR-ABL1/ABL1</i> obtenidos para controles de ARN a partir de 7 ensayos distintos.....	56
Tabla 11. Valores de cuantificación al diagnóstico de 18 pacientes previo al inicio del tratamiento.....	57
Tabla 12. Mediana y dispersión de los valores de base obtenidos en 18 pacientes con LMC previo al inicio del tratamiento.....	58
Tabla 13. Equivalencia entre cantidad de transcrito en escala internacional, variación logarítmica estimada y respuesta molecular.....	59
Tabla 14. Disminución del transcrito <i>BCR-ABL1</i> en pacientes bajo tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.....	62
Tabla 15. Frecuencia del tipo de transcrito <i>BCR-ABL1</i> en otras poblaciones.....	70
Tabla 16. Coficiente de correlación de Spearman (r_s) y valor de p obtenidos para la correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el % <i>BCR-ABL/ABL</i> en Sangre Periférica.....	78

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Células madre hematopoyéticas y células sanguíneas adultas.....	6
Figura 2. Formación del cromosoma Philadelphia.....	7
Figura 3. Puntos de ruptura más frecuentes de los genes <i>BCR</i> y <i>ABL1</i>	13
Figura 4. Tipos de transcripto <i>BCR-ABL1</i> y su correspondiente Proteína <i>BCR-ABL</i>	13
Figura 5. Relación entre tipo de transcripto y fenotipo de la enfermedad.....	14
Figura 6. Efecto del dominio de dimerización del BCR en la activación de SH1 y su actividad tirosin quinasa en el dominio ABL.....	16
Figura 7. Tratamiento de primera línea de pacientes con LMC diagnosticados en Crisis Blástica o Fase Acelerada.....	20
Figura 8. Proporción acumulada de pacientes con leucemia mieloide crónica diagnosticados en fase crónica temprana	21
Figura 9. A. Esquema de conversión de resultados de cuantificación de transcripto <i>BCR-ABL1</i> a escala internacional por medio de la utilización de un factor de conversión. B. Aplicación de los factores de conversión a los resultados de los ensayos local.....	26
Figura 10. Total de pacientes incluidos para este estudio.....	42
Figura 11. Características demográficas de los pacientes participantes del estudio.....	44
Figura 12. Distribución de edades al diagnóstico de 39 pacientes con LMC.....	47
Figura 13. Productos de amplificación de PCR correspondientes a las isoformas b3a2 y b2a2 de la proteína p210 junto con el producto de amplificación del gen control <i>ABL1</i>	50
Figura 14. Frecuencia del tipo de transcripto <i>BCR-ABL1</i>	51
Figura 15. Sensibilidad de las reacciones de PCR para la detección del transcripto <i>BCR-ABL1</i> codificante de la proteína p210.....	52
Figura 16. Curvas de amplificación del transcripto <i>BCR-ABL1</i> realizadas a partir de diluciones seriadas de plásmidos calibradores conteniendo un número de copias conocido.....	53
Figura 17. Curva estándar <i>BCR-ABL1</i>	54
Figura 18. Frecuencia de Respuestas Moleculares en 57 pacientes con LMC en tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.....	59
Figura 19. Frecuencias de Respuestas Moleculares según tiempo de tratamiento para 47 pacientes con LMC en tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.....	61
Figura 20. Correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el % <i>BCR-ABL/ABL</i> en Sangre Periférica.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS

μ -BCR: Punto de ruptura micro del gen *BCR*

A260: Absorbancia a 260 nanómetros

A280: Absorbancia a 280 nanómetros

ABL 1: Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1

ABL 1: Designación para la proteína ABL

ADN: Acido desoxirribonucleico

ADNc: Acido desoxirribonucleico complementario

ARN: Ácido ribonucleico

b2a2: Variante de *BCR-ABL 1*

b3a2: Variante de *BCR-ABL 1*

BCR: Breakpoint Cluster Region

BCR: Designación para la proteína BCR

BCR-ABL 1: Designación de la proteína quimérica o proteína de fusión.

DEPC: Dietilpirocarbonato

dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfatados

DTT: Dithiothreitol.

e19a2: Variante de *BCR-ABL 1*

e1a2: Variante de *BCR-ABL 1*

EI: Escala Internacional

FISH: Hibridación in situ fluorescente.

GB: Glóbulos Blancos

KDa: Kilo Dalton

L: litro

LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

M - BCR: Punto de ruptura mayor del gen *BCR*

m-BCR: Punto de ruptura menor del gen *BCR*

mg: microgramo

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

mL: microlitros

mL: mililitro

mm³: milímetro cúbico

ng: nanogramos

nm: nanómetros

p190: Proteína BCR-ABL 1 con peso molecular 190 Kilo Daltons

p210: Proteína BCR-ABL 1 con peso molecular de 210 Kilo Daltons

p230: Proteína BCR-ABL 1 con peso molecular de 230 Kilo Daltons

pb: pares de base

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

qRT - PCR: Transcripción Reversa Reacción en Cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa.

RM: Respuesta Molecular

RMM: Respuesta Molecular Mayor

rpm: revoluciones por minuto

RT – PCR: Transcripción Reversa Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RT: Retrotranscripción

STI 571: Denominación del Imatinib

UV: Ultravioleta

**DETECCIÓN MOLECULAR Y CUANTIFICACIÓN DEL TRANSCRIPTO *BCR-ABL1*
EN PACIENTES PARAGUAYOS CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA**

**MOLECULAR DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE *BCR-ABL1*
TRANSCRIPT IN PARAGUAYAN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID
LEUKEMIA**

RESUMEN

DETECCIÓN MOLECULAR Y CUANTIFICACIÓN DEL TRANSCRIPTO *BCR-ABL1* EN PACIENTES PARAGUAYOS CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa asociada a la presencia del gen de fusión *BCR-ABL1* en la célula madre hematopoyética producto de la translocación t(9;22) (q34;q11.2). Este nuevo gen codifica para una proteína tirosin quinasa con actividad oncogénica. Este estudio descriptivo de corte transversal tuvo como objetivo identificar y cuantificar los transcritos *BCR-ABL1* mediante técnicas de biología molecular en pacientes con sospecha clínica y en tratamiento de LMC, que concurrieron al laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud desde tres hospitales públicos de referencia. Se estudiaron un total de 69 pacientes a partir de los cuales se obtuvieron 19 muestras antes del inicio del tratamiento y 57 a distintos tiempos durante el tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa. Se analizó el tipo de transcrito en 42 muestras hallándose la isoforma b3a2 en el 64%, la b2a2 en el 31% y ambas en el 5%. A partir de las cuantificaciones realizadas en 57 muestras en tratamiento se determinó la respuesta molecular a los inhibidores de la tirosina quinasa. El 61% no alcanzó la RM Mayor y el 30% obtuvo una RM Mayor o Completa. Este estudio logró implementar por primera vez a nivel nacional la detección y cuantificación del transcrito *BCR-ABL1* en pacientes con LMC, introduciéndose una herramienta necesaria para el diagnóstico y seguimiento de la respuesta al tratamiento.

Palabras Claves: fusión de genes-genética, inhibidor de tirosinquinasa, transcripción reversa (RT), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR), respuesta molecular (RM).

ABSTRACT

MOLECULAR DETECTION AND QUANTIFICATION OF THE *BCR-ABL1* TRANSCRIPT IN PARAGUAYAN PATIENTS WITH CHRONIC MYELOID LEUKEMIA

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a myeloproliferative neoplasm associated to the presence of *BCR-ABL1* fusion gene originated from the t(9;22) (q34;q11.2) translocation in the hematopoietic stem cell. This new gene codifies for a tyrosine kinase protein with oncogenic activity. This cross-sectional study was conducted to identify and quantify the *BCR-ABL1* transcript through molecular biology methods in CML patients with clinical symptoms and during treatment that were derived to the Health Sciences Research Institute from three referral public hospitals such. A total of 69 patients were studied from which 19 samples before treatment and 57 samples during treatment with tyrosine kinase inhibitors were collected. The transcript type was analyzed in 42 samples. Isoform b3a2 was found in 64% of samples, b2a2 in 31% and both in 5%. Quantifications obtained from 57 samples collected during treatment were used to determinate the molecular response to tyrosine kinase inhibitors: 61% did not achieve Major MR, 30% had Major or Complete MR. This study achieved for the first time in our country the detection and quantification of the *BCR-ABL1* transcript in CML patients, introducing an important tool for diagnosis and follow-up of these patients.

Key Words: gene fusion-genetics, tyrosine kinase inhibitors, reverse transcription (RT), real time polymerase chain reaction (qRT-PCR), molecular response (MR).

1. Introducción

1.1.Generalidades

La leucemia es una neoplasia maligna de los órganos hematopoyéticos que se caracteriza por una sustitución difusa de la médula ósea por precursores de los leucocitos inmaduros en la circulación general e infiltración de los ganglios linfáticos, bazo, hígado y otros órganos (1).

Las neoplasias que afectan los tejidos hematopoyéticos se clasifican según el linaje correspondiente a las células neoplásicas, pudiendo ser éstas de origen mieloide o linfoide (2). La célula madre mieloide es aquella que da origen a plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos blancos como monocitos y los polimorfonucleares entre los cuales se incluyen neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Por su parte, la célula madre linfoide origina células citolíticas naturales o “*natural killers*” junto con linfocitos B y T (Figura 1). Cuando una de estas células madre sufre alguna alteración ocurre una proliferación excesiva de células sanguíneas y/o formas inmaduras de las mismas tanto en médula ósea, lugar de residencia de dichas células madres, como en sangre periférica (3). Dependiendo de la cantidad de formas inmaduras y de la agresividad de la enfermedad se habla de una leucemia crónica o aguda, presentando la primera un menor porcentaje de células inmaduras y menor grado de agresividad en relación a la segunda. No obstante, una leucemia cuyos inicios se presenta bajo una forma crónica puede progresar a una forma aguda (4).

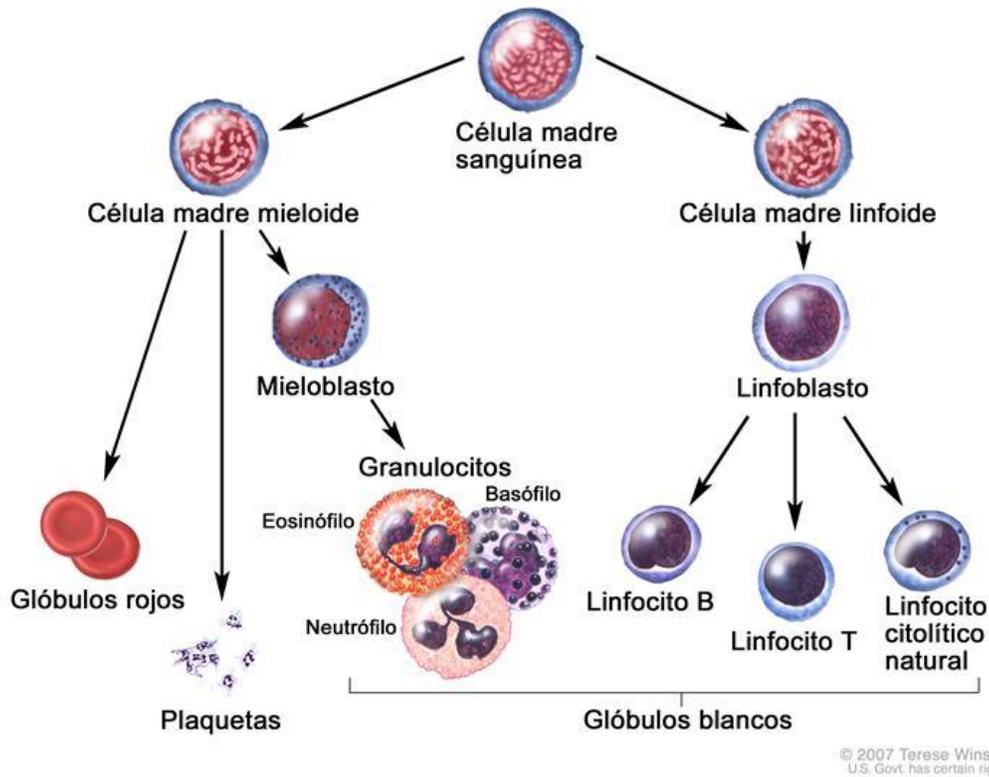


Figura 1. Células madre hematopoyéticas y células sanguíneas adultas. Extraído de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemiamielogena/Patient/page1>⁽⁵⁾

1.2. Clasificación de la Leucemia Mieloide Crónica

La leucemia mieloide crónica (LMC) se considera una neoplasia mieloide que se incluye dentro del grupo de neoplasias mieloproliferativas y surge a partir de una célula madre pluripotencial anormal de la médula ósea. Se asocia a la presencia del gen de fusión *BCR-ABL1* localizado en el Cromosoma Philadelphia (Cr Ph), producto de la translocación t(9;22)(q34;q11.2) (Figura 2), y se caracteriza por una leucocitosis neutrofílica o, dicho de otra manera, aumento del número de neutrófilos en diferentes estadios de maduración y sin displasia significativa (2).

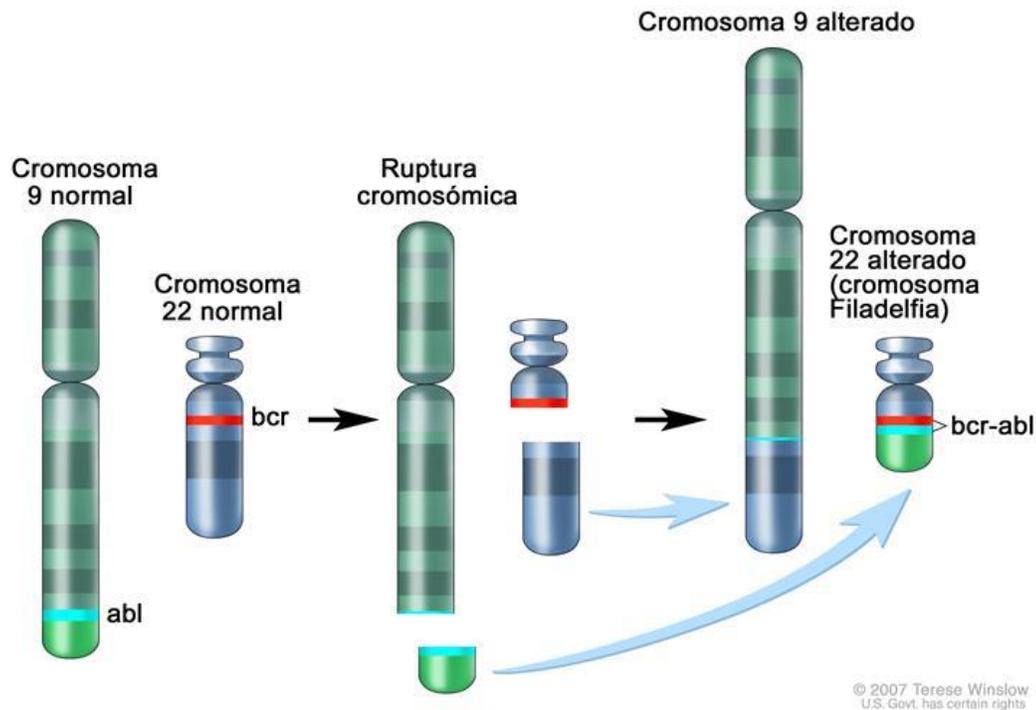


Figura 2. Formación del cromosoma Philadelphia. Extraído de <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemiamielogena/Patient/page1>⁽⁵⁾

1.3.Epidemiología y etiología de la LMC

La incidencia anual de la LMC es de uno a dos casos por cada 100.000 individuos a nivel mundial, observándose cierta predominancia en hombres con una relación hombre:mujer de 1,4:1. Constituye 14% de todas las leucemias y 20% de las leucemias en adultos. Esta enfermedad puede presentarse en cualquier etapa de la vida, sin embargo resulta muy rara en niños (menos del 5% de las leucemias infantiles) ya que la mediana de edad al diagnóstico es de 65 años (2,6,7).

Una de las causas que se logró asociar al origen de esta enfermedad es la exposición a radiaciones ya que se registró una mayor frecuencia en individuos expuestos a la bomba atómica lanzada en Japón en 1945, en radiólogos y en individuos con espondilitis anquilosante

tratados con radioterapia. Se desconocen factores que predispongan a esta enfermedad, aparentemente no existe predisposición hereditaria alguna ya que la alteración genética característica de esta patología, la translocación t (9;22), sólo se encuentra en células hematopoyéticas y no se ha encontrado un aumento de la incidencia de la enfermedad en gemelos monocigóticos ni en parientes de pacientes (2,6,7).

1.4. Clínica de la Leucemia Mieloide Crónica

La historia natural de la LMC se inicia con una Fase Crónica que luego progresa a una Fase Acelerada, con una transformación final en Fase Terminal o Crisis Blástica (6–8).

1.4.1. Fase Crónica

En su mayoría, casi el 90% de los pacientes, son diagnosticados durante esta fase que puede tener una duración entre 3 y 5 años. Entre los síntomas reportados con mayor frecuencia se encuentran: fatiga, sangrados que pueden estar relacionados a conteo y funcionamiento anormales de plaquetas, pérdida de apetito y molestias en el bazo. Otros síntomas que pueden acompañar son: fiebre, sensación de debilidad, dolores de cabeza y sudores nocturnos. Entre un 40 y 60% de los pacientes presenta esplenomegalia y entre 10-20% hepatomegalia al momento del diagnóstico. La leucocitosis es un rasgo común ($12-1000 \times 10^9/L$, mediana de aproximadamente $100 \times 10^9/L$) y puede ser detectada accidentalmente en análisis de sangre de rutina, lo cual ha generado un aumento en la incidencia de pacientes asintomáticos de un 15% a un 20-40 %. Aun cuando el conteo de glóbulos blancos sea alto, las formas inmaduras o blastos no superan el 2% en sangre periférica. En médula ósea se puede constatar un aumento de la celularidad debido a la proliferación de granulocitos en distintos estadios de maduración y un porcentaje de blastos de alrededor del 5% (7–9).

1.4.2. Fase Acelerada

Puede presentar una duración entre 6 a 18 meses y se caracteriza por un aumento de blastos tanto en médula ósea como en sangre periférica (10-19%). En esta última se observa además un aumento de basófilos circulantes (20% o más). Otros síntomas que acompañan son: resistencia a la terapia, agudización de los síntomas presentes en fase crónica, esplenomegalia progresiva, aparición de nuevas anomalías citogenéticas además del Cr Ph, leucocitosis persistente, trombocitosis o trombocitopenia. Entre un 10-20% de los pacientes fallece durante esta fase (6–8).

1.4.3. Fase Terminal o Crisis Blástica

Esta fase asemeja una leucemia aguda y puede ser diagnosticada por la presencia de blastos en una frecuencia mayor al 20% en sangre periférica o médula ósea así como la proliferación extramedular de blastos. Estos últimos pueden corresponder al linaje mieloide (70% de los casos) o linfoide (20-30%). Se acompaña de síntomas como pérdida de peso, fiebre, sudores nocturnos, dolor de hueso, infecciones y sangrados (2,7).

1.5. Citogenética de la Leucemia Mieloide Crónica

La alteración citogenética característica de la LMC es la translocación t(9;22) (q34;q11.2) descrita por Nowell y Hungerford como un cromosoma más pequeño al que denominaron Cromosoma Philadelphia (Cr Ph)(10). Casi una década después fue Rowley quien determinó que se trataba de una translocación recíproca entre el brazo largo del cromosoma 9 y el brazo largo del cromosoma 22 (11). Esta translocación se encuentra en el 90-95% de los casos de LMC. El 5 a 10% restante puede presentar translocaciones más

complejas que involucren 3, 4 o incluso 5 cromosomas además del 9 y del 22 o una translocación críptica no identificable por métodos de citogenética convencional. Entre los cromosomas más frecuentes observados en estas translocaciones complejas se reportan el 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 15, 16 y 17. Los métodos de análisis mediante hibridación fluorescente in situ (*FISH*), transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y *Southern Blot* son necesarios para determinar la presencia del gen de fusión *BCR-ABL1* tanto en el caso de translocaciones complejas como crípticas (12–15).

Cuando son observadas otras anomalías cromosómicas en 86% de los pacientes con LMC se encuentran asociadas a progresión de la enfermedad hacia la Fase Acelerada. Según la frecuencia con la cual se registran se clasifican en alteraciones de la ruta principal y alteraciones de la ruta secundaria. Entre las primeras se encuentran las anomalías +8, i (17q), +19 y Cr Ph extra, reportadas en un 71% de los pacientes. En el segundo grupo, que constituye 15% de los pacientes, se pueden observar las alteraciones numéricas como -7, -17, +17, +21, -Y y la alteración estructural t (3;21) (q26;q22) (16).

1.6. Biología Molecular de la Leucemia Mieloide Crónica

A nivel molecular, la translocación t(9;22)(q34;q11.2) fusiona el gen BCR situado en el cromosoma 22 con el gen ABL localizado en el cromosoma 9 (Figura 2). Esto genera un nuevo gen de fusión que a su vez producirá un ARN mensajero anómalo o transcripto de fusión que posteriormente será traducido a la proteína BCR-ABL. Dicha proteína presenta actividad oncogénica y otorga a la célula madre hematopoyética características de una célula neoplásica como: adhesión celular alterada, activación constitutiva de la señalización mitogénica y reducción de la apoptosis celular (3,17,18).

1.6.1. Genes implicados

Se conoce poco sobre la función normal desempeñada por el gen *BCR*, cuyo producto presenta una localización intracelular citoplasmática. Sin embargo se sabe que se expresa de manera constitutiva, con niveles altos tanto en cerebro como en tejidos hematopoyéticos, así como en los primeros estadios del proceso de diferenciación mieloide (17,19).

Por su parte, el gen *ABL1* codifica para una proteína tirosin quinasa de localización nuclear, estrechamente regulada y con implicación en procesos de diferenciación, división y adhesión celular, así como en respuesta al estrés. Sin embargo, la proteína BCR-ABL1 se localiza en el citoplasma y su dominio ABL1 presenta actividad tirosin quinasa constitutiva (20).

1.6.2. Puntos de ruptura

Se han descrito distintos puntos de ruptura a nivel del gen *BCR*. Dichos puntos, situados en los intrones, se agrupan en tres regiones conocidas como *Major breakpoint cluster region (M-bcr)*, *minor breakpoint cluster region (m-bcr)* y *Micro breakpoint cluster region (μ -bcr)* (Figura 3). Esta diversidad de puntos de ruptura a nivel del ADN origina transcritos de fusión de distintos tamaños que se traducen a proteínas quiméricas con distinto peso molecular (Figura 4)(18).

Así, se observa que cuando el punto de ruptura se encuentra en la región correspondiente a *M-bcr* que abarca los exones 12 al 16 del gen (conocidos como b1-b5) se pueden generar los transcritos de fusión b2a2 y b3a2 mediante corte y empalme alternativo

que codifican para una proteína quimérica de 210 kDa y presentes en más del 90% de los pacientes con LMC y en el 35% de las LLA de adultos Ph+ (21,22).

Cuando el punto de ruptura se localiza en la región *m-bcr* se genera un transcripto de fusión e1a2, que combina el exón 1 del *BCR* con el exón 2 del *ABL1*. Dicho punto de ruptura se encuentra presente en el 65% de las LLA Ph+ en adultos, 80% de las LLA Ph+ infantiles, casos esporádicos de LMC con exclusiva producción de este transcripto y en bajas cantidades en más del 90% de los pacientes LMC con expresión de p210 mediante mecanismo de corte y empalme alternativo. Dicho transcripto se traduce en una proteína de 190 kDa que ha reportado mayor actividad oncogénica en experimentos in-vitro (18,21–23).

Por último, cuando el punto de ruptura corresponde a la región *μ-bcr* se produce el transcripto de fusión e19a2 que se traduce en una proteína de 230 kD que se asocia a un cuadro más benigno con mayor maduración neutrofílica y/o trombocitosis (22).

En relación al gen *ABL1*, el punto de ruptura en el cromosoma 9 se mantiene relativamente constante, situándose en la región 5' al exón a2, aunque pueden existir rupturas esporádicas en la región 3' propiciando la fusión con el exón a3 (Figura 3) (18).

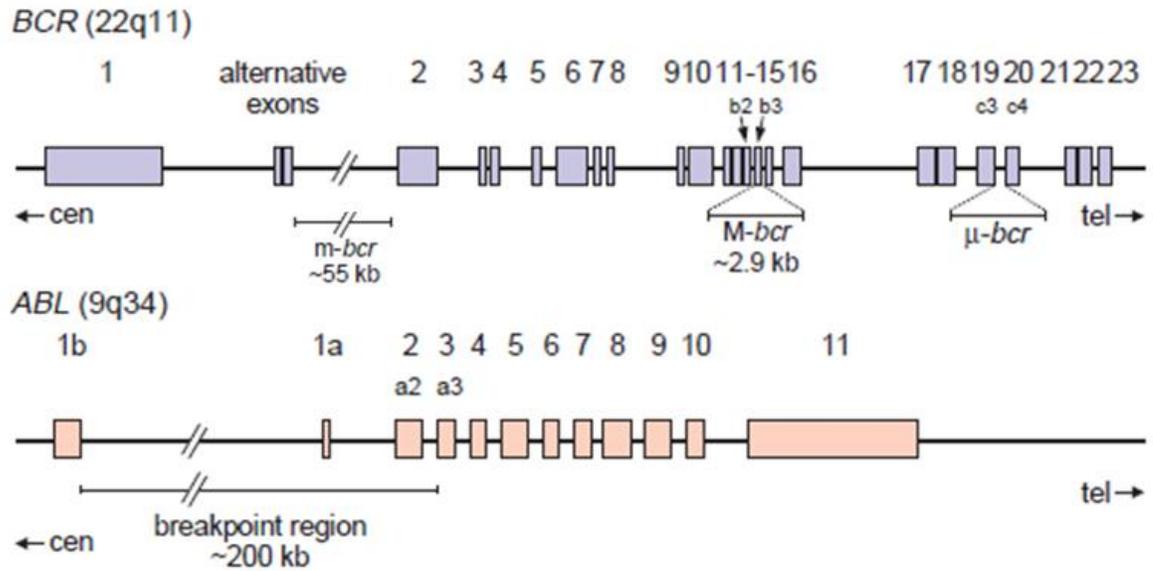


Figura 3. Puntos de ruptura más frecuentes de los genes *BCR* y *ABL1*. El gen *BCR* presenta tres puntos de ruptura principales: *M-bcr*, *m-bcr* y μ -*bcr*. El gen *ABL1* presenta su punto de ruptura en una región de aproximadamente 200 kb (*breakpoint region*) que se sitúa entre los exones 1b y 3 (a3). *Alternative exons*: exones alternativos. Cen: centrómero. Tel: telómero. Extraído de *van Dongen et al 1999*⁽¹⁸⁾.

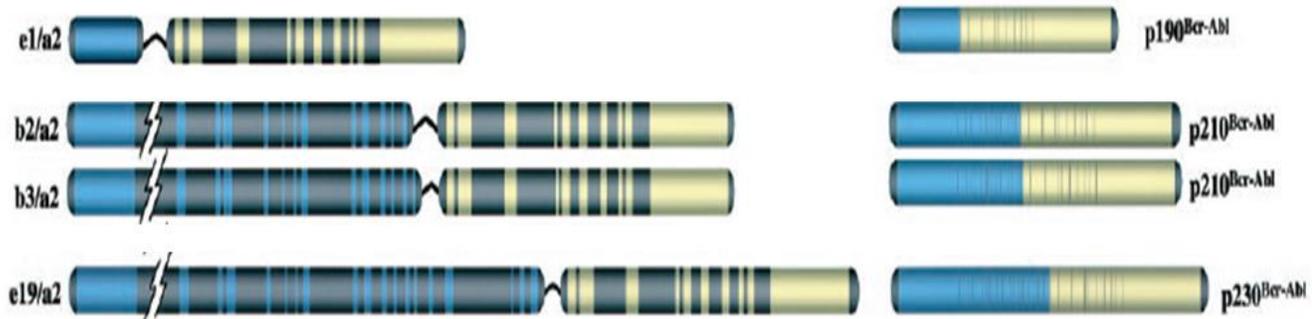


Figura 4. Tipos de transcripto *BCR-ABL1* y su correspondiente proteína BCR-ABL1. Se observan cuatro tipos de transcritos: e1a2, b2a2, b3a2 y e19a2; que se traducen a proteínas BCR-ABL1 de 190, 210 y 230 kilo Dalton. Extraído de *Laurent et al 2001*⁽¹⁹⁾.

1.6.3. Importancia de la determinación del punto de ruptura

La importancia de caracterizar el tipo de transcripto correspondiente a un paciente radica en que el mismo se encuentra asociado a un determinado fenotipo (Figura 5), pudiendo asemejar otra patología. Como ya se ha mencionado, en aquellos casos en los que se han descrito la presencia del transcripto p230 se observa un predominio de neutrófilos maduros y el cuadro presenta un curso similar a la Leucemia Neutrofílica Crónica, de progresión lenta. Por otro lado, aquellos casos que presentan el transcripto correspondiente a la proteína p190 presentan un curso de la enfermedad similar a la Leucemia Mielomonocítica Crónica, con un número aumentado de monocitos. Sin embargo, según *Melo et al* 1996, siempre que se confirma la presencia de algún transcripto de fusión *BCR-ABL1*, se debe clasificar el cuadro como LMC (22).

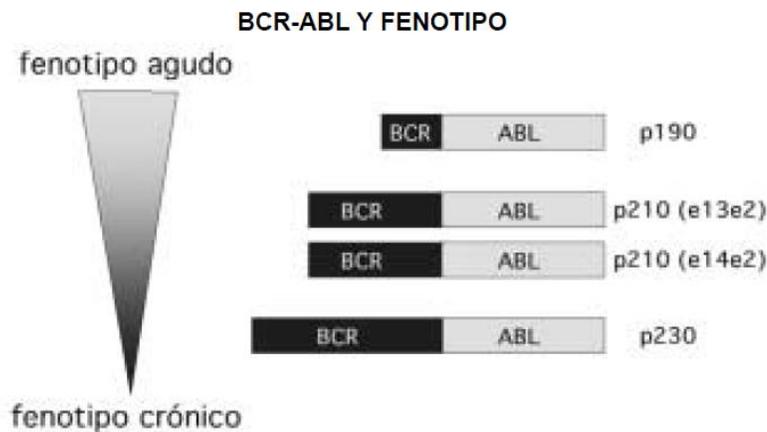


Figura 5. Relación entre tipo de transcripto y fenotipo de la enfermedad. Extraído de *Giraldo-Cstellano et al* 2003 ⁽²⁴⁾.

Desde un punto de vista técnico, es necesario primeramente identificar el punto de ruptura correspondiente para posteriormente medir la expresión del transcripto detectado ya que en el primer caso se recurre a una RT-PCR de punto final y en el segundo a una RT-PCR en tiempo real o cuantitativa. En este último método para cada tipo de transcripto se

utiliza un conjunto de cebadores y sondas específicos para medir la expresión de los diferentes tipos de transcritos (21). En resumen, la RT-PCR de punto final permite la detección del tipo de transcrito y la RT-PCR en tiempo real o cuantitativa permite medir su expresión.

1.6.4. Proteína BCR-ABL1.

La proteína BCR-ABL1 es el producto de la expresión del nuevo gen de fusión *BCR-ABL1* localizado en el Cr Ph. Sus propiedades oncogénicas surgen a partir de la combinación de dominios funcionales de la proteína BCR junto con aquellos de la proteína ABL1. La proteína BCR presenta en su extremo N-terminal un dominio de oligomerización (Figura 6) capaz de formar tetrámeros. Al ocurrir esto, se produce la fosforilación de los dominios *Src-homology 1* (SH1) con actividad tirosin quinasa situados en la proteína ABL. Esto a su vez produce la activación de las vías de señalización Ras-MAPK y Akt dando como resultado global aumento de la proliferación, reducción de la adherencia celular e inhibición de la apoptosis (17,19).

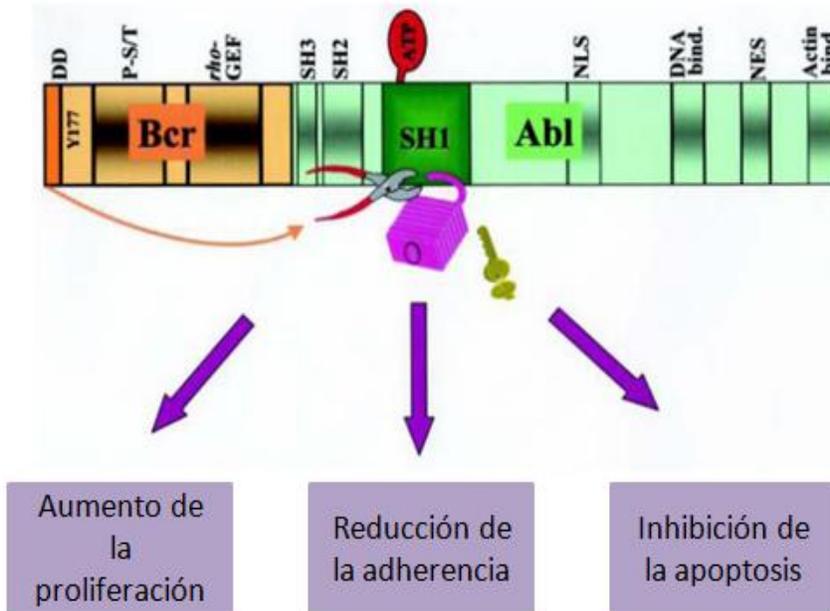


Figura 6. Efecto del dominio de dimerización del BCR en la activación de SH1 y su actividad tirosin quinasa en el dominio ABL. DD: Dominio de dimerización. Y177: Tirosina 177, sitio de autofosforilación para unión de proteínas adaptadoras. P-S/T: Secuencias ricas en fosfoserina y fosfotreonina. Rho-GEF: Región homóloga la factor Rho de intercambio de nucleótidos de guanidina. SH1: Dominio 1 de homología con la familia Src. SH2: Dominio 2 de homología con la familia Src. SH3: Dominio 3 de homología con la familia Src. NLS: Señal de localización nuclear. *DNA bind.*: Sitio de unión a ADN. NES: Señal de exportación al núcleo. *Actin bind.*: Dominio de unión a actina. Extraído de *Melo et al 2003*⁽¹⁷⁾.

1.7. Diagnóstico de la Leucemia Mieloide Crónica

El diagnóstico de LMC se realiza teniendo en cuenta datos clínicos, de laboratorio y citogenético del paciente. Los síntomas clínicos incluyen aquellos referidos en la Sección 1.3.1.

1.7.1. Hallazgos de Laboratorio en Sangre

En sangre periférica se puede constatar: Recuento de leucocitos elevado, granulocitos en todas las etapas de desarrollo y de aspecto normal, prevalencia media de células blásticas del 3% con variaciones del 0% al 10 %, prevalencia de progranulocitos alrededor del 4%, precursores

mieloides (mielocitos, metamielocitos y formas en banda) representan alrededor del 40 %, neutrófilos segmentados constituyen alrededor del 35 %, baja actividad de la fosfatasa alcalina en neutrófilos, proporción de eosinófilos no aumentada pero con recuento absoluto elevado, aumento absoluto de la concentración de basófilos, recuento absoluto de linfocitos también elevado, recuento de plaquetas elevado en 50% de los pacientes y anomalías funcionales de los neutrófilos leves por lo cual los pacientes no son muy susceptibles a infecciones con patógenos oportunistas (25).

1.7.2. Hallazgos de Laboratorio en Médula Ósea

En médula ósea se puede observar hiper celularidad debido a que el tejido hematopoyético integra el 75% al 90% del volumen medular, grasa reducida, granulopoyesis dominante con un cociente granulocítico/eritroide de 10-30:1 versus normal de 2-4:1, eritropoyesis reducida, megacariocitos normales o más numerosos de lo común, eosinófilos y basófilos aumentados en relación al aumento observado en sangre, incremento de figuras mitóticas y fibrosis de reticulina debido al aumento del colágeno tipo III que se correlaciona con mayor tamaño del bazo, anemia más intensa y mayor proporción de blastos en médula y sangre periférica (25).

1.7.3. Citogenética

Al momento del diagnóstico debe estar presente la translocación t(9;22)(q34;q11.2) cuyo derivado 22 lleva el nombre de Cr Ph. Si esta alteración no puede ser identificada al microscopio, la presencia del rearrreglo *BCR-ABL1* comprobada ya sea por *FISH*, RT-PCR o Southern Blot es necesaria para un correcto diagnóstico (2). Entre estas últimas técnicas citadas, la RT-PCR resulta la más conveniente en cuanto a costo y rapidez se refiere para la detección

del transcripto *BCR-ABL1*. Además, otra ventaja de esta técnica es su sensibilidad frente a las técnicas de citogenética convencional (0,1% -0,01% vs 1%)(18,26). Por lo tanto, la RT-PCR permite la detección del transcripto *BCR-ABL1* con mayor rapidez, mayor sensibilidad frente a la citogenética y a un menor costo.

1.8.Tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica

Poco después de las primeras descripciones de la enfermedad, en la segunda mitad del siglo XIX, la LMC era tratada con arsénico o benceno. A inicios del siglo XX se introdujo la radioterapia y posteriormente la quimioterapia que inicialmente era llevada a cabo con Busulfan y posteriormente con Hidroxiurea, la cual sigue siendo utilizada hasta hoy día en nuestro medio, ya sea como tratamiento previo a otras terapias o para tratar otras neoplasias mieloproliferativas (27,28). A principios de los años 80 ya se utilizaba el trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas para tratar a los pacientes. Este fue el primer tratamiento que logró cambiar el curso natural de la enfermedad y proporcionar una cura definitiva para algunos. Sin embargo, dicho procedimiento puede representar mayor riesgo en aquellos pacientes mayores a 40 años, en etapas avanzadas de la enfermedad luego de sucesivos tratamientos o sin un donante compatible. Así, como opción de tratamiento para aquellos pacientes en los cuales el trasplante implica un alto riesgo, se utilizó la aplicación de interferón α en combinación con citarabina consiguiéndose respuestas citogenéticas completas frente al uso de otras drogas como Hidroxiurea (28,29).

Durante la década de los noventa se desarrollaron drogas inhibidoras de la tirosin quinasa que tenían como blanco terapéutico a la proteína *BCR-ABL1*. Entre ellas surgió el Imatinib cuya eficacia fue comprobada en el estudio *International Randomized Study of*

Interferon versus STI571(IRIS) frente al interferón α en combinación con citarabina (30). En dicho estudio, el porcentaje de respuesta citogenética completa (ausencia de metafases positivas para el cromosoma Ph) fue del 68% en el grupo tratado con Imatinib frente al 7% del grupo tratado con interferón. Esta terapia constituye el primer ejemplo de diseño de una droga dirigida a un blanco molecular subyacente a una patología neoplásica. Esto propició un cambio en el esquema de tratamiento de la LMC que requirió de nuevos delineamientos referentes al manejo de los pacientes (28,30).

Actualmente, siguiendo los delineamientos de la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)*, para un paciente diagnosticado con LMC en fase crónica se recomienda una de las siguientes opciones de tratamiento con inhibidor de la tirosina quinasa: Imatinib 400 mg/día, Nilotinib 300 mg dos veces al día o Dasatininib 100 mg/día. En Paraguay se cuenta con el Imatinib desde el año 2003 y recientemente se incorporó el Nilotinib (31). En cuanto a los pacientes diagnosticados en fase avanzada se recomiendan las opciones de tratamiento indicadas en la Figura 7.

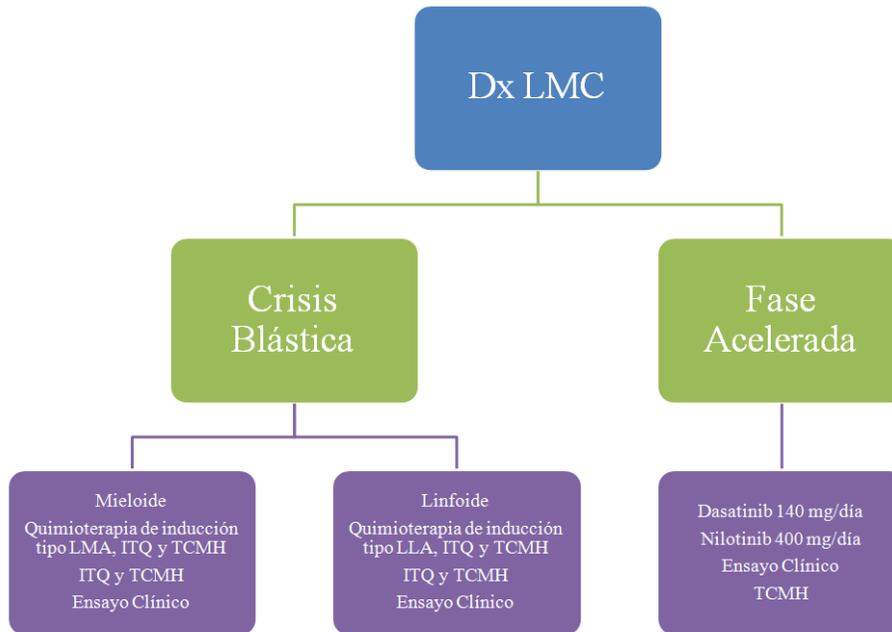


Figura 7. Tratamiento de primera línea de pacientes con LMC diagnosticados en Crisis Blástica o Fase Acelerada. LMA: Leucemia Mieloide Aguda. LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda. ITQ: Inhibidor de la tirosina quinasa. TCMH: Transplante de células madre hematopoyéticas. Adaptado de *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology*³².

Los inhibidores de tirosina quinasa han incrementado la sobrevida de los pacientes (Figura 8) (7). Sin embargo mutaciones en el dominio *ABL1* quinasa del *BCR-ABL1* que confieren resistencia a los inhibidores de la tirosina quinasa disponibles al público u otros mecanismos como la evolución cariotípica clonal, la activación de una tirosina quinasa alternativa, la sobreexpresión del gen de resistencia a drogas y presencia de células quiescentes Ph+ positivas insensibles al Imatinib constituyen causas de falla del tratamiento (33), por lo que se requiere de un seguimiento adecuado que permita detectar respuestas subóptimas a fin de reorientar el tratamiento antes del surgimiento de recaídas.

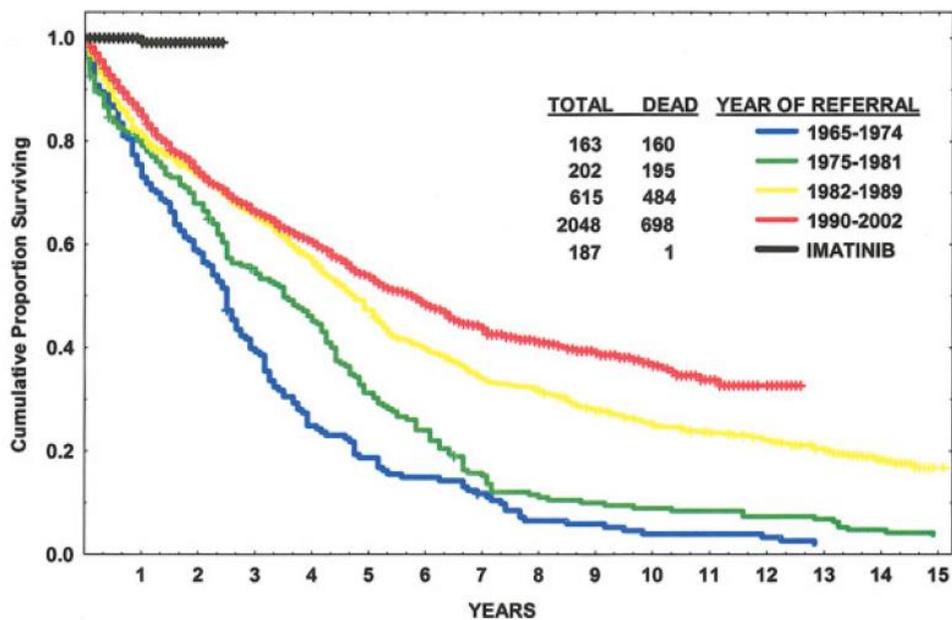


Figura 8. Proporción acumulada de supervivencia de pacientes con leucemia mieloide crónica diagnosticados en fase crónica temprana (datos obtenidos en el M.D. Anderson entre 1965 y 2002). *Years*: Años. *Cumulative Proportion Surviving*: Proporción acumulada de supervivencia. *Dead*: Muerte. *Year of referral*: Año de referencial. Extraído de *García-Manero et al 2003*⁽⁷⁾.

1.9. Evaluación de la respuesta al tratamiento en la Leucemia Mieloide Crónica

La respuesta de un paciente que inicia tratamiento con inhibidores de tirosin quinasa debe ser evaluada a tres niveles: hematológico, citogenético y molecular. Para cada nivel se toman criterios bien definidos (Tabla 1) que permiten determinar si un paciente presenta una respuesta óptima, subóptima o falla del tratamiento.

Tabla 1. Criterios de respuesta hematológica, citogenética y molecular. Extraído y adaptado de *Baccarani et al 2006*(34) & *NCCC Clinical Practice Guidelines in Oncology*(32)

Nivel de Respuesta	Criterios de Respuesta
Respuesta Hematológica	<ul style="list-style-type: none"> • Normalización del conteo de glóbulos blancos en sangre periférica $< 10 \times 10^9/L$. • Contaje de plaquetas $< 450 \times 10^9/L$ en sangre periférica. • Ausencia en sangre periférica de formas inmaduras: mielocitos, promielocitos y blastos. • Sin síntomas clínicos ni bazo palpable.
Respuesta Citogenética	<ul style="list-style-type: none"> • Completa: ausencia de metafases Ph+ positivas en médula ósea. • Parcial: 1%-35% de metafases Ph+ positivas en médula ósea. • Mayor (Completa + Parcial): 0%-35% de metafases Ph+ positivas en médula ósea. • Menor: 36%-65% de metafases Ph+ en médula ósea. • Mínima: 66%-95% de metafases Ph+ en médula ósea. • Nula: $> 95\%$ de metafases Ph+ en médula ósea.
Respuesta Molecular	<ul style="list-style-type: none"> • Respuesta molecular completa: transcripto <i>BCR-ABL1</i> indetectable en Escala Internacional en sangre periférica. • Respuesta molecular mayor: disminución equivalente 3 logaritmos en base 10 a partir de un valor de base de <i>BCR-ABL1</i> en sangre periférica.

De esta forma, una respuesta óptima implica una respuesta hematológica completa a los tres meses junto con una respuesta citogenética menor o una cantidad de transcripto *BCR-ABL1* $\leq 10\%$ en escala internacional, una respuesta citogenética parcial a los seis meses, una respuesta citogenética completa a los 12 meses y una respuesta molecular mayor a los 18 meses de tratamiento. Los demás criterios que determinan una respuesta subóptima o falla al tratamiento se listan en la Tabla 2.

Tabla 2. Criterios de respuesta óptima, subóptima y falla al tratamiento. Extraído y adaptado de *Baccarani et al 2006* (34) & *NCCC Clinical Practice Guidelines in Oncology*(32).

Tiempo	Respuesta Óptima	Respuesta Subóptima	Falla
3 meses	RHC y RCgMe o $BCR-ABL1 \leq 10\%$ en EI	Sin RCg o $BCR-ABL1 \geq 10\%$ en EI	Sin RHC
6 meses	RCgP	Sin RCgP	Sin RCg
12 meses	RCgC	RCgP	Sin RCgP
18 meses	RMM	Sin RMM	Sin RCgC

RHC: Respuesta Hematológica Completa. RCg: Respuesta Citogenética. RCgP: Respuesta Citogenética Parcial. RCgMe: Respuesta Citogenética Menor. RCgC: Respuesta Citogenética Completa. RMM: Respuesta Molecular Mayor. EI: Escala Internacional.

1.9.1. Evaluación de la Respuesta Molecular en la Leucemia Mieloide Crónica.

Con la llegada de las drogas inhibidoras de la tirosina quinasa, la eficacia del tratamiento ha impulsado la implementación de técnicas con mayor sensibilidad, como la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* por qRT-PCR, que permitan el seguimiento de la enfermedad residual mínima más allá de la respuesta citogenética completa (30,35). Ya a finales de los años noventa se implementó el monitoreo del tratamiento mediante la medición de los niveles de transcripto *BCR-ABL1* en sangre periférica por RT-PCR cuantitativa o en tiempo real y se comprobó una buena correlación con el porcentaje de células con cromosoma Philadelphia en médula ósea. Esta técnica de cuantificación fue implementada a raíz de que muchos pacientes en remisión citogenética luego de un trasplante de médula ósea permanecían *BCR-ABL1* positivos por la técnica de RT-PCR cualitativa o de punto final durante varios meses sin recaer. Por lo tanto, la presencia o ausencia del transcripto *BCR-ABL1* no es predictiva de una recaída. En cambio, la cuantificación de los niveles de *BCR-ABL1* permitió discriminar aquellos

pacientes con niveles estables o en descenso de aquellos con niveles en aumento, siendo este último caso predictivo de una recaída (36). Actualmente, tanto la *European Leukemia Net* como la *National Cancer Comprehensive Network* recomiendan el monitoreo de la respuesta molecular cada 3 a 6 meses una vez obtenida una respuesta citogenética completa (32,34,37).

A partir del surgimiento del monitoreo molecular, la respuesta molecular mayor (RMM) ha surgido como marcador pronóstico de la respuesta al tratamiento. La misma fue definida a partir del estudio *IRIS* como una reducción de 3 logaritmos en base 10 a partir de un valor de base estandarizado. Dicho valor de base fue obtenido a partir de la cuantificación de alícuotas de 30 pacientes con LMC sin tratamiento alguno analizadas por los tres laboratorios que conformaron parte de este estudio. La mediana de los valores de cuantificación obtenidos en cada laboratorio fue el valor de base estandarizado. De esta forma, si la mediana obtenida como la relación $\%BCR-ABL/ABL$ correspondió a 65, una relación de 0,065 representa una reducción de tres logaritmos a partir del valor de base estandarizado siendo equivalente a una RMM (30).

A partir del seguimiento de los pacientes en el brazo Imatinib del estudio *IRIS* se ha logrado asociar una RMM a los 18 meses con una probabilidad del 98% de sobrevida libre de evento y 100% sin progresión a fase acelerada o crisis blástica a los 72 meses de seguimiento (38). También se ha visto una asociación entre una disminución del nivel de transcripto igual o mayor a 1 logaritmo en base 10 a los 3 meses de tratamiento y una probabilidad del 93% de sobrevivencia libre de progresión a los 8 años del diagnóstico frente a una probabilidad del 87% en aquellos pacientes con una disminución del nivel del transcripto menor a 1 logaritmo a los tres meses de tratamiento (39). En consecuencia, la respuesta molecular del paciente a los tres meses ya permite discriminar a aquellos pacientes con una respuesta óptima de aquellos que

necesitarán ajustes en el tratamiento a fin de incrementar su probabilidad de obtener una buena respuesta a largo plazo.

Dada la importancia de la medición de los niveles de transcrito *BCR-ABL1* en el seguimiento del tratamiento y pronóstico de los pacientes, se han llevado a cabo esfuerzos a fin de estandarizar las distintas metodologías de qRT-PCR minimizando las variaciones interlaboratoriales: por un lado, a través de recomendaciones relacionadas a la obtención de la muestra, procesamiento y análisis; y por otro lado, a través de la generación de factores de conversión que permiten expresar resultados en una escala internacional y hacerlos comparables entre uno u otro centro (Figura 9A) (35,40,41). En esta escala se toman como referencia dos valores obtenidos en el estudio *IRIS*: el valor de base que corresponde al 100% y la RMM que equivale a 0,1% (22,35,40). La implementación de los factores de conversión ha demostrado ser factible y ha contribuido a disminuir las variaciones interlaboratoriales (Figura 9B) (35). De esta manera se pueden obtener resultados de cuantificación del transcrito *BCR-ABL1* equiparables a nivel internacional.

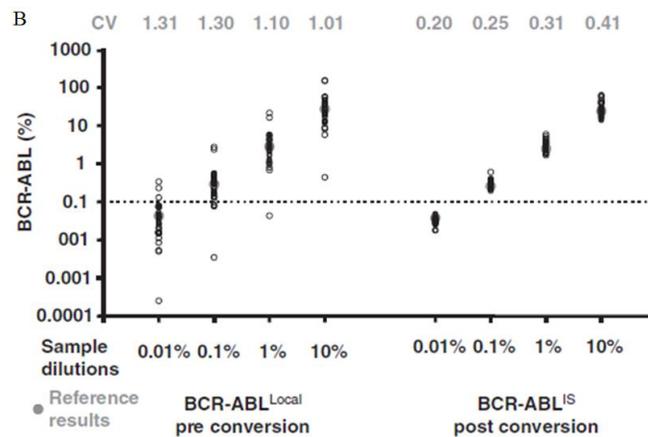
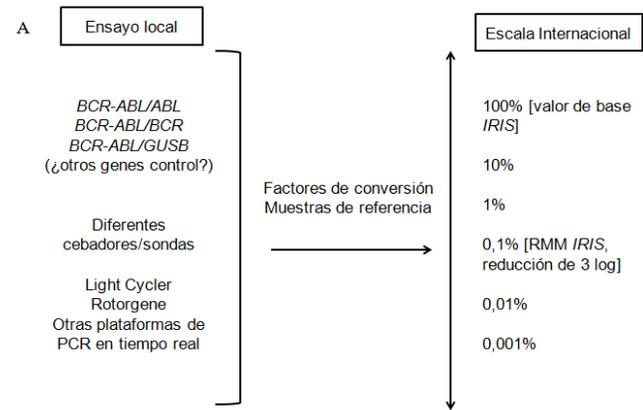


Figura 9. A. Esquema de conversión de resultados de cuantificación de transcripto *BCR-ABL1* a escala internacional por medio de la utilización de un factor de conversión. B. Aplicación de los factores de conversión a los resultados de los ensayos locales. CV: Coeficiente de variación. *Sample dilutions*: Diluciones de muestras preparadas a partir de células de un paciente sin tratamiento y células de un donador sano, indicándose el porcentaje de células del paciente para cada dilución. *Reference results*: Resultados de referencia obtenidos en el laboratorio Mannheim en Europa el cual cuenta con un factor de conversión validado en Adelaida, Australia. *IS(International Scale)*: Escala Internacional. Extraído y adaptado de Müller *et al* 2009(35)

1.9.2. Perspectivas futuras del tratamiento y seguimiento de la Leucemia Mieloide

Crónica.

Estudios recientes han comprobado la efectividad como tratamiento de primera línea de los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación, Dasatinib y Nilotinib, frente al Imatinib (42,43) por lo que hoy día ya se incluyen estos fármacos como opción de tratamiento de primera línea en la guía clínica de la *National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* (32). Sin embargo, a pesar de su efectividad, existen mutaciones en el dominio ABL1 quinasa de la proteína BCR-ABL1 como la T315I que produce un cambio de una tirosina por una isoleucina en la posición 315 de la proteína confiriendo resistencia a las drogas actualmente disponibles (20). Para aquellos pacientes portadores de esta mutación se están desarrollando nuevas drogas capaces de contrarrestarla, como el DOC-2036, que están siendo estudiadas además en pacientes Ph+ con LLA y en aquellos intolerantes al Dasatinib y al Nilotinib (44,45).

Recientemente fue aprobada por la *Food and Drug Administration (FDA)* el Ponatinib (Iclusig), evaluado en el ensayo PACE que incluyó pacientes con LMC en distintas fases de la enfermedad y pacientes con LLA Ph+ (42)(46). Entre estos pacientes se encontraron portadores de la mutación T315I e intolerantes a otros inhibidores de tirosina quinasa como Dasatinib y Nilotinib (44).

Con respecto a los pacientes que continúan siendo tratados con inhibidores de tirosina quinasa y que han respondido de manera óptima, alcanzando niveles de *BCR-ABL1* indetectables, se están llevando a cabo estudios de suspensión del tratamiento y seguimiento a fin de determinar si los pacientes mantienen su respuesta o presentan recaída,

obteniéndose resultados similares tanto en pacientes tratados con Imatinib como en aquellos tratados con Nilotinib o Dasatinib (47,48). Se ha reportado que el 40% de los pacientes, bajo tratamiento con Imatinib y con respuesta molecular completa de por lo menos dos años, ha conseguido luego del retiro de la droga mantenerse en remisión molecular por un mínimo de dos años (49). El hecho de que algunos pacientes mantengan su respuesta frente a la suspensión del tratamiento y otros no ha suscitado nuevas interrogantes en relación a las células madres leucémicas quiescentes, su respuesta a los inhibidores de la tirosina quinasa y los mecanismos que estarían implicados (50).

En base a todo lo expuesto, se puede afirmar que la aparición de los inhibidores de la tirosina quinasa ha supuesto un cambio de paradigma en el tratamiento y seguimiento de los pacientes con LMC. Las técnicas de biología molecular han asumido un papel preponderante tanto al diagnóstico como en el seguimiento, ayudando a determinar el pronóstico de los pacientes desde etapas tempranas y brindando datos que permitan la optimización de los regímenes de tratamiento. Este estudio ha logrado implementar las técnicas moleculares de RT-PCR y qRT-PCR posibilitando por primera vez en el país la detección del tipo de transcripto *BCR-ABL1* y su cuantificación en pacientes de la población paraguaya, contribuyendo al diagnóstico y manejo de los pacientes en tratamiento. Además, con la llegada del Nilotinib al país, es imprescindible contar con el monitoreo de la respuesta molecular que permitirá identificar con antelación a aquellos pacientes cuya respuesta al Imatinib no sea óptima, sin necesidad de acudir a centros en el extranjero que implican un alto costo económico no accesible para la mayoría de los pacientes paraguayos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General

Identificar y cuantificar los transcritos *BCR-ABL1* resultantes de la translocación cromosómica 9,22 t(9; 22) (q34; q11) en pacientes con sospecha clínica y en tratamiento de LMC que concurrieron al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud desde el Hospital Central Dr. Emilio Cubas del Instituto de Previsión Social, el Hospital de Clínicas-Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción y el Hospital Nacional de Itaguá del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, mediante técnicas de biología molecular como PCR transcripción reversa (RT-PCR) y PCR transcripción reversa cuantitativa (qRT-PCR).

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar la presencia e identificar el tipo de transcripto *BCR-ABL1* por la técnica de RT-PCR de punto final en pacientes paraguayos con LMC.
- Determinar la frecuencia de los tipos de transcripto en pacientes paraguayos con LMC.
- Cuantificar el transcripto *BCR-ABL1* por la técnica de qRT-PCR en pacientes paraguayos con LMC.
- Determinar la respuesta molecular a partir de la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* obtenida en pacientes paraguayos con LMC en tratamiento.

3. Materiales y Métodos

3.1. Diseño del Estudio

Este trabajo consistió en un estudio observacional, descriptivo, de corte transversal con muestreo no probabilístico de casos consecutivos en el cual se estudiaron pacientes paraguayos con sospecha clínica de LMC (sin diagnóstico) y con LMC (diagnóstico confirmado por cariotipo) remitidos al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud entre Abril de 2011 y Julio de 2012. Estos pacientes fueron enviados por profesionales médicos hematólogos de tres hospitales públicos: Hospital Central Dr. Emilio Cubas del Instituto de Previsión Social, Hospital de Clínicas-Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción y Hospital Nacional de Itaguá del Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social.

Se incluyeron dentro del estudio pacientes con sospecha clínica de LMC que presentaron alguno de los siguientes síntomas como fatiga excesiva, pérdida de sensación de bienestar, disminución de la tolerancia al ejercicio, anorexia, molestias abdominales, saciedad precoz, pérdida de peso, sudoración excesiva, esplenomegalia e hipersensibilidad esternal junto con resultados de recuentos de células sanguíneas y frotis sanguíneos indicativos de un cuadro de LMC (25) y pacientes que acudieron para su control de tratamiento con inhibidores de la tirosina quinasa que hayan tenido cariotipo positivo para el Cr Ph.

Se procedió a la toma de muestra en aquellos pacientes que accedieron a participar de manera voluntaria previa explicación verbal sobre en qué consistía el estudio, cuál sería su aporte y su participación dentro del mismo. Se entregó a cada uno una carta de explicativa (anexo A), se aclararon las dudas del paciente y se procedió a la firma del consentimiento informado (anexo B). En caso de pacientes menores de edad se proporcionaron los documentos

y las explicaciones pertinentes a los padres o tutores legales. A todos los pacientes se les solicitó sus datos personales y los valores de hemograma al momento de la toma de muestra.

Este protocolo de investigación contó con la aprobación del Comité Ético y Científico del Instituto de Investigaciones en Ciencias de las Salud.

3.2. Toma de Muestra

La toma de muestra consistió en punción venosa para la extracción de 5 a 10 mL de sangre periférica.

No se incluyeron aquellos pacientes que no estuviesen dispuestos a participar y en caso de muestras remitidas al laboratorio no se aceptaron aquellas que no se encontrasen en buenas condiciones de transporte, por ejemplo que estuviesen congeladas o coaguladas, a fin de asegurar la integridad de la muestra y evitar degradación del ARN.

3.3. Determinación de la presencia e identificación del tipo de transcripto *BCR-ABL1*

A fin de determinar la presencia e identificar el tipo de transcripto *BCR-ABL1* se realizaron los siguientes pasos:

A. Separación de Glóbulos Blancos

La sangre periférica obtenida con EDTA fue sometida a centrifugación a 3000 rpm durante tres minutos. Se agregó 10 mL de *buffer* de lisis de glóbulos rojos pH 7,4 ($MgCl_2$ 5 mM, NaCl 10mM, Tris base 10 mM pH 8) y se incubó en heladera durante 10 minutos. A continuación, se realizó centrifugación a 3000 rpm durante tres minutos, se desechó el sobrenadante y se volvió repetir el lavado con el buffer de lisis. Una vez limpio el pellet de glóbulos blancos se agregó 1 mL de *Tri Reagent* (*Molecular Research Center Inc*, EUA) por

cada $5-10 \times 10^6$ células, se homogeneizó y se transfirió a tubos para microcentrífuga de 1,5 mL. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente a fin de permitir la disociación de los complejos de nucleoproteínas y se almacenó a -70°C hasta su posterior procesamiento para extracción y purificación de ARN.

B. Extracción y purificación de ARN

Para la extracción de ARN, se procedió según instrucciones del fabricante: a 1 mL de *Tri Reagent* se agregó 0,2 mL de Cloroformo (*MERCK*, Alemania), se mezcló con agitación vigorosa durante 10 a 12 segundos y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugó 15 minutos a 12000 g en centrífuga refrigerada a 4°C (*Hermle Labortechnik*, Alemania). La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo para microcentrífuga de 1,5 mL al cual se le agregó 0,5 mL de Isopropanol (*Biopack*, Argentina), se mezcló por inversión y se dejó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 12 minutos, a 12000 g y a 4°C . Se descartó el Isopropanol y se agregó 1 mL de Etanol al 75% (*Biopack*, Argentina) preparado con agua tratada con DEPC al 0,1% (*Sigma-Aldrich*, EUA). Se centrifugó durante 5 minutos a 12000 g y a 4°C . Se descartó todo el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente durante 5 minutos. El pellet de ARN obtenido se suspendió en 30 μL de agua DEPC al 0,1%.

C. Cuantificación y pureza del ARN

La cuantificación y determinación de la pureza del ARN se realizó mediante el método de espectrofotometría (51) con un equipo espectrofotómetro (*Biowave DNA*, *WPA*, Reino Unido). La cuantificación se obtuvo en $\mu\text{g/mL}$ midiendo la absorbancia a 260 nm y aplicando la siguiente fórmula: $[]_{\text{ARN}} = A_{260} \times 40 \times \text{Factor de Dilución}$. Para la determinación de la pureza se obtuvo la relación $A_{260}/280$, considerándose entre 1,6 y 2 como aceptable,

repetiéndose el proceso de extracción en caso de obtención de una relación fuera de dicho rango. El ARN fue posteriormente diluido a 0,2 µg/µL y utilizado para síntesis de ADN complementario.

D. Retrotranscripción o síntesis de ADN complementario

Para la síntesis de ADNc se utilizó 1 µg de ARN; 1 µL de *Random Primers* (50 ng/µL) (*Genbiotech*, Argentina); 0,4 µL de dNTPs (25mM de cada dNTP) (*Promega*, EUA) y agua destilada estéril tratada con DEPC al 0,1% (*Sigma-Aldrich*, EUA) hasta completar 10 µL. Se incubó 5 minutos a 65°C y posteriormente se colocó en hielo. Para la reacción de retrotranscripción fueron agregados 10 µL de ADNc Mix con los siguientes componentes: 4 µL de buffer 5X (*Life Technologies*-EUA), 2 µL de DTT 0,1 M (*Life Technologies*-EUA), 1 µL de *Rnase Out* 40U/µL (*Life Technologies*-EUA) y 0,3 µL de *SuperScript II* Transcriptasa Reversa 200U/µL (*Life Technologies*-EUA). Se incubó a 25°C durante 10 minutos, se realizó la retrotranscripción a 42°C durante 50 minutos y se procedió a la inactivación a 70°C durante 15 minutos en un equipo termociclador (*ESCO Healthcare Swift MaxPro*-China).

E. Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se realizó la detección de los transcritos b3a2 y b2a2 codificantes para la proteína p210 utilizando el par de cebadores RG94/RG95 cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 3(52). Para la preparación de la Master Mix fueron utilizados los siguientes componentes: 10 µL de *5X Green Go Taq® Flexi Buffer* (*Promega*, EUA); 3 µL de MgCl₂ 25 mM (*Promega*, EUA); 0,5 µL de dNTPs 25 mM (*Promega*, EUA); 2,5 µL de cada cebador 10 µM (*Sigma-Aldrich*, Brasil); 0,25 µL de *GoTaq® Hot Start Polymerase 5U/µL* (*Promega*, EUA); 29,25 µL de agua estéril bidestilada y 2 µL de ADNc. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 96°C 2

minutos; 1 ciclo de 94°C 1 minuto, 61°C 1 minuto 30 segundos, 72°C 3 minutos; 3 ciclos de 94°C 35 segundos, 61°C 1 minuto 30 segundos; 72°C 2 minutos; 35 ciclos de 94°C 35 segundos, 61°C 1 minuto 30 segundos, 72°C 2 minutos 50 segundos; extensión final 72°C 10 minutos. Se utilizó el equipo termociclador (*ESCO Healthcare Swift MaxPro-China*). El producto generado para el transcripto b3a2 fue de 296 pb y el generado para el transcripto b2a2 de 221 pb(52).

Tabla 3. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR para la detección de los transcriptos b3a2 y b2a2 con sus respectivos tamaños de producto.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Transcripto y	Autor
		Tamaño (pb)	
RG94	CCGGGAGCAGCAGAAGAAGT	b3a2 296	<i>Sagayadan et al.</i> 1994(52)
RG95	TGGGTCCAGCGAGAAGGTTT	b2a2 221	

En forma paralela a la detección de los transcriptos b3a2 y b2a2, se llevó a cabo en un tubo separado la detección del gen *ABLI* como control de reacción, utilizando el par de cebadores ABL 5 F/ABL 5 R cuyas secuencias se encuentran en la Tabla 4. Los mismos fueron diseñados para este estudio utilizando la herramienta informática *Custom Primers-OligoPerfect™ Designer* (*Life Technologies* -EUA) a partir de la secuencia correspondiente al transcripto *ABLI* obtenida del *GenBank*, con número de referencia NM_005157.4. Para la preparación de la Master Mix fueron utilizados los siguientes componentes: 10 µL de 5X *Green Go Taq® Flexi Buffer* (*Promega*, EUA); 3 µL de MgCl₂ 25 mM (*Promega*, EEUU); 0,5 µL de dNTPs 25 mM (*Promega*, EEUU); 2,5 µL de cada cebador 10 µM (*Invitrogen*, EUA); 0,3 µL de *GoTaq® Flexi Polymerase* 5U/µL (*Promega*, EUA); 28,2 µL de agua estéril bidestilada y 3

μL de ADNc. Las condiciones de ciclado fueron las siguientes: 94°C 5 minutos; 35 ciclos de 94°C 30 segundos, 55°C 30 segundos, 72°C 40 segundos; extensión final 72°C 6 minutos.

Tabla 4. Secuencias de los cebadores utilizados en la PCR para la detección del transcripto *ABL1* y diseñados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	Tamaño (pb)
ABL F 5	AACACCCTAACCTGGTGCAG	248
ABL R 5	CAAGTGGTTCTCCCCTACCA	

F. Electroforesis y visualización de los resultados

La corrida electroforética se realizó en gel de agarosa al 2,5% (*Ultra Pure™ Agarose – Life Technologies*, EUA), con buffer TAE 1X (0,04 M tris-acetato, 0,001 M EDTA) y en cuba electroforética (*Thermo Scientific*, EUA) a 120V por 1 hora 30 minutos. Para la visualización de los productos se realizó una tinción con Bromuro de Etidio 0,5 μg/mL (*Promega*, EUA), se reveló con transiluminador UV (*Major Science UVDI*, EUA) y se registró fotográficamente con la cámara digital *Power Shot G11* (*Canon-Japón*).

3.4. Prueba de sensibilidad de la PCR

A fin de estimar el límite de detección del transcripto *BCR-ABL1* se realizó una prueba de sensibilidad utilizando diluciones de ARN de la línea celular K562 (positiva para la isoforma b3a2) y de un paciente positivo para ambas isoformas (b3a2 y b2a2) en ARN extraído de un individuo sano como control negativo. Se estudió una muestra sin diluir y diluciones seriadas 1:10 hasta 10⁻⁶.

3.5. Cuantificación del transcrito *BCR-ABL1*

Para la cuantificación del transcrito *BCR-ABL1* se utilizó el kit *One-Step qRT-PCR BCR-ABL (Molecular MD-EUA)*, diseñado para la detección de los transcritos b2a2 y b3a2 codificantes de la proteína p210. La plataforma de PCR en tiempo real utilizada para la cuantificación fue *ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems-EUA)*. Brevemente, se utilizó el método de cuantificación relativa, a partir de la cuantificación absoluta de los genes *BCR-ABL1* y *ABL1*, para lo cual se construyeron curvas de calibración a partir de diluciones de plásmidos calibradores (proveídos con el kit) con número de copias conocido midiendo el *cycle threshold (Ct)* tanto para el transcrito de fusión *BCR-ABL1* como para el gen control *ABL1*. Se evaluaron las curvas mediante la medición de controles positivos de ARN con valores del transcrito *BCR-ABL1* conocidos (proveídos por el kit): un control alto equivalente a 10% en EI, un control bajo correspondiente a una RMM y un control negativo para el transcrito *BCR-ABL1*.

La cuantificación de los transcritos en las muestras se realizó mediante la interpolación del *Ct* en la curva de calibración correspondiente. El número de copias obtenidos para *BCR-ABL1* se expresó en relación al gen control mediante la relación $\%BCR-ABL/ABL$ y se multiplicó por un factor de conversión (0,81) propio del kit a fin de expresar los resultados en EI y determinar la respuesta molecular del paciente en dicha escala (40). El gen *ABL1* fue además utilizado como control de la reacción a fin de evaluar la calidad de la muestra de los pacientes, considerándose un número de copias superior a mil como indicativo de buena integridad del material según lo establecido por el manual del kit.

Tanto los plásmidos calibradores, como los controles y las muestras se estudiaron en duplicado.

3.6. Aspectos Éticos

El estudio fue aprobado por el comité de ética del IICS y se realizó teniendo en cuenta los principios éticos de la investigación clínica que fueron los siguientes:

A. Respeto a la persona humana

A los pacientes se les solicitó la donación de una muestra de sangre con total colectada con anticoagulante EDTA para su estudio molecular. El estudio se realizó en forma gratuita. Previa a la toma de muestra se les informó sobre los objetivos del proyecto y se les preguntó si deseaban participar. Aquellas personas que aceptaron participar se les proveyó un documento donde se expresó el consentimiento informado y aclaración de donante voluntario (Anexos A y B), en donde se incluyó la forma en que se les tomaría la muestra y las condiciones del anonimato. Los investigadores, de manera exclusiva, manejaron el banco de datos correspondiente.

B. Justicia

La toma de muestra se realizó con los máximos recaudos a fin de evitar cualquier inconveniente para el paciente. En caso de pacientes menores de edad, se habló conjuntamente con los padres o tutores legales para pedir la participación en el proyecto.

C. Beneficiencia

Los resultados fueron entregados en sobres cerrados tanto a los pacientes como a los médicos tratantes a fin de que éstos pudiesen evaluar los ajustes pertinentes en el tratamiento.

3.7. Asuntos estadísticos

Los datos fueron introducidos en una planilla electrónica (*Microsoft Excel*) y posteriormente analizados utilizando estadística descriptiva con el programa *GraphPad InStat 3*. Para la comparación de medianas con otros reportes se utilizó la prueba de Wilcoxon. Para la comparación de las frecuencias obtenidas de los distintos tipos de transcritos *BCR-ABL1* se recurrió a la Prueba de Chi^2 de comparación de proporciones. Para el contraste de medias y coeficientes de correlación obtenidos para las curvas de calibración se aplicó la prueba *t* de Student para muestras no pareadas. Por último, para determinar la correlación entre el porcentaje de células Ph+ de médula ósea y la cantidad de transcrito $\%BCR-ABL/ABL1$ en EI en sangre periférica se calculó el coeficiente de correlación de Spearman.

4. Resultados

4.1. Características demográficas de los pacientes participantes del estudio.

Para el presente estudio se incluyeron un total de 99 pacientes que fueron derivados al Laboratorio de Genética Molecular del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud en el período comprendido entre mayo de 2011 y julio de 2012, de los cuales 49 llegaron con sospecha de LMC y 50 con diagnóstico de LMC bajo tratamiento.

De este grupo, 30 pacientes resultaron *BCR-ABL1* negativos observándose también un cariotipo Philadelphia negativo y 69 fueron *BCR-ABL1* positivos (Figura 10). Los 30 pacientes *BCR-ABL1* negativos llegaron con sospecha de LMC. Para el presente estudio fueron excluidos estos 30 pacientes *BCR-ABL1* negativos y el análisis se realizó únicamente con los 69 pacientes *BCR-ABL1* positivos entre los cuales 12 fueron estudiados al momento del diagnóstico, 7 al diagnóstico y durante el tratamiento y 50 sólo durante el tratamiento.

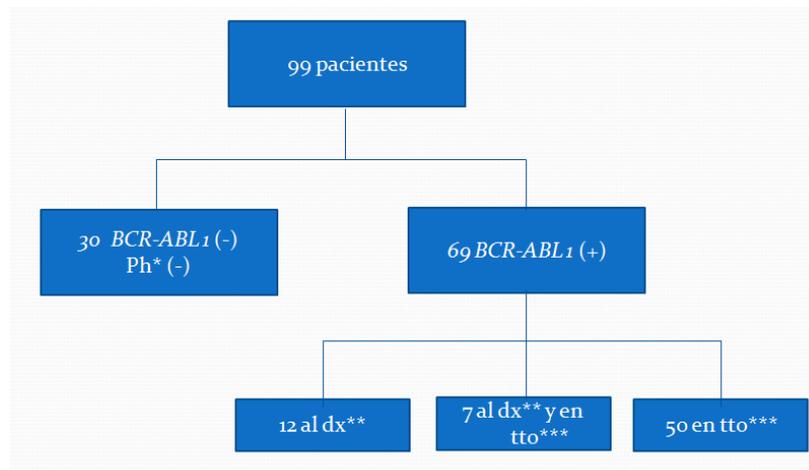


Figura 10. Total de pacientes incluidos para este estudio. Un total de 99 pacientes fueron incluidos de los cuales 30 fueron *BCR-ABL1*(-) con cariotipo Ph(-) y 69 fueron *BCR-ABL1*(+). Dentro de este segundo grupo 12 pacientes fueron estudiados al diagnóstico, 7 al momento del diagnóstico y durante el tratamiento y 50 durante el tratamiento. *Ph: Philadelphia. **dx: diagnóstico. *tto: tratamiento.**

La mediana de edad observada al momento de la toma de muestra para el grupo de 69 pacientes analizados fue de 45 años, con un desvío intercuartílico (Q_3-Q_1) de 24 años ($Q_3= 55$ y $Q_1= 31$) y un rango de 78 años. El valor máximo registrado fue de 82 años y el valor mínimo de 4 años. El 62% (43/69) fue del sexo masculino y el 38% (26/69) del sexo femenino (Figura 11 A); con una relación hombre/mujer igual a 1,7. El 78% (55/69) de los pacientes fueron derivados del Hospital de Clínicas (Facultad de Ciencias Médicas-Universidad Nacional de Asunción), el 16% (11/69) del Hospital Central Dr. Emilio Cubas (Instituto de Previsión Social) y el 6% (4/69) del Hospital Nacional de Itaguá (Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social) (Figura 11 B).

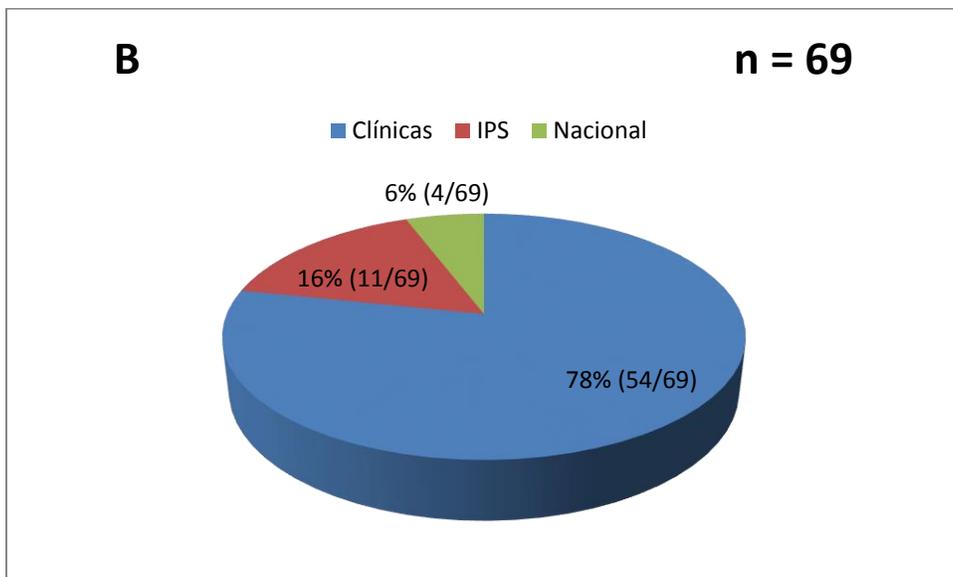
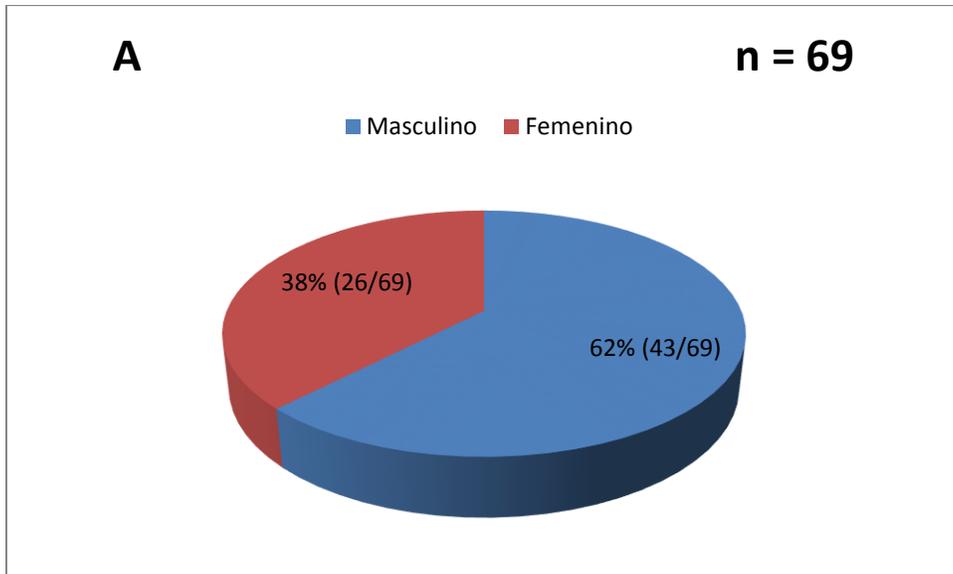


Figura 11. Características demográficas de los pacientes participantes del estudio. A. Distribución de frecuencia por sexo. B. Distribución de frecuencia según servicio a partir del cual fue derivado el paciente.

En la tabla 5 se presentan datos de procedencia de los 69 pacientes estudiados según Departamentos. Se observó que el Departamento Central y la ciudad de Asunción, con el 42% (29/69) de los pacientes, fueron los sitios de procedencia más frecuentes.

Tabla 5. Procedencia según departamentos de los 69 pacientes incluidos en este estudio.

Departamento	Frecuencia absoluta de pacientes	Frecuencia relativa de pacientes
Concepción	4	5,8%
San Pedro	3	4,3%
Cordillera	1	1,4%
Guairá	3	4,3%
Caaguazú	4	5,8%
Caazapá	5	7,2%
Itapúa	6	8,7%
Misiones	0	0%
Paraguarí	2	2,9%
Alto Paraná	6	8,7%
Central	23	33,3%
Ñeembucú	1	1,4%
Amambay	1	1,4%
Canindeyú	0	0%
Presidente Hayes	1	1,4%
Alto Paraguay	0	0%
Boquerón	2	2,9%
Asunción	6	8,7%
Sin dato	1	1,4%

4.2. Características de los pacientes al momento del diagnóstico.

Se evaluó la edad y datos clínicos como: conteo de glóbulos blancos, conteo de plaquetas, hemoglobina, presencia o ausencia de esplenomegalia y cariotipo al momento del diagnóstico mediante búsqueda y consulta de las fichas clínicas de los 69 pacientes. Sin embargo, solo se obtuvieron datos completos al momento del diagnóstico en 39 pacientes (debido a falta de acceso a las fichas clínicas y/o fichas clínicas incompletas), por lo que se halló la mediana, el desvío intercuartílico (Q_3-Q_1), el rango y los valores máximo y mínimo únicamente en este grupo de pacientes ($n=39$).

La mediana de edad observada en el grupo de pacientes con datos completos ($n=39$) al momento del diagnóstico fue de 44 años, con un desvío intercuartílico (Q_3-Q_1) de 21 años ($Q_3= 53$ y $Q_1= 32$) y un rango de 70 años. El valor máximo registrado fue de 73 años y el valor mínimo de 3 años. El 7,7% de los pacientes (3/39) era menor de 20 años, el 20,5% (8/39) tenía entre 20 y 34 años, el 25,6% (10/39) fue diagnosticado entre 35 y 44 años, el 23,1% (9/39) entre 45 y 54 años; el 12,8% (5/39) entre 55 y 64 años, el 10,3% (4/39) restante se encontraba entre los 65 y 74 años (Figura 12) (53).

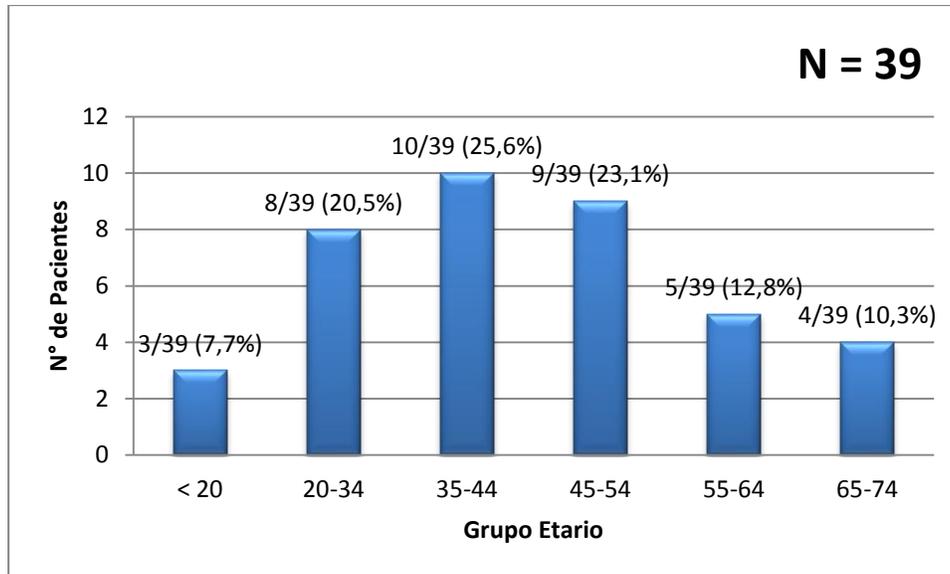


Figura 12. Distribución de edades al diagnóstico de 39 pacientes con LMC.

En cuanto al conteo de glóbulos blancos al diagnóstico, la mediana encontrada fue de 138.000 GB/mm³, con un desvío intercuartílico (Q₃-Q₁) de 166.200 GB/mm³ (Q₃= 242.600 y Q₁= 76.400) y un rango de 885.700 GB/mm³. El valor máximo hallado fue de 898.000 GB/mm³ y el valor mínimo de 12.300 GB/mm³ (tabla 6).

Tabla 6. Datos de edad, conteo de glóbulos blancos, conteo de plaquetas y hemoglobina en 39 pacientes al momento del diagnóstico.

	Mediana	Desvío Intercuartílico (Q ₃ -Q ₁)	Valor Máximo	Valor Mínimo	Rango
Edad	44	21	73	3	70
Glóbulos blancos/mm ³	138.000	166.200	898.000	12.300	885.700
Plaquetas/mm ³	369.000	295.000	1.800.000	140.000	1.660.000
Hemoglobina g/dL	10,4	1,8	15,1	4,1	11,0

Con respecto al conteo de plaquetas al diagnóstico, la mediana obtenida fue de 369.000 plaquetas/mm³, con un desvío intercuartílico (Q₃-Q₁) de 295.000 plaquetas/mm³ (Q₃= 542.000 y Q₁= 247.000) y un rango de 1.660.000 plaquetas/mm³. El valor máximo encontrado fue de 1.800.000 plaquetas/mm³ y el valor mínimo de 140.000 plaquetas/mm³ (tabla 6).

En relación a los valores de hemoglobina la mediana obtenida fue de 10,4 g/dL, con un desvío intercuartílico (Q₃-Q₁) de 1,8g/dL y un rango de 11,0 g/dL. El valor máximo encontrado fue de 15,1 g/dL y el valor mínimo de 4,1g/dL.

En cuanto a presencia/ausencia de esplenomegalia en el 77% (30/39) se encontró un aumento del tamaño del bazo al momento del diagnóstico mientras que el 23% (9/39) restante presentó un bazo de tamaño normal.

Los resultados de cariotipo al diagnóstico demostraron que el 90% (35/39) presentó Cr Ph positivo t(9;22)(q34;q11.2), en 5% (2/39) se encontraron otras anomalías cromosómicas adicionales además del Cr Ph y en el otro 5% (2/39) el Cr Ph no fue visible al microscopio. Dentro del grupo con anomalías cromosómicas adicionales, un paciente presentó pérdida del cromosoma Y y un cromosoma marcador, y en otro paciente se observó el cromosoma Ph y una translocación t(12;22) (Pacientes 1 y 2, tabla 7). En el grupo en el cual no se observó el Cr Ph, uno presentó una variante críptica y otro cariotipo normal (cromosoma Ph críptico) (Pacientes 3 y 4, tabla 7). En los Pacientes 2, 3 y 4 se confirmó la presencia del rearrreglo *BCR-ABL1* isoforma b3a2 dentro de este estudio.

Tabla 7. Cariotipos al diagnóstico de 4 pacientes: 2 con anomalías cromosómicas adicionales y 2 Ph-

	Cariotipo
Paciente 1	45,X,-Y,t(9;22)(q34;q11),+mar [25]
Paciente 2	47,XY,t(9;22)(q34;q11),t(12;22),+l(12q) [20]
Paciente 3	46, XX, t(1;22) (1p11;22p11) [20]
Paciente 4	46, XX [15]

4.3.Detección y determinación de la frecuencia de los diferentes tipos de transcripto *BCR-ABL1*.

La detección y determinación del tipo de transcripto se realizó mediante la técnica de PCR, previa obtención del ADNc mediante retrotranscripción (RT). Los tipos de transcriptos detectados (Figura 13A) fueron los correspondientes a las isoformas b3a2 y b2a2 los cuales codifican para la proteína BCR-ABL p210, con un peso molecular de 210 kDa. Se ha podido detectar además la expresión de ambos transcriptos en forma simultánea. El gen *ABL1* fue utilizado como control a fin de garantizar la integridad de la muestra y evitar los falsos negativos (Figura 13B).

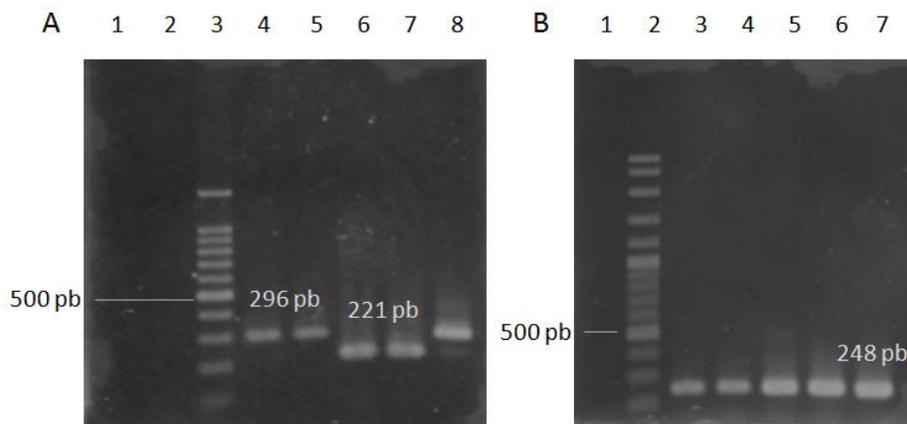


Figura 13. Productos de amplificación de PCR correspondientes a las isoformas b3a2 y b2a2 de la proteína p210 junto con el producto de amplificación del gen control. Agarosa al 2,5%. A. Carril 1. Blanco de la reacción de PCR (H₂O), carril 2. Control negativo, carril 3. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega-EUA), carriles 4 & 5. Producto correspondiente al transcripto b3a2 (296 pb), carriles 6 & 7. Producto correspondiente al transcripto b2a2 (221 pb), carril 8. Producto de amplificación de los transcriptos b3a2 y b2a2 con predominancia del primero. B. Carril 1. Blanco de la reacción de PCR, carril 2. Marcador de peso molecular de 100 pb (Genbiotech-Argentina), carriles 3 al 7. Producto de amplificación del gen control *ABLI* (248 pb).

Se analizó el tipo de transcripto y la frecuencia en 42 pacientes, 19 al diagnóstico y 23 al tratamiento (Figura 14). El transcripto b3a2 fue hallado en el 64% (27/42), el 31% (13/42) mostró expresión del transcripto b2a2 y en 5% (2/42) se constató la expresión simultánea de ambos transcriptos con predominancia del b3a2.

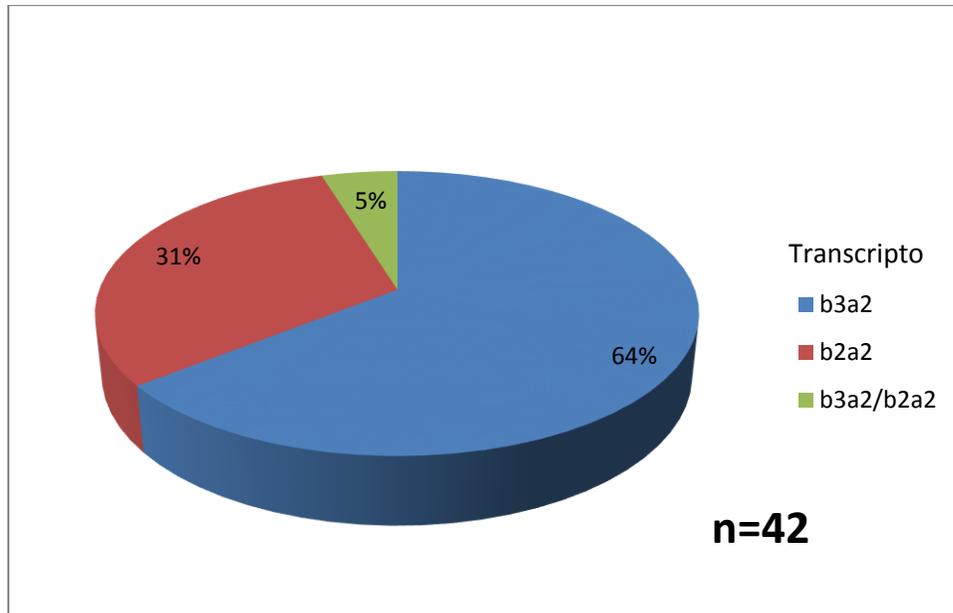


Figura 14. Frecuencia del tipo de transcritto *BCR-ABL1*. Se determinó el tipo de transcritto y su frecuencia a partir de muestras de 42 pacientes.

4.4. Prueba de sensibilidad de las reacciones de PCR.

A fin de estimar el límite de detección del transcritto *BCR-ABL1* se realizó una prueba de sensibilidad utilizando diluciones de ARN de la línea celular K562 positiva para la isoforma b3a2 en ARN extraído de un individuo sano como control negativo. Se estudió una muestra sin diluir y diluciones 1:10 hasta 10^{-6} (Figura 15 A) obteniéndose una sensibilidad de hasta 10^{-4} . Por otro lado, se realizó otra prueba de sensibilidad utilizando diluciones de ARN de un paciente positivo para ambas isoformas (b3a2 y b2a2) en ARN extraído de un individuo sano como control negativo. Se estudió una muestra sin diluir y diluciones 1:10 hasta 10^{-6} (Figura 15 B) obteniéndose una sensibilidad de hasta 10^{-3} .

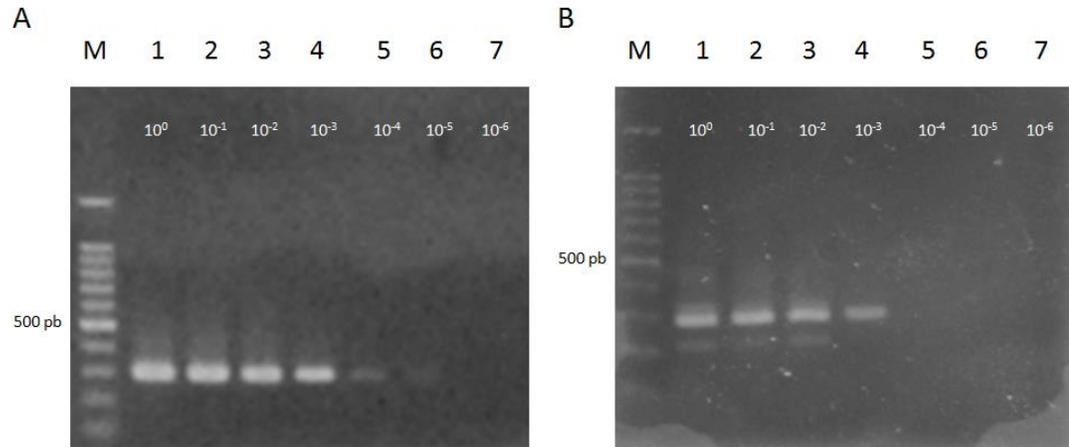


Figura 15. Sensibilidad de las reacciones de PCR para la detección del transcrito *BCR-ABL1* codificante de la proteína p210. **A.** Agarosa al 2,5%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega-Argentina), 2 al 7. Producto de PCR obtenido a partir de ADNc sintetizado a partir de diluciones de ARN de la línea celular K562 positiva para la isoforma b3a2 en ARN obtenido a partir de un individuo sano como control negativo. **B.** Agarosa al 2,5%. Carriles: 1. Marcador de peso molecular de 100 pb (Promega-Argentina), 2 al 7. Producto de PCR obtenido a partir de ADNc sintetizado a partir de diluciones de ARN de un paciente positivo para ambas isoformas b3a2/b2a2 en ARN obtenido a partir de un individuo sano como control negativo.

4.5. Cuantificación del transcrito *BCR-ABL1*.

La cuantificación del transcrito *BCR-ABL1* se realizó mediante el método de qRT-PCR utilizando el kit *One-Step qRT-PCR BCR-ABL (Molecular MD-EUA)* y la plataforma ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystems-EUA*). Se empleó una cuantificación absoluta, mediante implementación de dos curvas estándares (*BCR-ABL1* y *ABL1*), lo cual permitió hacer la cuantificación relativa respecto al gen control *ABL1*. Se obtuvieron curvas de amplificación a partir de diluciones de plásmidos calibradores conteniendo un número conocido de copias de *BCR-ABL1* (Figura 16). A partir del Ciclo Umbral o *Cycle Threshold (Ct)* obtenido para cada punto, se construyó una curva estándar en función del logaritmo del número de copias (Figura 17). Así, la cantidad de transcrito *BCR-ABL1* presente en una muestra se determinó mediante la extrapolación del *Ct* en la curva estándar a través del Software 7500 v2.0.1 (*Applied*

Biosystems-EUA). El mismo procedimiento fue utilizado para la construcción de la curva estándar del gen control *ABL1* y para la medición del número de copias *ABL1* presentes en la muestra.

Las curvas estándares obtenidas, 8 para el transcripto *BCR-ABL1* y 9 para el transcripto *ABL1*, fueron lineales en 6 órdenes de magnitud para el transcripto *BCR-ABL1* (desde 3 copias a 300.000 copias) y en 4 órdenes de magnitud para el transcripto *ABL1* (desde 300 a 300.000 copias). Además, se obtuvieron valores de pendiente y coeficientes de correlación al cuadrado (r^2) dentro de los rangos esperados y especificados por el kit utilizado para la cuantificación (Tabla 8).

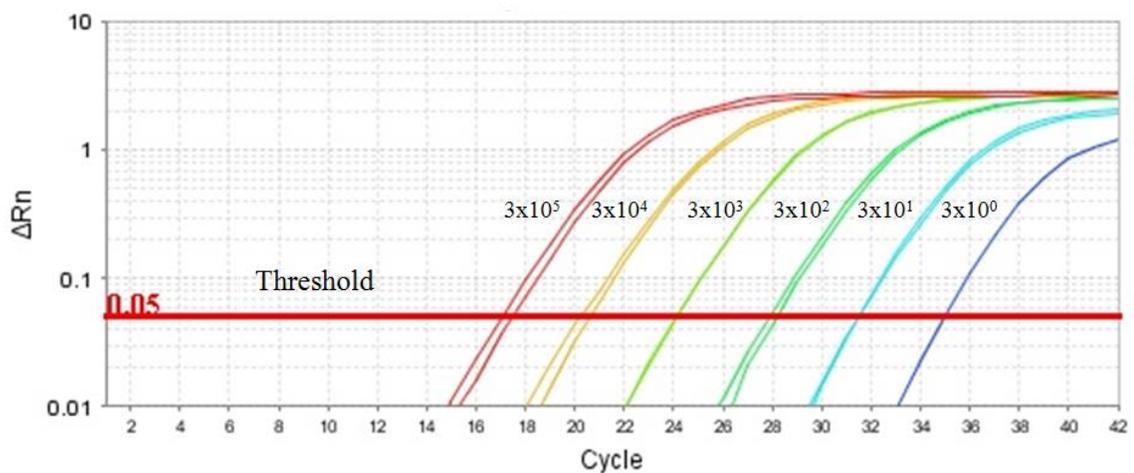


Figura 16. Curvas de amplificación del transcripto *BCR-ABL1* realizadas a partir de diluciones seriadas de plásmidos calibradores conteniendo un número de copias conocido. Se observa el aumento de la fluorescencia (ΔRn) en función al Ciclo (*Cycle*) de la reacción de PCR. El software 7500 calculó el *Cycle threshold* (Ct) para cada punto de dilución que correspondió al ciclo en el cual la curva de amplificación cruzó la línea umbral o *Threshold* que corresponde al límite entre la fluorescencia de ruido y la correspondiente a señal de amplificación.

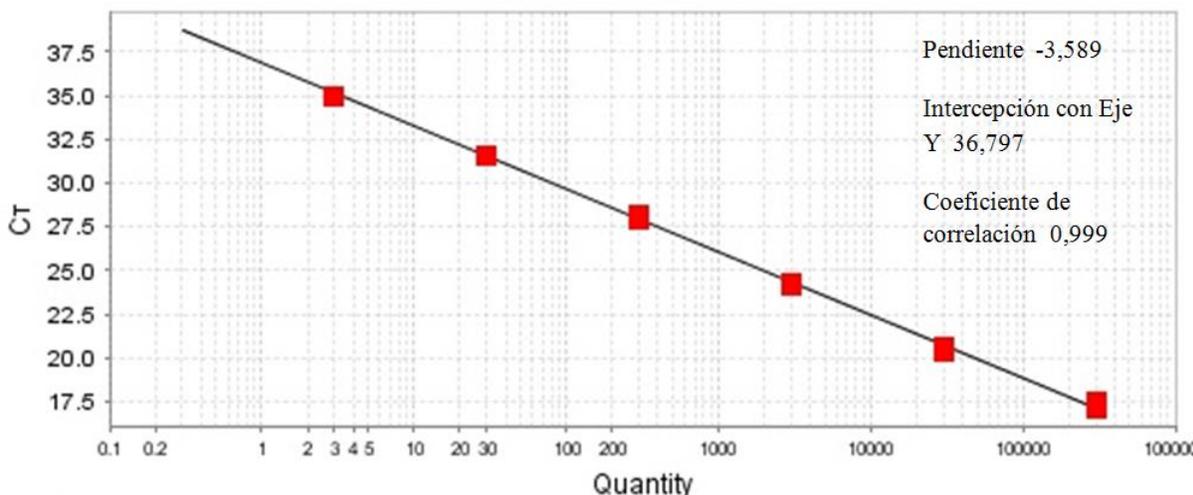


Figura 17. Curva estándar *BCR-ABL1*. A partir del *Ct* calculado para cada punto de dilución se construyó una curva de calibración en función al número de copias correspondiente a cada punto. Se muestran los valores de pendiente, intercepción con el eje Y y coeficiente de correlación utilizados para evaluar la curva. El rango dinámico de detección fue de seis órdenes de magnitud.

Tabla 8. Valores de pendiente y coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) obtenidos para las curvas de calibración.

Transcripto	N° de Curvas Estándar	Pendiente		Coeficiente de correlación al cuadrado (r^2)	
		Valores obtenidos de pendiente	Valores esperados de pendiente	Valores obtenidos de r^2	Valores esperados de r^2
<i>BCR-ABL1</i>	8	-3.36 ± 0.2	-3.45 ± 0.3	0.998 ± 0.002	> 0.990
<i>ABL1</i>	9	-3.26 ± 0.1	-3.45 ± 0.3	0.998 ± 0.001	> 0.990

Se compararon los promedios de pendiente y coeficiente de correlación (r) obtenidos para 8 curvas de calibración del transcripto *BCR-ABL1* y 9 del *ABL1* (Tabla 9). En ambos casos no se observó una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,0924$ para pendiente y $p = 0,7277$ para r , prueba t de Student para muestras no pareadas). Esto indica que las cinéticas de

reacción son similares y que la cuantificación relativa del transcripto *BCR-ABL1* con respecto al transcripto *ABL1* es válida.

Tabla 9. Análisis de las curvas de calibración para los transcriptos *BCR-ABL1* y *ABL1*. Los promedios obtenidos para los valores de pendiente no difirieron estadísticamente ($p > 0,05$; *t* Student), indicando cinéticas de reacción similares.

Tipo de transcripto	N° de curvas de calibración	Coeficiente de Correlación (r)		Pendiente	
		Promedio	CV	Promedio	CV
<i>BCR-ABL1</i>	8	0.999	0.067 %	-3.364	4.625 %
<i>ABL1</i>	9	0.999	0.075 %	-3.259	2.391 %

Habiendo presentado las curvas de calibración valores de pendiente, r^2 dentro de los rangos establecidos y con cinéticas de reacciones similares para ambos transcriptos, se procedió a la cuantificación en las muestras de los pacientes junto con tres controles de ARN con valores del transcripto *BCR-ABL1* conocidos y proveídos por el kit: un control alto (*HIGH*) equivalente a 10% en EI, un control bajo (*MMR*) correspondiente a una RMM y un control negativo (*NEG*) para el transcripto *BCR-ABL1*. Los valores obtenidos para dichos controles se encuentran resumidos en la Tabla 10 y constituyen indicadores de una buena eficiencia tanto de la reacción de síntesis de ADNc así como de la reacción de amplificación.

Tabla 10. %BCR-ABL1/ABL1 obtenidos para controles de ARN a partir de 7 ensayos distintos.

Control de ARN	%BCR-ABL1/ABL1 obtenido	%BCR-ABL1/ABL1 esperado según el kit de cuantificación
<i>HIGH</i>	12 ± 1.5	6 - 24
<i>MMR</i>	0.10 ± 0.02	0.06 – 0.24
<i>NEG</i>	0	0

Las cuantificaciones obtenidas en un grupo de 18 pacientes al diagnóstico se resumen en la Tabla 11, constituyendo los valores de base del transcripto *BCR-ABL1*. La mediana hallada fue de 68%, correspondiendo al valor de base para el laboratorio. El cuartil 3 (Q₃) fue de 101% y el cuartil 1 (Q₁) de 50%, presentándose un desvío intercuartílico (Q₃-Q₁) de 51%. El valor máximo obtenido de cuantificación fue de 190% y el valor mínimo fue de 24% (Tabla 12). Una muestra al momento del diagnóstico no se incluyó en este análisis. Se determinó el tipo de transcripto como b3a2 pero se obtuvo un valor de base correspondiente al 3%. Este hecho junto con la presencia de una translocación compleja en el cariotipo al diagnóstico hacen sospechar de la presencia de un transcripto atípico que no está siendo detectado en el proceso de cuantificación además del transcripto b3a2.

Tabla11. Valores de cuantificación al diagnóstico de 18 pacientes previo al inicio del tratamiento. Se presentan los valores obtenidos de mayor a menor.

Paciente	%BCR-ABLI/ABLI
1	190*
2	131
3	118
4	115
5	96
6	87
7	85
8	82
9	75
10	61
11	59
12	56
13	56
14	50
15	48
16	33
17	30
18	24**

*Valor Máximo. **Valor Mínimo.

Tabla 12. Mediana y dispersión de los valores de base obtenidos en 18 pacientes con LMC previo al inicio del tratamiento.

Mediana % <i>BCR-ABL1/ABL1</i>	Q1	Q3	Desvío Intercuartílico
68	52	94	42

4.6. Determinación de la respuesta molecular a partir de la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* en pacientes en tratamiento.

De los 57 pacientes en tratamiento, 96% (55/57) estaba siendo tratado con Imatinib y 4% (2/57) se encontraba con inhibidor de tirosin quinasa de segunda generación (uno con Nilotinib y otro con Dasatinib). Previo al inicio del tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa los pacientes recibieron hidroxiurea hasta la confirmación de la presencia del Cr Ph o del rearreglo *BCR-ABL1*.

De las 57 muestras obtenidas durante el tratamiento se determinaron los valores de cuantificación en EI. A partir de los valores obtenidos se agrupó a los pacientes en distintas categorías de Respuesta Molecular (RM) (Tabla 13).

Se observó el 21% de los pacientes (12/57) en RM Nula, 28% (16/57) presentó RM Mínima, 12% (7/57) tenía RM Menor, 18% (10/57) RM Mayor y 21% (12/57) mostró RM Completa (Figura 18).

Tabla 13. Equivalencia entre cantidad de transcrito en escala internacional, variación logarítmica estimada y respuesta molecular (37).

% <i>BCR-ABL1/ABL1</i> en Escala Internacional	Variación Logarítmica Estimada	Respuesta Molecular (RM)
>10	<1	RM Nula
1-10	≤ 1	RM Mínima
0,1-1	≥ 2	RM Menor
<0,1	≥ 3	RM Mayor
<0,01	≥ 4	RM Completa

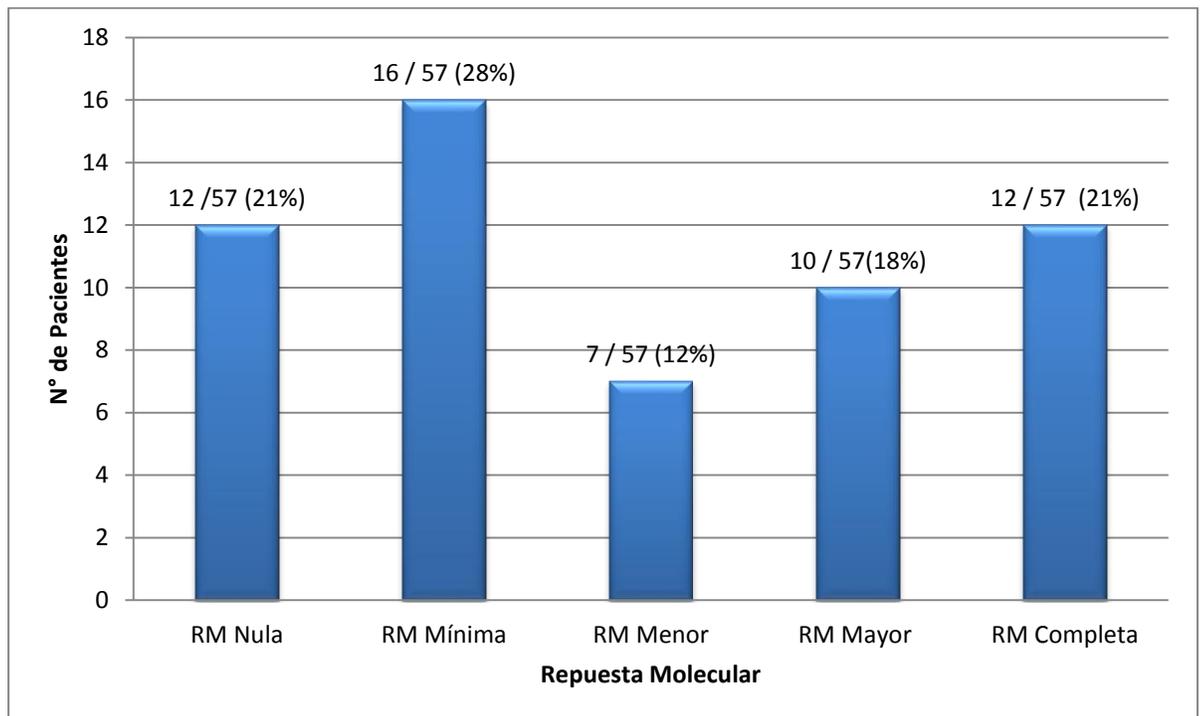


Figura 18. Frecuencia de Repuestas Moleculares en 57 pacientes con LMC en tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.

Teniendo en cuenta los tiempos de tratamiento (obtenidos para 47 pacientes de los 57 en tratamiento) dentro de cada grupo de respuesta molecular (Figura 19) se pudo constatar que 28% (13/47) llevaban más de 18 meses de tratamiento y presentaron niveles de transcripto por encima de una RM Mayor: 9% (4/47) en RM Nula, 15% en RM Mínima (7/47) y 4% (2/47) en RM Menor. Dado que una respuesta óptima al tratamiento implica una RM Mayor a los 18 meses (32,34), la medición de los niveles de transcripto *BCR-ABL1* resulta una herramienta útil para identificar a este grupo de pacientes que no presentan una respuesta óptima dentro del tiempo esperado.

Otro criterio de respuesta óptima al tratamiento es la obtención de niveles de transcripto *BCR-ABL1* $\leq 10\%$ a los tres meses de tratamiento (32). En el grupo de 47 pacientes presentados en la figura 19 se puede observar a 6% (3/47) de los pacientes con tiempos de tratamiento entre 3 y 18 meses con niveles de transcripto sobrepasando el 10% (RM Nula). De esta manera a través de la cuantificación de los niveles de transcripto se logra identificar de manera temprana otro grupo de pacientes que no presentan una respuesta óptima dentro del tiempo esperado.

A los 12 meses de tratamiento se espera en aquellos pacientes con buena respuesta al tratamiento una respuesta citogenética completa (0% de metafases Ph+ en médula ósea) (32,34). Esta respuesta a nivel citogenético se asocia a una disminución del nivel de transcripto ≥ 2 (entre 0,1-1%) lo que se correspondería a una RM Menor (54). Se observa así (Figura 19) a un 11% (5/47) de los pacientes entre 3 y 18 meses de tratamiento dentro de este grupo de respuesta molecular que podrían situarse dentro del grupo de pacientes con respuesta óptima al tratamiento.

Por último, entre los pacientes que presentaron una buena respuesta al tratamiento cabe destacar que en del grupo de RM Mayor 1 paciente se encontraba entre los 12 y 18 meses de tratamiento. Por otro lado, dentro del grupo de RM Completa, 1 paciente alcanzó dicha respuesta entre los 3 y 6 meses; y otro paciente entre los 12 y 18 meses. Una RM mayor o completa a los 18 meses o antes se asocia a un buen pronóstico para el paciente (32,34). En el resto de los pacientes

dentro de este grupo, al no contar con cuantificaciones previas no se puede determinar en qué momento durante el tratamiento se alcanzaron dichas respuestas. Por lo tanto tampoco se puede inferir si se encuentran dentro del grupo de mejor pronóstico.

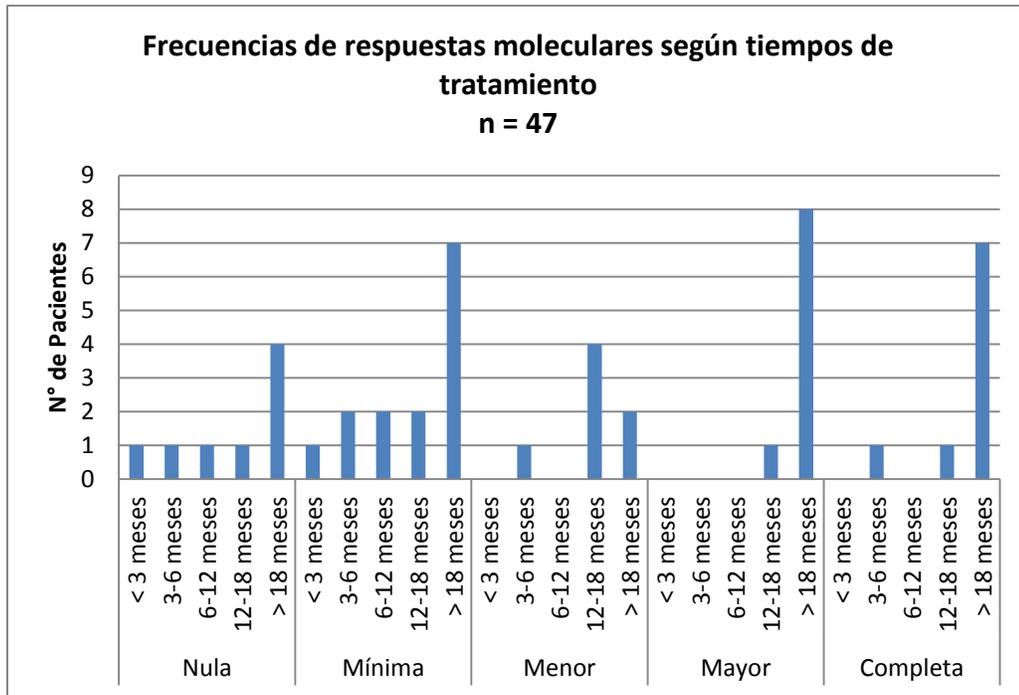


Figura 19. Frecuencia de Repuestas Moleculares según tiempo de tratamiento para 47 pacientes con LMC en tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.

4.7. Medición de la disminución del transcripto *BCR-ABL1* en pacientes bajo tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.

Dado que la medición de los niveles de transcripto es una herramienta importante para el seguimiento de los pacientes, en un grupo pequeño de pacientes (n = 7) se midió la cantidad de transcripto *BCR-ABL1* al momento del diagnóstico y a distintos tiempos de tratamiento con inhibidor de tirosina quinasa (Tabla 14). En el 72% (5/7) se registró una disminución por debajo del 10% mientras que en el 28% (2/7) restante se obtuvieron cuantificaciones superiores al 10%. Los tiempos de tratamiento a los cuales se llevó a cabo la cuantificación se detallan en la tabla 14.

Tabla 14. Disminución del transcripto *BCR-ABL1* en pacientes bajo tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa. Se presentan los datos según tiempo de tratamiento de menor a mayor.

Paciente	% <i>BCR-ABL1/ABL1</i> en EI al diagnóstico	% <i>BCR-ABL1/ABL1</i> en EI al tratamiento	Tiempo de tratamiento (meses)
1	190	29	1
2	87	3	2
3	96	27	3
4	118	0,2	3
5	56	2	3
6	50	8	4
7	56	6	7

4.8. Correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el %*BCR-ABL1/ABL1* en sangre periférica

En un grupo de 18 pacientes se analizaron 20 muestras (dos pacientes fueron estudiados al diagnóstico y durante el tratamiento), 10 al tiempo cero y 10 al tratamiento, a partir de las cuales se obtuvo el % de células con Cr Ph+ en médula ósea y se correlacionó con la cantidad de transcripto %*BCR-ABL1/ABL1* en EI obtenida a partir de muestras de sangre periférica colectadas al mismo tiempo (forma paralela) (Figura 20). El coeficiente de correlación de Spearman (r_s) fue de 0.8108 y resultó altamente significativo ($p < 0,0001$; tabla exacta para r_s). Esto indica una fuerte correlación entre el % de Cr Ph en médula ósea y el %*BCR-ABL1/ABL1* en sangre periférica dentro del grupo de muestras analizadas.

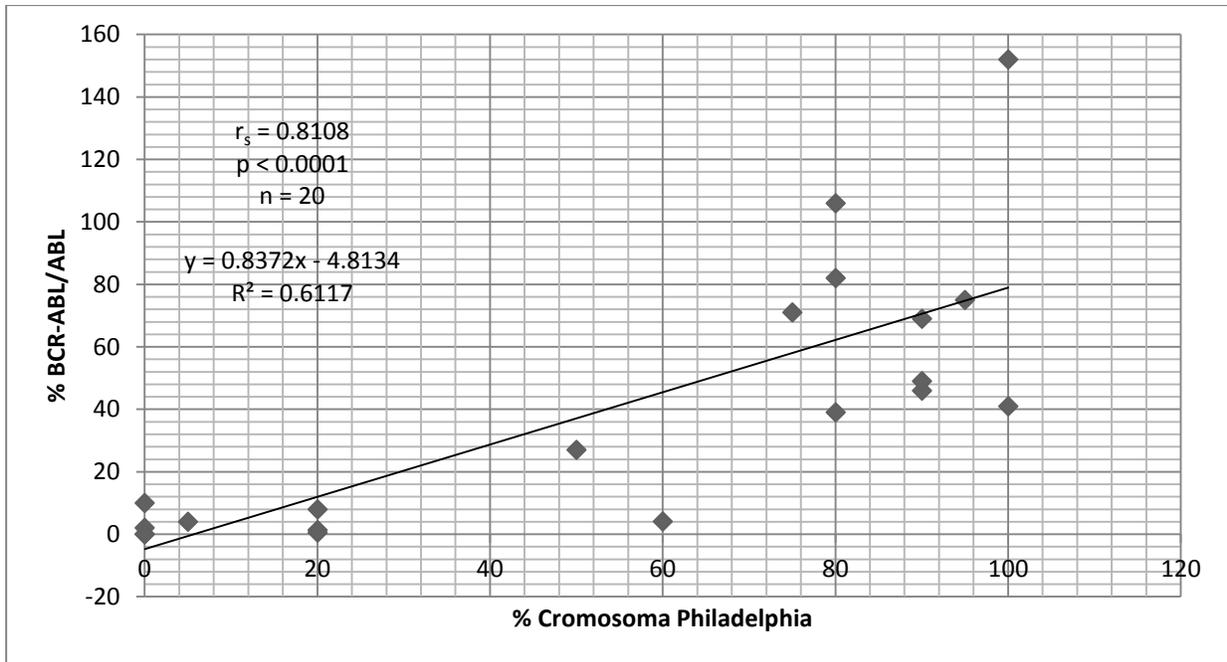


Figura 20. Correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el %BCR-ABL/ABL en Sangre Periférica.

5. Discusión

5.1. Características demográficas de los pacientes participantes del estudio

Del total de 99 pacientes derivados para este estudio, 30 resultaron *BCR-ABL1* negativos acompañados de un cariotipo Philadelphia negativo.

En cuanto a las características demográficas del grupo de 69 pacientes analizados dentro de este estudio, se observó una relación hombre/mujer de 1,7 coincidiendo con lo reportado en la literatura que habla de una “leve predominancia del sexo masculino” y una relación entre 1,3 y 2,2 (2,7).

Se registró una mayor concurrencia de pacientes provenientes del Hospital de Clínicas (HC), dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Asunción en relación con el Instituto de Previsión Social (IPS) y el Hospital Nacional de Itauguá (HN). Dentro del HC los pacientes con LMC reciben el Imatinib en forma gratuita a través de la fundación *MAX* y su programa *GIPAP (Glivec® International Patient Assistance Program)*(55) por lo cual todos aquellos pacientes de escasos recursos son derivados a esta institución para su tratamiento. Por otro lado, dentro de IPS los asegurados, quienes acceden a los servicios de salud mediante aportes mensuales, cuentan con el Imatinib dentro de la lista de medicamentos cubiertos por esta institución. Por lo tanto, los pacientes de IPS poseen más recursos económicos en comparación con los pacientes del Hospital de Clínicas. Teniendo en cuenta que los estudios de detección y cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* fueron realizados en forma gratuita dentro de este estudio, se podría suponer que la mayor afluencia desde el Hospital de Clínicas se debió a factores económicos. Con respecto al HN, los costos de transporte hasta el Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud pudieron haber influenciado en la baja concurrencia desde este centro.

Respecto a la procedencia de los pacientes al momento de la toma de muestra, se observó que Asunción junto con el Departamento Central incluyeron al 42% de los pacientes y el 58% provinieron de distintos puntos del interior del país. Estas frecuencias podrían estar ligadas al restringido acceso a servicios de salud que cuenten con personal capacitado para el diagnóstico de patologías oncohematológicas. Los tres hospitales incluidos dentro de este estudio son centros de referencia a nivel nacional y se encuentran localizados en Asunción y Departamento Central.

5.2. Características de los pacientes al momento del diagnóstico

Se calcularon las medianas de edad en años, glóbulos blancos/mm³, plaquetas/mm³ y hemoglobina en g/dL al momento del diagnóstico en 39 pacientes cuyas fichas clínicas estaban completas o disponibles en los centros desde los cuales fueron derivados. Los datos obtenidos se compararon con valores reportados por *Savage et al* 1997 en 430 pacientes (9). Se encontró una diferencia significativa en relación a la mediana de edad ($p = 0,0142$; prueba de Wilcoxon), que fue de 44 años en el presente estudio y de 34 años para el grupo estudiado por *Savage et al* (9). En relación a los otros parámetros estudiados no hubo diferencia significativa.

Las medianas de edad reportadas en otros estudios fueron de 65 años (6), 64 años (50) y entre 45 y 55 años (7) indicando que existe variación de este parámetro de un estudio a otro. En nuestra población estudiada el 28,2% de los pacientes fue menor de 35 años, el 53,8% fueron menores de 45 años al momento del diagnóstico y el 76,9% resultó ser menor de 55. En base a estos resultados se puede afirmar que la mediana de edad de la población dentro de este estudio indica una mediana de edad al diagnóstico más cercana al límite inferior de lo reportado por *García-Manero et al* (7) correspondiente a 45 años.

En relación a la presencia o ausencia de esplenomegalia al momento del diagnóstico, el 77% (30/39) presentó esplenomegalia y el 23% (9/39) presentó bazo con tamaño normal. De los 430 pacientes estudiados por *Savage et al* 1997(9), en un periodo de 15 años, 75,8% presentó bazo palpable al momento del diagnóstico y 24,2% no presentó bazo aumentado de tamaño, mostrando estas frecuencias similitud con lo hallado en este estudio. Sin embargo, en el estudio de *Savage et al* 1997 se ha reportado una disminución progresiva de la frecuencia de esplenomegalia del 75% al 36% (9) así como un aumento de la incidencia de pacientes asintomáticos al diagnóstico del 15% al 40-50% (7). Se considera que estos cambios observados están relacionados a una asistencia médica más temprana (25) y a hallazgos casuales de leucocitosis en controles de rutina (6).

Una limitación encontrada en el presente estudio fue la obtención de datos clínicos completos debido a la falta de una base de datos. Esto sería una fuente importante no sólo en cuanto a pacientes con LMC se refiere, sino también para otras patologías hematooncológicas ya que nuestro país aún no cuenta con registro oficial.

Los resultados de cariotipo al diagnóstico demostraron que el 90% (35/39) presentó Cr Ph positivo t(9;22)(q34;q11.2), en 5% (2/39) se encontraron otras anomalías cromosómicas adicionales además del Cr Ph y en el otro 5% (2/39) el Cr Ph no fue visible al microscopio. Se sabe que entre un 90 a 95% de los casos de LMC presentan la típica translocación t(9;22)(q34;q11.2) cuyo derivado 22 corresponde al Cr Ph, portador del gen de fusión *BCR-ABL1*(2). En el 5 a 10% de los casos en los cuales no se observa el Cr Ph, una tercera parte de los mismos presentan el rearrreglo *BCR-ABL1* el cual puede ser detectado por técnicas de biología molecular. Dichos pacientes pueden presentar anomalías cromosómicas complejas que involucren 3, 4 e incluso 5 cromosomas o un cariotipo normal con una translocación críptica

entre las regiones 9q34 y 22q11.2 (2,12,25,56). Este hecho resalta la importancia de contar con técnicas de biología molecular como la RT-PCR que acompañen el estudio de cariotipo al diagnóstico a fin de confirmar la presencia del rearrreglo *BCR-ABL1* en aquellos pacientes con translocaciones complejas o con cariotipo normal al diagnóstico que presenten una clínica correspondiente a LMC. Cabe destacar que la detección del *BCR-ABL1* mediante RT-PCR implica una inversión de tiempo menor y permite confirmar el diagnóstico de manera más rápida. En estos pacientes se confirmó la presencia del rearrreglo *BCR-ABL1* isoforma b3a2 dentro de este estudio definiendo así el diagnóstico de LMC.

5.3. Detección y determinación de la frecuencia de los diferentes tipos de transcriptos *BCR-ABL1*

Se determinó el tipo de transcripto presente en 42 pacientes: 64% (27/42) fue positivo para la isoforma b3a2, 31% (13/42) mostró expresión de la isoforma b2a2 y 5% (2/42) fue positivo para ambas isoformas con predominio del transcripto b3a2. En los demás pacientes no pudo determinarse el tipo de transcripto correspondiente ya que los niveles de transcripto *BCR-ABL1* resultaron indetectables con la técnica RT-PCR de punto final o cualitativa.

Comparando las frecuencias obtenidas con las sugeridas por *Melo et al* 1996 (22), que postula a partir de una revisión de las frecuencias reportadas para varias poblaciones que en la población de pacientes adultos con LMC 2/3 expresa la isoforma b3a2 o de manera simultánea con la isoforma b2a2 y que 1/3 expresa solamente la isoforma b2a2, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,6444$; prueba χ^2 de comparación de proporciones).

Las frecuencias obtenidas en este estudio también fueron comparadas con las reportadas para distintas poblaciones del mundo mediante una prueba χ^2 de comparación de proporciones. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las

frecuencias reportadas en Ecuador ($p < 0,0001$) y en el estudio de *Rosas-Cabral et al* (57) en México ($p < 0,001$), siendo menor la frecuencia registrada para el transcritto b3a2 en relación al transcritto b2a2. Los autores sostienen que estas diferencias de frecuencias están relacionadas a diferencias de origen étnico en las poblaciones estudiadas(57,58).

En relación con las demás frecuencias reportadas (Tabla 15) no se encontró una diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 15. Frecuencia del tipo de transcrito *BCR-ABL* en otras poblaciones

Población ^(Referencia)	n	b3a2 (%)	b2a2 (%)	b3a2/b2a2 (%)	Otros* (%)
Brasil(59)	33	42,4	39,4	18,2	N/A
Brasil(60)	22	59,1	31,8	9,1	N/A
Argentina**	Sin dato	55,0	45,0	N/A	N/A
Ecuador(58)	37	5,4	94,6	N/A	N/A
México(57)	97	28,0	59,0	13,0	N/A
México(61)	93	48,0	40,0	12,0	N/A
Cuba(62)	25	60,0	32,0	N/A	8,0
Inglaterra(63)	119	61,0	34,0	5,0	N/A
Italia(64)	34	70,6	29,4	N/A	N/A
España(61)	84	55,0	45,0	N/A	N/A
Polonia(61)	114	64,0	36,0	N/A	N/A
Sudán(65)	43	41,9	53,5	4,6	N/A
India(66)	112	61,6	29,5	5,4	3,5
Tailandia(61)	119	61,0	34,0	5,0	N/A
Japón(67)	57	59,6	29,8	10,5	N/A

N/A: No aplica.

*Incluye los transcritos e1a2 y e19a2 codificantes de la proteína p190 y p230 además de otros transcritos con puntos de ruptura pocos frecuentes. ** Frecuencias comentadas en la Tesis Doctoral de la Bioq. Isabel Giere titulada: "Implicancia clinico-molecular de los reordenamientos génicos en leucemia mieloide crónica" presentada el 4 de julio de 2002 en la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires.

Dado que el Paraguay fue principalmente colonizado por españoles en tiempos de la conquista, se esperaría que las frecuencias halladas para este estudio no difirieran significativamente de las reportadas en relación a la población española. Un estudio de polimorfismos asociados a los genes codificantes de los Antígenos Humanos Leucocitarios realizado por *Benítez et al* 2010 (68), en el cual se compararon las frecuencias encontradas para una población de indígenas guaraníes, una población de “mestizos” paraguayos y tres poblaciones de tres regiones distintas de España demostró que la población de “mestizos” paraguayos se encontraba genéticamente distante de la población guaraní y más cercana a las poblaciones españolas.

Se han reportado polimorfismos en el exón 13 (b2) y en el intrón 13 del gen *BCR* que favorecen la eliminación del exón 14 (b3) de los transcritos *BCR* y *BCR-ABLI* y se encuentran en la totalidad de los pacientes que producen los transcritos b3a2 y b2a2 de manera conjunta, y en el 33% al 40% de los pacientes que expresan la isoforma b2a2 en Brasil y Australia respectivamente (69,70). Tal vez las frecuencias de los tipos de transcritos *BCR-ABLI* estén ligadas a las frecuencias de estos polimorfismos mencionados tanto en la población sana como en la de pacientes con LMC.

5.4. Prueba de sensibilidad de las reacciones de PCR

Las pruebas de sensibilidad de las reacciones de PCR mostraron una sensibilidad de hasta 10^{-4} a partir de diluciones de la línea celular K562 (b3a2) en ARN obtenido de un donador sano y de hasta 10^{-3} a partir de diluciones de ARN de un paciente positivo para ambas isoformas (b3a2 y b2a2). Los autores que publicaron las secuencias de cebadores utilizadas en este estudio no mencionan su sensibilidad (52), sin embargo otro trabajo en el cual fue probada la sensibilidad de cebadores diseñados para amplificar los transcritos codificantes de la proteína

p210 reportó una sensibilidad de 10^{-4} para la línea celular K562 y de 10^{-3} a partir de muestras de pacientes (18) coincidiendo con lo hallado en este estudio.

5.5. Cuantificación del transcripto *BCR-ABL1*

La cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* se realizó mediante el método de qRT-PCR utilizando el kit *One-Step qRT-PCR BCR-ABL (Molecular MD-EUA)* y la plataforma ABI PRISM 7500 (*Applied Biosystems-EUA*). Se empleó una cuantificación absoluta mediante el empleo de una curva estándar.

Las curvas estándares obtenidas presentaron valores de pendiente y coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) dentro de lo esperado. En la práctica es aceptable un valor de pendiente comprendido entre -3,0 y -3,9 condicionado a que el coeficiente de correlación (r) sea mayor a 0,95 (71). Las curvas estándares obtenidas dentro de este estudio se mantuvieron dentro de dicho rango, lo cual indica una buena eficiencia de las reacciones de PCR. Además, los promedios de pendiente obtenidos para ambas curvas estándares (*BCR-ABL1* y *ABL1*) no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($p > 0,05$; prueba t de Student para muestras no pareadas) indicando una cinética de reacción similar tanto para el transcripto *BCR-ABL1* como para el *ABL*. Éste último presenta dos funciones importantes en el proceso de cuantificación: por un lado permite corregir variaciones inherentes a la cantidad o calidad del ARN y por otro lado permite la normalización de la cantidad del transcripto en estudio (71). Se ha comprobado que el *ABL* es el gen control más idóneo frente a otros como *GUS* y *B2M* por las razones siguientes: presenta un nivel de expresión similar tanto en pacientes como en individuos sanos, no presenta pseudogenes y posee un nivel de expresión similar al gen de fusión *BCR-ABL1* lo cual permite llevar a cabo una cuantificación confiable (21,71).

Las cuantificaciones obtenidas para los 18 pacientes al diagnóstico mostraron gran variabilidad y distribución asimétrica por lo que se recurrió a la mediana como medida de tendencia central y al desvío intercuartílico como medida de dispersión para describir al conjunto de datos (72). En estudios previos se observaron valores de cuantificación con la misma variabilidad (30,36,73). La obtención de cuantificaciones por encima del 100% se considera como consecuencia del gran número de células inmaduras presentes al diagnóstico (36), en el caso de nuestro estudio al momento del diagnóstico 3 cuantificaciones se encontraban por encima de este porcentaje. Estos valores de cuantificación obtenidos de forma previa al inicio del diagnóstico se constituyen en los valores de base para cada paciente a partir de los cuales se podrá medir la disminución del transcripto *BCR-ABL1* una vez iniciado el correspondiente tratamiento. Sin embargo, no es necesario contar con el valor de base para cada paciente ya que se puede recurrir a la mediana y utilizarla como valor de base del laboratorio así como lo hicieron en el estudio *IRIS* a partir de muestras de 30 pacientes (30). De esta forma se puede medir la disminución del nivel del transcripto *BCR-ABL1* de un paciente ya en tratamiento utilizando la mediana de los valores de cuantificación obtenidos en aquellos pacientes que no han recibido ningún tipo de terapia. El valor de base obtenido para este estudio fue de 68% a partir de 18 cuantificaciones de pacientes al momento del diagnóstico restan 12 cuantificaciones más para sacar un valor de base definitivo, el cual posteriormente deberá ser validado en un laboratorio referencia a nivel internacional (35,40).

5.6.Determinación de la respuesta molecular a partir de la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* en pacientes en tratamiento.

De los 57 pacientes en tratamiento, 96% (55/57) estaba siendo tratado con Imatinib y 4% (2/57) se encontraba con inhibidor de tirosin quinasa de segunda generación (uno con

Nilotinib y otro con Dasatinib). Por lo general, previo al inicio del tratamiento con inhibidor de la tirosin quinasa los pacientes reciben hidroxiurea hasta la confirmación de la presencia del Cr Ph o del rearreglo *BCR-ABLI*.

Aquellos pacientes que cuentan con seguro del Instituto de Previsión Social obtienen el Imatinib en forma gratuita y aquellos que no son derivados al Hospital de Clínicas donde reciben el medicamento a través de la fundación *MAX* y su programa *GIPAP (Glivec® International Patient Assistance Program)* (55). Recién a finales de julio de 2012 se realizó el lanzamiento del Nilotinib en nuestro país (31). Este hecho, además de ser un importante avance para aquellos pacientes con síntomas clínicos de resistencia a Imatinib, explica la baja frecuencia de pacientes en tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa de segunda generación.

En una encuesta realizada a 435 médicos hematólogos de distintos países latinoamericanos (Brasil, México, Argentina, Colombia, Venezuela, Perú, Chile, Panamá, Nicaragua, El Salvador, Costa Rica, Guatemala, Honduras, Bolivia, Ecuador y Uruguay) 92% (400/435) afirmaron disponer del Imatinib como terapia inicial y 42% (183/435) afirmaron tener acceso a los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación (74). Esto demuestra que los inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación no siempre son accesibles en lo que respecta a Latinoamérica.

A partir de los valores de cuantificación obtenidos en EI, mediante aplicación del factor de conversión del kit se determinó la respuesta al tratamiento de estos 57 pacientes. Así, el 21% de los pacientes se encontraba en RM Nula, 28% presentó RM Mínima, 12%, 18% en RM Mayor y 21% mostró RM Completa.

Teniendo en cuenta los tiempos de tratamiento (obtenidos para 47 pacientes de los 57 en tratamiento) dentro de cada grupo de respuesta molecular se pudo constatar que 34% (16/47) se encontraba en respuesta subóptima: 28% (13/47) con niveles de transcripto por encima de una RM Mayor a más de 18 meses de tratamiento y 6% (3/47) con niveles de transcripto sobrepasando el 10% entre los 3 y 18 meses de tratamiento. Se reporta que 65-85% de los pacientes tratado con Imatinib como terapia de primera línea presentan respuestas favorables (75). Por lo tanto existe un 35-15% que no responde de manera tan favorable. Cabe mencionar también que el estudio *IRIS* (30) 30% de los pacientes no presentaron una respuesta citogenética completa a los un año de tratamiento.

Existen varios factores que pueden estar asociados a una respuesta subóptima entre los cuales se encuentran el cumplimiento del tratamiento por parte de paciente, diferencias individuales en cuanto al metabolismo de la droga, expresión aberrante de proteínas transportadoras o variaciones biológicas como la presencia de clones más sensibles al Imatinib o más resistentes (76).

Se observaron 11% (5/47) de los pacientes entre 3 y 18 meses de tratamiento dentro del grupo de RM Menor. A los 12 meses de tratamiento se espera en aquellos pacientes con buena repuesta al tratamiento una respuesta citogenética completa (0% de metafases Ph+ en médula ósea) (32,34). Esta respuesta a nivel citogenético se asocia a una disminución del nivel de transcripto ≥ 2 (entre 0,1-1%) lo que se correspondería a una RM Menor (54). A fin de corroborar esta repuesta, se recomendaría un estudio de cariotipo en este grupo de pacientes.

Entre los criterios de respuesta subóptima establecidos por la *European Leukemia Net*, se encuentra la falta de una RM Mayor a los 18 meses de tratamiento (77). Dentro de nuestro grupo de pacientes estudiados se registraron 3 pacientes con RM Mayor o Completa antes de los 18 meses de tratamiento, Dichos pacientes caen dentro del grupo de buen pronóstico ya que

una RM Mayor a los 18 meses de tratamiento se asocia a una probabilidad del 98% de sobrevida libre de evento y 100% sin progresión a fase acelerada o crisis blástica a los 72 meses de seguimiento (38). En cuanto a los demás pacientes que obtuvieron una buena respuesta molecular, al no contar con varias mediciones previas no es posible determinar el tiempo del tratamiento al cual alcanzaron una RM Mayor o Completa. Por lo tanto no se puede inferir si se encuentran o no dentro del grupo de mejor pronóstico.

5.7. Medición de la disminución del transcripto *BCR-ABL1* en pacientes bajo tratamiento con inhibidor de tirosin quinasa.

Dentro del grupo de 7 pacientes en los cuales fueron obtenidos el valor de base al momento del diagnóstico y una segunda medición una vez iniciado el tratamiento 72% (5/7) registró una disminución por debajo el 10%. Esta disminución indica una respuesta al tratamiento (32). Por otro lado, 28% (2/7) obtuvo cuantificaciones superiores al 10%. En estos dos pacientes, uno se encontraba a tres meses de iniciado el tratamiento y su cariotipo en este mismo periodo resultó 50% Ph+. Esto indica una respuesta subóptima al tratamiento por lo cual sería aconsejable realizar ajustes como aumentar la dosis de Imatinib (32,34). El otro paciente, si bien presentaba una cuantificación > a 10%, al mes de tratamiento su nivel de transcripto había disminuido mas de 6 veces su valor inicial. Se ha reportado que una disminución del 50% del valor inicial al mes de tratamiento se asocia a una mayor probabilidad de presentar una respuesta citogenética completa a los seis meses (78) por lo que en este caso el tratamiento mostraría indicios de estar funcionando de forma óptima. Así podemos afirmar que la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* aporta información de manera temprana sobre acerca de la respuesta del paciente al tratamiento.

5.8. Correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el %*BCR-ABL1/ABL1* en Sangre Periférica.

En un grupo de 18 pacientes se analizaron 20 muestras, 10 al tiempo cero y 10 al tratamiento, a partir de las cuales se obtuvo el % de células con Cr Ph⁺ en médula ósea y se correlacionó con la cantidad de transcripto % *BCR-ABL1/ABL1* en EI obtenida a partir de muestras de sangre periférica colectadas al mismo tiempo (forma paralela). El coeficiente de correlación de Spearman (r_s) fue de 0.8108 y resultó altamente significativo ($p < 0,0001$; prueba del rango de Spearman). Este resultado se encuentra dentro de los valores reportados previamente en otros estudios (Tabla 16), lo cual indica que la qRT-PCR es una metodología válida de seguimiento, resultando más comfortable para el paciente ya que se realiza a partir de sangre periférica y no se requiere punción de médula ósea. Existen además reportes que apoyan una buena correlación entre el %*BCR-ABL1/ABL1* medido a partir de sangre periférica y en médula ósea (79,80).

Tabla 16. Coeficiente de correlación de Spearman (r_s) y valor de p obtenidos para la correlación entre el porcentaje de células con Cromosoma Philadelphia en Médula Ósea y el %*BCR-ABL1/ABL1* en Sangre Periférica.

Estudio	Coeficiente de correlación de Spearman (r_s)	Valor p
<i>Branford et al(36)</i>	0,9400	< 0,0001
<i>Merx et al(78)</i>	0,7400	< 0,0001
<i>Wang et al(81)</i>	0,8500	< 0,001
<i>Kantarjian et al(79)</i>	0,9200	< 0,001
<i>Lange et al(80)</i>	0,6840	< 0,001
<i>Ross et al(82)</i>	0,7650	< 0,001
Este estudio	0,8108	< 0,0001

En cuanto al valor predictivo de los niveles de transcriptos *BCR-ABL1* medidos a partir de sangre periférica y la subsecuente respuesta citogenética medida a partir del número de células Ph+ en médula ósea se ha reportado que la cuantificación obtenida a los 2 meses mediante qRT-PCR predice la respuesta molecular a los 6 meses (18), de la misma forma se ha correlacionado los niveles de transcripto en sangre periférica a los 3 con la probabilidad de alcanzar una respuesta citogenética mayor a los 6 meses (80). Esto resalta la importancia del seguimiento molecular desde los primeros estadios del tratamiento como herramienta para identificar aquellos pacientes que podrían no estar respondiendo de manera óptima y realizar

los ajustes pertinentes en el régimen de tratamiento. Sin embargo, a pesar del valor predictivo que aportan los niveles de transcriptos en las primeras etapas del tratamiento, no es recomendable dejar de lado el seguimiento a nivel citogenético ya que el mismo puede proporcionar evidencia sobre la aparición de otras anomalías cromosómicas. Es este estudio un paciente, con más de tres años de tratamiento con Imatinib y con una respuesta molecular mayor determinada por qRT-PCR, presentó el cariotipo siguiente: 46, XY/47, XY +21. La trisomía 21 se describe como una alteración secundaria de la ruta mayor que podría preceder o indicar progresión de la enfermedad (83). En consecuencia, controles periódicos de cariotipo deben acompañar al seguimiento molecular en caso de una eventual aparición de una anomalía cromosómica asociada al progreso de la enfermedad. Se recomienda que aquellos pacientes en respuesta citogenética completa mantengan controles de cariotipo una vez al año (37).

5.9.Perspectivas

Luego de culminado este estudio se pretende conseguir los recursos necesarios para instalar la detección y cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* como servicio dentro del IICS a los pacientes con LMC tanto al momento del diagnóstico como para seguimiento del tratamiento. Además, dada la llegada al país de inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación(31), teniendo en cuenta que dentro del grupo de pacientes en tratamiento 34% presentó niveles de transcripto indicativos de una respuesta subóptima, consideramos necesaria la implementación de técnicas que permitan la detección de mutaciones del dominio ABL quinasa de la proteína BCR-ABL a fin de descartar mutaciones no sensibles a inhibidores de la tirosina quinasa de segunda generación (20).

Una necesidad observada a partir de la implementación del presente estudio es la implementación de una base de datos de patologías hematooncológicas de manera conjunta con

la creación de un banco de muestras. Esta iniciativa podrá proporcionar, por un lado datos epidemiológicos más completos de la población paraguaya y por otro lado una fuente de material de estudio para futuros proyectos de investigación o implementación de técnicas moleculares de diagnóstico dado que dentro de este grupo de patologías las anomalías genéticas están siendo incluidas como criterio diagnóstico (2).

También proponemos la implementación de la detección de otros transcritos *BCR-ABL1*, como el e1a2 y el e19a2, presentes en menor frecuencia en pacientes con LMC pero de gran importancia para otras patologías como la Leucemia Linfoblástica Aguda tanto en adultos como en niños o una variante de la LMC conocida como Leucemia Neutrofilica Crónica (22). Consideramos también importante el estudio mediante técnicas de secuenciación del paciente reportado con una translocación compleja conjuntamente con la presencia del transcrito *BCR-ABL1* isoforma b3a2 y un porcentaje bajo de cuantificación al momento del diagnóstico, a fin de descartar o confirmar la presencia de un transcrito de fusión atípico.

Por último, proponemos el estudio del polimorfismo reportado para el exón 13 (b2) del gen *BCR*, que promueve la eliminación del exón 14 durante el procesamiento de ARN mensajero, tanto en pacientes con LMC así como en población sana a fin de correlacionar dicho polimorfismo con las frecuencias de transcritos de fusión *BCR-ABL1* observada en la población de pacientes (69,70).

6. Conclusiones

Para el presente estudio fueron analizados un total de 69 pacientes *BCR-ABL1* positivos provenientes de tres hospitales públicos de referencia.

6.1. Se determinó el tipo de transcripto para 42 pacientes con leucemia mieloide crónica junto con las frecuencias de las isoformas: 64% b3a2, 31% b2a2 y 5% b3a2/b2a2.

6.2. Se obtuvo la cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* en 19 pacientes al diagnóstico y en 57 pacientes al tratamiento. A partir de las cuantificaciones realizadas en los pacientes en tratamiento se determinó la respuesta molecular a los inhibidores de la tirosina quinasa y teniendo en cuenta el tiempo de tratamiento obtenido para 47 pacientes, el 34% de estos mostraron valores de cuantificación indicativos de una respuesta subóptima.

6.3. Se obtuvo una correlación buena entre el % de células Ph⁺ en médula ósea y la cantidad de transcripto *BCR-ABL1* en sangre periférica. Esto indica que las cuantificaciones obtenidas son válidas para realizar el seguimiento de los pacientes.

6.4. Finalmente, con este estudio se consiguió implementar por primera vez a nivel nacional la detección y cuantificación del transcripto *BCR-ABL1* en pacientes con leucemia mieloide crónica, introduciéndose así una herramienta necesaria para el diagnóstico y seguimiento de la respuesta al tratamiento. Esto resulta además un gran avance junto que a la llegada de los inhibidores de tirosina quinasa de segunda generación.

7. Anexos

ANEXO A

INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

PROYECTO: DETECCIÓN MOLECULAR DEL REARREGLO BCR-ABL EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

A través de esta hoja deseamos que Usted reciba toda la información para que pueda decidir si quiere participar en este proyecto. Nosotros le aclararemos todas las dudas que pueda tener.

El objetivo de este proyecto es poner en óptimas condiciones una nueva tecnología que en Paraguay todavía no se realiza, para diagnosticar y seguir el tratamiento de pacientes que como Usted tienen leucemia mieloide crónica.

Si decide participar, le sacaremos un poco de sangre de una vena del brazo; el equivalente a una cuchara (10 mL), esto puede causarle algunas molestias pero no es riesgoso para su salud. A esta muestra de sangre le asignaremos un código (un número), que nosotros utilizaremos para identificarla, así resguardaremos sus datos y aseguramos la confidencialidad, esto quiere decir que su participación en este estudio será anónima, nadie a no ser los investigadores de este proyecto, sabrán que usted está participando y que su nombre no aparecerá en ninguna presentación o publicación que puede resultar de esta investigación.

Si bien es cierto que su participación es voluntaria y gratuita (no deberá pagar nada), como lo que estamos tratando de hacer es implementar una nueva tecnología, el resultado de su estudio puede tardar mucho tiempo en entregarse, o inclusive existe la posibilidad de que no pueda entregarse. En caso de que consigamos hacer funcionar esta técnica los resultados le serán muy útiles y beneficiarán también a otros pacientes con la misma enfermedad.

En caso de que en un futuro pueda implementarse otras técnicas relacionadas a este proyecto nos gustaría pedirle permiso para guardar un poco de su muestra para que nos autorice utilizarla. En este caso, antes de volver a utilizarla nos comunicaremos como usted para pedirle su autorización, por este motivo sus datos de contacto (nombre, teléfono y dirección) quedarán guardados y nadie a no ser los investigadores tendrán acceso a estos datos.

Las investigadoras responsables son la Lic. Silvia Sánchez y/o la Dra. Ana Ayala Lugo, del Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Molecular y Genética del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la UNA. Ante cualquier duda puede comunicarse de lunes a viernes, al teléfono 423618 en el laboratorio de Genética, en horario de 7.00 a 13.00 hrs.

ANEXO B

CONSENTIMIENTO LIBRE Y DE ACLARACION AL DONANTE VOLUNTARIO

DETECCIÓN MOLECULAR DEL REARREGLO BCR-ABL EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA.

Justificativo: El presente trabajo tiene como objetivo identificar, detectar y cuantificar los transcritos BCR-ABL que producen la leucemia mieloide crónica por técnicas de biología molecular.

Es importante que usted lea y entienda que:

- 1) Este estudio **NO** tiene ningún costo para usted.
- 2) Su participación es voluntaria.
- 3) Que al tratarse de un estudio que pretende implementar y estandarizar una nueva tecnología y técnica, el resultado de su estudio puede **tardar mucho tiempo en entregarse** o inclusive existe la posibilidad de que **NO** se pueda entregar.
- 4) En caso de que **SI** se consiga esta nueva tecnología y técnica, su resultado será entregado y usted tendrá el beneficio de contar con el resultado molecular del seguimiento y detección de su enfermedad.
- 5) Su donación consistirá en la toma de 10 mL sangre del brazo.
- 6) Este material quedará guardado en el laboratorio junto con sus datos personales, teléfono y dirección. Estos datos no serán utilizados para ninguna otra cosa que no sea el presente proyecto.

- 7) En caso de que en un futuro puedan implementarse otras técnicas relacionadas a este proyecto y necesitemos de nuevo de este material que quedará congelado, usted será contactado de nuevo para pedir su autorización.
- 8) La participación de usted en este estudio será anónima es decir nadie a no ser los investigadores sabrán que usted está participando. Su nombre no aparecerá en ninguna presentación o publicación que puede resultar de esta investigación.

Si no comprendo algo debo solicitar su aclaración al investigador responsable: Dra. Ana Ayala Lugo o Lic. Silvia Sánchez del laboratorio de Genética del IICS.

Por lo tanto, Yo.....,

con CIN°:.....entiendo que la toma de muestra de sangre del brazo no implica riesgo alguno para mi salud, ya que la misma será obtenida con materiales estériles, leí y comprendí todos los puntos anteriormente citados por lo tanto **ACEPTO** participar de este estudio.

.....

Paciente

Nombre:

ATORIZACIÓN DE LOS PADRES O TUTORES LEGALES

He leído el procedimiento descrito arriba. El (la) investigador(a) me ha explicado el proyecto y ha contestado mis preguntas. Voluntariamente doy mi consentimiento para que mi hijo(a) _____, participe en el proyecto.

Padre/Madre / Tutor Legal

.....

Investigadores responsables

Lic. Silvia Sánchez (CI. 2354584) y/o Dra. Ana Ilda Ayala Lugo (CI. 1874735)

8. Bibliografía

1. Carlos Gispert. Diccionario Médico. 4ª Edición ed. Barcelona: OCEANO; 1996.
2. Vardiman JW, Elias Campo, Nancy Lee Harris, Elaine S. Jaffe, Stefano A. Pileri, Harald Stein, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4ª ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2008.
3. Fanny Carreño. Estudio molecular del oncogen BCR/ABL t (9:22) en pacientes venezolanos con Leucemia Mieloide Crónica. [Tesis Doctoral]. [Sertenejas]: Universidad Simón Bolívar; 2008.
4. Lo que usted necesita saber sobreTM la leucemia - National Cancer Institute [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/necesita-saber/leucemia/page1>
5. Leucemia mielógena crónica: Tratamiento (PDQ®) - National Cancer Institute [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/leucemiamielogena/Patient/page1>
6. Quintás-Cardama A, Cortes JE. Chronic Myeloid Leukemia: Diagnosis and Treatment. Mayo Clin Proc. 2006;81(7):973-88.
7. Garcia-Manero G, Faderl S, O'Brien S, Cortes J, Talpaz M, Kantarjian HM. Chronic myelogenous leukemia: A review and update of therapeutic strategies. Cancer. 2003;98(3):437-57.
8. Cotta CV, Bueso-Ramos CE. New insights into the pathobiology and treatment of chronic myelogenous leukemia. Ann Diagn Pathol. 2007;11(1):68-78.

9. Savage DG, Szydlo RM, Goldman JM. Clinical features at diagnosis in 430 patients with chronic myeloid leukaemia seen at a referral centre over a 16-year period. *Br J Haematol.* 1997;96(1):111-6.
10. Peter C. Nowell, David A. Hungerford. A minute chromosome in Human Chronic Granulocytic Leukemia. *Science.* 1960;132(3438):1488-501.
11. Janet D. Rowley. A New Consistent Chromosomal Abnormality in Chronic Myelogenous Leukemia identified by Quinacrine Fluorescence and Giemsa Staining. *Nature.* 1973;243(1):290-3.
12. Achkar WA, Wafa A, Mkrтчyan H, Moassass F, Liehr T. Novel complex translocation involving 5 different chromosomes in a chronic myeloid leukemia with Philadelphia chromosome: a case report. *Mol Cytogenet.* 2009;2(1):21.
13. Achkar WA, Wafa A, Mkrтчyan H, Moassass F, Liehr T. A rare case of chronic myeloid leukemia with secondary chromosomal changes including partial trisomy 17q21 to 17qter and partial monosomy of 16p13.3. *Mol Cytogenet.* 2010;3(1):6.
14. Manabe M, Yoshii Y, Mukai S, Sakamoto E, Kanashima H, Inoue T, et al. A Rare t(9;22;16)(q34;q11;q24) Translocation in Chronic Myeloid Leukemia for Which Imatinib Mesylate Was Effective: A Case Report. *Leuk Res Treatment.* 2011;2011:1-3.
15. Amare P. Chronic myeloid leukemia: Cytogenetics and molecular genetics. *Indian J Hum Genet.* 2002;8(1):4-10.
16. Vargas M MT, Fernández-Novoa G M del C, García-Creus R MD, González R J. Trisomía 8 en dos casos de leucemia mieloide crónica ABL/BCR negativo. *Revista médica de Chile*

- [Internet]. abril de 2002 [citado 18 de marzo de 2013];130(4). Recuperado a partir de:
http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_isoref&pid=S0034-98872002000400015&lng=es&tlng=e
17. Melo JV, Hughes TP, Apperley JF. Chronic Myeloid Leukemia. *Hematology*. 2003(1):132-52.
 18. JJM van Dongen, EA Macintyre, JA Gabert, E Delabesse, V Rossi, G Saglio, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia* [Internet]. 1999 [citado 3 de diciembre de 2012];13(12). Recuperado a partir de:
<http://www.nature.com/leu/journal/v13/n12/abs/2401592a.html>
 19. Laurent E, Talpaz M, Kantarjian H, Kurzrock R. The BCR Gene and Philadelphia Chromosome-positive Leukemogenesis. *Cancer Res*. 2001;61(6):2343-55.
 20. Hochhaus A, Rosée PL, Müller MC, Ernst T, Cross NCP. Impact of BCR-ABL mutations on patients with chronic myeloid leukemia. *Cell Cycle*. 2011;10(2):250-60.
 21. Gabert J, Beillard E, Velden VHJ van der, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of ‘real-time’ quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia*. 2003;17(12):2318-57.
 22. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype [editorial; comment]. *Blood*. 1996;88(7):2375-84.

23. Marjan Yaghmaie, Seyed H. Ghaffari, Ardachir Ghavamzadeh, Kamran Alimoghaddam, Mohammad Jahani, Seyed-Asadollah Mousavi, et al. Frequency of BCR-ABL Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia. Arch Iran Med. 2008;11(3):247-51.
24. cml.pdf (objeto application/pdf) [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/cml.pdf
25. Ernest Beutler, Marshall A. Lichtman, Barry S. Coller, Thomas J. Kipps, Uri Seligsohn. Hematología. 6° Edición. Madrid: MARBÁN; 2005.
26. Tefferi A, Dewald GW, Litzow ML, Cortes J, Mauro MJ, Talpaz M, et al. Chronic Myeloid Leukemia: Current Application of Cytogenetics and Molecular Testing for Diagnosis and Treatment. Mayo Clinic proceedings. Mayo Clin Proc. 2005;80(3):390-402.
26. Geary CG. The story of chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2000;110(1):2-11.
27. Deininger MW. Milestones and Monitoring in Patients with CML Treated with Imatinib. Hematology. 2008;2008(1):419-26.
28. Silver RT, Woolf SH, Hehlmann R, Appelbaum FR, Anderson J, Bennett C, et al. An Evidence-Based Analysis of the Effect of Busulfan, Hydroxyurea, Interferon, and Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Treating the Chronic Phase of Chronic Myeloid Leukemia: Developed for the American Society of Hematology Presented in part at the Education Session of the American Society of Hematology, December 5, 1998, Miami Beach, FL. Blood. 1999;94(5):1517-36.

29. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, et al. Frequency of Major Molecular Responses to Imatinib or Interferon Alfa plus Cytarabine in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 2003;349(15):1423-32.
31. Tassigna, nueva droga para la leucemia - ABC Color [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.abc.com.py/edicion-impresa/locales/tassigna-nueva-droga-para-la-leucemia-430953.html>
32. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology [Internet]. [citado 29 de septiembre de 2012]. Recuperado a partir de: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp
33. Raquel M. Bengio, Patricia Gargallo, Paula Barreyro, Roberto Bitton, Irene Larripa. Leucemia Mieloide Crónica Mecanismos Genéticos de Resistencia al Imatinib. *MEDICINA.* 2007;67(Supl II):71-4.
33. Baccarani M, Saglio G, Goldman J, Hochhaus A, Simonsson B, Appelbaum F, et al. Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 2006;108(6):1809-20.
34. Muller MC, Cross NCP, Erben P, Schenk T, Hanfstein B, Ernst T, et al. Harmonization of molecular monitoring of CML therapy in Europe. *Leukemia.* 2009;23(11):1957-63.
71. Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable alternative to bone marrow cytogenetics. *Br J Haematol.* 1999;107(3):587-99.
35. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations

for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37.

36. Hughes TP, Hochhaus A, Branford S, Muller MC, Foroni L, Druker BJ, et al. Reduction of BCR-ABL Transcript Levels at 6, 12, and 18 Months (mo) Correlates with Long-Term Outcomes on Imatinib (IM) at 72 Mo: An Analysis from the International Randomized Study of Interferon versus STI571 (IRIS) in Patients (pts) with Chronic Phase Chronic Myeloid Leukemia (CML-CP). *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2008;112(11):334.
37. Hanfstein B, Muller MC, Erben P, Lauseker M, Saussele S, Proetel U, et al. Molecular and Cytogenetic Response After 3 Months of Imatinib Treatment Is Predictive for the Risk of Disease Progression and Death in Newly Diagnosed Chronic Myeloid Leukemia Patients - a Follow-up Analysis of the German CML Study IV. *ASH Annual Meeting Abstracts*. 2011;118(21):783.
38. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*. 2006;108(1):28-37.
39. Branford S, Fletcher L, Cross NCP, Müller MC, Hochhaus A, Kim D-W, et al. Desirable performance characteristics for BCR-ABL measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. *Blood*. 2008;112(8):3330-8.

40. Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, et al. Dasatinib versus Imatinib in Newly Diagnosed Chronic-Phase Chronic Myeloid Leukemia. *New Engl J Med.* 2010;362(24):2260-70.
41. Nakamae H, Shibayama H, Kurokawa M, Fukuda T, Nakaseko C, Kanda Y, et al. Nilotinib as frontline therapy for patients with newly diagnosed Ph+ chronic myeloid leukemia in chronic phase: results from the Japanese subgroup of ENESTnd. *Int J Hematol.* 2011;93(5):624-32.
42. Cortes JE, Kim D-W, Pinilla-Ibarz J, Le Coutre PD, Chuah C, Nicolini FE, et al. Initial Findings From the PACE Trial: A Pivotal Phase 2 Study of Ponatinib in Patients with CML and Ph+ ALL Resistant or Intolerant to Dasatinib or Nilotinib, or with the T315I Mutation. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2011;118(21):109.
43. Cortes JE, Talpaz M, Kantarjian HM, Smith H, Bixby D, Rafferty U, et al. A Phase 1 Study of DCC-2036, a Novel Oral Inhibitor of BCR-ABL Kinase, in Patients with Philadelphia Chromosome Positive (Ph+) Leukemias Including Patients with T315I Mutation. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2011;118(21):601.
46. FDA Approves Ponatinib to Treat Leukemia - Cancer Network [Internet]. [citado 18 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.cancernetwork.com/leukemia/content/article/10165/2120240>
45. Goh H-G, Choi S-Y, Bang J-H, Kim S-H, Jang E-J, Kim D, et al. Discontinuation of Imatinib Therapy in Chronic Myeloid Leukemia Patients with Sustained Complete Molecular Response. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 2011;118(21):2763.

46. Rea D, Rousselot P, Nicolini FE, Legros L, Tulliez M, Giraudier S, et al. Discontinuation of Dasatinib or Nilotinib in Chronic Myeloid Leukemia (CML) Patients (pts) with Stable Undetectable Bcr-Abl Transcripts: Results From the French CML Group (FILMC). ASH Annual Meeting Abstracts. 2011;118(21):604.
47. Melo JV, Ross DM. Minimal Residual Disease and Discontinuation of Therapy in Chronic Myeloid Leukemia: Can We Aim at a Cure? Hematology. 2011;2011(1):136-42.
48. Chomel J-C, Turhan AG. Chronic myeloid leukemia stem cells in the era of targeted therapies: resistance, persistence and long-term dormancy. Oncotarget. 2011;2(9):713-27.
51. Dany Spencer Adams. Lab Math: A handbook of measurements, calculations and other quantitative skills for use at the bench. Primera edición. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
50. Sagayadan GE, Wiernik PH, Sun N, Ahearn G, Thompson D, Hallam SJ, et al. Effect of retinoic acid and interferon alpha on granulocyte-macrophage colony forming cells in chronic myeloid leukemia: Increased inhibition by all-trans- and 13-cis-retinoic acids in advanced stage disease. Leuk Res. 1994;18(10):741-8.
53. National Cancer Institute. Chronic Myeloid Leukemia - SEER Stat Fact Sheets [Internet]. [citado 30 de octubre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cmyle.html>
54. European Leukemia Network: Imatinib PCR testing for CML [Internet]. [citado 3 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de:

http://www.eutos.org/content/molecular_monitoring/information/pcr_testing/index_eng.htm

1

55. The Max Foundation [Internet]. [citado 30 de octubre de 2012]. Recuperado a partir de: <http://www.themaxfoundation.org/GIPAP/Answers.aspx?q=13>
54. Verma RS, Chandra P. Clinical significance of reverse BCR/ABL gene rearrangement in Ph-negative chronic myelogenous leukemia. *Leuk. Res.* 2000;24(7):631-5.
55. Alejandro Rosas-Cabral, Manuel Martínez-Mancilla, Manuel Ayala-Sánchez, Jorge Vela-Ojeda, Patricia Bahena-Reséndiz, Manuel Vadillo-Beunfil, et al. Análisis del tipo de transcrito bcr-abl y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. *Gac Méd Méx.* 2003;139(6):553-9.
56. Paz-y-Miño C, Burgos R, Morillo SA, Santos JC, Fiallo BF, Leone PE. BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002;132(1):65-7.
57. Meissner R de V, Covas DT, Dias PMB, Job F, Leite M, Nardi NB. Analysis of mRNA transcripts in chronic myeloid leukemia patients. *Genet Mol Biol.* 1999;22(4):475-9.
60. Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia [Internet]. [citado 4 de diciembre de 2012]. Recuperado a partir de: http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2005/vol4-4/gmr0158_full_text.htm
59. Meza-Espinoza JP, Gutiérrez-Angulo M, Vázquez-Cárdenas A, Delgado-Lamas JL, Esparza-Flores MA, González-García JR. Prevalence of the BCR/ABL1 transcripts in Mexican patients with chronic myelogenous leukemia. *Rev. Invest. Clin.* 2007;59(5):338-41.

60. Karina Casanueva-Calero, Gretta Pantaleón-Florido, Yeniley Ruis-Noa, Jorge Mato-Luis, Marlene Quesada-Dorta, José Carnot-Uria. Estudio del reordenamiento molecular BCR-ABL en pacientes cubanos con diagnóstico presuntivo de leucemia mieloide crónica. *Rev Hematol.* 2011;12(4):243-8.
61. Shepherd P, Suffolk R, Halsey J, Allan N. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol.* 1995;89(3):546-54.
62. Martinelli G, Testoni N, Montefusco V, Amabile M, Saglio G, Ottaviani E, et al. Detection of bcr-abl transcript in chronic myelogenous leukemia patients by reverse-transcription-polymerase chain reaction and capillary electrophoresis. *Haematologica.* 1998;83(7):593-601.
65. Osman E-AI, Hamad K, Elmula IMF, Ibrahim ME. Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukaemia patients. *Genet Mol Biol.* 2010;33(2):229-31.
64. Mondal BC, Bandyopadhyay A, Majumdar S, Mukhopadhyay A, Chandra S, Chaudhuri U, et al. Molecular profiling of chronic myeloid leukemia in eastern India *Am J Hematol.* 2006;81(11):845-9.
65. Inokuchi K, Inoue T, Tojo A, Futaki M, Miyake K, Yamada T, et al. A possible correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet count in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood.* 1991;78(12):3125-7.

66. Benitez O, Busson M, Charron D, Loiseau P. HLA polymorphism in a Guarani-Indian population from Paraguay and its usefulness for the Hispano-Indian admixture study in Paraguay. *Int J Immunogenet.* 2011;38(1):7-11.
67. Meissner RV, Dias PM, Covas DT, Job F, Leite M, Nardi NB. A polymorphism in exon b2 of the major breakpoint cluster region (M-bcr) identified in chronic myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol.* 1998;103(1):224-6.
68. Branford S, Hughes TP, Rudzki Z. 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. *Br J Haematol.* 2002;117(4):875-7.
71. Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJM. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* print;17(6):1013-34.
72. Sidia M. Callegari-Jacques. *Bioestadística: Principios y aplicaciones.* Primera edición. Brasil: Artmed; 2003.
72. Branford S, Rudzki Z, Harper A, Grigg A, Taylor K, Durrant S, et al. Imatinib produces significantly superior molecular responses compared to interferon alfa plus cytarabine in patients with newly diagnosed chronic myeloid leukemia in chronic phase. *Leukemia.* 2003;17(12):2401-9.
73. Cortes J, De Souza C, Ayala-Sanchez M, Bendit I, Best-Aguilera C, Enrico A, et al. Current patient management of chronic myeloid leukemia in Latin America: a study by the Latin American Leukemia Net (LALNET). *Cancer.* 2010;116(21):4991-5000.

74. Jabbour E, Cortes JE, Kantarjian HM. Suboptimal Response to or Failure of Imatinib Treatment for Chronic Myeloid Leukemia: What Is the Optimal Strategy? *Mayo Clin Proc.* 2009;84(2):161-9.
75. O'Brien S, Berman E, Moore JO, Pinilla-Ibarz J, Radich JP, Shami PJ, et al. NCCN Task Force report: tyrosine kinase inhibitor therapy selection in the management of patients with chronic myelogenous leukemia. *J Natl Compr Canc Netw.* 2011;9 Suppl 2:S1-25.
76. Baccarani M, Cortes J, Pane F, Niederwieser D, Saglio G, Apperley J, et al. Chronic Myeloid Leukemia: An Update of Concepts and Management Recommendations of European LeukemiaNet. *J Clin Oncol.* 2009;27(35):6041-51.
77. Merx K, Müller MC, Kreil S, Lahaye T, Paschka P, Schoch C, et al. Early reduction of BCR-ABL mRNA transcript levels predicts cytogenetic response in chronic phase CML patients treated with imatinib after failure of interferon alpha. *Leukemia.* 2002;16(9):1579-83.
78. Kantarjian HM, Talpaz M, Cortes J, O'Brien S, Faderl S, Thomas D, et al. Quantitative polymerase chain reaction monitoring of BCR-ABL during therapy with imatinib mesylate (STI571; gleevec) in chronic-phase chronic myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.* 2003;9(1):160-6.
79. Lange T, Bumm T, Otto S, Al-Ali H-K, Kovacs I, Krug D, et al. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction should not replace conventional cytogenetics for monitoring patients with chronic myeloid leukemia during early phase of imatinib therapy. *Haematologica.* 2004;89(1):49-57.

80. Wang L, Pearson K, Pillitteri L, Ferguson JE, Clark RE. Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2002;118(3):771-7.
81. Ross DM, Branford S, Moore S, Hughes TP. Limited clinical value of regular bone marrow cytogenetic analysis in imatinib-treated chronic phase CML patients monitored by RQ-PCR for BCR-ABL. *Leukemia.* 2006;20(4):664-70.
82. Dávila-Rodríguez MI, Cerda-Flores RM, Leal-Garza CH, Arana-Trejo RM, Báez-de la Fuente E, Cortés-Gutiérrez EI. Alteraciones cromosómicas secundarias en pacientes con leucemia mieloide crónica, en un hospital de referencia del noreste de México. *Gac Méd Méx.* 2004;140(6):589-92.