

Análisis del tipo de transcrito *bcr-abl* y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica

Alejandro Rosas-Cabral,*, **** Manuel Martínez-Mancilla,**** Manuel Ayala-Sánchez, ** Jorge Vela-Ojeda, ** Patricia Bahena-Reséndiz, ** Manuel Vadillo-Buenfil,* J. Antonio Aviña-Zubieta,* Daniel Salazar-Exaire,* Enrique Miranda-Peralta, *** Alberto Marroquín, **** Ernesto Longoria-Revilla**

Resumen

Problema: Se ha sugerido que el tipo de transcrito quimérico *bcr-abl* (*b3a2* o *b2a2*) está asociado con diferencias en las características clínicas y hematológicas de los pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC); sin embargo su valor pronóstico aún es controvertible.

Métodos: Se analizaron 97 casos de LMC Filadelfia-positiva, para determinar el tipo de transcrito *bcr-abl* y su relación con los parámetros clínicos al diagnóstico, mediante la Reacción Inversa en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).

Resultados: Nosotros detectamos 27 (28%) pacientes con un transcrito *b3a2* y 57 (59%) con un transcrito *b2a2*, en 13 casos (13%) se detectaron ambos transcritos *b3a2/b2a2*, estas frecuencias son inversas a las reportadas por otros grupos. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes que presentaron el transcrito *b3a2* o el *b2a2* con respecto a edad, sexo, concentración de hemoglobina o cuenta leucocitaria. Sin embargo, la cuenta plaquetaria de los pacientes que expresaron un transcrito *b3a2* fue significativamente más elevada que la de los pacientes con transcrito *b2a2* (743.3 vs $477.3 \times 10^9/L$; $p=0.01$). Además, en el subgrupo de pacientes cuya cuenta leucocitaria al diagnóstico fue $<100 \times 10^9/L$ y que presentaban un transcrito *b3a2*, la cuenta plaquetaria fue significativamente mayor que la de los pacientes que expresaron un transcrito *b2a2* (679.1 vs $352.2 \times 10^9/L$; $p=0.001$).

Conclusiones. Se observó una frecuencia de transcritos de *bcr-abl* inversa a la reportada en la mayor parte de los estudios realizados en esta dirección, pero acorde con otros estudios realizados en Latinoamérica. Además, se observó que, al menos en nuestra población existe un subgrupo de pacientes en los cuales el transcrito *b3a2* de *bcr-abl* está asociado a una mayor actividad trombopoyética, lo cual sugiere en nuestra población una conducta biológica diferente de la LMC.

Palabras clave: Leucemia mieloide crónica, *bcr-abl*, *b3a2*, *b2a2*, plaquetas, RT-PCR

Summary

Problem. It has been suggested that type of chimeric mRNA is associated with differences in the clinical and hematologic characteristics of chronic myeloid leukemia (CML). However, prognostic value of type of chimeric mRNA *bcr-abl* (*b3a2* or *b2a2*) is still controversial.

Methods. We analyzed 97 cases of Philadelphia-positive CML to determine mRNA type by reverse-polymerase chain reaction (RT-PCR) and its relationship with clinical features.

Results: We detected *b3a2* *bcr-abl* transcripts in 27 (28%) cases, *b2a2* in 57 (59%) cases, and 13 (13%) with both mRNA transcripts *b3a2/b2a2*. These frequencies were the total reverse of other reports.

Age, sex, hemoglobin, and white-cell counts showed no significant difference for those with either *b3a2* or *b2a2* *bcr-abl* transcripts. However, platelet counts of *b3a2* patients were significantly higher than those of *b2a2* patients (743.3 vs $477.3 \times 10^9/L$; $p = 0.01$). In addition, in the subgroup of patients whose white-cell count at diagnosis was $<100 \times 10^9/L$, those with *b3a2* transcript had a significantly higher platelet count (679.1 vs. $352.2 \times 10^9/L$; $p = 0.001$).

Conclusions: We observed reversed frequency of *bcr-abl* transcripts in this population, but agreement with other Latin-American reports. In addition, our data suggested that there is different CML biological behavior in our population and that there is a subpopulation of CML patients in whom *b3a2* is associated with higher thrombopoietic activity.

Key words: Chronic myeloid leukemia, *bcr-abl*, *b3a2*, *b2a2*, platelets, RT-PCR.

*Unidad de Epidemiología Clínica Hospital de Especialidades, Centro Médico La Raza, IMSS.

**Servicio de Hematología Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza, IMSS

***Hospital General de México

**** Departamento de Biomedicina Molecular. CINVESTAV-IPN

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Alejandro Rosas-Cabral, Hospital de Especialidades Centro Médico La Raza. IMSS. Seris y Zaachila s/n, Colonia La Raza, Delegación Atzacapotzalco, 02290 México, D.F. Teléfono 5724 5900, extensión 1083. Fax 5774 5920

Introducción

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia hematológica originada por la transformación maligna de la célula madre multipotencial y caracterizada clínicamente por la proliferación excesiva de células mieloides maduras y de los precursores granulocíticos, en la sangre periférica y en la médula ósea.¹ La LMC fue la primera neoplasia humana en ser asociada consistentemente con una anomalía cromosómica,² que consiste en la translocación t(9;22)(q34;q11) o Cromosoma Filadelfia (Ph), en el 90% de los casos. A nivel molecular, esta translocación resulta en una fusión cabeza-cola de los genes *bcr* y *abl*.^{3,4} Lo cual da lugar a la formación de un gen quimérico denominado *bcr-abl*.⁵ La ruptura del gen *abl* se localiza usualmente en el intrón 5' del exón 2,^{6,7} en tanto que, en la mayoría de los casos de LMC, el punto de ruptura en el cromosoma 22 se localiza dentro de una pequeña región de 5.8 kb denominada Región Principal del Agrupamiento del Rompimiento o *M-bcr*, entre los exones b2 y b3 o b3 y b4.⁸ La gran mayoría de los pacientes con LMC exhiben rupturas que resultan en un ARN mensajero (ARN/m) de fusión, en el cual el exón b2 o b3 del gen *bcr* es fusionado al exón a2 del gen *abl* (transcritos b2a2 o b3a2). Ambos transcritos dan lugar a una proteína de fusión BCR-ABL de 210 kd considerada central en la patogénesis de la LMC.⁹⁻¹¹

La localización por Southern blot del punto de ruptura en el *M-bcr*, en particular con respecto a un sitio de restricción Hind III en 3' al exón b3 del gen *bcr*, ha sido considerada un posible factor pronóstico en LMC,¹²⁻¹⁵ pero los resultados han sido contradictorios. Algunos autores han descrito una fase crónica más corta, con peor pronóstico para los pacientes con un punto de ruptura en la región 3' en comparación con aquellos que presentan un rompimiento con localización 5'. No obstante, estudios más recientes y un número cada vez mayor de reportes, han negado tal correlación.¹⁶⁻²² Sin embargo el estudio del punto de ruptura por Southern Blot no es totalmente confiable, debido a que los puntos de ruptura que ocurren 5' a un sitio de restricción Hind III pueden incluir o excluir al exón b3, requiriendo por lo tanto, de la identificación directa del transcrito mediante la Reacción Inversa en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para un análisis más específico. Los estudios que emplean esta técnica son prevaletentes actualmente en esta área de investigación, los resultados son diversos, con algunas evidencias a favor y otras en contra de que el tipo de transcrito de fusión b3a2 o b2a2 influye en el curso de la enfermedad.

Mills²³ y Dobrovic²⁴ sugirieron una asociación entre el ARNm b3a2 y una fase crónica más corta con menor supervivencia; sin embargo, estudios prospectivos más recientes no confirman estos resultados.^{25,26,27}

Por otro lado, se han reportado diferentes porcentajes de los rearreglos b3a2 y b2a2, en diversos estudios

realizados en pacientes con LMC,^{24,28,29} estos estudios se realizan en poblaciones con tamaños muy diversos y empleando técnicas diferentes (Southern Blot o RT-PCR), o bien, con pacientes expuestos a diversos tratamientos (Interferon-alfa, trasplante de médula ósea o quimioterapia oral). No obstante, en una revisión reciente, J. Melo³⁰ sugiere una frecuencia del 66% en los pacientes con LMC que expresan los transcritos b3a2 o b3a2/b2a2 y de 33% para los pacientes que expresan transcritos b2a2. En la intención de conocer la frecuencia relativa de los transcritos b3a2 y b2a2 en nuestra población y buscando además, una posible correlación entre el tipo de transcrito y algún parámetro clínico, nosotros estudiamos a 97 pacientes con LMC diagnosticada mediante la técnica de RT-PCR.

Pacientes y Métodos

Pacientes: Noventa y siete pacientes con diagnóstico de LMC Ph+ fueron el objeto del presente estudio. Todos ellos se encontraban en fase crónica y fueron estudiados al momento del diagnóstico o durante tratamiento con Interferón-alfa. El cromosoma Filadelfia fue diagnosticado empleando las técnicas citogenéticas habituales.³¹

Preparación y procesamiento de muestras. Se obtuvieron 20 mL de sangre periférica en tubos heparinizados, de pacientes con diagnóstico clínico y citogenético de LMC en fase crónica, se obtuvo la fracción mononuclear por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma. St Louis, Mo). Las células así obtenidas se almacenaron en 1000 ml de amortiguador PBS a -70°C, hasta su uso.

Extracción del ARN. El ARN total (ARNt) de las células nucleadas fue extraído de acuerdo al procedimiento descrito por Chomeczynski.³²

Síntesis de cADN. Un microgramo de ARNt fue mezclado con 0.5mg/mL de oligo-dt 12-18 (GIBCO, BRL) y 5 mL de agua bidestilada, la mezcla se calentó a 70°C durante 10 minutos y después se colocó rápidamente en hielo. La síntesis de cADN se realizó adicionando 8 mL de mezcla de cADN (Mezcla de cADN= 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 0.2 mmo/L de DTT, 100 mMol de cada dNTP's (GIBCO, BRL) y 200 U de enzima Moloney-Murine Leukemia Virus en un volumen final de 20 mL. Los tubos se incubaron a 42°C por 50 minutos y se terminó la reacción calentando a 70°C durante 10 minutos; el cADN se almacenó a -20°C hasta su empleo.

Reacción en Cadena de la Polimerasa; 5 mL de cADN se mezclaron con 45 mL de mezcla de primera ronda (Mezcla de primera ronda= 200 mM Tris-HCl pH 8.4, 150 mM MgCl₂, 50 mM de KCl, 150 nmol de iniciadores C y D, 200 mMol de cada dNTP's, 5 U/ml de Taq polimerasa y un volumen variable de agua bidestilada, hasta completar un volumen de 45 mL. La PCR fue realizada en un

termociclador Perkin-Elmer por 40 ciclos, a 94°C por 40 segundos, 62°C por 50 segundos y 72°C por 60 segundos, seguidos de una extensión final de 10 minutos a 72°C. El producto de esta reacción fue reamplificado con iniciadores internos de la manera siguiente a 48 mL de mezcla de segunda ronda (Mezcla de segunda ronda= 200 mMol Tris-HCl pH 8.4, 150 mM MgCl₂ 50 mM KCl, 150 nmol de iniciadores A y B, 200 mM de cada dNTP's, 5 U/mL de Taq polimerasa un volumen variable de agua bidestilada hasta completar un volumen de 48 mL), se le adicionaron 2mL del producto de reacción de la primera ronda y la amplificación fue llevada a cabo por 35 ciclos de 94°C por 40 segundos, 56°C por 50 segundos y 72°C por 30 segundos. En todos los casos el gene de Beta-2-microglobulina fue utilizado como control interno de la PCR. Los iniciadores empleados para la amplificación de los transcritos de *bcr-abl* ya han sido descritos previamente.²⁸

Los productos de la reacción de PCR fueron llevados a electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. Después del corrimiento, se visualizaron los productos de la reacción bajo Luz ultravioleta, se obtuvieron una banda de 494 pares de bases para el transcrito b3a2, una banda de 319 pares de bases para el transcrito b2a2 y una banda de 100 pares de bases para el gen de la Beta-2-microglobulina.

Secuenciación directa. Los productos de RT-PCR fueron llevados a electroforesis en gel de agarosa al 1% y recuperados mediante un kit de extracción en gel Qiaex (Qigen). La secuenciación directa del cDNA amplificado por PCR fue llevado a cabo usando Secuensa (USB). La desnaturalización inicial del templado fue llevada a cabo por

calentamiento a 95°C por 5 minutos en la presencia del iniciador de secuenciación, seguido de enfriamiento rápido en hielo durante 10 minutos. Las muestras fueron llevadas a electroforesis en un gel de secuenciación conteniendo acrilamida al 6% y urea a 7 mol/L, luego fue secado y expuesto a una placa de Rayos-X (Kodak) a temperatura ambiente durante 5 días.

Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó usando la prueba de Kruskal-Wallis para comparar variables numéricas entre los 3 grupos y mediante la prueba de U de Mann-Whitney, para comparar variables numéricas entre dos grupos.

Resultados

Reportamos el análisis de muestras de sangre periférica de 97 pacientes con LMC, en fase crónica, usando la técnica de RT-PCR para demostrar la presencia del transcrito *bcr-abl*. La amplificación de la región comprendida en la translocación t(9;22)(q34;q11) se detectó en todos los pacientes, en la figura 1 se muestran dos muestras representativas (b3a2 y b2a2). De la amplificación posterior a RT-PCR se obtienen un producto de 494 pares de bases, en el caso de un ARNm b3a2, y un producto de 319 pares de bases específico del ARNm b2a2. En todos los casos, se obtuvo un producto de amplificación fácilmente detectable cuando se

Cuadro I. Datos clínicos al diagnóstico en 97 pacientes con Leucemia Mieloide Crónica y su relación con el transcrito bcr/abl encontrado

Transcrito	b3a2	b2a2	b3a2/b2a2	p
Datos clínicos	N=27	N=57	N=13	
Hemoglobina 3/dL	11.5	11.7	10.6	NS
Leucocitos (x10 ⁹ /L)	13.3	180.5	197.6	NS
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	743.2	477.2	453.1	0.01
Basófilos (x10 ⁹ /L)	4.6	4.8	4.6	NS
Blastos en M.O. (x10 ⁹ /L)	2.5	3.3	?	NS
Esplenomegalia (cm)	9.8	10.9	10.	NS
Edad (mediana)	44	40	38	NS
(rango)	37-60	15-74	19-55	
Sexo				
Masculino	13	35	9	
Femenino	14	22	4	
Clasificación de Kantarjian				
1	9 (9%)	19(20%)	5(5%)	NS
2	9(9%)	26(27%)	5(5%)	NS
3	9(9%)	12(13%)	3(3%)	NS

Cuadro II. Relación entre la cuenta plaquetaria y el tipo de transcrito bcr/abl en 97 pacientes con Leucemia Mieloide Crónica al Diagnóstico

	b3a2	b2a2	p
Número de casos con Leucocitos <100 x 10 ⁹ /L	19	17	
Plaquetas x 10 ⁹ /L (Promedio)	679.1	352.2	0.001
Número de casos con Leucocitos > 100 x 10 ⁹ /L	8	40	
Plaquetas x 10 ⁹ /L (Promedio)	895.6	530.3	0.61

coamplificó Beta-2-microglobulina en la reacción. La presencia del exon b3 de *bcr* en el ARNm fue determinado por el tamaño de la banda amplificada (Figura 1). Adicionalmente, el producto de PCR de una muestra fue purificado y secuenciado y los resultados demuestran claramente que esta secuencia se corresponde con la secuencia publicada para el transcrito de fusión b3a2 del gene *bcr-abl*. (figura 2).

En total se estudiaron 97 pacientes 27(28%) mostraron un transcrito b2a2, 57(59%) un transcrito b2a2, y en 13 casos (13%) se detectaron ambos transcritos b3a2/b2a2. El cuadro I muestra los datos clínicos al diagnóstico y su relación con el tipo de transcrito de los casos evaluados. El promedio de edad fue 44 años para los pacientes b3a2, 40 años para los pacientes b2a2 y 38 años para los b3a2/b2a2 (p=0.1). La relación Hombre/Mujer fue 0.9 en los casos b3a2, 1.59 en los casos b2a2 y 2.25 para los casos b3a2/b2a, respectivamente (p=0.01). El promedio de la cuenta de leucocitos fue (113.39 x 10⁹/L) para los b3a2, (180.50 x 10⁹/L) para los b2a2 y (197.67 x 10⁹/L) para los pacientes b3a2/b2a2. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para la concentración de hemoglobina, cuenta de leucocitos, número de basófilos, número de blastos, tamaño del bazo, ni cuando se agrupó a los pacientes de acuerdo a la clasificación de riesgo de Kantarjian. Sin embargo, las cuentas plaquetarias de los pacientes que expresan un ARNm b3a2, fueron significativamente más elevadas que las de los pacientes que expresan un ARNm b2a2 (743.2 x 10⁹/L vs 477.2 x 10⁹/L; p=0.01). Además, si se subdivide a los pacientes de acuerdo a su cuenta leucocitaria y al tipo de ARNm que expresan, aquellos con una cuenta leucocitaria menor de 100 x 10⁹/L transcrito b3a2, presentan una cuenta plaquetaria significativamente más elevada que aquellos con un transcrito b2a2 (679.1 x 10⁹/L vs 352.2 x 10⁹/L; p=0.001). Sin embargo, cuando se considera a los pacientes con cuentas leucocitarias mayores de 100 x 10⁹/L, no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los que expresan un transcrito b3a2 o un transcrito b2a2 (895.6 x 10⁹/L vs 530.3 x 10⁹/L; p=0.61). (cuadro II).

Discusión

Las implicaciones pronósticas de la determinación del punto de ruptura en LMC, han permanecido controvertibles por largo tiempo. La mayoría de los estudios realizados a este respecto se han basado en la identificación del punto de rompimiento en el cromosoma 22, ya sea 5' o 3', de un sitio de restricción Hind III. Se ha sugerido que los rompimientos en la región 5' están asociados con fases crónicas más prolongadas, mayor sobrevida^{13,23,24} y un menor grado de trombopoyesis, que los rompimientos en la región 3'.³⁵⁻³⁷ Sin embargo, estos hallazgos son discutibles pues otros autores no han encontrado correlación entre la duración de la fase crónica o la sobrevida y el punto de rompimiento en

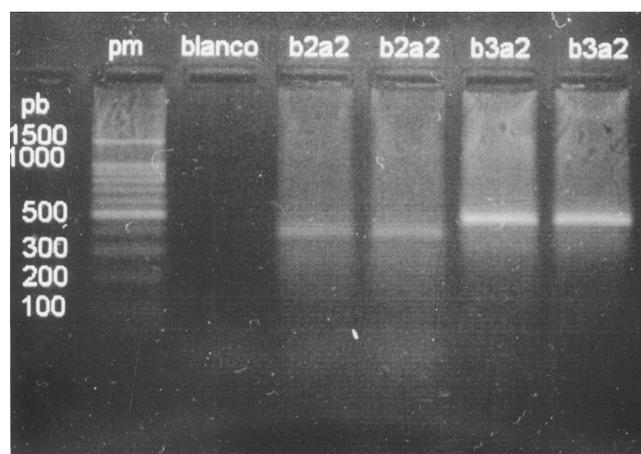


Figura 1. Detección del rearrreglo bcr-abl en pacientes con LMC. El ARNt fue extraído a partir de células monoculares de sangre periférica y la RT-PCR fue realizada como se describe en materiales y métodos. Los productos de RT-PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. En el carril PM se observa el marcador de peso molecular de 100 pb (GIBCO, VRL); en el carril 2, blanco de agua; en los carriles 2 y 3 dos pacientes con transcrito b2a2; carril 3, un paciente con un transcrito b3a2 y en el carril 4, como control positivo producto de RT-PCR de la línea celular K-562.

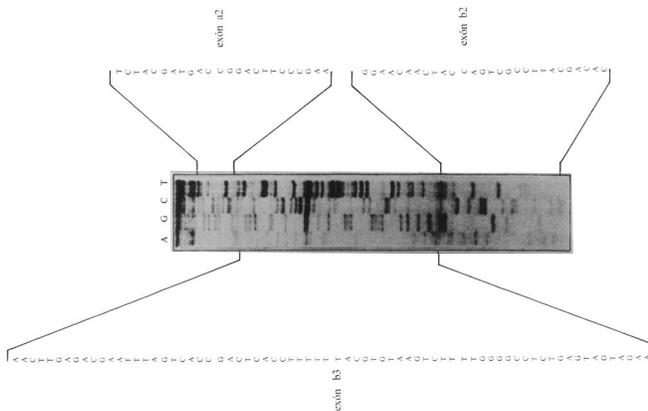


Figura 2. Identificación de un rearrreglo b3a2 en un paciente con LMC, mediante secuenciación directa en un fragmento de DNA obtenido por RT-PCR como se describe en materiales y métodos

los pacientes con LMC.^{15,17,20,21} Estos estudios han sido realizados con técnicas de Southern Blot y el mapeo del punto de rompimiento no permite la identificación exacta del gen de fusión, debido a que un rompimiento 5' puede incluir (b3a2) o excluir (b2a2) al exon b3 del gen *bcr*, por lo cual se requiere de una identificación más exacta del gen de fusión, como la que se logra con la técnica RT-PCR.

El tipo de ARNm del gen *bcr-abl* también ha sido estudiado por RT-PCR en un esfuerzo por encontrar una correlación entre el tipo de transcrito y la progresión de la enfermedad. Algunos investigadores han reportado que los casos con transcrito b2 a 2 están asociados con una fase crónica más larga, mayor sobrevida y mejor respuesta al tratamiento con interferón, en oposición a los casos que expresan un transcrito b3a2 o b3 a 2/b2a2.²³ Otros autores han reportado que no observan diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de transcrito expresado por los pacientes con LMC y algún parámetro clínico al diagnóstico.^{26,37,40,54} Nosotros tampoco encontramos diferencias significativas entre el tipo de transcrito *bcr-abl* expresado por nuestros pacientes al diagnóstico, y la concentración de hemoglobina, cuenta leucocitaria, número de basófilos en sangre periférica, número de basófilos en médula ósea, número de blastos en sangre periférica, número de blastos en médula ósea, tamaño del bazo, grupo de riesgo según la clasificación de Kantarjian, la edad o el sexo (cuadro I).

Inokuchi y cols.^{35,45} describieron cuentas plaquetarias elevadas, en pacientes con puntos de ruptura 3' o con transcritos b3 a 2. En un estudio posterior, Arden y cols.³⁶ también encontraron esta correlación, sin embargo Opakla y cols.^{40,42} no encontraron ninguna correlación entre el tipo de transcrito y la cuenta plaquetaria, hallazgo similar al reportado posteriormente por Shepherd y cols.²⁷ En este estudio nosotros encontramos una diferencia estadísticamente significativa entre la cuenta plaquetaria de los pa-

cientes que expresan el transcrito b3a2 y la de los que expresan el transcrito b2a2 (743.2×10^9 vs $477.2 \times 10^9/L$; $p=0.1$ (cuadro I). Además observamos que, en algunos pacientes con transcrito b3a2 a pesar de presentar cuentas plaquetarias muy elevadas, su cuenta leucocitaria no se eleva acorde con la cifra de paquetas, por lo cual analizamos a los pacientes de acuerdo al tipo de transcrito que expresan, esto es, si presentan una cuenta leucocitaria mayor o menor a $100 \times 10^9/L$. Encontramos que los pacientes con menos de $100 \times 10^9/L$ leucocitos y que expresan un transcrito b3a2 tienen cuentas plaquetarias significativamente más elevadas que los que expresan un transcrito b2a2 (679.1×10^9 vs $352.2 \times 10^9/L$; $p=0.001$), lo cual no se encontró en los pacientes con cuentas leucocitarias mayores a $100 \times 10^9/L$ y que expresan el transcrito b3a2, en comparación a los que expresan b2a2 ($895.6 \times 10^9/L$ vs $530.3 \times 10^9/L$; $p=0.61$) (cuadro II). Estos hallazgos coinciden con lo reportado en trabajos recientes en los cuales incluso se ha analizado la estructura de la región de la proteína *BCR/BL*, traducida por el exon b3 del gen *bcr* y su relación con tromboytesis.⁴³⁻⁴⁷

Aunque el número de pacientes estudiados por nosotros es aún pequeño, consideramos que los pacientes que expresan un tipo de transcrito b3a2 presentan una mayor actividad trombopoyética, que los que expresan un transcrito b2a2; por lo tanto, el ARNm b3a2 puede ser uno de los factores que propicien la producción plaquetaria en LMC, lo cual está de acuerdo con lo encontrado por otros autores en pacientes con trombocitemia esencial que expresan el transcrito *bcr-abl*, observando un franco predominio del transcrito b3a2.⁴⁸ Lo anterior reviste mayor importancia debido a que recientemente se ha asociado la presencia de cuentas plaquetaria mayores de $1000 \times 10^9/L$ en pacientes con LMC con un pronóstico desfavorable, independientemente de otros factores pronósticos.²⁷ Si esto se comprueba tendría implicaciones terapéuticas porque, dado su mayor riesgo, en caso de contar con un donador HLA-compatible se consideraría a estos pacientes para trasplante alogénico de médula ósea en forma más temprana o de no haber donador, para terapia combinada de interferón más citarabina o Gleevec.⁵⁷

En el presente estudio aún no hemos analizado el impacto del tipo de transcrito *bcr-abl* en la sobrevida de nuestros pacientes por el breve tiempo de desarrollo del mismo.

La frecuencia de presentación de los tipos de transcritos en LMC es diferente a lo reportado por otros grupos.^{37,41,49,50} Además, JV melo³⁰ en una revisión reciente de la literatura refiere una frecuencia de 66% para los casos que expresan un transcrito b3a2 y/o b3a2/b2a2 y el 33% para los casos con transcrito b2a2, en paciente adultos con LMC. No obstante en este estudio nosotros encontramos una preponderancia de transcritos b2a2 del 59% en nuestros pacientes, lo cual es contrario a lo reportado por las

series anteriormente referidas, pero coincide con los hallazgos de un grupo Brasileño.⁵¹ y por un reporte reciente de un grupo Ecuatoriano,⁵² los cuales encuentran una frecuencia de transcritos b2a2 del 62 y 65% en series de 99 y 144 pacientes, respectivamente. Esto nos orienta a sugerir diferencias raciales, como posible explicación para las diferencias observadas entre nuestros pacientes y las series realizada en otras regiones del mundo.

Asimismo, la mediana de edad en nuestros pacientes fue de 40 años, la cual es menor que la observada por otros autores (50-54 años, revisado por Mills y cols.)²³ Se ha considerado que los diferentes protocolos para la selección de los pacientes, pudiera ser la causa de tal variación; sin embargo, debemos notar que, a pesar de la preponderancia en el tipo de transcrito b2a2, en las escasas series de pacientes pediátricos con LMC reportadas a la fecha y que pudieran explicar la menor edad de presentación de nuestros paciente⁵³ no se observa una correlación significativa entre el tipo de transcrito *bcr-abl* y edad ($p=0.6$) (cuadro I)

En conclusión, nuestros datos sugieren: 1) que puede haber una subpoblación de pacientes con LMC en los cuales el transcrito b3a2 se ve asociado con una mayor actividad trombopoyética aunque se requiere más estudios prospectivos para confirmar este hallazgo; 2) que a pesar de que se ha propuesto que la diferencia en el tamaño de la muestra y el empleo de diferentes técnicas podrían explicar los diferentes resultados encontrados por diversos autores, nosotros consideramos que las características raciales también podrían participar en dichas diferencias sugiriendo un comportamiento biológico diferente a la LMC en nuestra población.

Referencias

1. Jandl JH. Chronic myelogenous leukemia. In: Blood. Textbook of hematology. Little Brown, Co. First. ed. 1987. p. 671-713.
2. Nowell PC, Hungerford DA. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. Science 1960;132:1197-1200.
3. Hermans A, Heisterkamp N, Von Liddern M, Van Baal S, Meijer D, Van der Plas D, Weidemann LM, Groffen J, Bootsma A, Grosveld G. Unique fusion of BCR and C-ABL genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. Cell 1987;51:33-44.
4. de Klein A, Geurts Van Kessel A, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeier A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR. A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. Nature 1982;300:765-767.
5. Heisterkamp N, Stam K, Groffen J, de Klein A, Grosveld G. Structural organization of the BCR gene and its role in the Ph+ translocation. Nature 1985;315:758-761.
6. Shitvelman EB, Lifshitz B, Gale RP, Canani E. Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. Nature 1986;315:550-554.
7. Bernards A, Rubin CM, Westbrook CA, Paskind M, Baltimore D. The first intron in the human c-abl gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocation in chronic myelogenous leukemia. Mol Cell Biol 1987;7:3231-3236.
8. Groffen J, Bootsma A, Grosveld G. Unique fusion of BCR and c-ABL genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. Cell 1987;51:33-44.
9. Daley GQ, Van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210 bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. Science 1990;247:824-830.
10. Hochhaus A, Lin F, Rieter A, Skladny H, Masson PJ, Van Rhee F, Shepherd PC, Allan N, Heilmann R, Goldman JM, Cross NCP. Quantification of residual

- disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon therapy by competitive polymerase chain reaction. Blood 1996;87:5491-5550.
11. Wetzler M, Talpaz M, Estrov Z, Kurzrock R. CML: mechanisms of disease initiation and progression. Leuk Lymph 1993;11:47-50.
12. Shafer-Rego K, Dudek M, Popenoe D, Arlin Z, Mears JG, Bank A, Leibowitz D. CML patients in blast crisis have breakpoints localized to a specific region of the BCR. Blood 1987;70:448-455.
13. Birnie GD, Mills KI, Benn P. Does the site of the breakpoint on chromosome 22 influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia. Leukemia 1989;3:545-547.
14. Mills KI, MacKenzie ED, Birnie GD. The site of the breakpoint within the bcr is a prognostic factor in Philadelphia-positive CML patients. Blood 1988;72:1237-1241.
15. Shtalrid M, Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian H, Trujillo J, Gutterman J, Yoffe G, Blick M. Analysis of breakpoints within the bcr gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. Blood 1988;72:485-490.
16. Dreazen O, Berman M, Gale RP. Molecular abnormalities of bcr and c-abl in chronic myelogenous leukemia associated with a long, chronic phase. Blood 1988; 71:797-799.
17. Przepiorka D. Breakpoint zone of bcr in chronic myelogenous leukemia does not correlate with disease phase or prognosis. Cancer Gen Cytogene 1988;36:117-122.
18. Holyoake DT. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukemia: lessons to be learned from the laboratory. Br J Haematol 2001;113:11-23.
19. Morris SW, Daniel L, Ahmed CMI, Elias A, Leibowitz P. Relationship of bcr breakpoint to chronic phase duration, survival and blast crisis lineage in chronic myelogenous leukemia patients presenting in early chronic phase. Blood 1990;75:2035-2041.
20. Tien HF, Wang CH, Chen YC, Shen MC, Wu HS, Lee FY, Chuang SM, Liu CH. Chromosome and bcr rearrangement in chronic myelogenous leukemia and their correlation with clinical states and prognosis of the disease. Br J Haematol 1990;75:469-475.
21. Jaubert J, Martiat P, Dowding C, Ibrah N, Goldman JM. The position of the M-BCR breakpoint does not predict the duration of the chronic phase or survival in chronic myeloid leukemia. Br J Haematol 1990;74:30-35.
22. Zaccaria A, Martinelli G, Buzzi M, Testoni N, Farabegoli P, Zuffa E, Zamagni MD, Russo D, Baccarani M, Ambrosetti A, Guerrasio A, Saglio, Tura S. The type of BCR/ABL junction does not predict the survival of patients with Ph positive chronic myeloid leukemia. Br J Haematol 1993;84:265-268.
23. Milis KI, Benn P, Birnie GD. Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature. Blood 1991;78:1155-1161.
24. Dobrovie A, Trainor KJ, Morley AA. Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. Blood 1990;72:2063-2065.
25. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. Blood 2000;96:3343-3356.
26. Rozman C, Urbano-Ispizua A, Cervantes F, Rozman M, Colomer D, Féliz P, Vives-Corrons JL. Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within M-BCR and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia. Leukemia 1995;9:1104-1107.
27. Stiepherd P, Suffloek R, Halsey J, Allan NC. Analysis of molecular breakpoint and m-RNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukemia. No correlation with clinical features, cytogenesis response, duration of chronic phase, or survival. Br J Haematol 1995;89:546-554.
28. Cross NCP, Melo JV, Lin F, Goldman JM. An optimized multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detection of BCR-ABL fusion mRNAs in hematological disorders. Leukemia 1994;8:186-189.
29. Pignotti JM, Henni T, Amselem S. Frequent detection of residual disease by use of the polymerase chain reaction in long-term survivors after bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. Leukemia 1990;4:83-86.
30. Melo JV. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. Blood 1996;88:2375-2384.
31. Williams DI, Harber J, Murphy SB, Look AT, Kalwinsky DK, Rivera C, Melvin SI, Stass S, Dahl GV. Chromosomal translocations play a unique role in influencing, prognosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. Blood 1986;68:205-212.
32. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA, and proteins from cell and tissue samples. BioTechniques 1993;15:532-537.
33. Eisenberg A, Silver R, Soper L, Arlin Z, Coleman M, Bernhardt B, Benn P. The location of breakpoints within the breakpoint cluster region (bcr) of chromosome 22 in chronic myeloid leukemia. Leukemia 1988;2:642-646.
34. Grossman A. Fine mapping of chromosome 22 breakpoints within the breakpoint cluster region (bcr) implies a role for bcr exon 3 in determining disease duration in chronic myeloid leukemia. Am J Hum Genet 1989;45:729-738.
35. Inokuchi K, Futaki M, Yamada T, Tanabe Y, Dan K, Shinohara T, Kuriya SH, Nomura T. The relationship between the site of breakpoints within the bcr gene and thrombopoiesis of Philadelphia-positive chronic myelocytic leukemia. Leuk Res 1993;15:1067-1073.

36. **Arden JC.** Molecular analysis in chronic granulocytic leukemia: location of breakpoints within M-BCR and relationship with presentation platelet counts. *Clin Lab Haematol.* 1993;15:253-258.
37. **Fioretos T.** Clinical impact of breakpoint position within M-bcr in chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1993;7:1225-1231.
38. **Lee M, Kantarjian H, Deisseroth A, Freireich E, Trujillo J, Stalh S.** Clinical investigation of bcr-abl splicing patterns by polymerase chain reaction in Philadelphia chromosome (Ph⁺) positive chronic myelogenous leukemia (CML). *Blood.* 1990;75(Suppl 1):294a.
39. The Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Chronic myeloid leukemia. bcr/abl transcript, response to alpha-interferon and survival. *Leukemia* 1995;9:1648-1652.
40. **Opalka B, Wandl UB, Kloke O, Beer U, Seeber S, Niederle N.** No correlation between site of breakpoint in the bcr gene and the platelet counts in Philadelphia chromosome-positive CML. *Leuk Res* 1992;16:937-939.
41. **Inokuchi K, Inotie T, Tojo A, Futaki M, Miyake K, Yamada T, Tanabe Y, Ohki I, Dan K, Ozawa K, Asano SH, Nomura T.** A possible correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet count in Philadelphia positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1991;78:3125-3127.
42. **Opalka B, Wandl U, Stutenkemper R, Kloke O, Seeber S, Niederle N.** No correlation between the type of bcr-abl hybrid messenger RNA and platelet counts in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1992;80:1 854-1 855.
43. **Inokuchi k, Futaki M, Yamada T, Tanabe Y, Ohki I, Dan K, Nomura T, Inoue T, Tojo A, Ozawa K, Asano SH.** Molecular breakpoints and platelet counts in chronic myeloid leukemia. *Blood* 1992;80: 556-557.
44. **Inokuchi K, Futaki M, Dan K, Nomura T.** Possible correlation of b3-a2-type bcr-abl messenger RNA defined by semiquantitative RT-PCR to platelet and megakaryocytic counts in Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Intern Med* 1994;33:189-192.
45. **Nakata Y.** Bcr-abl mRNA expression in patients with chronic myeloproliferative disorders- absence of bcr-abl fused clone except chronic myelocytoc leukemia. *Hiroshima J Med Sci* 1993;42:67-7.
46. **Nakamura et al.** Molecular studies of chronic myelogenous leukemia using the polymerase chain reaction. *Cancer* 1993;68:2426-2430.
47. **Perego RA, Costantini M, Cornacchini G, Gargantini L, Biallchi C, Pungolino E, Rovida E, Morra E.** The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukemia. *Eur J Cancer* 2000;36:1395-1401.
48. **Cervantes F, Colomer D, Vives-Corrans JL, Rozman C, Montserrat E.** Chronic myeloid leukemia of thrombocytemic onset: a CML subtype with distinct hematological and molecular features? *Leukemia* 1996;10:1241-1243.
49. **Shitvelman EB, Gale RP, Dreazen O, Berrebi A, Zaizov R, Ktibbonishi I, Miyoshi I, Canaani E.** bcr-abl RNA in patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1987;69:971-973.
50. **MacKenzie E, Stewart E, Birnie GD.** ABL-BCR mRNAs transcribed from chromosome 9q+ in Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 1993;7:702-706.
51. **Melo RAM, Melo FCBC, Lima DF, Seaffo MHS, Fernandes RC, Ismael GFV, Bighetti JPM, Zago MA, Simoes BP.** Lack of clinical relevance of the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia: a study of 90 patients. *Blood* 1997;90:4018a.
52. **Paz-y-Mino C, Burgos R, Morillo SA, Santos JC, Fiallo BF, Lione PE.** BCR/ABL rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador. South America. *Cancer Genet Cytogenet* 2002;132(1):65-67.
53. **Aurer I, Butturini A, Gafe RP.** BCR-ABL rearrangements in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1991;78:2407-2410.
54. **Prewzer W.** Relationship of the BCR gene breakpoint and the type of BCR/ABL transcript to clinical course, prognostic indexes and survival in patients with chronic myeloid leukemia. *Med Sci Monit* 2002;8(5):195-197.

