



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DEL GEN FUSIÓN BCR-ABL
RELACIONADOS CON LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA MEDIANTE
LAS TÉCNICAS DE RT-PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR

Autora

Kimberly Naomi Proaño Rubio

Año
2019



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS APLICADAS

ANÁLISIS DE LOS TRANSCRITOS DEL GEN FUSIÓN *BCR-ABL*
RELACIONADOS CON LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA MEDIANTE LAS
TÉCNICAS DE RT-PCR Y ELECTROFORESIS CAPILAR

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesor Guía

M.Sc. German Burgos Figueroa

Autora

Kimberly Naomi Proaño Rubio

Año

2019

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

"Declaro haber dirigido el trabajo, Análisis de los transcritos del gen fusión *BCR-ABL* relacionados con la leucemia mieloide crónica mediante las técnicas de RT-PCR y electroforesis capilar a través de reuniones periódicas con la estudiante Kimberly Naomi Proaño Rubio, en el semestre 201910, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

German Burgos Figueroa
Magíster en Biología
CI: 1721014379

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

"Declaro haber revisado este trabajo, Análisis de los transcritos del gen fusión *BCR-ABL* relacionados con la leucemia mieloide crónica mediante las técnicas de RT-PCR y electroforesis capilar, de Kimberly Naomi Proaño Rubio, en el semestre 201910, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

María Isabel Baroja Oviedo
Master en ciencias. Biotecnología biomédica.
CI: 1720077211

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.”

Kimberly Naomi Proaño Rubio
CI: 1718815796

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por todas sus bendiciones y por guiarme durante toda mi carrera universitaria.

A mis padres a los que admiro por su trabajo duro y quienes siempre han apoyado las decisiones que he tomado durante toda mi carrera. Gracias a ellos por darme tantas oportunidades en la vida.

A Juan José por motivarme siempre a alcanzar mis objetivos y jamás dudar de mí. Gracias por estar a mi lado en todas las etapas que he tenido durante este tiempo y por tu apoyo incondicional.

DEDICATORIA

A mis padres que sin ellos no sería la persona que soy en este momento y que sin su apoyo incondicional en cada una de mis necesidades no podría estar culminando este proceso.

A Juan José quien ha sido el que más me ha alentado y quien me ha ayudado a crecer como persona, sabiendo valorar cada esfuerzo que he hecho.

RESUMEN

La leucemia es un tipo de cáncer que aparece en las células primitivas de la médula ósea encargadas de la renovación sanguínea. La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo crónico que se originara en una célula madre pluripotencial común a las tres series hematopoyéticas, además es uno de los cuatro tipos principales de leucemia. El origen de esta patología se debe a un intercambio genético entre los cromosomas 9 y 22, dando como resultado el apareamiento del gen *BCR-ABL*, que puede presentar tres tipos de transcritos dependiendo de la ruptura que tenga el gen BCR. El objetivo de esta investigación es analizar los distintos transcritos del gen fusión *BCR-ABL* en pacientes ecuatorianos con LMC y reportar los resultados obtenidos para cada transcrito. Para alcanzar el objetivo planteado, se estudiaron mediante RT-PCR y electroforesis capilar 35 muestras de ARN de pacientes con diagnóstico positivo para *BCR-ABL*. Los resultados obtenidos después de la optimización de ambas técnicas, son la presencia del transcrito b3a2 como el más frecuente mostrándose en el 60% de los pacientes, seguido del transcrito b2a2 con 28,75% y por último, la coexpresión b2a2/b3a2 con 17,14%. Al compararse las frecuencias reportadas en este estudio con las frecuencias mundiales, se pudo apreciar que no existe discordancia. Sin embargo, las frecuencias obtenidas en este estudio no coinciden con las frecuencias reportadas previamente en Ecuador.

Palabras clave: *BCR-ABL*, RT-PCR, Leucemia Mieloide Crónica, Cromosoma Philadelphia, electroforesis capilar.

ABSTRACT

Leukemia is a type of cancer that appears in the primitive cells of the bone marrow responsible for blood renewal. Chronic myeloid leukemia (CML) is a chronic myeloproliferative syndrome that is originated in a pluripotent stem cell present in the three hematopoietic series. It is also one of the four main types of leukemia. This pathology results from a genetic exchange between chromosomes 9 and 22, giving rise to a chimeric gene *BCR-ABL*, where three types of transcripts may be presented, depending on the breakpoint in the BCR gene. The objective of this research consists in analyze the different transcripts of the *BCR-ABL* fusion gene in Ecuadorian patients with CML and report the results obtained for each transcript. To achieve this objective, 35 RNA samples from patients with a positive diagnosis for *BCR-ABL* were studied by RT-PCR and capillary electrophoresis. The results obtained after the optimization of the techniques is that the b3a2 transcript is the most frequent, occurring in 60% of the patients, followed by the b2a2 transcript with 28.75% and finally the coexpression between b2a2 / b3a2 with 17.14 %. The frequencies reported in this study were compared with the world frequencies, and found out that there are no differences. However, the frequencies obtained do not coincide with the frequencies previously reported in Ecuador.

Key words: BCR-ABL, RT-PCR, Chronic Myeloid Leukemia, Ph chromosome, capillary electrophoresis.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema	4
1.3. Objetivos.....	8
1.3.1. General	8
1.3.2. Específicos	8
1.4. Justificación de la investigación.....	8
2. MARCO TEORICO	10
2.1. Historia.....	11
2.2. Factores de riesgo	13
2.3. Heredabilidad.....	13
2.4. Epidemiología.....	14
2.5. Aspectos clínicos.....	14
2.6. Curso clínico	15
2.7. Translocación gen BCR-ABL.....	16
2.7.1. Cromosoma Filadelfia.....	16
2.7.2. Estructura del gen BCR-ABL	17
2.8. Técnicas de diagnóstico y monitoreo	18
2.8.1. Hemograma completo	18
2.8.2. Citogenética convencional	19
2.8.3. FISH	20
2.8.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	20
2.8.5. RT q-PCR	21
2.8.6. Electroforesis capilar	21
2.9. Tratamiento	22
2.9.1. Interferón alfa	24
2.9.2. Imatinib.....	24

2.9.3. Trasplante de médula ósea.....	26
3. DISEÑO DE PLAN EXPERIMENTAL	26
4. PROCEDIMIENTOS.....	27
4.1 Población y muestra.....	27
4.2 Cuantificación de ARN	28
4.3 Determinación genotípica.	28
4.3.1 Amplificación de los transcritos BCR-ABL.....	28
4.3.1.1 Diseño y análisis de cebadores	28
4.3.1.2 Optimización de las condiciones de la RT-PCR.....	29
4.3.1.3 Condiciones de electroforesis capilar.....	31
4.3.1.4 Análisis de los electroferogramas	32
4.3.2 Análisis estadístico	32
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1 Evaluación de cebadores.....	32
5.2 Optimización de la RT-PCR y electroforesis capilar.	34
5.3 Análisis estadístico	42
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
6.1 Conclusiones	50
6.2 Recomendaciones	51
REFERENCIAS.....	52
ANEXOS.....	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Antecedentes

Se han descrito una serie de causas para el apareamiento y progresión de la Leucemia Mieloide Crónica. Sin embargo, uno de los motivos predominantes que subyace a esta enfermedad es la presencia del denominado cromosoma Filadelfia (Ph+). Esta formación tiene lugar a partir del intercambio genético entre los cromosomas 9 y 22, dando como resultado el apareamiento del gen *BCR-ABL*, que codifica para una proteína anormal, cuya acción tirosina quinasa tiene funciones receptoras en la membrana durante el ciclo celular, lo que condiciona la patogénesis de la enfermedad (Avila Cabrera , 2014).

La Leucemia Mieloide Crónica ha sido investigada de manera exhaustiva, tanto para conseguir un diagnóstico temprano y asertivo, como para encontrar herramientas que permitan su tratamiento de manera exitosa. Partiendo de este marco, los métodos de diagnóstico convencionales se enfocan principalmente en confirmar la presencia o ausencia del cromosoma Ph+ en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y Leucemia Linfooblástica Aguda (LLA). No obstante, existen rearrreglos moleculares en el gen *BCR-ABL* que no pueden ser apreciados a nivel citogenético. En estos casos, los métodos de diagnóstico molecular ofrecen una alternativa de mayor sensibilidad (Rudín , 1998).

Partiendo de lo mencionado con anterioridad, es importante indicar que la evolución de las técnicas de detección tanto de la LMC como de la LLA han ido avanzando con los años; es así que para el año 1998, Mensink ya hace uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa y Retrotranscriptasa (RT-PCR) para detectar cantidades mínimas de los transcritos del gen de fusión *BCR-ABL*. Mensink con la intención de validar los resultados obtenidos, comparó sus

hallazgos con los patrones citogenéticos en un conjunto de 150 pacientes. Los estudios citogenéticos que ocasionalmente presentaron resultados negativos (en cantidades de *BCR-ABL* normalizadas de aproximadamente 3×10^{-2}), al ser evaluados mediante RT-PCR mostraron la presencia de productos de la fusión génica, lo cual demuestra que los métodos moleculares (RT-PCR) ofrecen una elevada capacidad de monitoreo, al ser técnicas precisas, sensibles y específicas (Mensink , 1998).

Paralelamente en 1999, Intile realizó una investigación en Reino Unido en la que se monitorearon pacientes con LMC que se encontraban en tratamiento. El seguimiento se hizo por medio de la RT q-PCR en muestras de sangre. El monitoreo a través de esta técnica determinó que si el tratamiento era efectivo, los niveles de *BCR-ABL* disminuían, también señaló que el monitoreo mediante RT q-PCR en sangre periférica es un forma confiable de control de la enfermedad (Branford, Hughes, & Rudzki, 1999).

Profundizando lo realizado por Intile, en el año 2004 Chasseraux y Cols caracterizaron e identificaron los distintos transcritos del producto de fusión *BCR-ABL* en un solo ensayo mediante RT-PCR multiplex y electroforesis capilar. Este estudio mostró la existencia de los transcritos P210, P190 y P230; con la particularidad de que además, permitió determinar el punto de ruptura de cada cromosoma, lo que más adelante se evidenciará como un valor pronóstico importante. En consecuencia y haciendo referencia a lo expuesto por estos grupos de investigación, se ratifican las ventajas de las técnicas moleculares especialmente en lo que se refiere a la reducción de resultados falsos negativos. (Chasseriau , 2004).

La identificación de los transcritos dependerá de los puntos de ruptura más frecuentes en el gen BCR que pueden aparecer en los exones 1 (e1), 12 (b2),

13(b3) y 19(e19); y posteriormente, se empalmarán con el punto de ruptura en el gen ABL que suele producirse en el exón 2(a2), generando algunos posibles reordenamientos, tales como: e1a2, b2a2 o b3a2 y el e19a2. De ahí que según el producto de la translocación sean descritas distintas proteínas de fusión, caracterizadas según su peso molecular de la siguiente manera: 190 kd (p190^{BCR-ABL}), 210 kd (p210^{BCR-ABL}) y 230 kd (p230^{BCR-ABL}). A pesar de ser distintos elementos protéicos, todos ellos están asociados con el apareamiento de enfermedades hematológicas como la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y Leucemia Neutrofílica. (Artigas , 2003).

Según la forma de reordenamiento, ha sido posible observar sus frecuencias en diferentes poblaciones. En algunas europeas; por ejemplo, se ha descrito que el 95% de los pacientes investigados tenían la proteína P210 que resulta de un reordenamiento M-BCR, que da lugar a las variantes de transcripción b2a2 y b3a2. Los porcentajes de estas variantes de acuerdo a este estudio fueron: b3a2 (64%) y b2a2 (36%). Mientras que las variantes de transcripción mixtas b3a2/b2a2 no fueron reportadas (Bennour , 2013).

Un estudio similar fue reportado en Ecuador en el año 2002. Esta investigación tuvo como objetivo el análisis de las frecuencias de las variantes de transcripción estudiadas en Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA). Para la evaluación se empleó una RT-PCR evaluada en PAGE en un total de 40 pacientes con LMC, en donde se observó que 35 pacientes presentaron el reordenamiento b2/a2 (94,6%), 2 de ellos tenían el reordenamiento b3/a2 (5,4%) y ninguno mostró el reordenamiento e1/a2 en la región *m-bcr*. Conjuntamente, se analizaron 49 pacientes con LLA de los cuales 21 (42,8%) presentaron alguno de los tipos de reordenamiento BCR-ABL y todos (100%) mostraron el reordenamiento e1/a2 de la región *m-bcr*. El tamaño de los fragmentos reportados tuvo relación con los

reordenamientos b3/a2 de 400 pb, b2/a2 de 267pb y e1/a2 de 100pb (Paz-y-Miño , 2001).

Por otra parte, haciendo relación a las técnicas de diagnóstico y monitoreo, cabe mencionar que así como la RT-PCR y la RT q-PCR permiten el diagnóstico efectivo de la translocación 9:22; la electroforesis capilar, hace posible el análisis directo y preciso del tamaño de los productos amplificados, revelando la identidad del transcrito. Esto fue evidenciado por Xu , en el año 2018, al determinar dos posibles tipos de unión *BCR-ABL*: b2a2 con un tamaño de 343 pares de bases, y b3a2 con 418 pares de bases. Estos hallazgos ponen de manifiesto que, la electroforesis capilar ofrece una amplia resolución y una gran sensibilidad para la detección e identificación de las variantes de los transcritos *BCR-ABL* (Xu, Zheng, Liu, Zhang, & Kang, 2018).

1.2. Planteamiento del problema

El cáncer es una de las patologías con mayor tasa de mortalidad (Leukemia & Lynphoma Society, 2013). La Organización Mundial de la Salud ha documentado que se han elevado considerablemente los casos de cáncer en los diferentes órganos y tejidos, por lo que en la actualidad representa una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad que existen en nuestra sociedad. El cáncer es provocado por células anormales que se multiplican sin control e invaden los tejidos, esto se da en muchas partes de la anatomía humana, incluyendo la sangre (De la Garza & Juarez, 2014).

La leucemia es un tipo de cáncer que se origina en las células primitivas de la médula ósea encargadas de la renovación sanguínea. En Ecuador en el año 2013, el Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC) reportó 3426

pacientes con leucemia en el país, con una tasa de letalidad de 5,98 por cada 100 ingresos hospitalarios (Lugmaña, 2014).

Uno de los métodos de diagnóstico más usados en la actualidad, es la citogenética convencional, debido a que no todos los hospitales cuentan con equipos especializados; sin embargo, está limitada por la viabilidad de los leucoblastos en médula ósea para el análisis en metafase. Debido a ésta y otras desventajas se pueden generar hasta un 10% de falsos negativos, y este subdiagnóstico dificulta el control temprano de la enfermedad (Nashed, Rao, & Gulley, 2003). Con la intención de corregir los fallos mencionados, se han desarrollado métodos microscópicos más precisos para diagnosticar la enfermedad, como la Hibridación Fluorescente *in situ* (FISH por sus siglas en inglés). Sin embargo, estas metodologías incrementan considerablemente el costo por paciente, en relación a la citogenética convencional.

En este contexto, es importante reiterar las ventajas en cuanto a sensibilidad y especificidad ofrecidas por las tecnologías basadas en la Biología Molecular tanto para el diagnóstico, como para el adecuado seguimiento al paciente. Dentro de las metodologías de mayor aporte se encuentran la RT-PCR, la RT q-PCR y la electroforesis capilar, que presentan la posibilidad de detectar los transcritos *BCR-ABL* y, además, permiten identificar y caracterizar los distintos reordenamientos dependiendo del punto de ruptura del gen BCR. También hacen posible el monitoreo de la evolución de la patología, al facilitar el cálculo de la enfermedad mínima residual (ERM) en pacientes con tratamiento (González, 2011).

En Ecuador, Hospitales de Tercer Nivel dentro de la Red de Salud Pública, como el Hospital Eugenio Espejo, realizan el diagnóstico de LMC empleando técnicas moleculares, como la RT q-PCR, con esta metodología es factible la

detección del número de copias del transcrito *BCR-ABL*. No obstante, no se puede determinar su identidad molecular, dificultando la aplicación de un tratamiento diferenciado basado en los tres tipos de productos protéicos *BCR-ABL* descritos. La electroforesis capilar, de los productos transcritos fluoromarcados, permite discriminar los diferentes transcritos basándose en su tamaño en pares de bases para realizar una correlación entre el tipo de traslocación y el pronóstico del paciente (Pane , 2002).

El uso de estas técnicas ha permitido comparar lo reportado en esta área, con respecto a otras regiones. En este sentido, se han reportado mundialmente las frecuencias de los transcritos, encontrados en varios países como Estado Unidos, Siria, Corea, entre otros, como se puede observar en la Tabla 1 (Bennour , 2013):

Tabla 1.

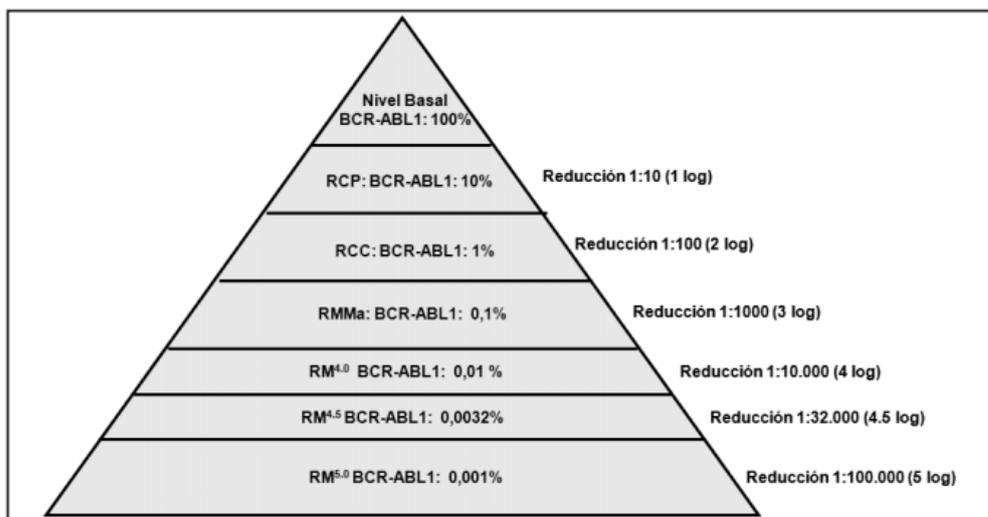
Incidencia de los puntos de ruptura b3a2 y b2a2.

Frecuencias de los puntos de corte		
Países	b2a2	b3a2
Austria(Reiter , Greinix HT, Brugger S, Keil F, 2013)	31.6%	68.4%
USA-Texas (Verschraegen CF1, Kantarjian HM, Hirsch-Ginsberg C, 1998)	30.2%	67.9%
Corea (Goh , 2006)	32.34%	67.66%
Japón (Kimura, 2004)	30.20%	67.5%
Ecuador (Paz-y-Miño , 2001)	96.4%	5.4%

Adaptado de: (Bennour , 2013)

Una vez realizado el diagnóstico y puesto en marcha tratamiento, es fundamental realizar el monitoreo de la progresión de la enfermedad en pacientes que padecen LMC y LLA. Esto se lleva a cabo mediante RT q-PCR, ya que los tratamientos farmacológicos están enfocados en la disminución de la cantidad de células tumorales, por tanto el empleo de metodologías ligadas a la microscopía por ejemplo, se vuelve poco eficiente ya que estas técnicas son dependientes de la celularidad (Mensink , 1998). Por esta causa, la evaluación molecular permite la obtención de indicadores de respuesta a los tratamientos empleados y además posibilita la apreciación de persistencia de la enfermedad a largo plazo, lo que repercute en la evaluación del éxito del tratamiento para cada paciente (Intile & Pavlovsky, 2017).

Lo planteado en el párrafo anterior, se ha descrito en la literatura como medición de la enfermedad mínima residual (EMR). Este término se ha empleado para designar a aquellas células tumorales persistentes en las leucemias que están en tratamiento o aquellas que se encuentran en remisión completa después del tratamiento (Mart, 2013). Los criterios de la respuesta molecular *BCR-ABL* están basados según Escalas Internacionales (EI), utilizando valores previamente definidos según el *International Randomized Study of Interferón and STI571* (IRIS). En donde el 100% de transcritos corresponden al nivel basal en EI y el 0,1% representa una respuesta molecular mayor (RMMa) (Bianchini & Larripa, 2014).



RCC: Respuesta Citogenética Completa, RCP: Respuesta Citogenética Parcial, RMMa: Respuesta Molecular Mayor, RM4: Respuesta Molecular con 4 logaritmos decimales de reducción, RM4.5: Respuesta Molecular con 4.5 logaritmos decimales de reducción, RM5.0: Respuesta Molecular con 5 logaritmos decimales de reducción.

Figura 1. Respuesta a nivel molecular según la EI

Tomado de : (Bianchini & Larripa, 2014)

1.3. Objetivos

1.3.1. General

Analizar los transcritos del gen fusión *BCR-ABL* relacionados con la Leucemia Mieloide Crónica mediante las técnicas de RT-PCR y Electroforesis Capilar.

1.3.2. Específicos

- Optimizar los parámetros de RT-PCR y electroforesis capilar para la detección de los diferentes transcritos del gen fusión *BCR-ABL*.
- Reportar las frecuencias de los transcritos del gen fusión de *BCR-ABL* en la población ecuatoriana mediante RT-PCR y electroforesis capilar.

1.4. Justificación de la investigación

El uso de técnicas moleculares, como la RT-PCR y la electroforesis capilar, presentan grandes ventajas en lo que se refiere a facilidad y eficiencia, permitiendo un diagnóstico inicial completo de la enfermedad lo que permitira una mejor prognosis de esta patología (Zhen & Wang, 2013). Vale la pena destacar que estas técnicas, se pueden basar en muestras de sangre periférica en lugar de médula ósea, tanto en la fase de diagnóstico como en el monitoreo, específicamente, porque usará ARN mensajero para medir la expresión del gen *BCR-ABL*.

El uso de RT-PCR no solo ratifica el diagnóstico citogenético de la LMC, sino que también permite conocer distintos detalles del gen fusión causante de esta enfermedad, al tener alta sensibilidad de detección del gen *BCR-ABL* se puede amplificar cantidades mínimas de ARN. Por su parte, la electroforesis capilar tiene una elevada sensibilidad y eficacia, pues permite el análisis de múltiples fragmentos al mismo tiempo; y por lo tanto, permite que el tiempo de análisis sea más corto. Además, el consumo de muestras y de reactivos es mucho menor en comparación a otras técnicas como *Southern Blot*, lo que resulta en un menor costo para identificar todos los transcritos de una forma rápida y precisa (Limsuwanachot , 2016).

Mediante las técnicas de RT-PCR y electroforesis capilar se puede conocer que tipo de transcrito *BCR-ABL* esta presente en la muestra y además en el mismo ensayo es posible determinar los puntos de ruptura del gen BCR durante el proceso de fusión. Para lograr esto, se utilizan cebadores acoplados a diferentes fluorocromos que amplificaran un producto de PCR, luego, por medio de un analizador genético ABI PRISM3130 (Applied Biosystems) se puede realizar la identificación de todos los transcritos de las muestras según los puntos de ruptura que generan diferencias de tamaño detectable mediante la fluorescencia de los cebadores, lo cual es útil para discernir el fenotipo de la

enfermedad en cada paciente y que a su vez permite buscar una estrategia terapéutica a seguir. (Al-Achkar, Moassass, Youssef, & Wafa, 2016)

El Laboratorio de Patología Molecular de Hospital Eugenio Espejo, realiza el monitoreo mediante la técnica RT q-PCR, el desarrollo de la investigación en la que se determina el tipo de transcrito es un aporte complementario a la información que se posee de estas muestras. La identidad de los transcritos se revela por análisis de fragmentos, mediante las técnicas de RT-PCR y electroforesis capilar como soporte pronóstico y de terapia hacia los pacientes afectados. (Koren-Michowitz , 2015).

Localmente, no se utilizan estas técnicas secundarias para complementar los diagnósticos de la Leucemia Mieloide Crónica, y aunque se tienen referencias respecto a la frecuencia de los transcritos del gen fusión de *BCR-ABL*, siguen siendo bastante limitadas. Además, estos datos son de gran relevancia a la hora de definir y mejorar el manejo adecuado del paciente y las políticas de salud pública en nuestro país.

2. MARCO TEORICO

La leucemia es un tipo de cáncer que se origina en las células primitivas de la médula ósea. La más frecuente es aquella que ataca a los glóbulos blancos, pero existen otras leucemias que afectan a otras células sanguíneas. Las células leucémicas no maduran de forma normal, además tienen una rápida reproducción, lo que genera su acumulación en la médula ósea. Por lo tanto, las células tumorales rápidamente reemplazan a las células sanguíneas normales. La leucemia puede variar entre aguda, que afecta con más frecuencia a niños y crónica, que es el tipo de leucemia más común en adultos.

No obstante, la Leucemia Linfocítica Aguda (LMC) y la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) son solo 2 de los cuatro tipos principales de leucemia, según los reportes generados por la Sociedad Americana de Cáncer en 2015.

La LMC fue la primera patología en ser asociada a una lesión genética. La lesión se produce por el intercambio de segmentos entre los cromosomas 9 y 22, lo que da lugar a la formación del gen de fusión *BCR-ABL* cuyo producto es una proteína aberrante. A medida que esta enfermedad progresa las células oncogénicas se vuelven genéticamente más inestables; lo que, sumado a la rápida proliferación celular, conduce al apareamiento de nuevas anomalías cromosómicas. Este proceso es conocido como evolución clonal (Morales, Víctor, Ribón, & Manrique, 2010). En consecuencia, la LMC suele manifestarse en un aumento acelerado del número de glóbulos blancos por mililitro de sangre, algunos de ellos aún en estado inmaduro, que usualmente no deberían encontrarse en sangre sino en médula ósea (Press, Kamel-Reid, & Ang, 2013).

2.1. Historia

En 1960, los investigadores Nowell y Hungerford, describen por primera vez una aberración cromosómica asociada a una neoplasia, gracias al estudio del cariotipo de un paciente con leucemia crónica granulocítica. Ellos encontraron células en las que el cromosoma 22 era más pequeño de lo habitual. Esta anomalía posteriormente se denominó cromosoma Filadelfia (Ph) y actualmente, se ha relacionado con la progresión de varios tipos de leucemia (Nowell & Hungerford, 1960). El mencionado hallazgo describió por primera vez un defecto genético directamente asociado con el apareamiento y proliferación de células cancerosas en humanos (Bueno, M., Perez, J., & Bueno, 2000).

Consecutivamente en 1973, Rowley realizó un estudio en nueve pacientes con LMC. Las muestras fueron analizadas mediante estudios de tinción cromosómica con quinacrina y el método Giemsa y se constató que el cromosoma (Ph⁺) era el resultado de una translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22. La alteración fue designada como t(9,22) (q34; q11) (Rowley, 1973).

Todos los hallazgos microscópicos descritos anteriormente, fueron corroborados gracias a la caracterización molecular de la translocación. Esto fue posible en virtud de la localización del gen c-ABL, un homólogo humano de v-ABL, el cual es un oncogén identificado en el virus de la leucemia murina de Abelson. El gen c-ABL se encontró en el brazo largo del cromosoma 9. (Donné & Hughes, n.d.).

Para realizar la confirmación de la translocación recíproca presente en esta patología, se usaron dos sondas del gen ABL, que comúnmente corresponden al cromosoma 9. En la investigación los linfocitos procedentes de pacientes con LMC mostraron una hibridación por complementariedad de la sonda descrita para el cromosoma 9, con el cromosoma 22q-. Mientras que las secuencias del oncogén c-sis, que usualmente se encuentran en el cromosoma 22, aparecían de manera específica en el cromosoma 9, solamente en las personas con signos clínicos de LMC. Lo detallado anteriormente demostró el intercambio de segmentos cromosómicos 9 y 22, corresponden a la descripción del cromosoma Filadelfia. Subsecuentemente, se estableció que como producto de esta translocación se produce la activación del proto-oncogen c-ABL (Neil A. Campbell, 2007).

La consecuencia directa de la transformación genética observada en la LMC, es la formación de un gen de fusión entre el gen ABL del cromosoma 9, con parte

del gen BCR del cromosoma 22. El mencionado gen de fusión *BCR-ABL*, produce una proteína anormal que tiene acción tirosina quinasa. Las propiedades de esta proteína están implicadas en la regulación del ciclo celular, con una marcada reducción de apoptosis, lo cual se advierte como un signo clínico fundamental para la patogénesis de la enfermedad, ocasionando la proliferación neoplásica de los precursores hemopoyéticos (Avila Cabrera , 2014).

2.2. Factores de riesgo

Para el desarrollo de la LMC existen algunos factores de riesgo. Uno de ellos es la edad, ya que se ha visto que el riesgo aumenta con los años. La incidencia máxima está descrita en personas de 40 a 60 años. Con relación al sexo, se ha visto que esta enfermedad es más frecuente en hombres con un 3% de posibles casos al año y con 4% de decesos al año, comparado a un 3% de mortalidad al año en mujeres y un poco más de 1% de posibles casos de mujeres al año (Morales, Víctor, Ribón, & Manrique, 2010).

Otro factor de riesgo asociado con el debut de LMC es la radiación. De hecho, se ha visto un incremento en la aparición de la patología en pacientes que han tenido exposición a altas dosis de radiación. Igualmente, la exposición de manera reiterada a hidrocarburos como el benceno, ha sido asociada con el desarrollo de LMC. (Leukemia & Lynphoma Society, 2013).

2.3. Heredabilidad

Las mutaciones del ADN en ciertas ocasiones pueden ser heredadas de los padres, lo que aumenta la probabilidad de desarrollar ciertos tipos de cáncer.

En el caso de la LMC, las mutaciones que causan la enfermedad no son hereditarias; sino que los cambios genéticos relacionados con el desarrollo de esta patología ocurren a lo largo de la vida del individuo (American Cancer Society, 2015).

2.4. Epidemiología

La LMC representa alrededor del 15% de todas las leucemias en adultos. En Estados Unidos cerca de 8,220 nuevos casos fueron diagnosticados en 2016, con un aproximado de 1,070 muertes. La incidencia es de 1.6 casos por cada 100,000 habitantes y se ha reportado que con los tratamientos actuales, la mortalidad anual se ha reducido entre un 2% y 3% por año (Jorge E. Cortes, MD, Richard T. Silver, 2016).

En Ecuador hasta el 2013, el INEC reportó 3426 pacientes con leucemia, con una tasa de letalidad de 5,98 por cada 100 ingresos hospitalarios. La incidencia de LMC en Ecuador es de 1 a 2 casos por cada 100.000 habitantes (Lugmaña, 2014).

2.5. Aspectos clínicos

Entre el 30 y 50% de pacientes diagnosticados con LMC en Estados Unidos no presentan síntomas; habitualmente se detectan irregularidades gracias a exámenes rutinarios de laboratorio en donde los valores de biometría aparecen alterados (Thews. & Mutschler, 1983).

Los síntomas que se pueden presentar son inespecíficos y no necesariamente frecuentes. Entre estos constan la pérdida de peso, fiebre, diaforesis, astenia, dolor en el hipocondrio izquierdo y malestar en general (Pozo, 2009). Además, cuando existe una exploración física en personas diagnosticadas con LMC se puede encontrar esplenomegalia. En el conteo sanguíneo se observa leucocitosis con basofilia y granulocitos inmaduros. Los pacientes no suelen presentar anemia severa, siendo más frecuente la trombocitosis. Estos aspectos clínicos son de importancia ya que gracias a ellos se distinguirá entre las fases crónica, acelerada y blástica. (Alvarado-Ibarra , 2016)

2.6. Curso clínico

La evolución clínica de la LMC comprende de tres fases características: crónica, acelerada y blástica (Mohan, 2012).

La fase crónica tiene una duración media de 5 a 6 años y su característica fundamental es la sobreproducción de células mieloides inmaduras y granulocitos maduros. Los pacientes atraviesan esta fase generalmente sin síntomas, pero con un aumento de leucocitos y plaquetas, además de un conteo menor al 10% de células blásticas. Debido a que estos factores son muy similares a los presentados en la leucemia aguda, es difícil la diferenciación clínica y hematológica entre éstas. Para ciertos casos el cuadro clínico podría presentar fatiga, palidez, fiebre, distensión abdominal y pérdida de peso sin razón aparente (Elisa, 2017).

La fase acelerada, se encuentra en dos de cada tres pacientes. Durante esta etapa existe la posibilidad de que se pase directamente de una fase crónica a una blástica. La duración de esta fase es de 18 meses, pero se han visto casos en los que la progresión a fase blástica ocurre en un periodo de 6 meses.

Durante esta etapa de la enfermedad existe una respuesta baja al tratamiento. Los síntomas presentados en la fase acelerada son: esplenomegalia, leucocitosis sin respuesta al tratamiento, aumento de los blastos de 10 a 30%, tanto en sangre como en médula ósea, incremento de basófilos en sangre periférica y finalmente, evolución clonal (Carretero, 2012).

La fase blástica por su parte, tiene una media de cuatro meses. El curso en esta etapa es fatal y se observa un aumento del 30% de células blásticas en médula ósea. En esta fase aparece la mayor resistencia a medicamentos, y se puede observar una enfermedad linfoide. Los síntomas asociados son: fiebre, dolor, aumento de los nódulos linfáticos, hipertrofia hepática, esplenomegalia y diaforesis (Morales, Víctor, Ribón, & Manrique, 2010).

2.7. Translocación gen BCR-ABL

2.7.1. Cromosoma Filadelfia

La formación del cromosoma Filadelfia tiene lugar al intercambiarse por error, parte del material genético del cromosoma 9 (gen ABL) y el cromosoma 22 (gen BCR) durante el proceso de división celular. Este fenómeno es conocido como translocación y da lugar a un nuevo gen de fusión denominado *BCR-ABL*. La formación del gen desempeña un papel de importancia en la aparición de células leucémicas. A su vez se genera el gen ABL-BCR en el cromosoma 9 que aparentemente no tienen relación alguna con la LMC (Romam, 2015).

Más del 95% de las personas con LMC dan un resultado positivo para el cromosoma Filadelfia (Ph+), por su parte, aproximadamente el 30% de los adultos con LLA son Ph+. Para detectar la presencia o ausencia del cromosoma Ph+ se realizan distintas pruebas diagnósticas. Adicionalmente, se realizan durante y después del tratamiento monitoreos, los cuales son

esenciales para detectar si quedan algunas células con el cromosoma Filadelfia, debido a que esto indicaría la reaparición de la enfermedad o resistencia al tratamiento (Cañizales, 2012).

2.7.2. Estructura del gen BCR-ABL

En este reordenamiento genético interviene el gen BCR del cromosoma 22 y gen ABL del cromosoma 9. El gen ABL suele sufrir una ruptura en un área de 300 kb en el extremo 5'. Los puntos de corte que pueden suceder en el gen BCR se agrupan en tres regiones bien definidas. La primera de ellas es conocida como el punto de corte mayor (M-bcr). Es una región cromosómica de 5,8 kb que abarca los exones 12-16, y es el más detectado en los casos de LMC. Dependiendo del punto de corte en el extremo 5' del gen BCR que comprende el exón 13 (b2) o el exón 14 (b3), se unirá al extremo 3' del gen ABL y origina el gen híbrido que codifica una proteína quimérica de 210 kDa (Velásquez , 2013).

La segunda región de corte, también se ha descrito como punto de corte menor (m-bcr) y abarca una secuencia intrónica de 55kb, entre los exones alternativos e1 y e2. La unión del extremo 5' del gen BCR con el extremo 3' del gen ABL, genera un gen híbrido que codifica una proteína quimérica de 185 kDa. Esta forma de translocación se ha encontrado en muy pocos casos de LMC, pero es el tipo más frecuente en pacientes con LLA (Alberto , 2014).

La tercera región de corte es la más reciente en ser descrita. Se ha denominado como punto de corte micro y se ubica en el exón 19 del gen BCR. Esta forma de translocación da lugar a una proteína quimérica más grande: con 230 kDa, que se encuentra asociada al apareamiento de LMC neutrofílica (Pane , 2002).

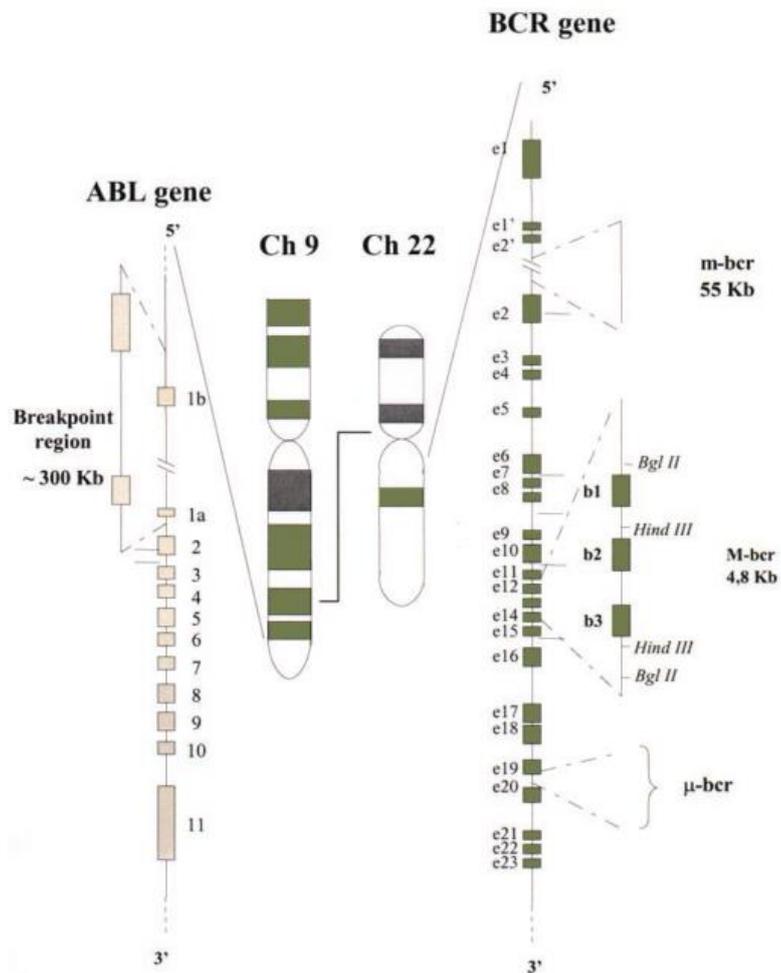


Figura 2. Ubicación de los puntos de ruptura entre los loci BCR y ABL.

Tomado de: (Pane , 2002).

2.8. Técnicas de diagnóstico y monitoreo

2.8.1. Hemograma completo

El hemograma mide la cantidad y los tipos de células en la sangre. Éste es un examen sin mucha complejidad, no obstante, ayuda a dar un primer diagnóstico. El hemograma entrega datos sobre la concentración de la hemoglobina, hematocrito, recuento de eritrocitos, leucocitos y plaquetas (Becker K, 2012).

En el caso de pacientes con LMC, la concentración de hemoglobina tiende a bajar y el conteo de glóbulos blancos aumenta. Con relación al número de plaquetas, se ha visto que existen diferencias dependientes a la fase que esté atravesando el paciente con LMC.

El examen de células sanguíneas teñidas en un microscopio óptico presenta un modelo característico de los glóbulos blancos: una proporción baja de células inmaduras (células blásticas leucémicas y promielocitos) y una proporción alta de glóbulos blancos maduros o en maduración. El rango de leucocitos en personas afectadas por LMC se encuentra entre 50 y 300 $E10^3$ células por microlitro de sangre; mientras que en personas sanas, generalmente no se encuentran células blásticas y mielocitos (Ernst, Ocqueteau, Bertin, Sarmiento, & Ramírez, 2015).

Se debe recalcar que cuando se observan pacientes con un hemograma anómalo, es imperioso que la médula ósea sea examinada (Avila Cabrera , 2014).

2.8.2. Citogenética convencional

Este método de diagnóstico tiene alta especificidad, pero presenta una baja sensibilidad ya que su capacidad de detección es de 1:100 pacientes (Mart, 2013). Se recomienda su realización después obtener un diagnóstico inicial mediante el hemograma. Este análisis permite la observación directa del cromosoma Ph+ en el 90% de los pacientes con LMC. La prueba consiste en observar los cromosomas bajo el microscopio para detectar si existen macrolesiones. En el caso de personas con LMC, el cromosoma Ph+ aparece

como una versión más corta del cromosoma 22 (Bengio, Enrico, Moiraghi, Freitas, & Larripa, 2016).

2.8.3. FISH

La técnica de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH), permite analizar los transcritos incluso cuando se encuentran núcleos interfásicos, mediante el uso de sondas que evalúan la presencia de reordenamientos tales como *BCR-ABL*, sin necesidad de que las células se encuentren en metafase. La desventaja de esta técnica es que la información se limita solo un transcrito buscado. Esta técnica tiene un porcentaje de falsos positivos del 10% y sensibilidad de 10^{-2} (Acevedo, 2010).

2.8.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite obtener millones de copias de un fragmento mediante una reacción enzimática *in vitro*, partiendo de una sola molécula de ADN. La PCR está basada en la replicación celular, en la que intervienen una serie de proteínas, siendo la más importante la polimerasa del ADN (Díaz & Rentería, 2013). Esta técnica necesita ciertos componentes para llevar a cabo el proceso de replicación, dichos componentes son los dNTPS, cebadores, cofactores, agua y soluciones amortiguadoras para las reacciones (Perez, 2012). Hay variantes de esta técnica que se han ido desarrollando con los años pero que tienen como base a esta técnica (Bolivar, Rojas, & Garcia-Lugo, 2014).

Un ejemplo de las variantes de la técnica es la RT-PCR que permite la síntesis de una cadena complementaria usando como molde una molécula de ARN, la

enzima transcriptasa reversa es fundamental en este procedimiento debido a que esta enzima permite este tipo de síntesis típico de los retrovirus. Esta es una de las técnicas más usadas en varios campos de la medicina; en el caso la LMC mediante el ARN mensajero es posible detectar los transcritos fusión del gen *BCR-ABL*, y a su vez identificar los reordenamientos (Artigas , 2013).

2.8.5. RT q-PCR

La RT q-PCR es una técnica de alta sensibilidad que permite cuantificar los transcritos de *BCR-ABL* mediante el uso de reporteros fluorescentes en la reacción. El resultado que arroja esta técnica en pacientes con el gen de fusión *BCR-ABL*, permite la estimación de la reducción logarítmica del reordenamiento, esto es esencial para el monitoreo de la enfermedad mínima residual. Cabe destacar que esta técnica no suele usarse para diagnóstico sino para seguimiento (Kawaguchi, , 2012)

Para la detección específica de una secuencia de interés, existen tres tipos de sondas: sondas de hidrólisis, sondas de hibridación y sondas de horquilla; estas sondas emiten fluorescencia cuando se unen a las moléculas de ARN o ADN. Todas las sondas se basan en principio de Transferencia de energía de resonancia de Foster (FRET), que consiste en la transferencia de energía de un donador a un aceptor. Durante la amplificación la sonda adicionada genera una señal, reflejando la cantidad de producto amplificado (Aguilera, Tachiquín, Munive,. 2014).

2.8.6. Electroforesis capilar

La electroforesis capilar (EC) separa fragmentos de ADN según su tamaño, obtenidos después de la amplificación por técnicas como la RT-PCR, detectando la emisión de fluorescencia de los diferentes fluoróforos al ser excitados con un láser de argón en un secuenciador automático de ADN. El equipo en el que se realiza la electroforesis capilar es totalmente automático, inyecta las muestras que se encuentran preparadas en una placa de 96 pocillos, en un capilar que se encuentra recubierto con un polímero que le confiere flexibilidad. Se detecta la fluorescencia emitida por los cebadores que están unidos a la cadena sencilla de ADN, esto generara un fragmento correspondiente a la muestra analizada que será visualizado mediante el uso de un *software* especial (Magaña, Arenas-Sordo, & Gómez, 2009).

La electroforesis capilar tiene una elevada sensibilidad, además tiene la ventaja de que el consumo de muestras y reactivos es bajo, lo que resulta en menores costos (Luthra, Sanchez-Vega, & Medeiros, 2004). El uso que se le da a la EC en el análisis de muestras con LMC es que al ir acoplado a técnicas con alta sensibilidad como la RT-PCR se podrá identificar de manera más certera y rápida los transcritos gracias a la especificidad de los cebadores que serán diseñados para cada tipo transcrito, además se podrá identificar cada reordenamiento al conocer los tamaños esperados y poder diferenciar con mayor exactitud que cuando son observados los reordenamientos en geles de agarosa.

2.9. Tratamiento

Existen criterios que permitirán conocer la eficiencia de los tratamientos en el caso de la LMC los parámetros que se toman en cuenta son los hematológicos, citogenéticos y moleculares (Tovar-Bovadilla & Ortiz-Hidalgo, 2016). Es así, que la remisión hematológica se considera cuando existe una cuenta normal de células sanguíneas y la desaparición de signos y síntomas de la enfermedad.

La respuesta citogenética completa es la ausencia total de células Ph+ en metafase. Y por último se habla de remisión molecular completa cuando durante en el monitoreo, la cantidad de transcritos *BCR-ABL* es indetectable por RT-PCR en tiempo real (Kanterjian & Jabbour, 2014).

La técnica de RT-PCR y electroforesis capilar permiten conocer los distintos transcritos presente en pacientes con LMC, lo que representa la posibilidad de generar un tratamiento diferencial para cada tipo de transcrito, ya que cada transcrito responde de distinta manera a un tratamiento que a otro (Almaguer & Tarín-arzaga, 2011). Para el transcrito P190 que puede aparecer en el 1% de casos con LMC, se ha visto que presenta un resultado desfavorable a la terapia con inhibidores de tirosina-kinasa y en los casos que se obtuvo respuesta la duración fue relativamente corta. Es por esto, que los pacientes que presentan este transcrito deben ser etiquetados como pacientes de alto riesgo, que deben ser monitoreados constantemente durante la terapia y en caso de cumplir los requisito para un trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas, ofrecer esta vía terapéutica en la que se ha visto resultado positivos para este transcrito (Verma , 2019).

Por otro lado, la investigación en pacientes con el transcrito P230 con presencia del reordenamiento e19a2 mostró que el uso de Imatinib como estrategia terapéutica era eficaz ya que se llegó en un periodo de 6 meses aproximadamente a la RCC en los pacientes a los que se administró este tratamiento (Lee., Kim., & Hwang, 2004)

En el caso de transcrito P210 el más común en pacientes con LMC, los reordenamientos b3a2 y b2a2 presentan un distinta respuesta a los tratamientos. Mientas que, en el caso del transcrito b2a2 se ha demostrado que la respuesta a los inhibidores de tirosina-kinasa es mejor en comparación con

el transcrito b3a2, ya que en varios estudios se ha comprobado que los pacientes con el transcrito b2a2 presentan una RCC en menos tiempo. En terapia con Imatinib se alcanza y se mantiene la remisión hematológica en los pacientes que tienen el transcritos b2a2 pero no se logra obtener los mismos resultados en los pacientes con el transcrito b3a2 (Pratik Deb, Chakrabarti, Chakrabarty, Uttam Nath, & Sankar Ray, 2014)

Por lo visto anteriormente, conocer la posición del corte del cromosoma, y la forma del gen de fusión, permite mejorar la terapéutica del paciente. Por tanto tener esta información durante el diagnóstico puede mejorar el manejo clínico del paciente.

2.9.1. Interferón alfa

Es una glicoproteína con propiedades antivirales y anti proliferativas. El mecanismo de acción en la LMC no es muy claro, pero se conoce que inhibe el crecimiento celular, regular la expresión de citosinas y la modulación inmunitaria (Carretero, 2012). Fue considerado por varios años como el tratamiento de primera línea sobre todo para pacientes que no cumplían con los requisitos para el trasplante. Sin embargo, su uso presenta inconvenientes relativos a sus elevados costos y a su alta toxicidad. Esta vía terapéutica presenta distintos efectos secundarios y una respuesta citogenética completa baja (5 al 15%) (Rey, 2009).

2.9.2. Imatinib

Es un inhibidor sintético múltiple de la actividad tirosina-quinasa, que ha demostrado eficacia en el tratamiento de pacientes con LMC. El Imanitib es un

derivado de la fenilaminopirimídica que actúa como inhibidor de las proteínas tirosina-quinasa. Su mecanismo de acción consiste en competir con el ATP por la unión del dominio SH1 de la proteína anormal *BCR-ABL*. De esta manera impide la fosforilación, lo que inactivará a la proteína, inhibiendo el crecimiento e induciendo la muerte celular de las células oncogénicas. El uso de este fármaco tomo fuerza a partir del año 2001, sobre todo en pacientes en fase crónica y acelerada. El tratamiento con Imatinib se considera una alternativa terapéutica importante para pacientes en los que el uso de interferón alfa no ha resultado exitoso (Hernández, 2011).

Las ventajas de este medicamento son la rápida absorción, puesto que alcanza altas concentraciones después de dos horas de haberse administrado por vía oral. (Morales, Torres-Cárdenas, Valencia, Ribón, & Manrique, 2010).

El principal objetivo de este medicamento es obtener una remisión hematológica completa (RHC) a los tres meses de seguimiento. El 90% de pacientes con LMC en fase crónica lograron RHC, mientras que entre el 70 y 80% de casos tuvieron remisión citogenética completa (RCC). En pacientes que se encuentran en fase acelerada o blástica, suelen presentar una RHC de 76% o 34%, respectivamente y no tienen la misma RCC que cuando se encuentran en frase crónica (Rodríguez , 2007).

La desventaja de este tratamiento es que un 20 o 30% de los pacientes adquieren resistencia al medicamento considerándose una falla en la respuesta si a los tres meses no hay RHC. Sin embargo, algunos pacientes adquieren resistencia después de 5 años lo cual es considerado una resistencia secundaria (Ernst, Ocqueteau, Bertin, Sarmiento, & Ramírez, 2015). Para los pacientes con resistencia, se han desarrollado otros fármacos como el

Dasatinib, Nilotinib y Bosutinib que ha mostrado buenos resultados en pacientes con LMC resistentes a Imatinib (Sánchez, 2013).

2.9.3. Trasplante de médula ósea

El trasplante de médula ósea (TMO) ha evolucionado de tal manera que ha llegado a ser el único tratamiento conocido que cura la LMC. Antes de realizar el trasplante se realiza un tratamiento de quimioterapia agresivo que destruye la mayor cantidad de células leucémicas. Al ser tan agresivo también elimina células primordiales en la médula ósea, por lo que el siguiente paso a realizar es el TMO. El éxito que tenga el trasplante varía dependiendo de factores como la edad. Los mejores resultados se observan en pacientes más jóvenes, observándose una mayor mortalidad en pacientes que sobrepasan los 50 años (Olaya-vargas, 2016).

Otros factores a tomar en cuenta son el nivel de compatibilidad entre el receptor y el donante y la fase de la enfermedad. Con respecto a esto, se ha demostrado que el trasplante en pacientes con LMC en fase crónica tienen una probabilidad de sobrevida mayor, que aquellos pacientes en fases avanzadas, debido a la resistencia que generan las células tumorales a las elevadas dosis de fármacos usados durante las terapias (Pavlovsky, 2017).

3. DISEÑO DE PLAN EXPERIMENTAL

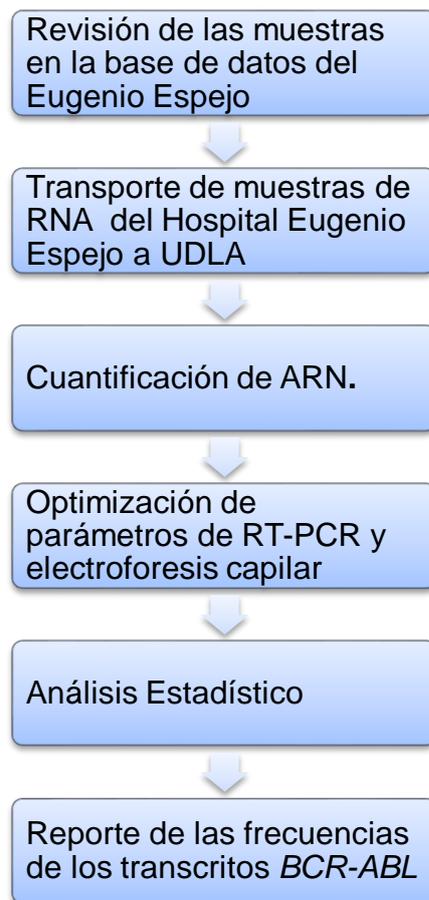


Figura 3. Esquema del diseño experimental.

4. PROCEDIMIENTOS

4.1 Población y muestra

La población que será utilizada para esta investigación son 35 muestras de ARN de pacientes ecuatorianos diagnosticados con LMC tratados en el Hospital Eugenio Espejo. Se usaran las muestras de ARN conservadas en congelación a -80° por el laboratorio de patología molecular del HEE que presentaron diagnóstico positivo para *BCR-ABL* desde diciembre de 2016 hasta febrero de 2018.

4.2 Cuantificación de ARN

Las muestras de ARN entregadas por el HEE se analizaron en el equipo *Nanodrop 2000 UV-VIS Spectrophotometer*. Se midieron las concentraciones de las muestras usando 1 μL de la solución de ARN. Para determinar la calidad de las muestras de ARN se tomó en cuenta la relación 260/280 en donde el rango óptimo de pureza esperado está entre 1,8 a 2,3.. Se considera óptima si la concentración de las muestras es igual o mayor a 0,8 ng/ μL .

4.3 Determinación genotípica.

4.3.1 Amplificación de los transcritos BCR-ABL

4.3.1.1 Diseño y análisis de cebadores

Se utilizaron las secuencias de los cebadores diseñados por Chassireaux, et al en 2004, para la amplificación de los tres tipos de transcritos de *BCR-ABL* que pueden presentar la LMC. El análisis de las secuencias se realizó en el programa *primer blast*. Los cebadores fueron específicos para el exón b1 correspondiente a la región M-BCR, también para los exones e1 y e19 que corresponden a las regiones m-BCR y μ -BCR. El cebador complementario para estos cebadores se ubica en el exón a3 e hibridará a las distintas variantes del gen *BCR-ABL*. Los cebadores *Forward* tienen incorporado un distinto fluorocromo en la región 5' (VIC, FAM, NEC, PET). Los fluorocromos tienen como objetivo ser detectados a través de la EC. También se diseñaron cebadores *Forward* y *Reverse* para el control interno, para este estudio se usará al gen de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como control.

La secuencia y el tipo de fluorocromo que tienen los cebadores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2.

Secuencias y fluorocromos de los cebadores usados en la amplificación de los transcritos BCR-ABL y del gen control G6PDH.

Secuencias de los cebadores	Fluorocromo	Transcrito
TGGAGGAGGTGGGCATCTAC	PET	E12-BCR-FWD
CCTCGCAGAACTCGCAACAG	NED	E19-BCR-FWD
TGGAGGAGGTGGGCATCTAC	FAM	E1-BCR-FWD
GATGCCTTCCATCAGTCGGA	FAM	G6PDH-FWD
GCTTCACACCATTCCCCATT	-	A3-ABL-REV
GCTCACTCTGTTTGCGGATG	-	G6PDH-REV

Adaptado de: (Chasseriau , 2004)

4.3.1.2 Optimización de las condiciones de la RT-PCR

Se realizó la optimización de la RT-PCR, mediante el planteamiento de distintos experimentos en los que se probaron diferentes condiciones hasta encontrar aquellas óptimas. Se realizaron distintos gradientes de concentración de los cebadores, ARN y temperatura. La amplificación se realizó en un solo paso en donde se añadió todos los oligonucleótidos mencionados anteriormente, con los que se realizará la amplificación de las distintas variantes de los puntos de ruptura de los transcritos.

Se utilizó el kit de *Super Script III Platinum SYBR Green One-Step RT-PCR*. Siguiendo las indicaciones del protocolo. El volumen final de las reacciones se

ajustó a 5 μL . Se realizó una mezcla para los cebadores *Forward* y otra para los *Reverse* variando las concentraciones de ciertos cebadores. La forma de preparar estas mezclas se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3.

Concentraciones finales usadas para realizar la mezcla de cebadores.

Mezcla de <i>Forward</i>		Mezcla de <i>Reverse</i>	
Volumen	Cebador	Volumen	Cebador
2 μL	E12b1 (10 μM)	2 μL	Rev A3 (12 μM)
2 μL	E1(10 μM)	2 μL	G6PDH (2 μM)
2 μL	E19(10 μM)	6 μL	Agua
2 μL	G6PDH (2 μM)		
2 μL	Agua		

Una vez hechas las mezclas de los cebadores se procedió a realizar un *master mix* para la amplificación. Las cantidades usadas por una reacción se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4.

Volúmenes finales usados en la estandarización de la PCR.

Reactivo	Volumen (μL)
<i>Syber Green</i>	2,5 μL
<i>Mix Forward</i>	0,5 μL
<i>Mix Reverse</i>	0,5 μL
Transcriptasa <i>Super Script</i> U/uL	0,1 μL

Agua	0,4 μ L
ARN 10ng/ul	1,0 μ L
Volumen Final	5,0 μ L

Las condiciones finales de amplificación para cada reacción fueron programadas en el termociclador con las siguientes condiciones:

- 45min a 45°C, (denaturación)
- 94°C por 2 minutos
- 45 ciclos:
 - 30seg a 94°C,
 - 60seg a 60°C, (Temperatura de alineamiento)
 - 120seg a 72°C,

Extensión final por 7 minutos a 68°C

4.3.1.3 Condiciones de electroforesis capilar.

Para observar los resultados obtenidos de las muestras amplificadas, se utilizó la electroforesis capilar, mediante el analizador genético *ABI PRISM3130* (*Applied Biosystems*)

Las condiciones que tiene el analizador genético durante la corrida de las muestras es una temperatura del horno a 60°C, el voltaje de inyección es de 1,0 KVolt, un tiempo de inyección de 15 segundos, un voltaje de corrida de 1,5 KVolt y un tiempo de corrida de 40 minutos. Para que las muestras ingresen al analizador se realiza una mezcla post-PCR con las siguientes cantidades:

- Formamida deionizada: 10 μ L por amplificado.
- GS-500 LIZ: 0,2 μ L por amplificado
- Producto de PCR: 1 μ L de cada amplificado

4.3.1.4 Análisis de los electroferogramas

Los datos fueron recolectados mediante el *software Data Collection v. 3.0 (Applied Biosystems)*, para después ser visualizados y editados en *software GeneMapper ver. 3.2 (Applied Biosystems)*.

4.3.2 Análisis estadístico

Las distribuciones de las frecuencias encontradas en este estudio de los diferentes transcritos, serán comparadas con las reportadas en otros países mediante una prueba de chi cuadrado y porcentajes.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Evaluación de cebadores

Se realizó la evaluación de los cebadores *BCR-ABL* y los del control interno *G6PDH* para conocer las concentraciones reales de los mismos. En la Figura 4, se puede observar que la intensidad de las bandas es bastante fuerte lo que indica que los cebadores se encuentran en una óptima integridad y pureza. Otra de las razones para que las bandas presenten mayor intensidad es que los cebadores *Forward* tienen incorporado un fluorocromo. Sin embargo, se observa que dos bandas no presentan la misma intensidad. Esto puede deberse a que los cebadores *Reverse* no se encuentran fluoromarcados.

Se puede observar que una de las bandas es bastante tenue en comparación con las demás bandas, incluso al compararse con la banda del cebador que no tiene añadido ningún fluorocromo, lo que indicaría una diferencia en la concentración del cebador *Reverse A3* (Figura 4, carril 9) y la concentración del cebador *Reverse G6PDH* (Figura 4, Carril 10). Al observar las dos bandas en la Figura 3, es posible identificar las concentraciones reales de ambos cebadores. Esto permite afirmar que el cebador *Reverse 6GPDH*, se encuentra en la concentración teórica de 100 μM , mientras que el cebador *Reverse A3* se encuentra en una concentración real del 10 μM . Es decir, 10 veces menor a la concentración teórica. Es de importancia conocer la concentración real de los cebadores durante la optimización de la PCR, ya que de esto dependerá que exista una mejor amplificación de los transcritos, sobre todo cuando hay una variación tan notoria entre la concentración teórica y la real.

Los cebadores usados fueron adaptados a partir de un estudio en el que se implementó un método conjunto entre la RT-PCR y la EC para que se obtengan resultados más específicos, confiables y que brinden un diagnóstico completo en un solo paso. Es así que, el desarrollo de los cebadores usados en este estudio se basó en que se pudieran identificar los ARN mensajeros de los transcritos P190, P210 y P230. Solo se usó un cebador *Reverse* para los cebadores *Forward* que amplifican a las variantes del transcrito *BCR-ABL*, debido a que el exón a3 está presente en todos los transcritos que resultan de la fusión t(9;22)(q34;11). Mientras que los cebadores *Forward* fueron desarrollados con el fin de que se pudiera identificar entre las diferentes regiones de ruptura en el gen BCR (M-BCR, m-BCR, μ -BCR). Adicionalmente, se adaptó un fluorocromo diferente que pudiera ser detectado por el sistema óptico del secuenciador automático.

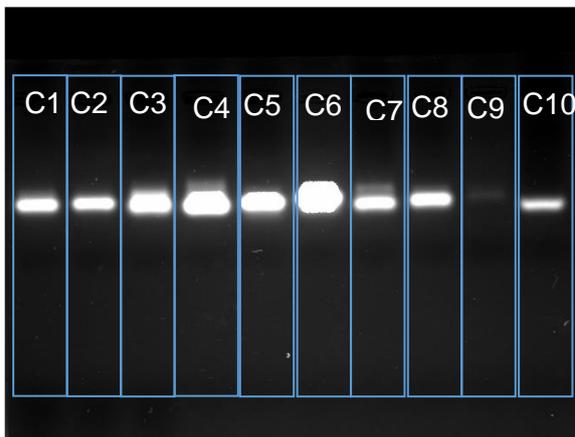


Figura 4. Electroforesis de cebadores *BCR-ABL* y *G6PDH*. Gel de agarosa al 3.5% teñido con *safe view*, para comprobar la concentración y calidad de los cebadores.

Carril 1: E19 FAM.

Carril 2: E12b1 FAM.

Carril 3: E19 VIC.

Carril 4: E12b1 PET.

Carril 5: E19 NED *Applied Biosystems*.

Carril 6, E12b1PET *Applied Biosystems*.

Carril 7: E1 FAM.

Carril 8: *G6PDH Forward* FAM.

Carril 9: A3 *Reverse*.

Carril 10: *G6PDH Reverse*.

5.2 Optimización de la RT-PCR y electroforesis capilar.

La muestra de ARN utilizada para la optimización corresponde a un paciente con un diagnóstico positivo para *BCR-ABL*. La concentración final del control positivo final fue de 10 ng/ μ L. La relación 260/280 utilizada para evaluar la

pureza de la muestra fue de 2. Lo que indica que presentó las condiciones adecuadas para considerarse como un control positivo.

La optimización de la RT-PCR implicó el estudio de varios parámetros como la concentración de los cebadores, la temperatura de alineamiento, el número de ciclos, etc. Todas estas condiciones se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5.

Concentraciones y variaciones en protocolo durante la estandarización de la RT-PCR.

Ensayo	Muestra	Ta (°C)	Concentración cebador Rev A3 (μM)	Concentración cebador Fwd e12b1 (μM)	Mix de primer Fwd (μM)	Concentración cebadores de control (μM)	N° de ciclos	ARN (ng/μL)	
1	BM-740	58	5	10	10	10	40	10	
			2,5						
			1,25						
			0,625						
2	BM-740	58	10	10	10	10	40	90	
								50	
								25	
								10	
								5	
3	BM-740	58	10	10	10	10	40	2	
								4	
								6	
								8	
								10	
4	BM-740	50	10	10	10	10	45	10	
		52							
		54							
		56							
		58							
		60							
		62							
		64							
5	BM-740	60	10	10	10	10	45	10	
									2
									4
									6
									8
12									
6	BM-740	60	12	10	10	0,25	45	10	
						0,5			
						0,75			
						1			
						2			
7	BM-740	60	12	10	10	2	45	10	

Durante la optimización de la RT-PCR se amplificaron las muestras de ARN con el kit *Super Script III Platinum SYBR Green One-Step RT-PCR* a un volumen final de 5μL, con los volúmenes especificados en la Tabla 4, que resultaron en la optimización de la muestra de ARN usada. Como se puede observar en la Figura 6, se logró la amplificación simultánea del control G6PDH y del transcrito P210.

En relación a la altura de los picos de los transcritos, se puede decir que se llegó a obtener resultados óptimos cuando la concentración del cebador *Reverse A3* fue 12 μM , de los cebadores *Forward* para el transcrito BCR-ABL 10 μM y de los cebadores del control G6PDH 2 μM . La baja concentración de los cebadores del control interno se debe a que se buscó reducir los *pull-ups* en las corridas, ya que los picos del control eran mucho más altos que los del transcrito cuando se usaba una concentración mayor a 2 μM .

Las condiciones óptimas de la amplificación se lograron al realizar 45 ciclos y subir la temperatura de alineamiento de 58 a 60°C como se observa en la Tabla 5 con más detalles.

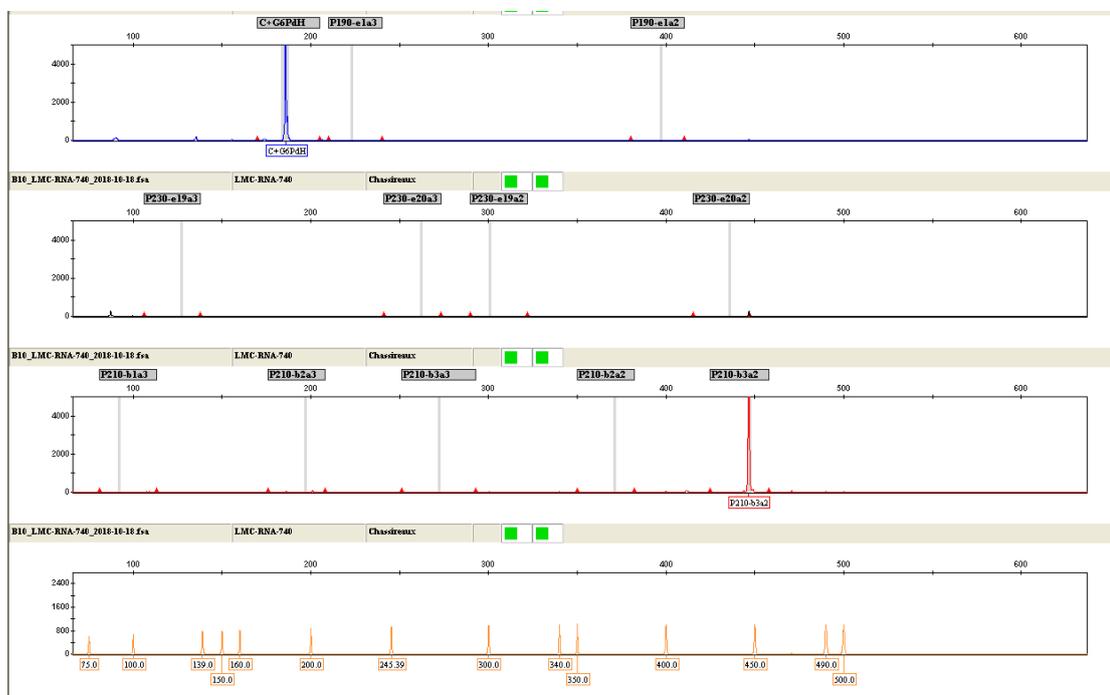


Figura 5. Electroferograma de la estandarización de la RT-PCR con el kit de *Super Script III Platinum SYBR Green One-Step RT-PCR*, se visualiza al

control G6PDH en el *dye* azul, con un tamaño de 186 pb y al transcrito b3a2 en el *dye* rojo, con un tamaño de 446pb.

Con respecto a los resultados obtenidos en la electroforesis capilar se puede apreciar en la Figura 5 que en el *dye* rojo se observa el pico correspondiente al reordenamiento b3a2, el cual tiene un tamaño de 446 pb, mismo que coincide con el tamaño esperado para este transcrito según lo descrito por Chasseriau., . A su vez, en la misma Figura en el *dye* azul se puede apreciar al control G6PDH, el cual tuvo un tamaño de 186 pb.

Para todos los ensayos realizados durante la optimización y la amplificación del total de muestras se usó agua como control negativo de RT-PCR. Como se muestra en la Figura 6, la plataforma se encuentra estandarizada, ya que no se observan contaminaciones de ningún tipo. En este sentido, se puede constatar que el electroferograma no muestra ninguna señal.

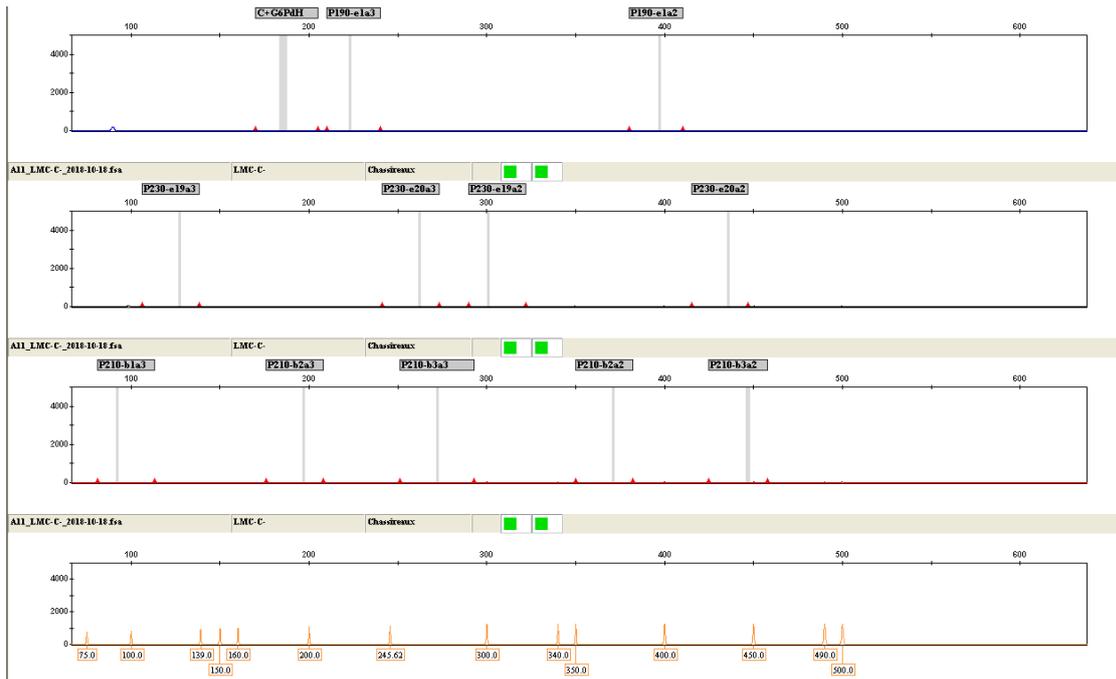


Figura 6. Electroferograma del control negativo (agua) de las muestras, no hay señal en ninguno de los *dyes*.

Adicionalmente, se realizó un control negativo de la prueba diagnóstica, en la que se usó una muestra de ARN de una persona sin la patología. Como se puede apreciar en la Figura 7, no se presentó ningún pico relativo a la translocación *BCR-ABL*. Pero el pico del control G6PDH está presente, validando el ensayo.

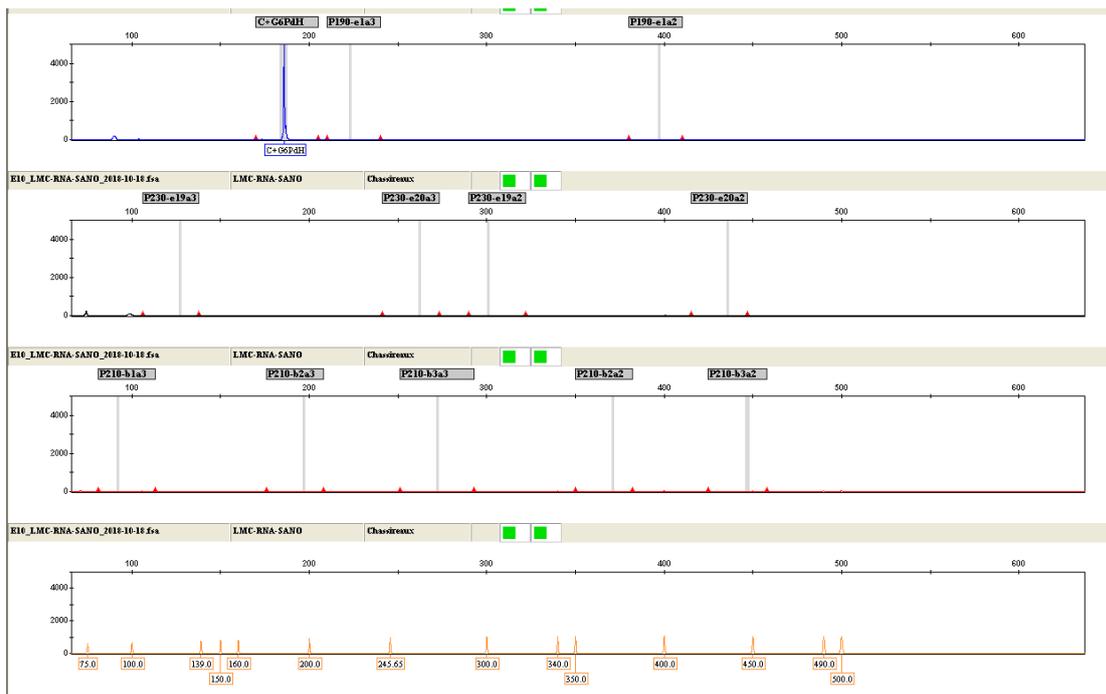


Figura 7. Electroferograma del control negativo de la prueba diagnóstica usando ARN humano sano, en donde se puede ver el pico del control G6PDH.

Una vez optimizado el protocolo de RT-PCR, se prosiguió a realizar el análisis total de las muestras de ARN entregados por HEE. En donde se encontró que el transcrito P210 es el más frecuente en pacientes con LMC ya que estaba presente en la totalidad de las muestras. Esto ya fue presenciado por Saravia en el año 2012. En el presente estudio se observó que dentro del transcrito encontrado, se pudo definir la presencia del reordenamiento b3a2 o el b2a2, siendo el transcrito b3a2 el más frecuente seguido del transcrito b2a2. Esto ya fue documentado en distintas investigaciones realizadas alrededor del mundo (Sastre , 2007). La aparición de uno u otro transcrito depende del punto de corte que se haya generado en el gen BCR durante la fusión del gen BCR y ABL. Además, se pudo apreciar que ciertas muestras presentaban una co-expresión entre los reordenamientos b3a2/b2a2 que se reporta por primera vez en Ecuador. Sin embargo, la coexpresión de estos transcritos si ha sido reportada en Bolivia, México, Corea, entre otros (Anand, Varma, Varma, Rana, & Malhotra, 2012). La importancia de identificar los distintos transcritos en

pacientes con LMC es relevante para brindar un diagnóstico diferencial entre los pacientes y que esto a su vez, permita ofertar tratamientos acordes a la realidad molecular de cada pacientes (Yaghmaie. , 2008).

Se puede observar en la Figura 5 el pico del reordenamiento b3a2 en el *dye* rojo. Este transcrito fue el más frecuente en las muestras analizadas, mientras que en la Figura 8 en el mismo *dye* se puede ver la presencia del pico de transcrito b2a2 y por último en la Figura 9, se observan dos picos los cuales corresponden a la co-expresión b3a2/b2a2.

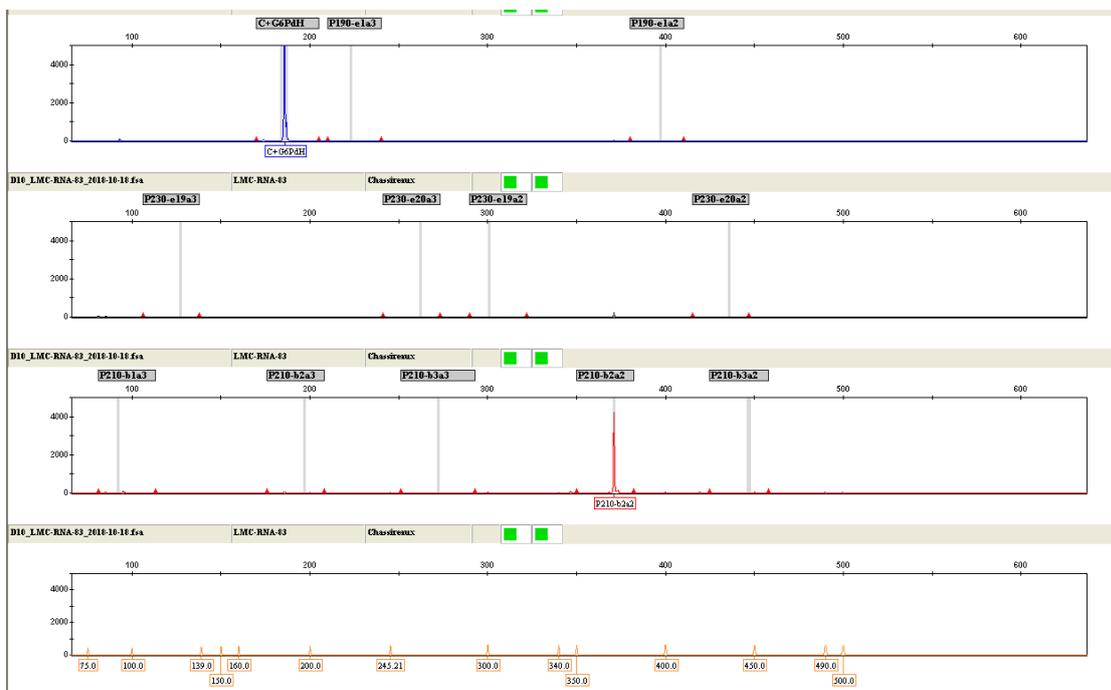


Figura 8. Electroferograma del transcrito de fusión b2a2 en *dye* rojo con un tamaño de 371 pb y el control en el *dye* azul.

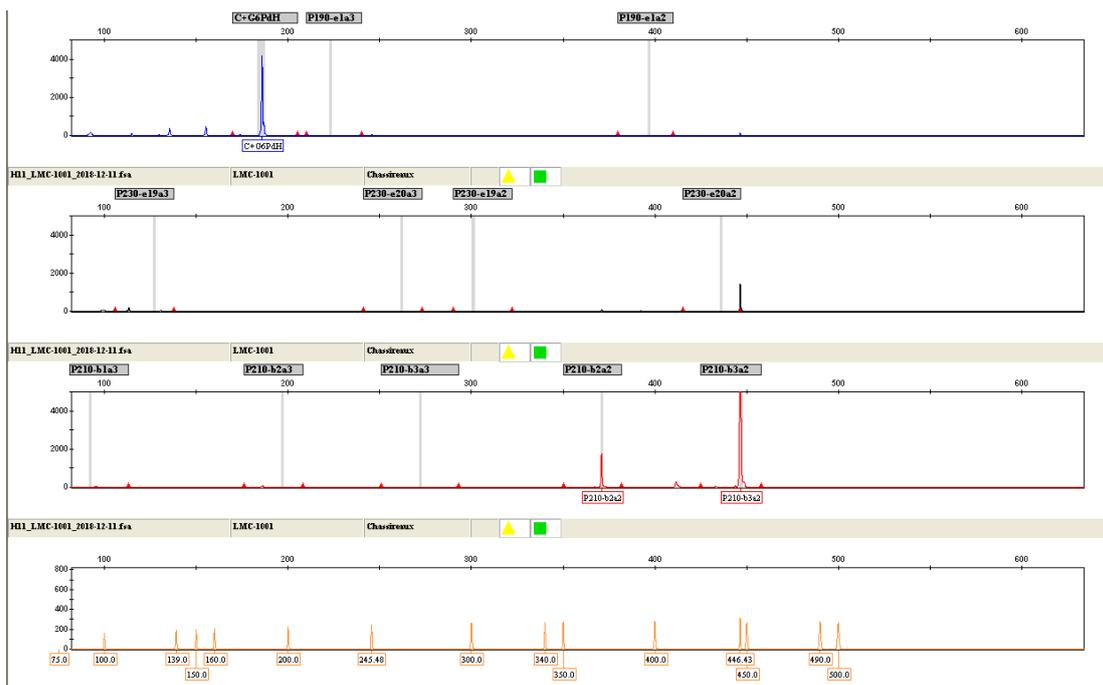


Figura 9. Electroferograma del transcrito con la co-expresión b3/a2 expresado con dos picos en el dye rojo.

5.3 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en la electroforesis capilar del total de muestras están representados en la Tabla 6:

Tabla 6.

Tipo de translocación obtenida de las 35 muestras de ARN amplificadas de pacientes con diagnóstico positivo para BCR-ABL.

Muestra	Tipo de translocación
BM17-530	b3a2
BM17-547	b3a2
BM17-562	b2a2
BM17-569	b3a2
BM17-572	b3a2
BM17-575	b3a2
BM17-740	b3a2
BM18-012	b3a2
BM18-083	b2a2
BM18-177	b3a2

BM18-400	b2a2/b3a2
BM18-460	b3a2
BM18-482	b3a2
BM18-509	b2a2
BM18-584	b2a2
BM18-739	b3a2
BM18-748	b3a2
BM18-755	b3a2
BM18-799	b3a2
BM18-898	b2a2/b3a2
BM18-942	b2a2
BM18-950	b2a2
BM18-1001	b2a2/b3a2
BM18-1012	b2a2/b3a2
BM18-1056	b2a2
BM18-1163	b3a2
BM18-1295	b3a2
BM18-1297	b3a2
BM18-1309	b3a2
BM18-1313	b3a2
BM18-1340	b2a2/b3a2
BM18-1347	b3a2
BM18-1382	b2a2/b3a2
BM18-1386	b3a2
BM18-1397	b3a2

Se realizó la prueba de chi cuadrado de las frecuencias observadas en este estudio comparadas con las frecuencias de varios países y la de Ecuador en 2001. Una vez se obtuvo el valor de chi cuadrado, se calculó el valor p para cada una de las frecuencias reportadas, estos valores se pueden observar en la Tabla 7 en Anexos. Esto se realizó con el fin de conocer si los resultados obtenidos en este estudio se ajustan a las frecuencias reportadas en otros países. La prueba chi cuadrado mostró que los resultados de este estudio se ajusta a las frecuencias de países como la India, Austria, Corea, Bolivia y otros, pero discrepaba de las frecuencias presentadas en Ecuador en 2001 y Colombia (Calzada , 2016).

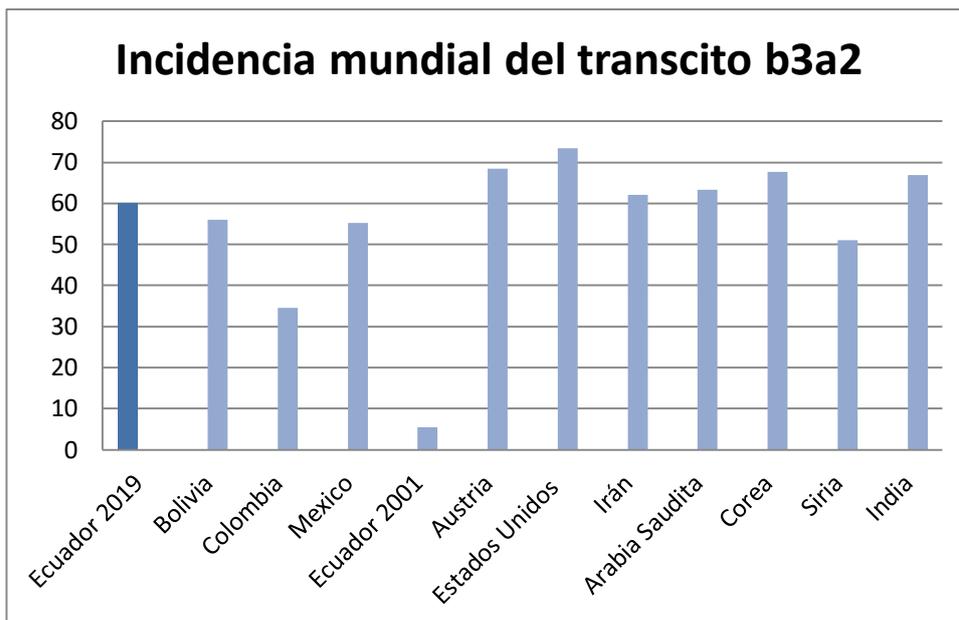


Figura 10. Gráfico sobre las frecuencias encontradas en este estudio y las reportadas en otros países para el tránsito b3a2

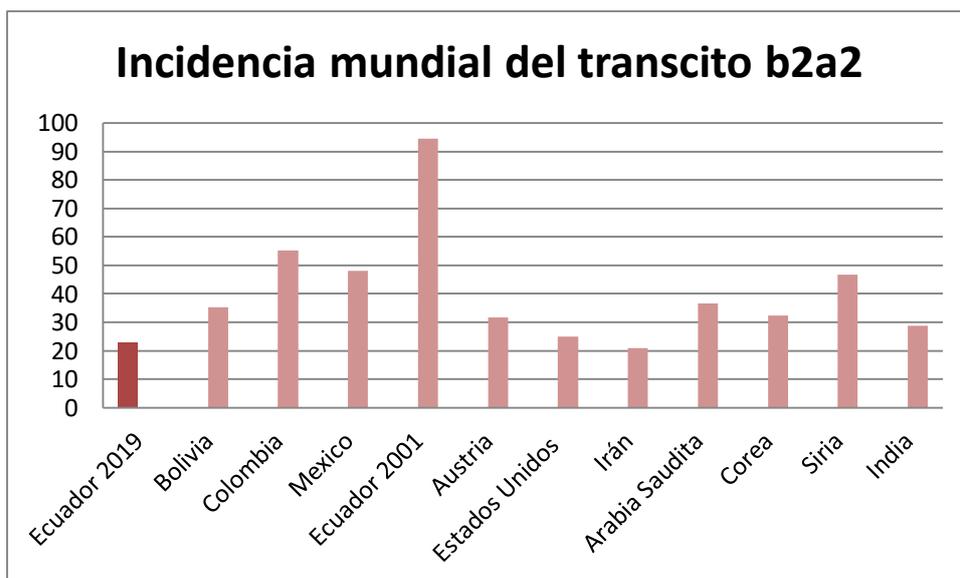


Figura 11. Gráfico sobre las frecuencias encontradas en este estudio y las reportadas en otros países para el tránsito b2a2.



Figura 12. Gráfico sobre las frecuencias encontradas en este estudio y las reportadas en otros países para la coexpresión de los transcrito b3a2/b2a2.

De las 35 muestras analizadas, 21 (60%) presentaron la translocación b3a2, 8 (22,85%) tenían las translocación b2a2 y 6 (17,14%) mostraron la variante de co-expresión b2a2/b3a2.

Como se observa en las Figuras 10, 11 y 12, en Ecuador en el año 2001 la investigación realizada por Paz y Miño describe una distribución de los reordenamientos donde el transcrito b3a2 tiene una incidencia de 5,4%, el transcrito b2a2 está presente en el 94,6% y la co-expresión no se reporta.

Sin embargo, como se puede observar en las mismas Figuras, en la Latinoamérica se han desarrollado distintos estudios reportando las frecuencias obtenidas de los transcritos p210 en pacientes con LMC. Por ejemplo, en Bolivia el estudio realizado por Calzada en pacientes con LMC presentó que el transcrito b3a2 estaba distribuido en el 56% de los pacientes y el b2a2 en el

35,3 %, mientras que la co-expresión b2a2/b3a2 se presentó en el 8,1%. Por otro lado, en Colombia las frecuencias reportadas por Aya mostraron que la incidencia del transcrito b2a2 es del 55,2%, mientras que el transcrito b3a2 en un 34,5% y la co-expresión b2a2/b3a2 en el 10,3%. Por su parte, el estudio realizado en pacientes mexicanos con LMC por Arana-Trejo describe el 48% de prevalencia para el transcrito b2a2, 35% para el transcrito b3a2 y 7% para la co-expresión b2a2/b3a2.

Las frecuencias de aparición de los transcritos encontradas en este estudio después de haber analizado 35 muestras de ARN de pacientes con LMC, fue del 60% para el reordenamiento b3a2, para el transcrito b2a2 se presentó el 22,85% y el 17,14% tenía una coexpresión entre los transcritos b2a2/b3a2.

Lo planteado anteriormente demuestra una relación directa de lo encontrado en este estudio con lo reportado en Bolivia, México, Austria, Estados Unidos, Irán, Arabia Saudita, Corea, Siria e India, y muestra también, una discordancia con relación a las frecuencias publicadas por Paz y Miño para el Ecuador en 2001.

Se ha discutido por Paz y Miño. en 2001, que los datos obtenidos en Ecuador se debían al *background* genético producto del mestizaje y a la altura a la que se encuentra Quito (ciudad de análisis), argumentando que la hipoxia podría alterar el comportamiento cromosómico. No obstante, poblaciones tales como la boliviana y la mexicana en las que también se ha presentado un alto grado de mestizaje presentan un porcentaje de aparición de los transcritos similares a los que ocurren en poblaciones caucásicas, orientales, etc. Por otra parte, con respecto a la altura, las muestras analizadas en este estudio corresponden a personas muestreadas a 2673 m.s.n.m en Quito, los datos demuestran que tanto en Bolivia en donde se realizó el muestreo a 3640 m.s.n.m como en este

estudio, la altura no tiene relevancia con respecto a la incidencia de los transcritos esto es algo contrario a lo presentado por Paz y Miño en 2001.

Las frecuencias reportadas para pacientes caucásicos y pacientes de poblaciones orientales son similares a las incidencias reportadas en este estudio y a frecuencias de ciertos países Latinoamericanos a pesar de ser poblaciones completamente diferentes, las frecuencias para las poblaciones caucásicas y orientales se pueden observar en la Tabla 8.

Tabla 8.

Frecuencias reportadas para los transcritos b3a2 y b2a2 en poblaciones caucásicas y orientales.

Países	Frecuencias para el transcrito b3a2 (%)	Frecuencias para el transcrito b2a2 (%)	Frecuencias para la coexpresión b2a2/b3a2 (%)
Austria	68,4	31,6	-
Estados Unidos	73,5	25	1
Irán	62	21	-
Arabia Saudita	63,3	36,6	-
Corea	67,66	32,34	2
Siria	51,1	46,7	-
India	66,82	28,84	3,36

Con relación a la coexpresión b2a2/b3a2, en este estudio se realizó el análisis de los productos de amplificación mediante la EC, pero estudios como los de Bolivia, México y otros países se analizaron los transcritos mediante geles de agarosa siguiendo la técnica de electroforesis convencional (Osman, Hamad,

Elmula, & Ibrahim, 2010). Debido a que la electroforesis capilar es más sensible que una electroforesis convencional, esto podría justificar la discordancia entre las frecuencias reportadas en este estudio para la co-expresión del transcrito b2a2/b3a2 con las reportadas en otros países.

Estandarizar estas tecnologías como herramientas diagnósticas ha permitido identificar los transcritos y a conocer el tipo de reordenamiento que pueden presentar las muestras. Esta información será de suma importancia para la prognosis de los pacientes, la cual se encuentra relacionada con los fragmentos, como por ejemplo se ha mostrado en distintos estudios en donde la cuenta de leucocitos varía de un transcrito a otro (Rosas-Cabral, 2003). Por otro lado, al disponer información completa sobre los transcritos a partir de una plataforma diagnóstica similar a la mostrada en este estudio, permitirá relacionar el transcrito y la respuesta que tiene hacia uno u otro tratamiento. Como ejemplo a lo descrito anteriormente está el estudio realizado por Lemos que presentó menor expresión *BCR-ABL* en los pacientes después de haber estado en tratamiento con Imatinib, en donde además se indicó que quizá el transcrito b2a2 era más sensible al Imatinib que el b3a2. Esto sugiere que aquellos pacientes que poseen el reordenamiento b3a2 presentan mayor resistencia a los tratamientos que aquellos que poseen el transcrito b2a2, por lo que se debería buscar un tratamiento alternativo para los pacientes que presenten el transcrito b3a2 (Sharma, Kumar, Mohanty, & Kochupillai., 2010).

En cuanto a co-expresión de los transcritos b2a2/b3a2 no existen datos clínicos, pero se explica que la aparición de la co-expresión de estos transcritos puede deberse a un mecanismo de *splicing* alternativo, en el que lo más probable es que durante el avance de la enfermedad solo uno de los transcritos prevalezca (Iqbal, 2011). Otra de las hipótesis que se dan para que exista una co-expresión de ambos transcritos es que la presencia de transcrito b2a2 puede estar relacionado a una progresión rápida de la enfermedad o a que

existan variaciones fenotípicas que resulten en variaciones en curso clínico de LMC (Léglise , 2015)

Con este estudio se pudo comprobar que las frecuencias de aparición no dependen de condiciones externas como la ubicación geográfica, grado de mestizaje o altura. Además se demostró la relación que existe entre las frecuencias de este estudio con las presentadas en varios países alrededor del mundo. También se demostró que el tener datos de la formación del gen fusión, es posible ofrecer un esquema de diagnóstico más preciso, para en un futuro relacionar con la prognosis y encontrar estrategias terapéuticas favor de los pacientes.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

El uso de la RT-PCR *Multiplex* es una herramienta de alta sensibilidad y eficiencia, en la detección de transcritos fusión en células leucémicas. Gracias al uso de múltiples cebadores se logró la detección rápida y eficiente de los transcritos *BCR-ABL*. Los puntos de ruptura de cada transcrito y la amplificación del control interno, todo esto en una sola reacción de PCR. Se puede destacar que estas técnicas son confiables y rápidas.

Los resultados presentaron que la translocación P210 es la más común en pacientes con LMC, se encontró que el transcrito más frecuente fue el b3a2 con un 60% de incidencia, seguido del transcrito b2a2 con 22.85% y la co-expresión de los transcritos b2a2 y b3a2 con 17,14%.

Los resultados obtenidos en este estudio concuerdan con frecuencias reportadas para los transcritos b3a2 y b2a2 en Latinoamérica, países con poblaciones caucásicas y países asiáticos como la India y Corea e incluso se encontró frecuencias similares en Siria, pero los resultados difieren de las frecuencias reportadas en Ecuador en 2001.

En este trabajo se reportó por primera vez en Ecuador, la co-expresión de transcrito b2a2 y b3a2. La frecuencia reportada en este estudio para la mencionada coexpresión es mayor a la reportada por otros estudios en el mundo, esto se podría deber a que las muestras fueron analizadas con métodos de mayor sensibilidad.

Este estudio constituye una herramienta basada en Biología Molecular que permite la observación e identificación los distintos transcritos del gen fusión *BCR-ABL*, que podrá ayudar en la toma de decisiones clínicas sobre los pacientes

6.2 Recomendaciones

Es importante diseñar un cebador *Reverse* alternativo para la amplificación de transcritos *BCR-ABL* debido a que el cebador *Reverse A3* demostró durante la evaluación de cebadores que la concentración real era mucho menor a la teórica, lo que presentó obstáculos durante la optimización de la RT-PCR.

Es importante incrementar el número de muestras analizadas para robustecer este estudio.

Se debería analizar cómo influye la presencia de los distintos reordenamientos b3a2, b2a2 y b2a2/b3a2 en la evolución de la enfermedad y en la respuesta a los tratamientos.

REFERENCIAS

- Acevedo, S. (2010). SEGUIMIENTO CITOGENETICO E HIBRIDIZACION IN SITU (FISH) EN LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL Seguimiento citogenético. Academia Nacional de Medicina, 87–90.
- Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real, 175–202.
- Al-Achkar, W., Moassass, F., Youssef, N., & Wafa, A. (2016). *Correlation of p210 BCR-ABL transcript variants with clinical, parameters and disease outcome in 45 chronic myeloid leukemia patients. Journal of B.U.ON., 21(2), 444–449.*
- Alberto, C., Bonilla, A., Torres, J. D., Muskus, C. E., Gaviria, G. R., Sierra, J. C., ... Garcés, B. (2014). Frecuencia de los transcritos p190BCR-ABL y p210BCR-ABL en una población colombiana con leucemia mieloide crónica (LMC) usando RT-PCR cualitativa.
- Almaguer, D. G.-, & Tarín-arzaga, L. C. (2011). Artículo de revisión Tratamiento de la leucemia mieloide crónica en fase crónica: una perspectiva mexicana, 12(4), 267–275.
- Alvarado-Ibarra, Cardiel-Silva, A, G.-C., González-González, L, E, H.-R., ... A10, Silva-López S, Silva-Vera K, T.-E. AL. (2016). Consenso de leucemia mieloide crónica por hematólogos del ISSSTE *Consensus on chronic myelogenous leukemia by hematologists of the ISSSTE. Rev Hematol Mex. Rev Hematol Mex Rev Hematol Mex, 171717(111), 34–6234.*
- American Cancer Society. (2015). CAUSAS, FACTORES DE RIESGO Y PREVENCIÓN.
- Artigas, C. G., Melo, A., Roa, J. C., Roa, I., Quijada, I., Vittini, C., ... Risueño, C. (2003). Acevedo, S. (2010). SEGUIMIENTO CITOGENETICO E HIBRIDIZACION IN SITU (FISH) EN LA ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL Seguimiento citogenético. Academia Nacional de Medicina,

87–90.

Aguilera, P., Tachiquín, M. R., Graciela, M., Munive, R., & Olvera, B. P. (2014). PCR en tiempo real, 175–202.

Al-Achkar, W., Moassass, F., Youssef, N., & Wafa, A. (2016). *Correlation of p210 BCR-ABL transcript variants with clinical, parameters and disease outcome in 45 chronic myeloid leukemia patients. Journal of B.U.ON., 21(2), 444–449.*

Alberto, C., Bonilla, A., Torres, J. D., Muskus, C. E., Gaviria, G. R., Sierra, J. C., ... Garcés, B. (2014). Frecuencia de los transcritos p190BCR-ABL y p210BCR-ABL en una población colombiana con leucemia mieloide crónica (LMC) usando RT-PCR cualitativa.

Almaguer, D. G.-, & Tarín-arzaga, L. C. (2011). Artículo de revisión Tratamiento de la leucemia mieloide crónica en fase crónica: una perspectiva mexicana, 12(4), 267–275.

Alvarado-Ibarra, Cardiel-Silva, A, G.-C., González-González, L, E, H.-R., ... A10, Silva-López S, Silva-Vera K, T.-E. AL. (2016). Consenso de leucemia mieloide crónica por hematólogos del ISSSTE Consensus on chronic myelogenous leukemia by hematologists of the ISSSTE. *Rev Hematol Mex. Rev Hematol Mex Rev Hematol Mex, 171717(111), 34–6234.*

American Cancer Society. (2015). CAUSAS, FACTORES DE RIESGO Y PREVENCIÓN.

Anand, M. S., Varma, N., Varma, S., Rana, K. S., & Malhotra, P. (2012). *Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous leukaemia patients in north India. Postgraduate Institute of Medical Education & Research, Chandigarh, India, (January), 42–48.*

Arana-Trejo, R. M., SANCHEZ, E., IGNACIO-IBARRA, G., BAÉZ DE LA FUENTE, E., GARCES, O., GÓMEZ MORALES, E., ... KOFMAN, S. (2002). *BCR / ABL p210 , p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican*

patients with chronic myeloid leukaemia (CML), 1(Cml), 145–150.

- Artigas, C. G., Melo, A., Roa, J. C., Roa, I., Quijada, I., Vittini, C., ... Risueño, C. (2003). TRANSCRIPTOS DE FUSIÓN DEL GEN BCR/ABL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA. *International Journal of Morphology*, 21(3), 205–209. <https://doi.org/10.4067/S0717-95022003000300004>
- Avila Cabrera, O. M., Exposito Delgado, Y. C., Gonzalez Pinedo, L., Espinosa Estrada, E., Hernández Padrón, C., Ramón Rodríguez, L. G., ... Bencomo Hernandez, A. (2014). Aspectos diagnósticos, evolutivos y terapéuticos de la leucemia mieloide crónica. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología Y Hemoterapia*, 30(1), 47–58.
- Becker K, A. (2012). Interpretación del hemograma. *Revista Chilena de Pediatría*, 72, 5.
- Bengio, D., Enrico, D., Moiraghi, D., Freitas, D., & Larripa, D. (2016). Leucemia mieloide crónica.
- Bennour, A., Ouahchi, I., Achour, B., Zaier, M., Youssef, Y. Ben, Khelif, A., ... Sennana, H. (2013). *Analysis of the clinico-hematological relevance of the breakpoint location within M-BCR in chronic myeloid leukemia. Medical Oncology*, 30(1). <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0348-z>
- Bianchini, M., & Larripa, I. (2014). BCR-ABL1 y evaluación de la respuesta molecular en Leucemia Mieloide Crónica. Instituto A. Fleming de Buenos Aires.
- Bolivar, A. M., Rojas, A., & Garcia-Lugo, P. (2014). PCR y PCR-Múltiple : parámetros críticos y protocolo de estandarización (PCR and PCR-Multiplex : critical parameters and standardization protocol) Resumen Introducción, 3(1), 25–33.
- Branford, S., Hughes, T. P., & Rudzki, Z. (1999). *Monitoring chronic myeloid leukaemia therapy by real-time quantitative PCR in blood is a reliable*

- alternative to bone marrow cytogenetics. British Journal of Haematology, 107, 587–599. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01749.x>*
- Bueno, M., Perez, J., & Bueno, O. (2000). El cromosoma humano 22. *Sociedad Canaria de Pediatría Santa Cruz de Tenerife, 24, 17–22.*
- Calzada, A. A., Masias, J., Ustarez, E., Choque, G., Peñaloza, R., Mansilla, S., & Amaru, R. (2016). PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (LMC) EN BOLIVIA. *Scielo, 22(Lmc), 13–19.*
- Cañizales, J. (2012). Transcritos del gen BCR-ABL en pacientes con leucemia mieloide crónica en Venezuela, *27, 422–429.*
- Carretero, M. (2012). Tratamiento de la leucemia mieloide crónica. *Offarm, 29(11), 134–136.*
- Chasseriau, J., Rivet, J., Bilan, F., Chomel, J. C., Guilhot, F., Bourmeyster, N., & Kitzis, A. (2004). *Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR. Journal of Molecular Diagnostics, 6(4), 343–347. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60530-2](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60530-2)*
- de Lemos, J. A. R., De Oliveira, C. M., Scerni, A. C. C., Bentes, A. Q., Beltrão, A. C., Bentes, I. R. G., ... Maradei-pereira, L. M. C. (2005). *Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. Genetics and Molecular Research, 4(4), 803–811.*
- Díaz, A. S., & Rentería, L. F. (2013). PCR : reacción en cadena, 53–74.
- Donné, A., & Hughes, J. (n.d.). Neoplasias mieloproliferativas Myeloproliferative neoplasms, 15–17.
- Elisa, M. (2017). Leucemia mieloide, 429–446.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1609324>.
- Ernst, D., Ocqueteau, M., Bertin, P., Sarmiento, M., & Ramírez, P. (2015). *Results of acute myeloid leukemia treatment. Analysis of 63 patients*

between 2010-2014, 1269–1276.

- Goh, H.-G., Hwang, J.-Y., Kim, S.-H., Lee, Y.-H., Kim, Y.-L., & Kim, D.-W. (2006). *Comprehensive analysis of BCR-ABL transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR*. *Translational Research*, 148(5), 249–256. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2006.07.002>
- González, M., Chillón, M. C., Marín, L., Corral, R., Alcoceba, M., Balanzategui, A., ... Miguel, J. F. S. (2011). Utilidad en la práctica clínica de la detección de la enfermedad mínima residual, 96(Extra 1), 3–7.
- Hernández, P. (2011). NUEVA OPCIÓN TERAPÉUTICA EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemote*, 17(3), 205–210.
- Intile, D., & Pavlovsky, C. (2017). ARTÍCULO ORIGINAL LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA . MONITOREO Y FACTORES PREDICTIVOS DE UNA RESPUESTA Materiales y métodos Resultados Las características de los pacientes se presentan en la, 161–166.
- Iqbal, Z., Manzoor, F., Iqbal, M., Ali, S., Sheikh, N., & Khan, M. (2011). *Frequency of Bcr-Abl Fusion Oncogene Splice Variants Associated with Chronic Myeloid Leukemia (CML)*, 2011(June), 176–180. <https://doi.org/10.4236/jct.2011.22022>
- Jorge E. Cortes, MD Richard T. Silver, MDH. Jean Khoury, MD Hagop M. Kantarjian, M. (2016). Leucemia mieloide crónica.
- Kanterjian, H., & Jabbour, E. (2014). *Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management*, 89(5), 547–556. <https://doi.org/10.1002/ajh.34>
- Kawaguchi, Y.; Jinnai, I.; Nagai, K.; Yagasaki, F.; Yakata, Y.; Matsuo, T.; Kuriyama, K. & Tomonaga, M. (2012). PCR a tiempo real.
- Kimura, T. I. H. T. K. T. K. I. T. K. H. D. N. K. A. (2004). *Insertion of a genomic fragment of chromosome 19 between BCR intron 19 and ABL intron 1a in a*

chronic myeloid leukaemia patient with I -BCR-ABL (e19a2) transcript,
(17). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2004.05119.x>

Koren-Michowitz, M., Shimoni, A., Daraio, F., Crasto, F., Lorenzatti, R., Volchek, Y., ... Nagler, A. (2015). *Sensitive Replicate Real-Time Quantitative PCR of BCR-ABL Shows Deep Molecular Responses in Long-Term Post-Allogeneic Stem Cell Transplantation Chronic Myeloid Leukemia Patients.* *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(10), 1852–1855. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2015.06.018>

Lee., J.-J., Kim., H.-J., & Hwang, J.-Y. (2004). *Imatinib induces a cytogenetic response in blast crisis or interferon failure chronic myeloid leukemia patients with e19a2 BCR-ABL transcripts.* *Nature*, 1539–1540. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403454>

Léglise, M., Pluchon-rivière, E., Calvez, G. Le, Berthou, C., Autrand, C., Sensebé, L., & Balcon, D. (2015). *Molecular Diagnosis and Follow Up in Myeloproliferative Syndromes and Acute Leukemias : Correlation Between Expression of Fusion Transcripts and Disease Progression in Chronic Myeloid Leukemia.* Taylor & Francis, (August). <https://doi.org/10.3109/10428199209067600>

Leukemia & Lymphoma Society. (2013). Leucemia mieloide cronica. *Arch. Med. Interna (Montevideo)*, 15(3), 125–7.

Limsuwanachot, N., Siriboonpiputtana, T., Karntisawiwat, K., Chareonsirisuthigul, T., Chuncharunee, S., & Rerkamnuaychoke, B. (2016). *Multiplex RT-PCR assay for detection of common fusion transcripts in acute lymphoblastic leukemia and chronic myeloid leukemia cases.* *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 17(2). <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.2.677>

Lugmaña, G. (2014). Anuario de Estadísticas Hospitalarias: Egresos y Camas 2014. *Inec*, 417. <https://doi.org/10.1128/AAC.03728-14>

Luthra, R., Sanchez-Vega, B., & Medeiros, L. J. (2004). *TaqMan RT-PCR assay*

coupled with capillary electrophoresis for quantification and identification of bcr-abl transcript type, 96–103. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800026>

- Magaña, J. J., Arenas-sordo, M. D. L., & Gómez, R. (2009). como una nueva estrategia en la medicina y el diagnóstico clínico, 946–956.
- Mart, N. (2013). Original Enfermedad Mínima Residual. *Unité de Recherces Sur La Biologie Des Cellules Souches*.
- Mensink, E., van de Locht, a, Schattenberg, a, Linders, E., Schaap, N., Geurts van Kessel, a, & De Witte, T. (1998). *Quantitation of minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia patients using real-time quantitative RT-PCR. British Journal of Haematology*, 102(3), 768–774.
- Mohan, H. (2012). *Patología* (Editorial).
- Morales, C., Víctor, T.-C., Ribón, G., & Manrique, R. D. (2010). Leucemia mieloide crónica: diagnóstico y tratamiento. *CES Medicina*, 24, 97–108. <https://doi.org/10.4067/S0718-09342002005100014>
- Nashed, A. L., Rao, K. W., & Gulley, M. L. (2003). *Clinical applications of BCR-ABL molecular testing in acute leukemia. Journal of Molecular Diagnostics*, 5(2), 63–72. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60454-0](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60454-0)
- Neil A. Campbell, J. B. R. (2007). *Biología* (7ma edicio). California: Medica Panamerica.
- Nowell, P., & Hungerford, D. (1960). *A minute chromosome in human chronic 9 granulocytic leukemia. Science*, 132(3438), 1488–1501. <https://doi.org/10.1126/science.132.3438.1488>
- Olaya-vargas, A. (2016). Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas en pediatría Principios básicos.
- Osman, E. I., Hamad, K., Elmula, I. M. F., & Ibrahim, M. E. (2010). *Frequencies of BCR-ABL1 fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid*

leukaemia patients, 231, 229–231.

Pane, F., Intrieri, M., Quintarelli, C., Izzo, B., Muccioli, G. C., & Salvatore, F. (2002). *BCR/ABL genes and leukemic phenotype: From molecular mechanisms to clinical correlations*. *Oncogene*, 21(56 REV. ISS. 7), 8652–8667. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206194>

Pavlovsky, A. (2017). El trasplante de médula ósea como puente hacia los nuevos tratamientos, 213–219.

Paz-y-Miño, C., Burgos, R., Morillo, S. A., Santos, J. C., Fiallo, B. F., & Leone, P. E. (2001). *BCR-ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America*. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 132(1), 65–67. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(01\)00515-5](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(01)00515-5)

Perez, A. (2012). Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction , PCR).

Pozo, F. J. F. del. (2009). *Anatomofisiología y Patología Basicas* (Arán Edici). Madrid.

Pratik Deb, P. ., Chakrabarti, S., Chakrabarty, R. A., Uttam Nath, S., & Sankar Ray, U. C. (2014). *Incidence of BCR-ABL transcript variants in patients with chronic myeloid leukemia : Their correlation with presenting features , risk scores and response to treatment with imatinib mesylate*, 35(1). <https://doi.org/10.4103/0971-5851.133707>

Press, R. D., Kamel-Reid, S., & Ang, D. (2013). *BCR-ABL1 RT-qPCR for monitoring the molecular response to tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 15(5), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.04.007>

Reiter , Greinix HT, Brugger S, Keil F, E. (2013). *Long-term follow-up after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia*. *NCBI*.

- Rey, L. A. J. M. (2009). Leucemia Mieloide Cronica, Estado del arte. Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud.
- Rodríguez, M., Cardona, A. F., Grajales, M. A., Enciso, L., Ruiz, G., Yepes, A., ... Molano, A. (2007). Leucemia mieloide crónica en crisis blàstica bases moleculares y diagnòstico. Revista Venezolana de Oncología, 19(4), 287–296.
- Romam, J. (2015). Leucemia y el papel del cromosoma Filadelfia, 7.
- Rosas-Cabral, A., Martínez-Mancilla, M., Ayala-Sánchez, M., Vela-Ojeda, J., Marroquín, A., & Longoria-Revilla, E. (2003). Análisis del tipo de transcrito bcr-abl y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica, 139.
- Rowley, J. D. (1973). *A new consistent chromosomal abnormality in Chronic Myelogenous Leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. Nature, 243(Cml), 290–293.*
- Rudín, M. C., Berger, P. C., Espeleta, G. G., Cruz, G. J., Montero, C., Luis, U., ... Rica, C. (1998). Diagnòstico Molecular del Cromosoma Filadelfia, 40(3), 24–30.
- Sánchez, M. S. I. (2013). Inhibidores de BCR-ABL como un abordaje molecular de la leucemia mieloide crónica, (Cic), 1–10.
- Sastre, D., Argaraña, C., Heller, V., Gallo, M., Fernández, E., & Rodríguez, C. (2007). *An analysis of multiplex-PCR in the detection of BCR-ABL transcripts in hematological disorders, 523, 520–523.*
- Sharma, P., Kumar, L., Mohanty, S., & Kochupillai., V. (2010). *Response to Imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia patients with variant BCR-ABL fusion transcripts. Springer-Verlag, 241–247.*
<https://doi.org/10.1007/s00277-009-0822-7>
- Thews., G., & Mutschler, E. (1983). Anatomía, fisiología y pato fisiología del hombre (Réverte). Barcelona.

- Tovar-Bovadilla, J. L., & Ortiz-Hidalgo, C. (2016). Utilidad de la biopsia de Médula Ósea (MO) en el diagnóstico de las Neoplasias Mieloproliferativas (NMP).
- Velásquez, C., Fonseca, A., Diana, M., Jacal, C., María, S., Sánchez, D. P., ... Ceballos, E. E. C. (2013). Artículo de revisión Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica.
- Verma, D., Kantarjian, H. M., Jones, D., Luthra, R., Borthakur, G., Verstovsek, S., ... Cortes, J. (2019). *Chronic myeloid leukemia (CML) with P190 BCR-ABL : analysis of characteristics , outcomes , and prognostic significance*, 114(11), 2232–2236. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-02-204693>.The
- Verschraegen CF1, Kantarjian HM, Hirsch-Ginsberg C, etal. (1998). *The breakpoint cluster region site in patients with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia*.
- Xu, M., Zheng, M., Liu, G., Zhang, M., & Kang, J. (2018). *Screening of break point cluster region Abelson tyrosine kinase inhibitors by capillary electrophoresis*. *Journal of Chromatography A*. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.019>
- Yaghmaie., M., Ghaffari., S. H., Ghavamzadeh., A., Alimoghaddam., K., Jahani., M., Mousavi., S.-A., ... Bibordi., I. (2008). *Frequency of BCR-ABL Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia*. *Hematology-Oncology and Bone Marrow Transplant Research Center, Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*, 11(3), 247–251.
- Zhen, C., & Wang, Y. L. (2013). *Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: International standardization of BCR-ABL1 quantitation*. *Journal of Molecular Diagnostics*, 15(5), 556–564. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2013.05.010>
- TRANSCRIPTOS DE FUSIÓN DEL GEN BCR/ABL EN PACIENTES CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA. *International Journal of Morphology*,

21(3), 205–209.

ANEXOS

Tipo de transcrito de fusión BCR-ABL	Ecuador (%) 2019	Bolivia	Colombia	Mexico	Ecuador 2001	Austria	Estados Unidos	Iran	Arabia Saudita	Corea	Siria	India
b3a2		56	34,5	55,2	5,4	68,4	73,5	62	63,3	67,66	51,1	66,82
<i>p-value</i>	60	0,59	1,42E-05	0,52	4,47E-122	0,31	0,12	0,80	0,68	0,35	0,21	0,40
b2a2		35,3	55,2	48	94,6	31,6	25	21	36,6	32,34	46,7	28,84
<i>p-value</i>	22,85	0,04	1,34E-05	2,83E-04	1,62E-13	0,12	0,67	0,69	0,02	0,10	4,83E-04	0,26
b3a2/b2a2		8,1	10,3	7	-	-	1	-	-	2	-	3,36
<i>p-value</i>	17,14	1,49E-03	3,31E-02	1,27E-04	-	-	1,34E-58	-	-	9,58E-27	-	5,58E-14

Tabla 7: Frecuencias reportadas en este estudio comparadas con las frecuencias y el chi cuadrado de otros países.

