

## Diagnóstico Molecular del Cromosoma Filadelfia

Manuel Campos Rudín\*, Patricia Cuenca Berger\*, Gustavo Gutierrez Espeleta\*, Guillermo Jiménez Cruz \*\*, Carlos Montero Umaña\*\*, Luis Vázquez Castillo\*\*\*, Marieta Ramón Ortíz\*\*\*

### Resumen

Por la relevancia que tiene confirmar la presencia o ausencia del cromosoma Filadelfia en el diagnóstico y seguimiento de los pacientes afectados con leucemia mieloide crónica y otras leucemias, se consideró necesario implementar el diagnóstico molecular en Costa Rica.

Se estudiaron 32 pacientes afectados por Leucemia Mieloide Crónica, 7 por otros Desórdenes Mieloproliferativos Crónicos y 2 por Síndromes Mielodisplásicos. Se utilizó la sonda Transprobe-1 (Oncogene Science, Inc.), la cual fue marcada con radioactividad ( $^{32}\text{P}$ ) o quimioluminiscencia (digoxigenina). De los 32 casos afectados por LMC, en 28 se logró realizar el análisis molecular, detectándose la translocación característica del cromosoma Filadelfia entre los genes *Mbcr/c-ABL* en 21 (75%) de los pacientes, en 7 (25%) no se encontró el rearrreglo. En siete de los nueve afectados por otros padecimientos fue posible obtener resultados, 3 que resultaron ser positivos para el rearrreglo entre *Mbcr/c-ABL* y 4 normales. En todos los casos se obtuvo resultados marcando la sonda con radioactividad, sin embargo se probó el marcaje con digoxigenina en siete de los pacientes, como una alternativa metodológica para los

laboratorios que carecen de los requerimientos para trabajar con radiación. Los resultados obtenidos fueron idénticos.

**Descriptores:** Leucemia Mieloide Crónica, Cromosoma Filadelfia, Diagnóstico Molecular.

### Introducción

Las leucemias han sido ampliamente estudiadas a nivel citogenético y por biología molecular. Estos análisis se utilizan como parte de los criterios diagnósticos, además de la clínica convencional. En muchos casos los resultados obtenidos por estas tecnologías son concluyentes para el diagnóstico de estas enfermedades. Dos ejemplos clásicos son el cromosoma Filadelfia en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) y la translocación t(15;17) en la Leucemia Aguda de Promielocitos<sup>1</sup>.

La primera aberración cromosómica consistentemente asociada a una neoplasia en el hombre, fue descrita por Nowell y Hungerford en el año de 1960. El pequeño cromosoma anormal encontrado recibió el nombre de cromosoma Filadelfia y posteriormente se descubrió que es producto de una translocación recíproca balanceada de los cromosomas 9 y 22. Los puntos de ruptura exactos fueron establecidos por Prakash y Yunis en 1984, en el cromosoma 9 corresponde a q34.1.22 y en el cromosoma 22 a q11.2 (ambos citados en ref. 1). A nivel citogenético se observa un cromosoma 9 de mayor tamaño y un cromosoma 22 más pequeño o cromosoma Filadelfia (Figura 1).

El 90% de los pacientes afectados por LMC presenta esta aberración cromosómica<sup>4</sup>. Esta incidencia aumenta al existir un grupo de pacientes que presentan rearrreglos entre los genes *Mbcr/c-ABL* submicroscópicos. El cromosoma Filadelfia no está presente en otros trastornos mieloproliferativos crónicos (TMC) o los síndromes mielodisplásicos (SMD)<sup>2</sup>. En la Leucemia Linfocítica Aguda (LLA) se ha descrito presencia del cromosoma Filadelfia en un 25% de los casos de adultos y un 10% en niños. Está presente también con una incidencia muy baja en la Leucemia Mieloide Aguda<sup>1,3</sup>.

El cromosoma Filadelfia es producto del rearrreglo y fusión del oncogen *c-ABL*, localizado en el cromosoma 9 y el gen *BCR* en

\* Instituto de Investigaciones en Salud (INISA) y Escuela de Biología, UCR.

\*\* Sección de Hematología, Hospital México, CCSS.

\*\*\* Sección de Hematología, Hospital San Juan de Dios, CCSS.

#### Abreviaturas:

TMC: Trastorno Mieloproliferativo Crónico; Kb: kilobases de ADN; LLA: Leucemia Linfocítica Aguda; LMC: Leucemia Mieloide Crónica; Mbcr: "major breakpoint cluster region" o punto de ruptura principal; P32: Fósforo 32; RFLP: Polimorfismos en el Tamaño de los Fragmentos de Restricción; SMD: Síndrome Mielodisplásico; Ph<sup>1</sup>: Cromosoma Filadelfia; ACD: Solución de dextrosa y ácido cítrico.

#### Correspondencia:

Manuel Campos

Instituto de Investigaciones en Salud (INISA),  
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica  
mecampos@cariari.ucr.ac.cr



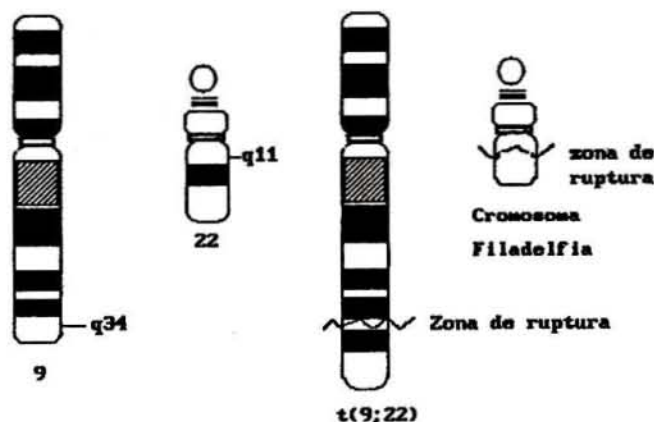


Figura 1. Formación del cromosoma Filadelfia, como producto de una traslocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22.

Fuente: Modificado de Wetzler y Talpaz, 1992. *Chronic Myelogenous Leukemia, the role of interferons*. Editorial Gardiner-Caldwell Communications, Ltd. UK.

el cromosoma 22. En el gen BCR la ruptura ocurre en una región no mayor a 5,8 kilobases (kb) conocida como MbcR "major breakpoint cluster region", ésta se localiza entre los exones 10 y 15 del gen<sup>4</sup>. Este punto de ruptura está presente en el 99% de los cromosomas Filadelfia de la LMC. En el cromosoma 9, el punto de ruptura ocurre dentro de una región muy extensa (100kb) dentro de c-ABL. Estos genes así fusionados MbcR/c-ABL codifican para una proteína de 210 kilodaltons, con actividad tirosina kinasa aumentada. Su actividad fosforilante es mucho mayor que la de la proteína normal codificada por el c-ABL silvestre<sup>5,6</sup>.

En la LLA el cromosoma Filadelfia a nivel citogenético es producto de una mutación similar a la encontrada en la LMC. A nivel molecular, se ha observado que la región de ruptura puede ser en el intrón que separa los exones 1 y 2 de BCR<sup>7,8</sup>. Es un sitio de ruptura diferente que recibe el nombre de mbcR "minor breakpoint cluster region" y es muy raro en la LMC<sup>6,7</sup>. En síntesis en la LLA, el punto de ruptura puede ser en mbcR o MbcR, pero en la LMC el punto de ruptura en el 99% de los casos se localiza en MbcR.

Hay rearrreglos moleculares entre los genes BCR y c-ABL que no son observados a nivel citogenético<sup>9</sup>, y sólo es posible su detección a nivel molecular. En este caso se acostumbra usar el término MbcR/c-ABL positivo como una forma más clara de informar que el diagnóstico de la mutación se realizó por medio de sondas de ADN. La biología molecular ofrece una alternativa diagnóstica más sensible.

Para el reconocimiento molecular de la región de ruptura MbcR han sido desarrolladas sondas específicas, con las cuales se puede detectar si se ha producido una translocación entre los cromosomas 9 y 22<sup>10,11</sup>. El empleo de métodos moleculares como "Southern Blot" tiene ventajas sobre la citogenética convencional, como: la reducción de falsos negativos, la posibi-

lidad de usar sangre periférica, no se requieren cultivos celulares y el paciente puede estar en tratamiento con quimioterapia y ser apto para realizar el análisis. Otra ventaja es que se puede llevar a cabo independientemente del estadio clínico en que se encuentre el paciente, tanto en etapas muy tempranas de la enfermedad así como en estados avanzados.

El objetivo principal del presente trabajo fue contribuir al mejoramiento del diagnóstico diferencial de las leucemias en el país, detectando el cromosoma Filadelfia por métodos moleculares en Costa Rica. Se emplearon dos métodos: con marcaje radioactivo y con quimioluminiscencia para demostrar la factibilidad de llevar a cabo estos estudios también en laboratorios que no están equipados para trabajar con radiactividad.

## Materiales y métodos

**Pacientes:** Desde enero de 1994 y hasta noviembre de 1995 se tomaron muestras en 41 pacientes provenientes de los servicios de Hemato-oncología de los Hospitales San Juan de Dios y México. Se emplearon 5ml de sangre periférica y/o 2ml de médula ósea en anticoagulante ACD. El diagnóstico clínico en 30 pacientes era LMC, 2 pacientes se consideraban como posibles casos de LMC, 7 como un trastorno crónico mieloproliferativo (TMC) distinto a LMC y 2 como síndrome mielodisplásico (SMD).

**Procesamiento de muestras:** Todas las muestras fueron incubadas a 37° C por 12 horas con proteinasa K. Luego se empleó el procedimiento común de fenol:cloroformo para extraer el ADN<sup>12</sup>.

**Electroforesis e hibridación:** De cada paciente, se digirieron 15ug de ADN con la endonucleasa de restricción *Bgl II*. Se separó el ADN digerido por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 0,7%, utilizando 50mV durante 14 horas.

Posteriormente se transfirió el ADN del gel a una membrana de nylon cargada positivamente. Para realizar la hibridación se empleó la sonda conocida como Transprobe-1 (Oncogene Science, Inc.), la cual reconoce toda la región de 5.8Kb en el gen Mbc, a excepción de un fragmento de 1.6 kb interno delimitado por sitios de restricción para la enzima *Hind III* (ver figura 2). La enzima de restricción *Xba I* fue empleada en aquellos pacientes con LMC que no mostraron rearrreglos con *Bgl II*, para evitar falsos negativos.

Como sistema de marcaje radioactivo se empleó el kit "Mega-primer DNA labelling system" (Amersham, Life Sciences). Para el marcaje no radioactivo se utilizó el kit "Genius 2 DNA labelling" siguiendo el protocolo recomendado por la casa fabricante Boehringer Mannheim. Tanto para el sistema radioactivo como para el no radioactivo se marcaron 100ng de sonda para cada membrana con ADN de 20 pacientes.

**Interpretación de los resultados:** La región conocida como Mbc es cortada por la enzima de restricción *Bgl II* en 3 sitios distintos: se generan por tanto 3 polimorfismos en el tamaño de los fragmentos de restricción (RFLP) (Figura 2). En una persona no portadora del rearrreglo en Mbc/c-ABL, los RFLP presentan los siguientes tamaños: 4.8kb, 2.3kb y 1.1kb. Si la persona ha

sufrido un rearrreglo molecular entre los genes Mbc/c-ABL se altera la secuencia de ADN, se pierden entonces los sitios de corte originales de la enzima de restricción y/o aparecen nuevos sitios de corte. Estos cambios generan la aparición de nuevos RFLP, los cuales pueden tener tamaños impredecibles<sup>11</sup> (Figura 3). Solamente una copia del gen BCR y c-ABL sufren rearrreglos, por lo que en una persona portadora de rearrreglos en Mbc/c-ABL tendrán RFLP normales producto del gen BCR no mutante y RFLP anormales producidos por la mutación.

Una interpretación similar se aplica si se utiliza otra enzima de restricción, como *Xba I*. Esta enzima de restricción sólo genera un RFLP normal en personas no portadores de rearrreglos en Mbc/c-ABL.

## Resultados

De total de casos afectados por LMC o remitidos como posible LMC, en 28 se logró realizar un análisis satisfactorio con la sonda Transprobe-1 y la enzima de restricción *Bgl II*. En 20 de ellos se detectó al menos un RFLP anormal, lo cual indica la presencia de un rearrreglo a nivel molecular en Mbc/c-ABL. En los restantes 8 pacientes, no se detectaron RFLP anormales, por

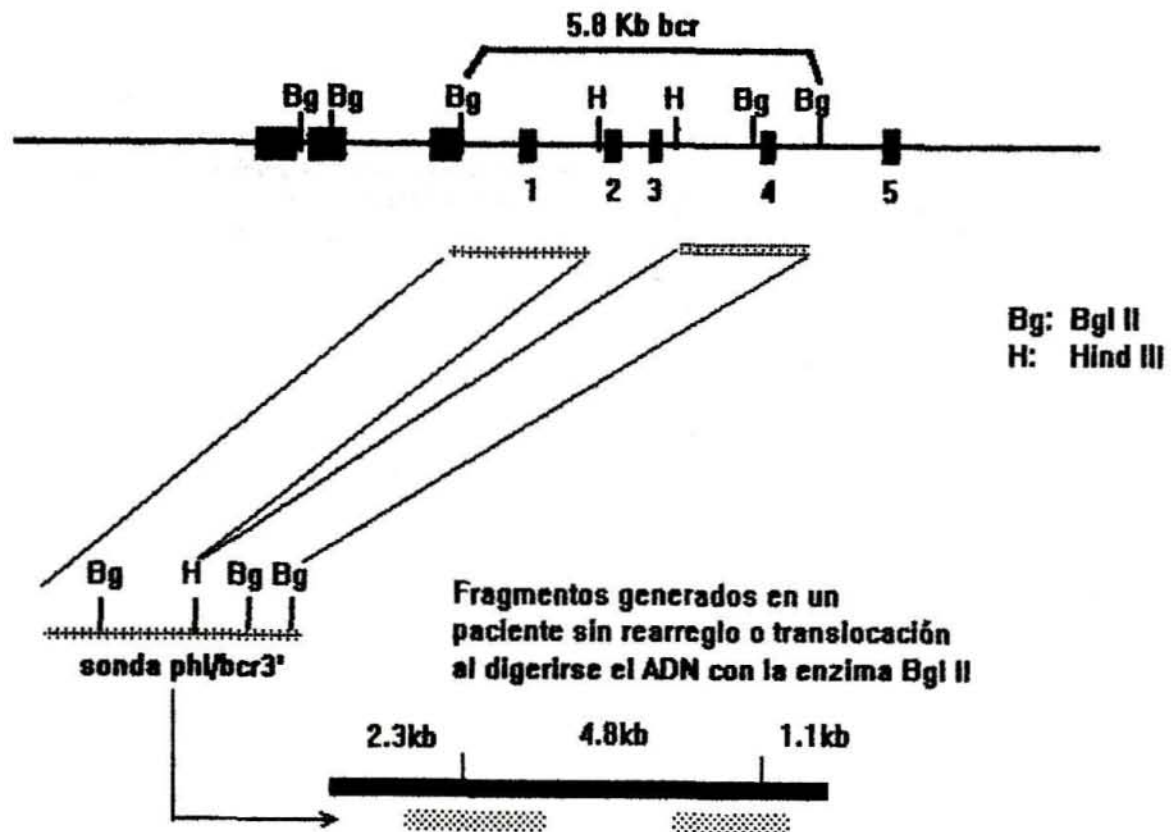


Figura 2. Mapa de restricción parcial para la región Mbc. En ella se representan los puntos de corte de las enzimas de restricción *Bgl II* y *Hind III*, así como las zonas donde hibrida la sonda *ph1/bcr3'*, también conocida como UBCR o Transprobe-1.



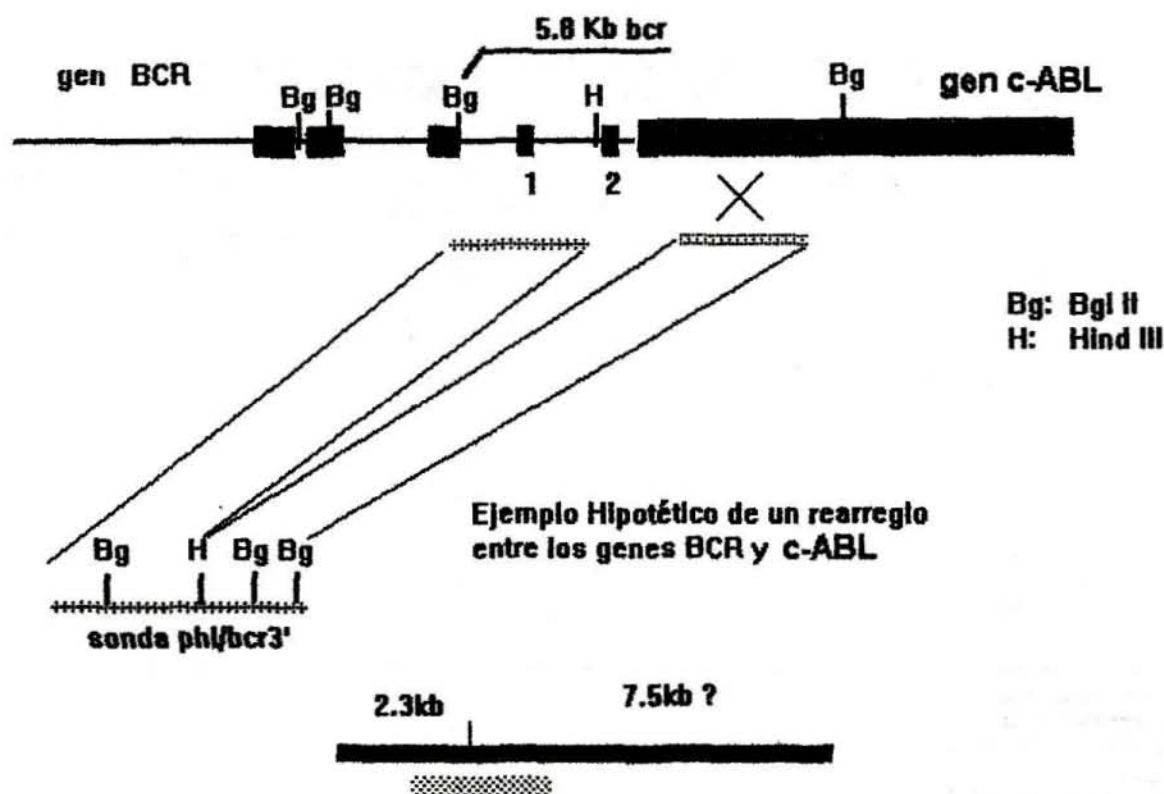


Figura 3. Ejemplo hipotético de un posible tipo de reemplazo entre los genes BCR y c-ABL. El reemplazo se da en la región conocida como Mbc y se genera en este caso un RFLP anormal de 7.5 kb y uno normal de 2.3 kb.

lo cual se informó la carencia de reemplazos en Mbc con la enzima *Bgl II*. En 2 de estos pacientes el diagnóstico de referencia no aseguraba que fuese LMC. En otro de ellos el resultado era de esperar pues había sido sometido previamente a un trasplante de médula ósea (Cuadro 1).

En 3 de los 8 pacientes afectados por LMC y negativos para reemplazos en Mbc/c-ABL con la enzima *Bgl II* se realizó un análisis adicional con la enzima *Xba I*. En 1 de ellos se presentaron RFLP anormales y los otros dos fueron normales. El primer caso se diagnosticó como portador de reemplazos en Mbc/c-ABL (un falso negativo por *Bgl II*) y en los otros 2 como pacientes negativos para reemplazos en Mbc/c-ABL. Se obtuvo una frecuencia del 75% (21/28) para cromosoma Filadelfia en los pacientes referidos como LMC y probable LMC.

De los 9 pacientes no clasificados como LMC se obtuvo resultados en 7. Tres de ellos presentaron RFLP anormales, es decir resultaron portadores del cromosoma Filadelfia y 4 fueron normales (Tabla 1).

El uso de sondas marcadas con  $^{32}\text{P}$  y digoxigenina fue satisfactorio. Los resultados obtenidos por ambas metodologías correlacionaron. Si embargo es importante señalar que las técnicas radiactivas ofrecen una mayor intensidad de bandas que las no radiactivas (Figura 4).

Desafortunadamente, en 4 pacientes afectados por LMC y 2 por otras enfermedades no se obtuvo un resultado satisfactorio por degradación y/o pobre extracción del ADN del paciente. En el caso de los 5 pacientes afectados por LMC y negativos para reemplazos en Mbc/c-ABL, un segundo análisis con la enzima de restricción *Xba I* no pudo realizarse por falta de recursos económicos.

## Discusión

Las enfermedades conocidas como LMC, Trombocitemia Esencial y Policitemia Vera, se les agrupa como TMC. Hay además un grupo de enfermedades conocidas como SMD. Cada una de ellas es una entidad patológica distinta, con una evolución diferente en cada caso<sup>2,13</sup>. El diagnóstico clínico puede complicarse en un número significativo de pacientes y en muchos casos es importante conocer si el paciente está o no afectado por una LMC (patología de peor pronóstico en ambos grupos). El cromosoma Filadelfia es un excelente marcador tumoral para diagnóstico y para monitorear el éxito o fracaso de una terapia a base de interferón o un trasplante de médula ósea<sup>14</sup>.

En esta investigación se obtuvo una frecuencia del 75% (21/28) de la mutación en los pacientes referidos con LMC, y un 25% (7/25) de negativos para cromosoma Filadelfia. Esto llama la

**TABLA 1**  
**Presencia de rearrreglos en Mbc/c-ABL en los pacientes referidos de los Hospitales México y San Juan de Dios con hematopatías (1994-1995)**

Diagnóstico Clínico	Rearreglo en Mbc/c-ABL	Sin rearrreglos moleculares	Pacientes analizados
LMC	21(84%)	4(16%)	25
Posible LMC (°)	0	2(100%)	2
Sometidos a Trasplante (*)	0	1(100%)	1
<b>Total de pacientes referidos por LMC</b>	<b>21(75%)</b>	<b>7 (25%)</b>	<b>28</b>
TMC	2(40%)	3(60%)	5
SMD	1(50%)	1(50%)	2
<b>Muestras no analizadas</b>			
LMC	N.A.	N.A.	4
TMC o SMD	N.A.	N.A.	2

LMC: Leucemia Mieloide Crónica

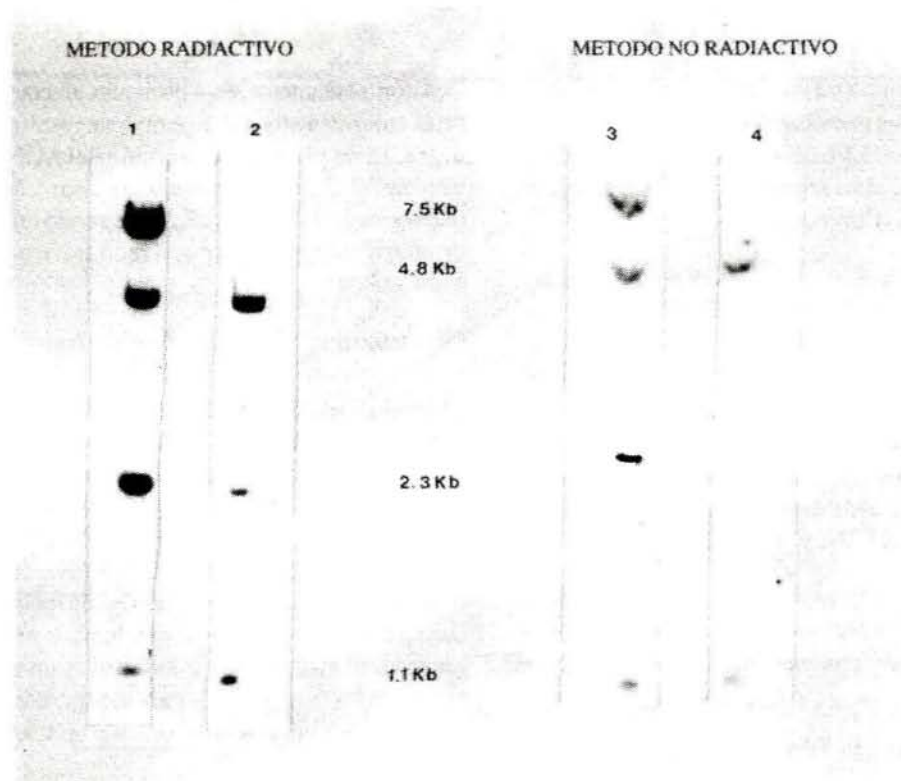
TMC: Trastorno Mieloproliferativo Crónico distinto a LMC.

SMD: Síndrome Mielodisplásico

N.A.: No aplica

°: Diagnóstico dudoso para LMC

\*: Paciente referido como LMC, previamente sometido a un trasplante de Médula Osea.



*Figura 4. Comparación de los resultados obtenidos por el método radiactivo y no radiactivo. En los carriles 1 y 3 se observa el mismo ADN de una persona portadora del rearrreglo en Mbc/c-ABL. En los carriles 2 y 4 el ADN de un control negativo. En todos los casos el ADN fue digerido con la enzima de restricción Bgl II y se empleó 15ug de ADN. En la zona central de la figura se indican los pesos moleculares de los RFLP generados, se observa un fragmento anormal de ADN de 7.5 kb en los carriles 1 y 3.*



atención ya que en la literatura se informa menos de un 5% de pacientes cromosoma Filadelfia negativos afectados por LMC<sup>6</sup>. La discrepancia hallada puede tener varios orígenes:

- 1) Clasificación errónea del diagnóstico clínico.
- 2) Problemas asociados con la metodología empleada.
- 3) Puntos de ruptura fuera de la región Mbc.

La clasificación errónea de la enfermedad se puede considerar como probable debido a que 3 pacientes con diagnóstico diferente a LMC presentaron cromosoma Filadelfia. Además en dos pacientes con un diagnóstico dudoso para LMC, uno de ellos pudo ser analizado con *Bgl II* y *Xba I*, y no se presentó la mutación. El otro sólo se analizó con *Bgl II* y fue negativo (no se realizó con *Xba I*). Otro paciente con diagnóstico de LMC había sido sometido a trasplante de MO y por ello muy probablemente no se detectó la mutación. Si separamos del análisis total a estos tres pacientes afectados por LMC o sospecha de LMC, tendríamos sólo 4 pacientes Mbc/c-ABL negativos. Estos nos daría una frecuencia de cromosoma Filadelfia negativo del 16% (Cuadro 1).

Un estudio citogenético realizado por Castro y colaboradores en 1993<sup>18</sup> encontró un 20% de pacientes cromosoma Filadelfia negativos en un total de 46 afectados por LMC. Esto muestra también una alta frecuencia de LMC en personas no portadoras del cromosoma mutante, lo cual reafirma la posición de que la discordancia entre estos datos y lo informado en la literatura puede obedecer a las dificultades clínicas para clasificar adecuadamente a los pacientes.

En uno de los 4 pacientes Ph' negativos fue posible confirmar la ausencia del rearrreglo al emplear *Xba I* y *Bgl II*. En los tres pacientes restantes habría, que proceder a realizar un segundo análisis, con *Xba I* (no se realizó por falta de recursos). Si aplicando la misma sonda de ADN Transprobe-1 y *Xba I* se repite el resultado, se puede considerar al paciente un verdadero cromosoma Filadelfia negativo.

El uso de dos enzimas de restricción es crucial para confirmar la ausencia de rearrreglos en Mbc. Haber y colaboradores en 1990 realizaron un análisis de los puntos de ruptura en Mbc empleando esta misma sonda y varias enzimas de restricción, entre ellas *Bgl II* y *Xba I*. Hallaron que ambas enzimas producen falsos negativos, *Bgl II* produjo un 10% y *Xba I*, otro 10%. Pero lo más importante es que todos los pacientes negativos por *Bgl II* fueron positivos por *Xba I*, y viceversa. Por ello el emplear *Xba I* sirve como un alternativa para confirmar la ausencia de rearrreglos en Mbc. La razón de este 10% de falsos positivos es por la posible formación de RFLP de alto peso molecular (más de 15 kb) los cuales son muy difíciles de separar con la electroforesis de agarosa<sup>15</sup>.

La discrepancia entre estos resultados y lo encontrado en la literatura no se podrían atribuir a una baja sensibilidad del método debido a que: 1) en los pacientes afectados por LMC

existe un elevado número de leucocitos, por lo que la extracción de ADN no es una limitante; 2) se trabajó con 15ug de ADN por análisis (en la literatura científica 10ug de ADN es considerado suficiente). En los únicos casos donde el método aplicado no tiene sensibilidad suficiente sería en aquellos donde el clon maligno estuviese en un porcentaje menor al 5%<sup>9</sup>.

Es posible también que el punto de ruptura en los pacientes sin cromosoma Filadelfia se encuentre fuera de la región Mbc. No obstante esto ocurre únicamente en el 1% de los casos<sup>16,17</sup>.

Aunque los hallazgos citogenéticos reportados por Castro y colaboradores (1993) y los moleculares de este estudio se asemejan, es necesario aún confirmar todos los casos LMC negativos para rearrreglos en Mbc/c-ABL empleando otra enzima de restricción, como la *Xba I* en todos los análisis.

La clasificación errónea también se presentó en 7 pacientes remitidos con un diagnóstico distinto a LMC, pues en 3 de ellos se detectaron rearrreglos moleculares en Mbc/c-ABL. Este resultado demuestra que la biología molecular puede afinar el diagnóstico clínico en nuestro país.

La tendencia actual no descarta el uso de Southern Blot, la citogenética o la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para tamizaje del cromosoma Filadelfia. Cada una de las técnicas presenta sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, la PCR se usa para monitoreo de pacientes sometidos a trasplante de médula ósea, la citogenética en pacientes con tratamiento a base de interferón, y todas juntas pueden emplearse en el tamizaje de esta mutación (aunque la PCR y Southern Blot son más rápidas y sensibles)<sup>9</sup>. Por su parte la técnica de Southern Blot es la que tiene menos dificultades metodológicas y requiere menor capacitación del personal. En síntesis, la selección de la metodología a usar dependerá de las necesidades del paciente, así como de la experiencia y recursos de cada laboratorio.

En este trabajo se empleó la técnica Southern Blot para detectar rearrreglos en Mbc/c-ABL, utilizando dos métodos para marcaje de la sonda de ADN: la radioactividad y la digoxigenina. El método tradicionalmente usado por muchos años ha sido la radioactividad. Por ello en todos los pacientes se empleó <sup>32</sup>P. Luego se realizaron pruebas con digoxigenina. Los resultados con ambas metodologías fueron idénticos en cuanto a capacidad para detectar la translocación, aunque se debe señalar que el marcaje radiactivo es más sensible, pues genera una mayor intensidad en las bandas, es menos laborioso y más barato. Lógicamente que el emplear un sistema donde el personal no se irradie, ni se genere contaminación radiactiva es muy atractivo, por lo que la opción del marcaje con digoxigenina es interesante de considerar, sobre todo para laboratorios que no cuentan con las facilidades para el trabajo con isótopos. Además la tendencia internacional es prescindir de la radiactividad por los riesgos que conlleva su uso, tanto para los usuarios como para el ambiente.

En conclusión, el tamizaje del cromosoma Ph' en la LMC puede ser realizado en forma eficiente y ágil por medio de la biología



molecular. El uso de la sonda Transprobe-1 y la enzima *Bgl II* es suficiente en la mayoría de los casos. Sin embargo debe emplearse otra enzima de restricción, como *Xba I* para confirmar los resultados negativos por *Bgl II*. La aplicación de métodos radioactivos como no radioactivos es viable en nuestro medio, y dependerá del diseño de cada laboratorio para optar por alguno de ellos. Ambos presentan desventajas y ventajas.

Se debe resaltar la importancia de aplicar estos métodos para refinar los diagnósticos que se brindan. Los tratamientos modernos para la LMC a base de interferón o trasplante de médula ósea requieren de estas técnicas para el monitoreo de los pacientes. La clínica convencional debe ser complementada con el estudio de esta mutación para el mejor manejo de los pacientes. Son muchas las mutaciones presentes en los diferentes tipos de leucemias que pueden ser estudiadas<sup>19</sup> y el cromosoma Filadelfia es sólo un primer paso. En nuestro país estas técnicas no deben ser consideradas un lujo, sino una necesidad para seguir progresando en la consecución de la salud.

## Referencias

- 1) Heim S, Mitelman F. *Cancer Cytogenetics*. New York: Alan R. Liss, Inc., 3 reimpression de la primera, 1987.
- 2) Kreipe H, Felgner J, Jaquet K, Heidorn K, Radzun H, Parwaresch R. DNA analysis to aid in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders. *Am. J. Clin. Pathol* 1992; 98: 43-54.
- 3) Dreazen O, Canaani E, Gele R. Molecular biology of chronic myelogenous leukemia. *Semin. Hematol* 1988; 25: 35-49.
- 4) Dobrovic A, Peters G.B, Ford JH, 1991. Molecular analysis of the Philadelphia chromosome. *Chromosoma* 1991; 100: 479-486.
- 5) Leibowitz D. *Molecular diagnosis of chronic myelocytic leukemia*. editado por J. Cossman en *Molecular Genetics in Cancer diagnosis*. Editorial Elsevier, New York 1990; pp: 179-188.
- 6) Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M. The molecular genetics of Philadelphia chromosome positive leukemias. *N. Eng. J. Med* 1988; 319: 990-998.
- 7) Melo JJ. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* 1996; 88: 2375-2384.
- 8) Maurer J, Janssen JW, Thiel E, van Denderen J, Ludwig WD, Aydemir U, et al. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. *Lancet* 1996; 337: 1055-1058.
- 9) Crisan D, Chen ST, Weil S. Polymerase chain reaction in the diagnosis of chromosomal breakpoints. *Hematol/Oncol Clin of North Am* 1994; 8 : 725-750.
- 10) Shtalrid M, Talpaz M, Kurzrock R, Kantarjian HM, Trujillo H, Guterma JU, et al. Analysis of the breakpoints within the bcr gene and their correlation with the clinical course of Philadelphia-positive chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1988; 72: 485-490.
- 11) Haber LM, Childs CC, Hirsch-Ginsberg C, Nellis K, Kantarjian HM, Cor A, et al. Strategy for breakpoint cluster region analysis in chronic myelocytic leukemia in a routine clinical laboratory. *Am. J. Clin. Pathol* 1990; 94: 762-767.
- 12) Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular cloning, a laboratory manual*. 2 edición, Cold Harbor Laboratory Press 1989.
- 13) Velez, H., Rojas, W., Borrero, J., Restrepo, J., 1992.- *Hematología-Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas*.- Cuarta edición, 395pp.
- 14) Kantarjian HM, Deisseroth, A, Kurzrock R, Estrov, Z, Talpaz M. Chronic myelogenous leukemia: a concise update.- *Blood* 1993; 82: 691-703.
- 15) Witte O. Mechanisms of leukemogenesis. En: *The Molecular Basis of Blood Diseases*, Estados Unidos: WB Saunders 1994; 1994: 835-852.
- 16) Nakamura Y, Hirose S, Aoki N. Consistent involvement of the half part of the first BCR intron in adult Philadelphia positive leukaemia without 3'M-bcr rearrangement. *Br. J. Haematology* 1993; 83: 53-57.
- 17) Chen SJ, Chen Z, Font MP, d'Auriol L, Larsen CJ, Berger R. Structural alterations of the BCR and ABL genes in Ph1 positive acute leukemias with rearrangements in the BCR gene first intron: further evidence implicating Alu sequences in the chromosome translocation. *Nucleic Acids Res* 1989; 17: 7631-7642.
- 18) Castro I, Montero C, Jiménez G. Características cromosómicas asociadas con leucemias y otras hematopatías en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop* 1993; 41: 385-392.
- 19) Yunis JJ, Tanzer J. Molecular Mechanisms of Hematologic Malignancies. *Crit. Rev. Oncog* 1993; 4 : 161-190.