

**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**DIAGNOSTICO MOLECULAR DEL CROMOSOMA FILADELFIA  
EN PACIENTES AFECTADOS POR LEUCEMIA MIELOIDE  
CRONICA**

**Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de  
Estudios de Posgrado en Biología para optar al  
grado de Magister Scientiae**

**MANUEL ENRIQUE CAMPOS RUDIN**

**Ciudad Universitaria "Rodrigo Facio"  
San José, Costa Rica**

**1996**

## DEDICATORIA

A todas las personas que han perecido ante una enfermedad de origen canceroso. En especial a los pacientes afectados por Leucemia Mieloide Crónica de los Hospitales San Juan de Dios y Hospital México, los cuales dieron parte de si mismos para que este proyecto se hiciera realidad. Su contribución ayudará a muchos otros pacientes dentro y fuera de nuestro país.

## AGRADECIMIENTOS

A mi esposa Daisy, por toda la ayuda brindada durante el desarrollo de este trabajo.

A mi Hermano, Madre y Padre, por el gran apoyo emocional y económico durante mi permanencia en el Sistema de Estudios de Posgrado.

A la Dra. Patricia Cuenca, muchísimas gracias. Su apoyo científico como humano, el cual fue constante a lo largo de esta tesis será bien recordado y estimado.

Por supuesto, a Gustavo Gutiérrez, M.Sc., quien fue mi director de tesis durante gran parte del proyecto y que lamentablemente tuvo que partir hacia el extranjero antes de finalizar el mismo.

Le agradezco al Dr. Jorge Azofeifa y a la Dra. Sandra Silva todas sus observaciones en la revisión de la tesis, así como sus valiosos consejos al momento de aplicar alguna técnica de laboratorio.

Como en muchos proyectos, la labor de los técnicos de laboratorios es invaluable. En este caso fue siempre satisfactorio contar con la ayuda del técnico Federico Hernández, quien de manera gentil brindó su cooperación cuando esta fue solicitada.

Un agradecimiento muy especial a los médicos, microbiólogos y enfermeras de los servicios de Hemato-Oncología del Hospital San Juan de Dios y Hospital México, por toda su colaboración brindada.

Al señor Carlos Villalobos por las fotografías incluidas en esta tesis.



## INDICE GENERAL

Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Hoja de aprobación.....	iv
Resumen.....	viii
Lista de cuadros.....	xi
Lista de figuras.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiii
I. INTRODUCCION.....	1
1. Aspectos generales de la hematopoyesis.....	1
2. Aspectos clínicos de las leucemias.....	2
2.1 Leucemia Mieloide Crónica.....	5
3. Oncogenes, factores de crecimiento y genes Supresores de tumores.....	8
3.1 Mutaciones en los oncogenes.....	12
3.2 Genes supresores de tumores.....	15
4. Los genes involucrados en el cromosoma Filadelfia.....	16
4.1 Reseña histórica.....	16
4.2 Caracterización del c-ABL.....	20
4.3 Caracterización del gen BCR.....	23
4.4 Caracterización del cromosoma Filadelfia.....	24
4.5 La proteína híbrida: producto del gen "híbrido" BCR/ABL.....	26
5. Métodos empleados para detectar el cromosoma Filadelfia.....	29

6. El cromosoma Filadelfia en la patogénesis de la LMC y LLA.....	33
6.1 Pronóstico de la enfermedad según el punto de ruptura en MbcR y la expresión del ARNm.....	35
7. La LMC en pacientes no portadores del cromosoma Filadelfia.....	37
8. Estudios moleculares de la LMC en otros genes.....	39
9. Importancia de la detección del Cromosoma Filadelfia.....	42
10. Tamizaje del cromosoma Filadelfia, su aplicación e importancia en Costa Rica.....	44
11. Objetivos del estudio.....	47
11.1 Objetivo general.....	47
11.2 Objetivos específicos.....	47
II. MATERIALES Y METODOS.....	48
1. Población de estudio.....	48
2. Preparación de las muestras para el análisis molecular.....	48
2.1 Toma de muestras.....	48
2.2 Extracción de ADN.....	49
2.3 Digestión de ADN con enzima de restricción <i>Bgl II</i> .....	49
2.4 Electroforesis.....	49
2.5 Transferencia del ADN a una membrana de nylon o "Southern Blot".....	50
3. Hibridización de la membrana con la sonda Transprobe-1 por métodos radioactivos.....	51
3.1 Descripción de la sonda.....	51

3.2 Marcaje de la sonda con P32.....	51
3.3 Procedimiento para hibridar la membrana de nylon con sondas marcadas con P34.....	52
4. Hibridación de membrana con la sonda Transprobe-1 por métodos no radioactivos.....	53
4.1 Marcaje de ADN sistema Genius "Random Primed".....	53
4.2 Prehibridización e hibridización.....	53
4.3 Detección de los ácidos nucleicos por digoxigenina y lumi-phos 530.....	54
III. RESULTADOS.....	56
IV. DISCUSION.....	66
V. CONCLUSIONES.....	78
VI. BIBLIOGRAFIA.....	79
VII. APENDICE.....	88

## RESUMEN

La leucemia mieloide crónica (LMC), es un tipo de cáncer de las células de la sangre, específicamente de las células de origen mieloide (basófilos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos y eritrocitos). A este cáncer le ha sido asociado una aberración cromosómica en el 95% de los casos, el cromosoma Filadelfia (Ph'). Este es producto de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, en la cual se genera un cromosoma 22 de tamaño menor al normal conocido como Ph'. Con el desarrollo de técnicas moleculares se detectaron dos genes afectados por la translocación, el oncogen c-ABL y el gen BCR. La fusión de estos genes origina la formación de una nueva proteína con actividad tirosina kinasa, con peso molecular de 210 kilodaltons.

El objetivo principal de este estudio fue el de aportar nuevos elementos al diagnóstico clínico y monitoreo de enfermedades hematológicas, a través de técnicas moleculares. El cromosoma Ph' es un marcador específico para la LMC. Dentro de las enfermedades agrupadas como desórdenes crónicos mieloproliferativos y síndromes mielodisplásicos, no hay presencia de esta mutación, salvo en los casos de LMC. Sólo en la leucemia linfocítica aguda y leucemia mieloide aguda se encuentran casos de portadores para el cromosoma Ph'.

Este proyecto empleó técnicas moleculares para detectar rearrreglos en MbcR/ABL (cromosoma Ph') en pacientes afectados por LMC. La técnica empleada es conocida como "Southern



Blot". Se utilizaron métodos no radioactivos y radioactivos para tamizar la presencia o ausencia del cromosoma Ph'. Se utilizó la sonda denominada Transprobe-1 (Oncogen Science, Inc.) y la endonucleasa *Bgl II*.

Dos centros hospitalarios colaboraron con este proyecto, el Hospital San Juan de Dios y el Hospital México. En total se recibieron 41 muestras de pacientes provenientes de ambos hospitales, 32 (78%) tenían como diagnóstico clínico LMC y 9 (22%) pacientes diagnósticos que los agrupan como síndromes mieloproliferativos o síndromes mielodisplásicos. En 25 pacientes afectados por LMC se logró realizar un análisis satisfactorio, en 20 de ellos (80%) el resultado fue Ph'+ y en 5 (20%) fue Ph' negativo. En aquellos pacientes no diagnosticados como LMC, se realizó un análisis molecular en 7 de ellos, en 3 pacientes se detectó la presencia de rearrreglos entre *Mbcr/ABL* (Ph'+) y en los restantes el resultado fue Ph' negativo.

Se determinó que el uso de métodos no radioactivos y radioactivos para marcar la sonda específica para la región *Mbcr* son viables. Además se encontró que la aplicación de una sola endonucleasa, en este caso *Bgl II*, es útil para realizar un primer tamizaje general de los pacientes. Pero se requiere de la aplicación de otra endonucleasa (ej: *Xba I*), para confirmar los casos que resultan Ph' negativos.

El desarrollo de esta técnica permite complementar los diagnósticos citogenéticos, confirmar los resultados obtenidos en pacientes Ph' negativos (individuos afectados por LMC pero no portadores de la translocación) y estudiar aquellos pacientes en los cuales no se ha podido realizar un diagnóstico citogenético. Es una metodología rápida y segura para monitorear un alto número de pacientes afectados por LMC. Además, su detección facilita el seguimiento de la respuesta del paciente ante las nuevas terapias: trasplante de médula ósea (ya se realiza en Costa Rica) y tratamientos a base de interferón.

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación FAB de las leucemias agudas.....	4
2. Clasificación FAB de los desórdenes mieloproliferativos.....	4
3. Clasificación FAB de las síndromes mielodisplásicos (SDM).....	5
4. Características clínicas de la LMC según las diversas etapas que presenta la enfermedad.....	7
5. Clasificación de los oncogenes más ampliamente estudiados, agrupados según la función del producto oncogénico codificado por estos.....	9
6. Sensibilidad de las técnicas empleadas, para detectar rearrreglos en los genes BCR/ABL.....	33
7. Total de muestras recibidas agrupadas según el diagnóstico clínico con el cual fueron referidas..	48
8. Pacientes referidos por el Hospital San Juan de Dios, el diagnóstico clínico por el cual fueron enviados y el resultado obtenido.....	58
9. Pacientes referidos por el Hospital México, diagnóstico clínico a la fecha del estudio y el resultado obtenido al usar la endonucleasa <i>Bgl II</i> .....	59
10. Cuadro comparativo que ilustra las ventajas y desventajas al emplear como método para cromosoma Filadelfia, una sonda exclusiva para la región <i>Mbc</i> r en comparación con la citogenética convencional.....	68
11. Comparación de la técnica "Southern Blot" contra la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	69

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Algunos de los oncogenes conocidos que ocasionan la independencia de la células hematopoyéticas de los factores de crecimiento.....	12
2. Formación del cromosoma Filadelfia como producto de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22.....	17
3. Representación esquemática de los genes BCR y c-ABL.....	19
4. Esquema que representa la unión de los genes BCR y c-ABL para formar el cromosoma Filadelfia.....	19
5. Fragmentos F0-F4 en que se divide la región Mbcr y el mapa de restricción de la misma zona.....	25
6. Vías comunes en la evolución citogenética en la LMC.....	41
7. Mapa de restricción parcial de la región Mbcr.....	60
8. Ejemplo hipotético de un posible rearrreglo entre los genes BCR y c-ABL.....	61
9. RFLPs generados por un paciente anormal y en otro portador del rearrreglo entre los genes BCR y c-ABL...:	62
10. Resultados de una autoradiografía al usar P32.....	64
11. Comparación entre el método radioactivo y no radioactivo.....	65
12. Procedimiento de laboratorio a emplear para detectar la presencia o ausencia del cromosoma Filadelfia en pacientes afectados por LMC.....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
BCR	Gen BCR. Su nombre se deriva de la región conocida como "bcr" localizada dentro del gen. .
bcr	Región de 5.8 kb conocida como "breakpoint cluster region", localizada dentro del gene BCR.
BSA	Albúmina sérica de bovino.
c-ABL	Oncogen celular, "Abelson Murine Leukemia".
c-MYC	Oncogen celular MYC.
N-RAS	Oncogen celular RAS.
IL	Interleucinas.
Kb	Kilobases de ADN.
Kd	Kilodaltons.
LMC	Leucemia Mieloide Crónica.
LLA	Leucemia Linfoide Aguda.
p53	Gen supresor de tumores denominado p53.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
Ph'	Cromosoma Filadelfia

Ph<sup>+</sup> Persona portadora de la t(9;22) o Cromosoma  
Filadelfia.

RFLP Polimorfismos en los fragmentos de restricción.

SMD Síndrome Mielodisplásico.

SMP Síndrome Mieloproliferativo.

## INTRODUCCION

### 1. ASPECTOS GENERALES DE LA HEMATOPOYESIS

La sangre está compuesta, entre otras cosas, por muchos tipos de células con una gran variedad de funciones. Los eritrocitos transportan el oxígeno y dióxido de carbono; los leucocitos combaten infecciones; y las plaquetas se adhieren a aquellos vasos sanguíneos que han sido dañados. Estas últimas son fragmentos celulares o minicélulas procedentes de células llamadas megacariocitos (Alberts et al., 1989).

Las células sanguíneas se originan de una célula pluripotente, de la cual surgen dos líneas principales, la linfoide y la mieloide. La célula pluripotente linfoide dará origen a las células T (se producen en el Timo) y a las células B. A partir de la célula pluripotente mieloide surgen los eosinófilos, basófilos, neutrófilos, monocitos (que darán origen a los macrófagos), megacariocitos y eritrocitos. En general todos los tipos de células hematopoyéticas, a excepción de los linfocitos T, se desarrollan en la médula ósea (Alberts et al., 1989).

En los procesos de división y diferenciación de cada una de estas células a partir de una célula pluripotente, intervienen los llamados factores de crecimiento y proto-oncogenes. Sus efectos son de vital importancia para una correcta maduración y diferenciación celular.

## 2. ASPECTOS CLINICOS DE LAS LEUCEMIAS

Las leucemias se caracterizan por una proliferación neoplásica de alguna de las líneas celulares de la sangre. La médula ósea, el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos no hematológicos (meninges, riñones, piel) se ven afectados. Por ejemplo, en la médula ósea se encuentra un gran número de precursores mieloides o linfoides los cuales pierden su capacidad de maduración; y en el caso particular de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) el bazo aumenta considerablemente de tamaño, lo cual es una característica propia de esta hematopatía. También se acompaña de la aparición en sangre periférica de células inmaduras de la línea celular implicada en el proceso cancerígeno (Cordero et al., 1986). En resumen podemos definir las leucemias como una proliferación no controlada de las células hematopoyéticas, las cuales no retienen su capacidad de maduración y por ello no pueden ejercer su función normal en el cuerpo humano. Algunos desórdenes hematológicos no son estrictamente una leucemia, por ejemplo en los *síndromes mieloproliferativos* aunque se da una expansión o crecimiento anormal de células de origen mieloides, estas retienen su capacidad de maduración. Por el contrario en los *síndromes mielodisplásicos* no se da una expansión o crecimiento anormal, pero se bloquea la capacidad de maduración y diferenciación (Sawyers et al., 1991).



Los varios tipos de leucemias y hematopatías, se clasifican según la línea celular hematológica implicada y el comportamiento de la enfermedad (aguda o crónica). Estas se agrupan en:

- 1) *Leucemias agudas*. Se caracterizan por una sustitución rápida de la médula ósea por células inmaduras de origen linfocítico o mieloide (cuadro 1).
  
- 2) *Síndromes mieloproliferativos (SMP)*. Son un grupo de enfermedades donde uno o varios linajes celulares hematopoyéticos derivados de la médula ósea se ven alterados. Su evolución es más lenta que en las agudas. En los casos de policitemia vera, de la trombocitemia esencial y de la metaplasia mieloide con mielofibrosis son menos dolorosas y malignas (cuadro 2).
  
- 3) *Síndromes mielodisplásicos (SMD)*. Presentan una maduración peculiar que afecta a los precursores granulocíticos, eritrocíticos, plaquetarios o a todos. Puede degenerar a leucemias agudas no linfoides (cuadro 3) (Rifkind et al., 1988).

**Cuadro 1. Clasificación FAB<sup>(1)</sup> de las leucemias agudas.**

**Subtipo**

**Denominación**

*Leucemias agudas linfoblásticas (LLA):*

L1	Células pequeñas: homogénea
L2	Células largas: heterogéneas
L3	Células largas: homogénea (tipo burkitt)

*Leucemias agudas no linfoblásticas (LNLA):*

M1	Leucemia aguda mieloblástica sin maduración (LMA)
M2	Leucemia aguda mieloblástica con maduración (LMA)
M3	Leucemia aguda promielocítica-hipergranular-(LAP)
M3V	Leucemia aguda promielocítica-microgranular-(LAP)
M4	Leucemia aguda mielomonocítica (AMMoL)
M4Eo	Leucemia aguda mielomonocítica con eosinofilia anormal
M5a	Leucemia aguda monocítica-pobrementemente diferenciada-(AMOL)
M5b	Leucemia aguda monocítica-bien diferenciada-
M6	Eritroleucemia (EL)
M7	Leucemia megacarioblástica

1: FAB es una clasificación propuesta por el grupo cooperativo Francés-Americano-Británico.

Fuente: Barch, The ACT cytogenetics laboratory manual, 1991

**Cuadro 2. Clasificación FAB de los desórdenes mieloproliferativos**

**Síndrome**

**Clasificación**

Leucemia mieloide crónica	LMC
Policitemia Vera	PCV
Trombocitemia esencial	TE
Mielofibrosis con metaplasia mieloide	MMM

Fuente: Barch, The ACT cytogenetics laboratory manual, 1991

**Cuadro 3. Clasificación FAB de los síndromes mielodisplásicos (SDM).**

<i>Síndrome</i>	<i>Clasificación</i>
Anemia Refractaria	AR
Anemia Refractaria con sideroblastos en anillo	RARS (siglas en inglés)
Leucemia mielomonocítica crónica	LMMC
Anemia Refractaria con exceso de blastos	AREB
Anemia Refractaria con exceso de blastos en transformación	AREB-t

Fuente: Barch, The ACT cytogenetics laboratory manual, 1991

### 2.1 LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA (LMC):

Se le conoce también como leucemia granulocítica crónica, esta se agrupa dentro de los síndromes mieloproliferativos (cuadro 2), y constituye el síndrome más importante dentro de este grupo. Aparece con mayor frecuencia entre los 30 y 40 años de edad (aunque la aparición en edades tempranas no es rara), con una incidencia igual en ambos sexos.

La LMC se origina a partir de una mutación (o varias) en la célula pluripotente de la línea mieloide. En el caso del oncogene c-ABL un mecanismo de estimulación autocrino se ha sugerido como uno de los factores que ocasionan el proceso neoplásico. En la enfermedad se presentan tres fases continuas: la crónica (inicial) que se caracteriza por una sobreproducción de células de la línea mieloide, fase acelerada, o directamente ocurre la fase aguda o crisis blástica (Delage et al., 1990). En la fase crónica las

células leucémicas pierden su capacidad de maduración y diferenciación; por ello se vuelven incapaces de cumplir las funciones esenciales de las células normales hematopoyéticas (Strife & Clarkson, 1988). El aumento en el número de precursores mieloides puede deberse a una maduración muy lenta o a un crecimiento no regulado de los precursores mieloides (Kurzrock & Talpaz, 1991). En la médula ósea se da una gran hiperplasia, en la que predomina la serie granulocítica o mieloide (90%) con un gran aumento de la serie megacariocítica (Cordero, 1986).

La fase acelerada puede durar unos pocos meses o años. En esta etapa el cuadro clínico no está claramente definido.

Finalmente surge la fase aguda, la que en promedio ocurre tres años después de realizado el diagnóstico inicial. La crisis blástica es el resultado de mutaciones adicionales en una o más líneas celulares, provocando la pérdida total o parcial de la capacidad de diferenciación y maduración de las células afectadas. En el proceso las células de la fase aguda reemplazan a las células presentes en la fase crónica (Strife & Clarkson, 1988). En la fase aguda el comportamiento del cáncer es idéntico al observado en las leucemias agudas; la muerte del paciente se produce por anemia, hemorragias o infecciones, presentándose frecuentemente neumonía terminal (Cordero, 1986) (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Características clínicas de la LMC según las diversas etapas que presenta la enfermedad.**

=====  
 Criterios de diagnóstico para un paciente de LMC en fase crónica:

Presencia de esplenomegalia (puede ser gigantesca).  
 Hematomegalia variable.  
 Adenopatías en forma variable y fiebre común.  
 Anemia.  
 La morfología de los eritrocitos es anormal.  
 Número de leucocitos mayor a 100.000 por mm.  
 Presencia de precursores mieloides.  
 Fosfatasa alcalina disminuida o ausente.  
 Acido úrico elevado.  
 A nivel de Médula Osea, el aspirado la médula es hipercelular y la biopsia muestra hiperplasia y/o fibrosis.  
 Presencia del cromosoma Filadelfia.

Rasgos que pueden definir la fase acelerada:

Dificultad en controlar por medio de quimioterapia el incremento en el número de leucocitos, glóbulos rojos y plaquetas.  
 Esplenomegalia progresiva.  
 Basofilia progresiva (más del 20%)  
 Un número mayor de blastos en sangre periférica o médula ósea, superior al 10%.  
 Aparición de nuevas mutaciones.  
 Fiebre de origen desconocido y dolor de huesos.

Criterios para determinar la entrada en fase de aguda:

El bazo no disminuye de tamaño.  
 El paciente sufre un malestar general.  
 Aumenta el número de basófilos en la sangre.  
 Presencia de blastos en médula ósea (superior al 20%).  
 El paciente no responde al tratamiento.  
 Es muy posible que el paciente presente un cuadro clínico similar a una LMA o LLA, o evolucione a una de estas leucemias.

=====  
 Fuente: Rifkind et al., 1988  
 Cordero, 1986

### 3. ONCOGENES, FACTORES DE CRECIMIENTO Y GENES SUPRESORES DE TUMORES

Existe un grupo de genes que se encarga de regular el crecimiento celular; en su estado normal se denominan proto-oncogenes. Estos proto-oncogenes una vez que se ven alterados por alguna mutación, pueden activarse de forma inapropiada y ocasionar el crecimiento anormal de las células afectadas. En su forma alterada reciben el nombre de oncogenes. En su gran mayoría estos oncogenes son producto de mutaciones dominantes (p ej. el oncogene c-ABL asociado a LMC), aunque existen otros de carácter recesivo (el retinoblastoma) (Tronick & Aaronson, 1991). En los genes supresores de tumores (gst) la situación cambia, en ellos se requiere que ambos alelos silvestres esten mutados, sólo así se genera un efecto dañino para el organismo. Como ejemplos de gst están el gen retinoblastoma y el gen p53. Sobre el gst p53 hay una fuerte investigación y por ello se ha destinado una pequeña sección más adelante para discutir su situación.

Los oncogenes codifican para una serie de proteínas que actúan como factores de crecimiento, como receptores de estos factores y como proteínas con actividad kinasa (cuadro 5). Los factores de crecimiento y sus receptores juegan un papel importante en el crecimiento y en la diferenciación celular (Tronick y Aaronson, 1990).

Cuadro 5. Clasificación de los oncogenes más ampliamente estudiados agrupados según la función del producto oncogénico codificado por estos.

=====  
Clase 1: Factores de crecimiento

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
sis	PDGF $\beta$ -cadena de factor de crecimiento
int-2	Relacionado al factor de crecimiento FGF
hst	Relacionado al factor de crecimiento FGF
FGF-5	Relacionado al factor de crecimiento FGF
wnt-1	Crecimiento y diferenciación

Clase 2: Receptores de Factores de Crecimiento con actividad Tirosina Kinasa

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
Ros	Receptor asociado a proteína de membrana
erbB	Receptor proteico truncado de EGF
erbB-2	Receptor proteico
fms	Receptor mutante para CSF-1
met	Receptor proteico truncado soluble
trk	Receptor proteico soluble NGF truncado
kit	Receptor proteico truncado para células madres
sea	Receptor proteico truncado de membrana
ret	Receptor proteico truncado

Clase 3: Proteínas citoplasmáticas con actividad Tirosina Kinasa

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
src	Proteína de membrana, no receptora
yes	Proteína de membrana, no receptora
fgr	Proteína no receptora
lck	Proteína de membrana, no receptora
fps/fes	Proteína no receptora
abl	Proteína de membrana, no receptora

Clase 4: Proteínas de unión a GTP

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
Ha-ras	Proteína de unión a GTP/GTPasa
Ki-ras	Proteína de unión a GTP/GTPasa
N-ras	Proteína de unión a GTP/GTPasa
gsp	Subunidad Gs-alfa, de la proteína G heterodimérica
gip	Subunidad Gi-alfa, de la proteína G heterodimérica

continuación Cuadro 5.

Clase 5: Proteínas Serina/Treonina Kinasa

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
raf/mil	Proteína citoplasmática
mos	Proteína citoplasmática
pim-1	Proteína citoplasmática
cot	Proteína citoplasmática

Clase 6: Factores de Transcripción Nuclear

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
myc	Proteína de unión a secuencias específicas de ADN
N-myc	Proteína de unión a secuencias específicas de ADN
L-myc	Proteína de unión a secuencias específicas de ADN
myb	Proteína de unión a secuencias específicas de ADN
fos	Se combina con el producto de c-jun para formar el factor de transcripción AP-1
jun	Proteína de unión a secuencias específicas de ADN, y es parte de AP-1
rel	Relacionado a NF-kB
ets	Proteína de unión a secuencias específicas de ADN
ski	Factor de transcripción?

Otros de función desconocida

<i>Gene</i>	<i>Producto</i>
mas	Posible receptor de angiotensina
crk	Proteína que posiblemente se une a las regiones SH2-SH3 de las proteínas con actividad tirosina quinasa como abl. Posible regulador de fosforilación.
dbl	Factor de intercambio de nucleótidos de Guanina
bcl-2	Traductor de señales?

=====

Fuente: DeClue & Lowry, 1994.



En general estas proteínas están involucradas en la activación de otras proteínas, la forma más común de hacerlo es a través de su actividad kinasa, y su efecto oncogénico ha sido estudiado en muchos genes. Por ejemplo el c-SCR, el c-erbB y c-ABL (Watson et al., 1989, Kipreos & Wang, 1992).

Un tipo de tejido donde se puede observar el efecto de los factores de crecimiento es en la diferenciación, maduración y división celular del sistema hematopoyético. Todas las líneas celulares de este sistema se derivan de una célula pluripotente. Luego por medio de la acción de las interleucinas (factores de crecimiento) se da la formación de células progenitoras comprometidas mieloides y linfoides. Estas darán origen a los diversos tipos de células sanguíneas (Bagby, 1994). Durante estos procesos de división y diferenciación se han logrado identificar una serie de oncogenes que intervienen en forma selectiva y específica para inducir a la maduración de las diversas líneas celulares (figura 1) (Pierce, 1989). En el caso del proto-oncogene ABL, se ha observado que el v-abl (su homólogo viral) elimina la dependencia de la interleucina-3 (IL-3), para ello se ha sugerido un mecanismo de estimulación autocrino (Kipreos et al., 1987).

Debido a que muchos oncogenes celulares poseen homólogos virales, se usa la letra v para identificar los homólogos

virales, y la letra c para los oncogenes celulares. Ejemplos de ello son: v-abl y c-ABL; v-src y c-SRC.

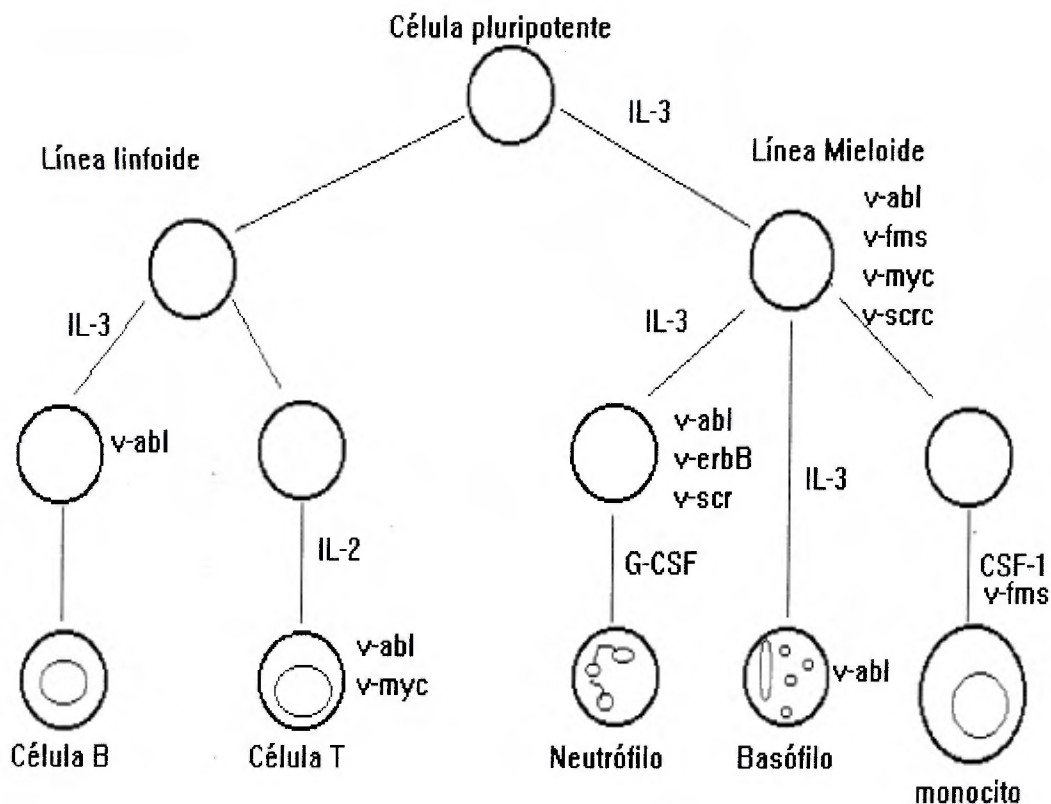


Figura 1. Algunos de los oncogenes conocidos que ocasionan la independencia de las células hematopoyéticas de los factores de crecimiento.

Fuente: Pierce, et.al. 1989.

### 3.1 MUTACIONES EN LOS ONCOGENES:

Existen varios mecanismos por los cuales se activan los proto-oncogenes: por translocaciones, mutaciones de punto, amplificaciones o por la integración de un oncovirus en el genoma.

### 1) *Activación oncogénica por translocaciones:*

Una translocación es un intercambio de material genético entre dos o más cromosomas homólogos o no homólogos. Este último tipo de intercambio no es un evento normal pero puede ocurrir si dos o más cromosomas se rompen al mismo tiempo (Richardson , 1991). En el Linfoma de Burkitt el c-MYC se ve alterado en su función, como consecuencia de una translocación entre los cromosomas 8 y 14. En la LMC el c-ABL es literalmente "cortado", una parte permanece en el cromosoma 9 y el resto se inserta en el cromosoma 22. Así se origina el cromosoma Filadelfia (Haluska et al.,1987).

### 2) *Activación oncogénica por mutaciones de punto:*

La sustitución de nucleótidos y el consecuente cambio en la cadena de ADN ocasiona en algunos casos que un codón codifique para otro aminoácido. Así se altera la función de la proteína. La familia de oncogenes **c-ras** presenta este tipo de mutación; es frecuente encontrar sustituciones en los codones 12 y 61. Se considera que estos codones son sitios calientes para mutaciones (Stuart, 1987). En otros oncogenes y genes supresores de tumores se ha observado cómo estas mutaciones alteran el marco de lectura abierta, o simplemente ocasionan mutaciones sin sentido. Los resultados en estos casos son proteínas con actividad kinasa aumentada, proteínas o ARNm no funcionales, o la pérdida completa de expresión de la proteína.

### 3) *Amplificación oncogénica:*

En este caso ocurre una producción aumentada de la proteína (no es requisito que esté alterada en su secuencia de aminoácidos). Su exceso ocasiona trastornos fisiológicos en la célula. Este es el caso del oncogene c-MYC (Watson et al., 1987). La presencia de cromosomas doblemente minúsculos ("double minute" en inglés) y regiones homogéneas en células transformadas o cancerosas de bandeó ejemplifican cómo la presencia de secuencias amplificadas en procesos cancerosos puede favorecer un proceso neoplásico.

### 4) *Virus, ¿son agentes causantes de cáncer?:*

Muchos tipos de virus han sido asociados a un riesgo aumentado de contraer algún tipo de cáncer. He aquí algunos ejemplos: 1) el virus de la hepatitis B en cáncer de hígado, 2) el virus Epstein-Barr en linfomas y cáncer nasofaríngeo, 3) ciertos tipos de virus de papiloma en cáncer cervical y genital, 4) el HTLV I y II en las leucemias linfoides. El modo de acción en estos casos no implica sólo la posibilidad de integración al genoma nuclear de un oncogene, pues la integración por sí misma puede ocasionar un efecto regulatorio sobre un proto-oncogene, o el virus mismo puede acarrear un oncogene. Su efecto puede ser el inducir la síntesis de una proteína que interactúe con un oncogene o gen supresor de tumores en la célula afectada (Marx, 1984; Masucci & Ernberg, 1994; Smith, 1994). Por ejemplo el virus Epstein Barr produce proteínas que interactúan con la proteína del

gen BCL-2, e inducen un bloqueo de la apoptosis celular al impedir la función normal del gen BCL-2.

### 3.2 GENES SUPRESORES DE TUMORES:

La proteína nuclear codificada por el gen p53 ha sido considerada como un oncogen, pero posee una acción anti-oncogénica en las células normales (Kern et al., 1992). Se ha sugerido que la proteína p53 en estado silvestre funciona como un supresor de tumores. Su función fisiológica apenas comienza a ser comprendida. En investigaciones recientes se indica una posible acción reguladora de la transcripción génica. La proteína producida por p53 activa la transcripción de aquellos genes situados cerca de su sitio de unión al ADN. Altas concentraciones de p53 se encuentran durante los procesos meióticos de espermatogénesis, justo en la fase tetraploide de paquitene. Es en esta fase donde se da la recombinación entre cromosomas homólogos, mecanismos promotores de la diversidad genética. Además se han observado elevaciones en los niveles de p53 cuando el ADN es sometido a radiaciones. La proteína p53 silvestre actúa deteniendo el ciclo celular en G1, dando suficiente tiempo a las enzimas reparadoras para corregir posibles daños en el ADN, disminuyendo así la promoción de mutaciones en el genoma durante la fase S (donde ocurre la síntesis y duplicación del ADN) (Harris & Hollstein, 1993; Hiramata & Koeffler, 1995).

Se ha descubierto un efecto dominante en las mutaciones para este gen, pues el gen mutante interfiere con la acción del otro alelo en estado silvestre. El gen p53 codifica una proteína dimérica, la expresión de un alelo mutante interfiere en la formación de proteínas diméricas funcionales normales (Kern et al., 1992).

Cuando se pierde un alelo del gen p53 o se produce la síntesis de una proteína p53 alterada, las células afectadas pueden iniciar un proceso pre-canceroso (Zvi et al., 1989). También pueden contribuir al proceso de transformación maligna como un evento adicional de otras mutaciones ya existentes en otros oncogenes. De esta forma p53 no es gen que inicia el proceso canceroso, sino un agente que favorece su progreso.

#### **4. LOS GENES INVOLUCRADOS EN EL CROMOSOMA FILADELFIA**

##### **4.1 RESEÑA HISTORICA:**

Nowell y Hungerford en 1960 describieron la primera aberración cromosómica consistente asociada a una neoplasia en el hombre, el cromosoma Filadelfia (Ph'). Originalmente se consideró como un cromosoma 21 derivado. Con el advenimiento de las técnicas de bandeo en los años 70, Rowley en 1973 claramente demostró que es un cromosoma 22 derivado. Este es el producto de una translocación recíproca entre los

cromosomas 22 y 9;  $t(9;22)(q34;q11)$ . Prakash y Yunis en 1984 al realizar un estudio citogenético empleando bandeado de alta resolución determinaron que los puntos de fractura son los siguientes: en el cromosoma 9 es q34.1.22 y para el 22 es q11.2 (Heim y Mitelman, 1991) (figura 2). La importancia del cromosoma Ph', radica en su fuerte asociación con la LMC. Alrededor de un 95% de las personas afectadas por esta enfermedad son Filadelfia positivos (Ph'+) (Kurzrock et al., 1988).

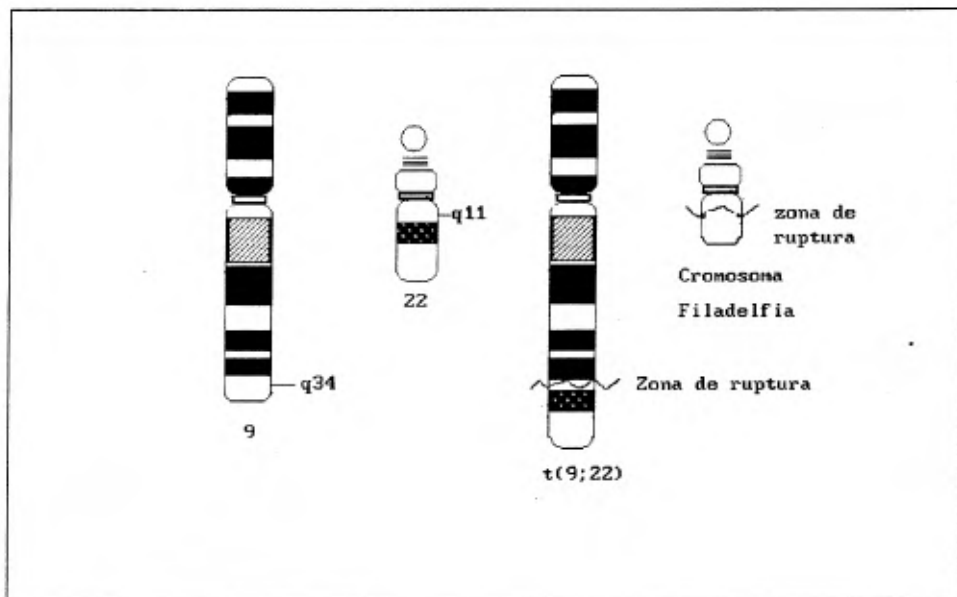


Figura 2. Formación del cromosoma Filadelfia, como producto de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22.

Fuente: Wetzler y Talpaz, 1992.

En los puntos de ruptura de estos cromosomas, se localizan dos oncogenes, el c-ABL asignado a 9(q34.1) y el c-sis localizado en 22(q12.3- q11.21). Aunque ambos oncogenes son intercambiados en la translocación 9;22 t(9;22) sólo el c-ABL posee un papel oncogénico en la enfermedad; es más el c-ABL es único que se ve "cortado" en dos secciones en este proceso. El c-sis no desempeña una función crítica en la patogénesis de la LMC, ni se haya involucrado en la proteína híbrida formada, producto de la t(9;22) (Dreazen et.al. 1988).

Groeffen y colaboradores, en 1989, encontraron que los puntos de ruptura en el cromosoma 22 para pacientes Ph'+ se hallan en una región de ADN de 5,8 Kb denominada en inglés como "breakpoint cluster region" (bcr). Esta región es parte de un gen de al menos 90 Kb, a este gen se le denomina BCR o ph1. Estos estudios identificaron los genes involucrados en la t(9;22): el c-ABL y el gen BCR (figuras 3 y 4).



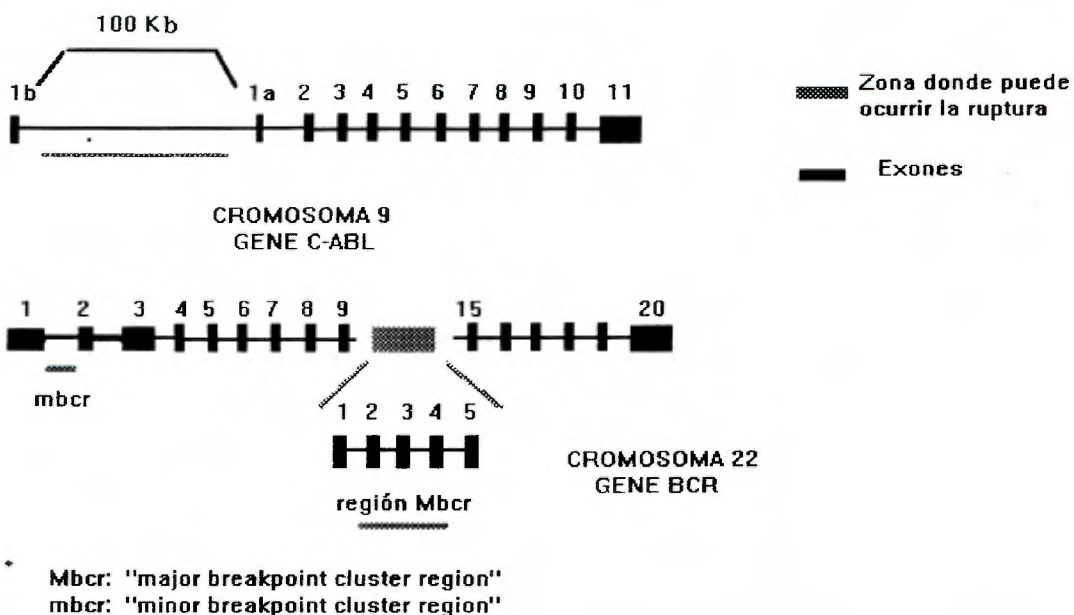


Figura 3. Representación molecular de los genes BCR y C-ABL.

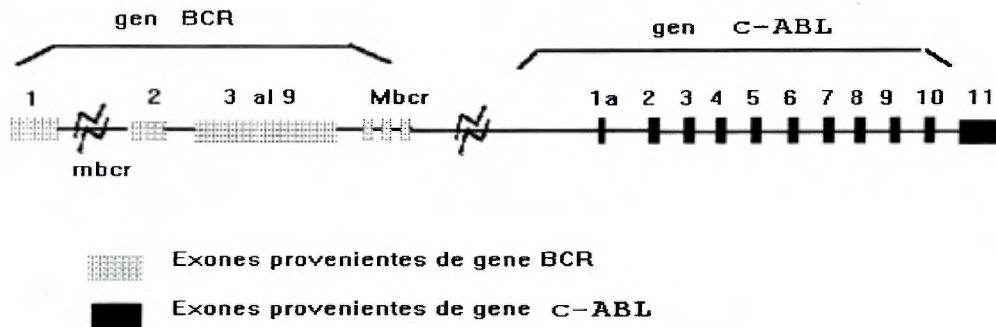


Figura 4. Representación molecular del cromosoma Filadelfia, cuando están involucrados los genes c-ABL y BCR. Se adjuntan los puntos de ruptura en m b c r característico de la LLA y el propio de la LMC en Mbc.

#### 4.2 CARACTERIZACION DEL C-ABL:

El c-ABL induce tumores linfoides en ratones. En ratones mutantes homocigotos para una delección 3' en este gene se han observado serios defectos al nacimiento (Kipreos y Wang, 1992). Se sabe que codifica para una proteína con actividad tirosina kinasa débil, con un peso de 145 kd. A nivel fisiológico la proteína producida por c-ABL puede afectar el crecimiento celular. El grupo de células afectadas es amplio, pues este oncogene se expresa en tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos.

En el hombre este gen se localiza cerca del extremo del brazo largo del cromosoma 9 y su extremo 5' está orientado hacia el centrómero. Tiene una longitud de 250 Kb, las secuencias que codifican para la actividad kinasa se localizan en la porción 3'. El c-ABL posee numerosos exones e intrones como se observa en la figura 4 (Leibowitz, 1990).

El c-ABL posee dos posibles primeros exones (1a o 1b). Estos son alternativamente editados y unidos al exón 2 (el cual ha sido llamado el exón común) (Leibowitz, 1990; Kurzrock et al., 1988). El exón 1a es proximal al exón 2 y los separa un intrón de 19Kb, pero el exón 1b se encuentra a una distancia de 100 Kb del exón 1a. Este gran intrón (100 Kb) que separa a los exones 1a y 1b no ha sido enteramente clonado o caracterizado (Leibowitz, 1990; Kurzrock et al. 1988). Como resultado, se transcriben dos tipos de ARNm: uno de 6 Kb, que corresponde a la transcripción de los exones 1a

y 2; y otro de 7 Kb, correspondiente al transcrito de los exones 1b y 2, donde se separa el exón 1a.

El c-ABL tiene ciertas características inusuales. Primero, el editaje debe ocurrir sobre largas distancias. La distancia entre los exones 1a y 1b es de 100 Kb aproximadamente. Segundo, cuando la transcripción da inicio en 1b, el exón 1a es eliminado y el exón 1b se fusiona al exón 2. El mecanismo de editaje para este caso no está aún definido (Groeffen et al., 1989). Esta propiedad del exón 2 como receptor del exón 1a o 1b es importante en la tumorigénesis, pues permite el fácil intercambio de ADN no c-ABL con este exón (Kurzrock et al., 1988). Este exón 2 sirve de aceptor para la secuencia bcr de la proteína híbrida BCR/ABL (Leibowitz, 1990).

Ambos exones 1a y 1b contienen secuencias para diferentes péptidos, lo cual sugiere la presencia de dos promotores distintos que dan origen a proteínas que difieren en su extremo N-terminal. Esto sugiere la existencia de dos proteínas codificadas por c-ABL con función distinta. Este gen tiene una baja expresión en muchos tejidos, no posee cajas TATA o CAAT, y sus dos regiones promotoras son ricas en (G+C), con abundantes regiones GGGCGG repetidas (Groeffen et al., 1989).

Como cualquier otro oncogene, el c-ABL puede ser activado de varias formas, por una translocación, por mutaciones de punto o por rearrreglos estructurales de mayor

magnitud como delecciones y amplificación génica o hiperproducción de la proteína. El resultado final de cualquiera de estos procesos es la producción de una proteína modificada con un alto grado de fosforilación. Hay tres formas conocidas por las cuales este oncogene se activa:

- 1) La sustitución del primer exón por secuencias del gen BCR.
- 2) Mutaciones del dominio SH3. Este es el dominio con actividad tirosina kinasa, si este dominio es alterado por modificaciones que afectan la estructura de la proteína, podría obtenerse un producto con alta actividad kinasa. Es decir se aumentaría la capacidad transformante de la proteína.
- 3) Una tercera fuente de cambio es la hiperexpresión del gen en niveles 500 o 1000 veces más de lo normal. Esto puede deberse a las cercanías de un promotor activo (Witte, 1993).

Experimentos realizados con el homólogo viral de este oncogene, han permitido demostrar que la actividad kinasa de c-ABL es capaz de eliminar la dependencia de factores de crecimiento por parte de células de origen mieloide. El v-abl posee una proteína fosforilada mucho más activa que el protooncogene c-ABL en estado silvestre, ello le permite bloquear el proceso de maduración celular. Inclusive v-abl es más eficiente que v-src, v-fms o v-fps en inducir la

independencia de Il-3 en células de origen mieloide y linfoide (Risser et al.,1989).

El oncogene abl una vez activado en forma descontrolada tiene efectos sobre células de origen mieloide y linfoide. Es más frecuente encontrar alterado este oncogene en las células precursoras o madres del linaje mieloide, pero su acción sobre células linfoides es clara. En la crisis blástica de la LMC, un 25% de los casos puede contener mayoritariamente células pre-B o pre-T, las cuales poseen el cromosoma Ph'+ (Risser & Hooland,1989). Esto sugiere que c-ABL puede transformar a la misma célula pluripotente para el linaje mieloide y linfoide. Otra función de c-ABL es la de regular la apoptosis celular, este tema se abordará en un próximo capítulo.

#### 4.3 CARACTERIZACION DEL GEN BCR:

Se localiza en el cromosoma 22, y tiene una longitud de 250 Kb. También codifica para dos transcritos de ARN, uno de 4,5 Kb y otro de 6 Kb, se generan dos proteínas normales de 160kD y 135kD. Este se expresa en una gran variedad de tejidos, pero su función permanece incierta (Leibowitz, 1990). El gen BCR contiene 20 exones (Dreazen et al.,1988) (Figura 3).

El primer exón de BCR codifica para un dominio con actividad serina treonina kinasa, la proteína silvestre de BCR tiene en su extremo carboxilo terminal un segmento que

funciona como una GTPasa-activadora de proteínas (Witte et al.,1994). Los oncogenes de la familia ras y otros genes codifican para GTPasas y estas cumplen un importante papel en la mediación de señales intracelulares. El concepto inicial de que BCR es un simple aceptor de c-ABL podría estar errado si contemplamos bajo esta nueva evidencia la función GTPasa de BCR. Witte (1993) ha propuesto además que el gen BCR no sería un simple aceptor del c-ABL, sino que por sí mismo juega un papel importante en la oncogenesis.

La zona de ruptura o región bcr contiene 5 pequeños exones, enumerados del 1 al 5; los cuales varían desde los 76 a 105 pb (Groeffen et al. 1989). En la figura 5 se presenta el mapa de restricción para la región bcr, dividida en 5 fragmentos F0, F1, F2, F3, F4. Esta división ha sido utilizada para clasificar los puntos de ruptura. Como veremos más adelante la región se subdividió para investigar si existía relación entre la zona de ruptura y la duración de la enfermedad.

#### 4.4 CARACTERIZACION DEL CROMOSOMA FILADELFIA:

No se conoce el mecanismo que promueve el intercambio de material genético entre los cromosomas 9 y 22. La información sobre las regiones que rodean los puntos de ruptura es limitada y no se considera que pueda ocurrir por recombinación homóloga (Dreazen, et al.,1988; y Groeffen, et al.,1989). Es importante destacar que la ruptura se da

siempre en regiones no codificantes (intrones) y nunca se ven alterados los exones en ambos genes.

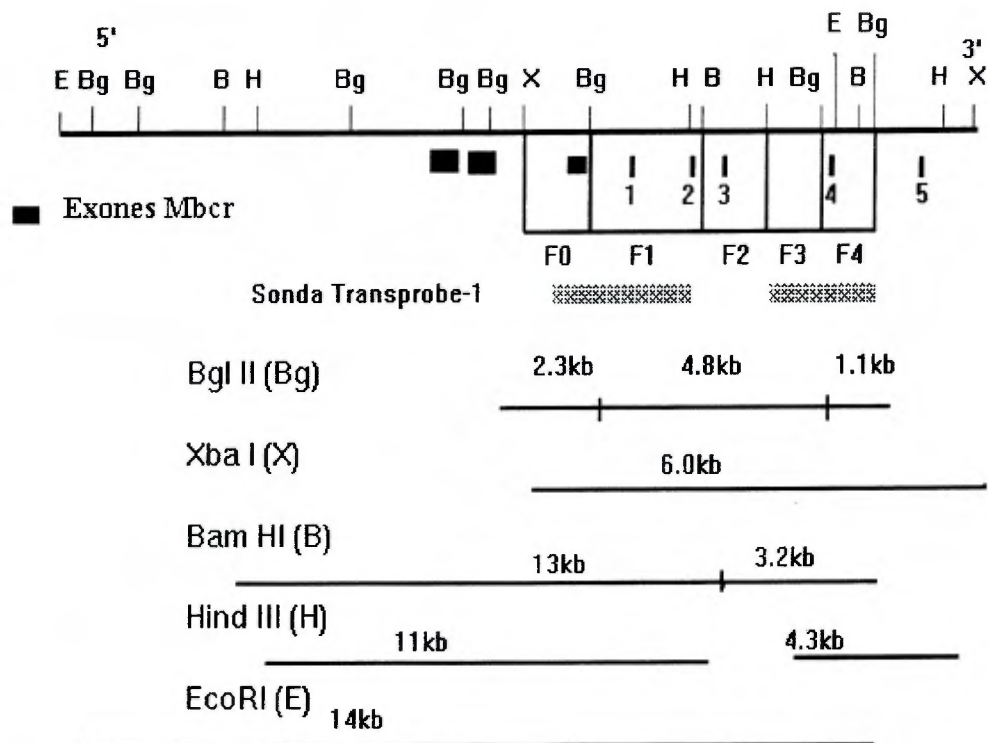


Figura 5. Fragmentos F0-F4, en que se divide la región Mbcr y el mapa de restricción de la misma zona. Se muestran los distintos fragmentos de restricción que se generan al usar varias enzimas, los cuales son reconocidos por la sonda Transprobe-1.

En la LMC el punto de ruptura en el cromosoma 22 ocurre casi invariablemente en una pequeña región de 5,8Kb (región bcr), conocida también como Mbcr, en inglés "major breakpoint cluster region" (figura 5). Por el contrario en el cromosoma 9, ésta ocurre en cualquier región localizada en dirección 5' del exón 2 de c-ABL (figura 3) (Leibowitz, 1985). Shtralid,

y colaboradores en 1988, determinaron el punto de ruptura exacto en 100 pacientes afectados por LMC, en 99 casos estaba dentro de la región Mbcr y sólo uno fuera de ella.

Groeffen et al., 1989 luego de hallar secuencias Alu en la región Mbcr, especularon sobre la posible intervención de éstas en la t(9;22). Recientemente Zhang y colaboradores (1995) al realizar una investigación sobre los puntos de ruptura en Mbcr, de 14 pacientes analizados, encontraron que sólo tres presentaron secuencias Alu dentro o cerca del punto de ruptura. En los demás casos los sitios de ruptura fueron dispersos y no se detectó prominencia de algún sitio o secuencia preferencial.

En la LLA los puntos de ruptura varían, ocurren dentro o fuera de la región Mbcr. Cuando aparece fuera de la región Mbcr, es el exón 1 de BCR el que se fusiona con los exones de c-ABL. A esta región se le conoce como "minor breakpoint cluster region" (mbcr) (Kurzrock et al. 1988; Maurer et al. 1991). Los exones de c-ABL que codifican para el dominio tirosina kinasa son fusionados al gen BCR, tanto en la LMC como en la LLA.

#### 4.5 LA PROTEINA HIBRIDA : PRODUCTO DEL GEN "HIBRIDO" BCR/ABL:

El nuevo ARNm es de aproximadamente 8Kb, y la proteína tiene una masa molecular de 210 kd (Shtivelman et al., 1985).



Posteriormente se describe otra proteína híbrida de 190 kd, asociada a pacientes con LLA (Fainstien et al., 1987).

Ambas proteínas, la p210 y p190 tienen características en común, tales como:

- a) el dominio tirosina kinasa de c-ABL;
- b) en ambas proteínas está ausente un fragmento en el extremo amino terminal; que se considera necesaria para la activación oncogénica del c-ABL,
- c) ambas son capaces de transformar las células en médula ósea, pero se demostró *in vitro* que la p190 tiene una actividad tirosina kinasa aumentada.

La proteína de 190 Kd difiere de la de 210 Kd sólo en los 501 aminoácidos de menos, los cuales son codificados por los exones de BCR que está presentes cuando hay ruptura en Mbcr y ausentes cuando se da en mbcr (Lugo et al., 1990). La proteína de 210 Kd se asocia principalmente a la LMC (por consiguiente, producto de un rearreglo en el Mbcr) y la de 190 Kd en la LLA (el rearreglo ocurre en el mbcr). A la p190 BCR-ABL se le confiere un mayor potencial oncogénico, debido a su mayor actividad tirosina kinasa in vitro; pero en un estudio realizado por Kantarjian, et al. (1991), no se encontró diferencia significativa en la acción de estas dos proteínas en pacientes afectados de LLA, es decir, su efecto no afecta la sobrevida o respuesta del paciente a la terapia.

Estos autores evaluaron las tasas de respuesta completa a la terapia empleada y no hubo diferencias significativas entre

la p190 y p210; al estudiar la duración de la remisión, la p190 tuvo un periodo más largo pero no fue significativo.

A nivel fisiológico no se conoce la acción de estas proteínas y los posibles sustratos con las que interactúan. También se desconoce por qué la p190 posee in vitro una actividad tirosina kinasa aumentada con respecto a la p210. Kipreos y Wang (1992), encontraron que la proteína codificada por c-ABL tiene actividad citoplasmática y nuclear.

La interacción de los aminoácidos codificados por las secuencias de BCR y c-ABL no se conoce con gran exactitud, pero Witte (1993), planteó una hipótesis bastante sugestiva.

Al darse la fusión de ambos genes, la región proveniente de BCR se une a los dominios regulatorios de la proteína que tienen acción sobre la actividad tirosina kinasa, de esta forma la proteína de abl permanecería fosforilada permanentemente. Witte(1993), demostró que la proteína BCR puede unirse al dominio SH2 de proteína de c-ABL (SH2 es un dominio regulatorio de la proteína). Adicionalmente si se altera el primer exón de BCR (el único que se mantiene en p190) se logra eliminar la actividad transformadora de la proteína híbrida, en otras palabras cualquier mutación que afecte sustancialmente la secuencia codificada por BCR en la fusión de BCR-ABL, destruye la capacidad oncogénica de la proteína.

La proteína híbrida de BCR-ABL produce un efecto transformador aún no dilucidado; lo que sí está claro es que

los dos genes, BCR y c-ABL, son necesarios para transformar una célula.

## **5. METODOS EMPLEADOS PARA DETECTAR EL CROMOSOMA FILADELFIA**

La citogenética, en la mayoría de los casos, puede detectar la presencia o ausencia del cromosoma Ph', pero su eficiencia no es del 100%. Se han encontrado pacientes citogenéticamente Ph' negativo y con rearrreglos en la región MbcR (Van der Plas et al., 1989). Esta es una razón por la cual se habla más de rearrreglos en BCR, que de presencia del cromosoma Ph'. Aunque la citogenética es útil, el tiempo y costo requerido para realizar el análisis es mayor en comparación con las técnicas moleculares; que son más sensibles, eficaces y económicas. Por lo que es imperativo implementar estas técnicas.

Diversas técnicas moleculares para la detección del cromosoma Ph' con fines de diagnóstico han sido desarrolladas en los últimos 10 años:

- a) Kawasaki et al. (1988), y Dubrovic et al. (1988), utilizaron la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR en inglés) en la detección del cromosoma Ph'. La PCR se realiza a partir de un ADNc, para ello se extrae primero el ARNm, luego se convierte en ADNc por

efecto de la enzima transcriptasa reversa y finalmente se realiza la amplificación del ADNc.

b) Shtalrid et al.(1988) y Haber et al. (1990), presentaron una estrategia para detectar los puntos de ruptura en el cromosoma Ph' al usar sondas específicas para la región bcr, sin necesidad de realizar PCR.

En la LMC, la región Mbcr se halla casi siempre involucrada en el rearreglo BCR-ABL y ocurre con mayor frecuencia entre los fragmentos F1, F2 o F3 (Figura 5) (Shtalrid et al.,1988 y Haber et al.,1990). En la LLA, los puntos de ruptura se pueden localizar en el Mbcr o en mbcr (este se localiza en dirección 5' de la región bcr, en el intrón que separa a los exones 1 y 2). En la LLA de adultos, la mitad de los pacientes presentan rearreglos en la región Mbcr, por el contrario, en niños esta ocurre principalmente en la mbcr (Kurzrock et al.,1988).

Parte de la estrategia llevada a cabo por Haber, y colaboradores (1990), y Shtalrid y colegas (1988), para detectar rearreglos en BCR-ABL, consiste en minimizar los falsos negativos productos de la delección en 3', para ello usan varias enzimas de restricción y una sonda complementaria a las regiones 5' y 3' de Mbcr (figura 5). Shtalrid, y colaboradores (1988) así como también, Popenoe, y Schaefer-Rego, (1986), demostraron la existencia de frecuentes y grandes delecciones en la t(9;22); y observaron la pérdida

del segmento 3' del gen BCR, al translocarse al cromosoma 9q+. Esto genera falsos negativos en la detección de rearrreglos moleculares en MbcR, de ahí la necesidad de utilizar dos sondas, una para la región 3' y otra para la región 5'. Si se desea conocer el punto de ruptura exacto, se requiere de dos enzimas de restricción como mínimo. En el trabajo realizado por Haber et al.(1990), el 20% (13 de 68) de los casos presentaron esta delección y el uso de una sonda 3' habría imposibilitado la detección molecular del rearrreglo.

El uso de PCR en la detección de rearrreglos en BCR-ABL, aumenta notablemente la sensibilidad de la prueba, al detectar cantidades mínimas del clon afectado. En muchos casos la cantidad de células anormales no son suficientes como para ser detectadas citogenéticamente o por un análisis convencional de "Southern Blot". El usar PCR es de mucha utilidad cuando hay cantidades residuales de este clon, por ejemplo después de un trasplante de médula ósea (Radich et al.,1995, y Thompson et al.,1992). Varios investigadores desarrollaron los primeros oligonucleótidos, Kawasaki et al.(1988) y Dubrovic et al.(1988), estos sirvieron como imprimadores para detectar rearrreglos en LMC como en LLA.

Hasta ahora no se ha podido realizar PCR a partir de ADN genómico, pues la región a amplificar en el gen c-ABL es muy grande, a lo que contribuye principalmente, el tamaño del intrón que se halla entre los exones 1b y 1a (Suryanarayan et

al., 1991).. Además no existe una zona de ruptura específica (Leibowitz, 1990).

En el caso de la LLA, donde las zonas de ruptura no se confinan a la región MbcR, el análisis por electroforesis en campo variable ("pulsed field gel electrophoresis") es una forma de detectar rearrreglos en los genes BCR y c-ABL. Combinando dos sondas y dos enzimas de restricción se logra efectuar el diagnóstico (Rubin et al., 1988; Jiang et al., 1989). Esta metodología no está en uso actualmente como un método de tamizaje para el cromosoma Ph'.

Además de la t(9;22) clásica, existen una serie de variantes. En la mayoría de los casos la porción delecionada del cromosoma 22, es translocada a otro cromosoma que no es el 9. Todos los cromosomas, a excepción del Y se han visto involucrados en alguna variante descrita, la que al momento de cerrar la revisión suman unas 300. Otro tipo de variantes incluye rearrreglos complejos entre 3 cromosomas (por lo general el 9 y 22 se hallan involucrados) (Heim y Mitelman, 1991).

Combinando la hibridización in situ, con hibridaciones de Southern convencionales, Verma, y colaboradores (1989) lograron detectar y caracterizar molecularmente variantes de la translocación 9;22 en LMC. En uno de los casos se determinó un cariotipo 46,XX, t(9;17;22) (q34;q25;q11). Para todas las variantes estudiadas por ellos se detectaron rearrreglos en BCR.

En resumen, se dispone de muchas alternativas para diagnosticar el cromosoma Ph'; todas ellas presentan ventajas y desventajas a nivel técnico o de sensibilidad. Pero definitivamente la PCR, el Southern Blot o la hibridización in situ ofrecen una mejor sensibilidad que la citogenética para rearrreglos entre los genes BCR y c-ABL (cuadro 6).

**Cuadro 6. Sensibilidad de las técnicas empleadas para detectar rearrreglos en los genes BCR/c-ABL.**

Tipo de Técnica	Mínimo de células malignas necesarias para el diagnóstico
Citogenética con bandas G (*)	12-14% de células malignas
Southern Blot (**)	1-5% de células malignas
PCR	1 célula maligna en 100.000

(\*) Análisis de 20-25 metafases

(\*\*) Se emplea una sonda para regiones 5' y 3'.

Fuente: Crisan et al., 1994.

## 6. EL CROMOSOMA FILADELFIA EN LA PATOGENESIS DE LA LMC Y LLA

In vitro, tanto la P210BCR-ABL como su homóloga producida por el v-abl, son capaces de transformar una gran variedad de células del tejido hematopoyético. La presencia de v-abl ocasiona enfermedades linfoides en ratón, pero la P210BCR-ABL en la LMC es poco conocida (Daley et al., 1990).

El cromosoma Ph' en la LMC, no parece ser el causante inicial de la enfermedad, ya que se detectaron pacientes inicialmente Ph' negativos que luego de un segundo análisis

en una etapa más avanzada de la enfermedad presentaron el cromosoma Ph'. Tampoco la activación del oncogene explica todos los rasgos de este cáncer, lo cual no es nada nuevo, si se considera que el cáncer es un proceso multifactorial, que requiere varios pasos para su desarrollo (Dreazen et al., 1988). Sin embargo la capacidad transformadora de la p210 no puede negarse, existen evidencias que sugieren que es responsable de ciertos rasgos particulares en la evolución de la enfermedad. De no ser así, se podría encontrar esta mutación en otros desórdenes crónicos mieloproliferativos.

La p210BCR-ABL está involucrada en los mecanismos que inhiben la apoptosis celular. Esta idea surgió inicialmente al observarse que las células de pacientes afectados portadoras de cromosoma Ph'+ no respondían a dosis convencionales de quimioterapia. Bedi y colaboradores (1995) realizaron un estudio donde asocian la presencia de esta proteína híbrida a una baja inducción de apoptosis.

La apoptosis celular puede ser desencadenada por daños en el ADN. Se supone que la p210BCR-ABL inhibe la apoptosis al bloquear su inducción por daños en el ADN. Su modo de acción no es impedir que se genere daño en el ADN, ni tampoco lo es el alterar la tasa de reparación del ADN. De manera muy interesante encontraron que su mecanismo de acción no es dependiente de p53, pues se ocasiona el mismo efecto en líneas celulares que poseen tanto el alelo p53 silvestre, como en aquellas con el p53 mutante. Aparentemente esta



proteína híbrida detiene las células en las fases G2/M (p53 lo hace en G1).

No se conocen los mecanismos mediante los cuales p210BCR-ABL actúa, ni está claro su efecto sobre las células hematopoyéticas. Se han realizado estudios donde se presentan posibles proteínas que se unen a p210 o que son posibles sustratos de esta. Algunas de ellas son: p63fes, p160bcr, p120abl, p68paxillin, p52shc, p46shc, p67syp, p210ras-gap, p190, p62 y crkl. Todas ellas son directa o indirectamente fosforiladas por p210 (Jong et al., 1995).

#### 6.1 PRONOSTICO DE LA ENFERMEDAD SEGUN EL PUNTO DE RUPTURA EN M<sub>bcr</sub> Y EXPRESION DEL ARNm:

En la actualidad se dispone de un buen número de sondas o iniciadores para detectar todos los tipos de rearrreglos en BCR-ABL. Varias investigaciones se han realizado con el fin de determinar si el punto de ruptura se relaciona con la evolución de la enfermedad. De ser así sería de gran utilidad para el médico conocer el tipo de rearrreglo en el momento de brindar la terapia al paciente (Kantarjian et. al, 1993). Según Shtalrid et al. (1988), existe una mayor duración de la fase crónica en aquellos pacientes que sufren una ruptura en F2, con respecto a F1 y F3; esta conclusión la obtuvieron luego de tamizar el punto de ruptura en 108 pacientes. Adicionalmente estos autores siguieron la evolución de 6 pacientes desde la fase crónica hasta la crisis blástica y

sólo en uno se encontró un nuevo rearreglo. En la actualidad no se considera que rearreglos posteriores en Mbcrr puedan ocasionar la evolución a crisis blástica en el paciente afectado por LMC.

La evidencia presentada hasta ese momento sobre estudios en los puntos de ruptura y el pronóstico de la enfermedad son contradictorios. Algunos autores afirman una correlación entre el punto de ruptura y la duración de la fase crónica, pero otros no encuentran esta asociación (Kantarjian et al., 1993; Mills et al., 1991). Si se considera que el proceso cancerígeno tiene varias etapas y existen muchos otros factores que determinan o afectan el desarrollo de la enfermedad, el sitio de ruptura o mutaciones posteriores en la región rearreglada (Mbcrr) no debe ser considerado como los únicos factores oncogénicos.

Se ha estudiado recientemente a nivel pronóstico, la expresión del ARNm quimérico producto del cromosoma Ph'. Se ha observado un incremento en la cantidad de este ARNm antes de la progresión de la enfermedad. Más estudios deben realizarse antes de que estos conocimientos puedan ser empleados en la clínica (Gaiger et al., 1995).

## 7. LA LMC EN PACIENTES NO PORTADORES DEL CROMOSOMA FILADELFIA

Hay un 95% de pacientes afectados de LMC y portadores de rearrreglos en BCR/c-ABL. ¿Pero qué sucede con el 5% restante de pacientes?

Se pueden dar al menos tres explicaciones posibles: 1) un diagnóstico erróneo de LMC, 2) la LMC Ph' negativo y BCR-ABL negativo es una nueva entidad etiológica, y 3) las técnicas moleculares o citogenéticas empleadas no fueron lo suficientemente sensibles.

La clasificación errónea de LMC puede darse en la clínica, ya que aunque existen características propias para cada desorden crónico mieloproliferativo, no siempre es fácil de diferenciar un desorden crónico mieloproliferativo de una LMC.

El grupo de pacientes Ph' negativo es heterogéneo. Algunos poseen rasgos clínicos típicos de una LMC y otros se asemejan más a una LMC que a otra entidad patológica (Costello et al., 1995). Dado el número tan bajo de pacientes internacionalmente estudiados hasta la fecha, se hace difícil de definir si existe la posibilidad de que la LMC Ph' negativo y Bcr/c-ABL negativo sea una entidad patológica distinta.

Una posible explicación de este fenómeno podría ser el descubrimiento reciente de sitios de ruptura fuera del Mbcr para la LMC. Nakamura et al. (1993), y Chen et al. (1989),

describieron la presencia de rearrreglos en el primer intrón de BCR en 21 pacientes afectados por leucemias agudas y 1 paciente de LMC. Todos ellos fueron Ph'+. Las sondas para detectar rearrreglos entre Mbcr y c-ABL son incapaces de detectar un rearrreglo en este primer intrón de BCR. Si sólo se emplea esta sonda y no se realiza un examen citogenético, es posible dar con falso negativo. Inclusive muchos de los pacientes diagnosticados Ph' negativo, son Mbcr/ABL positivos, así que es posible que pacientes con rearrreglos en este primer intrón, puedan ser Ph' negativos a nivel citogenético.

La presencia de otros sitios de ruptura para el gen BCR nos lleva a preguntarnos, si los pacientes diagnosticados como Ph' negativos y BCR/ABL negativo carecen realmente de un rearrreglo entre estos dos genes, esto por cuanto podrían existir algunos puntos de ruptura atípicos en BCR (Saglio et al., 1990).

Kurzock y Talpaz (1991) al estudiar 11 pacientes Mbcr/ABL negativos en LMC, encontraron que las fases crónicas de estos pacientes y los Mbcr/ABL positivos de LMC son similares. Por otra parte, la progresión de la enfermedad mostró diferencias: en los pacientes Mbcr/ABL positivos se llega a una crisis blástica, mientras que en los pacientes Mbcr/ABL negativos la crisis blástica no ocurre; en ellos la progresión de la enfermedad está caracterizada por un incremento en la leucemia, profunda leucocitosis,

organomegalia, infiltrados medulares y una eventual falla de la médula ósea (hay anemia y trombocitemia con conteos de blastos inferiores al 20%).

En conclusión este grupo de pacientes representa un grupo minoritario, pero interesante de investigar, pues en ellos podrían encontrarse puntos de ruptura atípicos o la acción de otros oncogenes distintos a c-ABL o al gen BCR. Una mala clasificación de estos pacientes y las limitaciones propias de cada técnica pueden estar generando este 5% de pacientes Ph' negativo y BCR/ABL negativos.

## 8. ESTUDIOS MOLECULARES DE LA LMC EN OTROS GENES

Desde el descubrimiento del cromosoma Ph', en 1960 por Nowell y Hugerford, y dado el avance de la citogenética, se han logrado identificar además del cromosoma Ph', una serie de aberraciones cromosómicas secundarias, con un patrón no azaroso (figura 6). La ganancia de un cromosoma 8 es característica de la evolución del cariotipo. En este cromosoma se localiza el oncogene c-myc (8q34). Su amplificación así como la elevación en la expresión de su ARNm se ha visto aumentada en estados avanzados de la enfermedad (Kurzrock et al. 1988). También la presencia del isocromosoma 17q, acarrea la pérdida del gen supresor de tumores p53 (se localiza en 17p). Fainstein y colaboradores (1991), encontraron asociación en un 25% de los casos entre la progresión de la enfermedad con alteraciones en el gen p53.

Foti y colegas (1991), estudiaron un paciente con sondas para el gen p53. Durante la fase crónica no se detectaron anormalidades en el gen, pero cuando el paciente entró en fase acelerada se logró determinar, por secuenciación, la aparición de una secuencia mutante. Lo más interesante de este estudio fue que cuando se logró reinducir al paciente a fase crónica la mutación desapareció.

En otro estudio realizado por Ahuja et al. (1991), se encontraron mutaciones y deleciones de p53 en aquellos pacientes que se hallaban en crisis blástica. Nakai y colaboradores (1995) concluyeron que existe asociación entre la pérdida de p53 y la progresión de la LMC. De manera contradictoria Gaidano y colaboradores (1994), al analizar 26 pacientes MbcR/ABL+ de LMC en crisis blástica y los cuales fueron tamizados para buscar mutaciones en los genes supresores de tumores p53 y RB1, sólo en un caso se detectó una mutación para p53.

El estudio de otros oncogenes, tales como c-MYC y N-ras ha sido efectuado buscando mutaciones que acompañen la evolución de la fase crónica a crisis blástica en la LMC (Liu et al., 1988). Además Ahuja et al. (1991) encontraron que sólo ocasionalmente el c-Ras y c-MYC sufren mutaciones (además del ya citado gen p53).

De todos los oncogenes y genes supresores de tumores estudiados a nivel molecular en la LMC, el p53 (después de bcr y c-ABL) es el que ha recibido mayor atención. Se cree

que este gen tiene influencia sobre la progresión de la enfermedad a la fase aguda. Todavía se investiga la posibilidad de otro gen, que se supone se localiza en 17p actúe en conjunto con p53 en la progresión de la enfermedad.

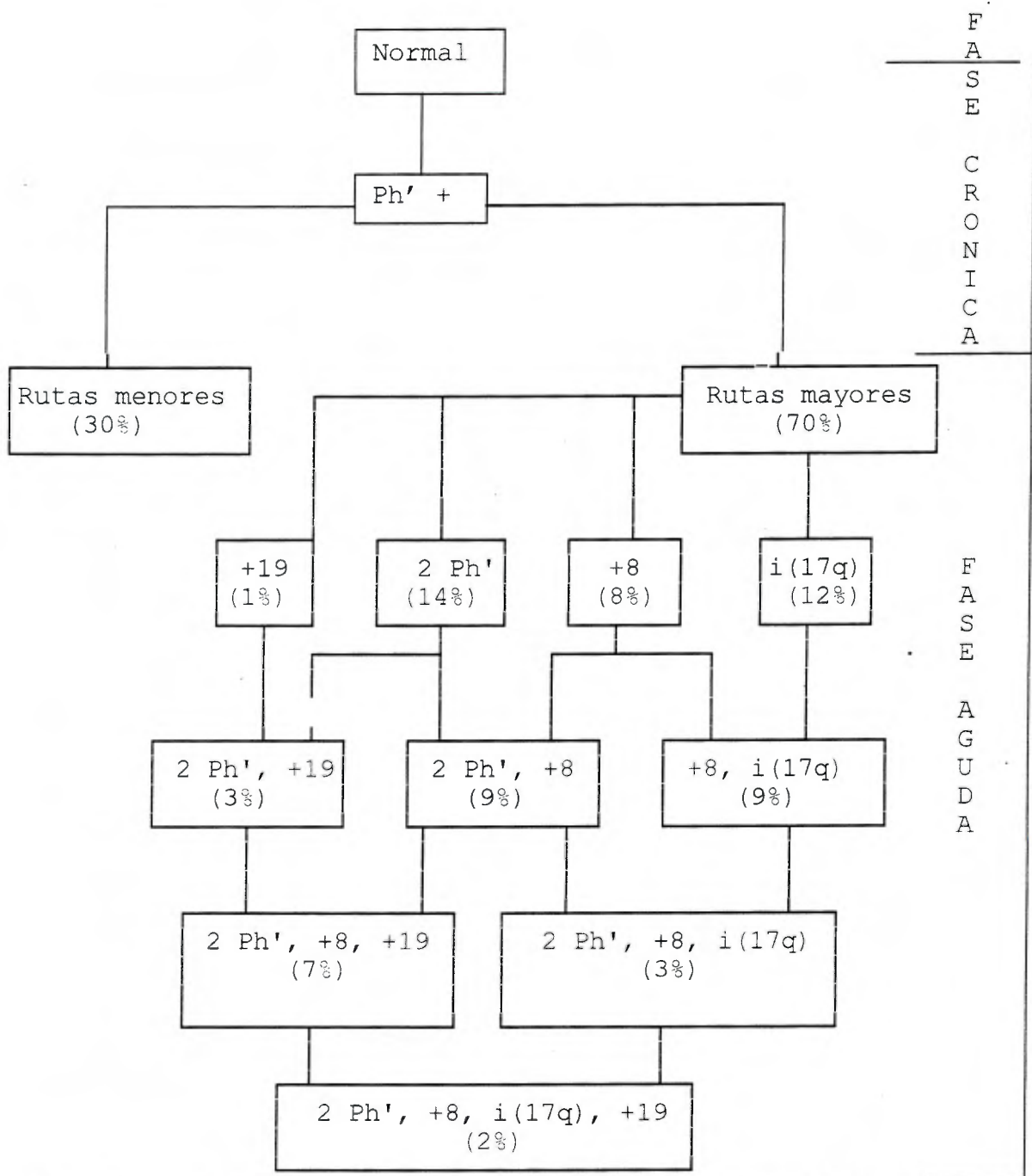


Figura 6. Vías comunes en la evolución citogenética de la LMC.

Fuente : Heim y Mitelman, 1991.

Se han buscado marcadores genéticos que sirvan para correlacionar el estado clínico del paciente. El gen Calcitonina presenta un patrón anormal de metilación cuando la enfermedad progresa en las leucemias agudas, en los linfomas y la LMC. Los procesos de metilación en la secuencia de ADN tiene efectos regulatorios y es interesante observar que en la LMC durante la fase crónica la metilación es normal, pero durante la fase aguda aparecen patrones de hipermetilación anormales (Malinen et al., 1991; Nelkin et al., 1991).

La t(9;22) es un paso para desarrollar la enfermedad, pero la activación de otros oncogenes y factores ambientales aún no identificados es importante para el desarrollo del proceso neoplásico (Popenoe et al., 1986, Kurzrock et al., 1988). También el hallazgo de nuevos marcadores que sirvan para identificar el estado clínico del paciente serán de gran ayuda para mejorar los tratamientos.

## **9. IMPORTANCIA DE LA DETECCION DEL CROMOSOMA**

### **FILADELFIA**

La detección y monitoreo de la presencia o ausencia del cromosoma Ph' es importante en el tratamiento del paciente. El uso de interferón-alfa-recombinante (INF-a-R) causa la supresión del cromosoma Ph' en la LMC. Se han obtenido respuestas favorables en el 75% (33 de 45) de los pacientes Ph'+, cuando estos eran detectados en etapas tempranas de la



enfermedad. De estos 33 pacientes 11 (33%) obtuvieron una remisión citogenética completa (Wetzler y Talpaz, 1992). La combinación de técnicas moleculares y citogenéticas para detectar la presencia del cromosoma Ph' y su desaparición es de gran utilidad en el tratamiento con INF-a-R. Sólo de esta forma se determina el éxito o fracaso de la terapia.

En Costa Rica la terapia con INF-a-R no está en uso por limitaciones económicas. Los hematólogos de nuestros hospitales conocen las grandes ventajas que posee este tratamiento con respecto al tratamiento convencional a base de bulsulfán y otras drogas. Es sólo cuestión de tiempo para que surja su aplicación en nuestro medio.

En los trasplantes de médula ósea (en el hospital San Juan de Dios se han realizado dos y se prevee continuar realizándolos) el uso de las técnicas citogenéticas y moleculares permiten evaluar la presencia o no del clon afectado por esta mutación.

La presencia del cromosoma Ph', como se discutió antes, está asociada únicamente a ciertos tipos de leucemias, por lo que su aparición en los síndromes mielodisplásicos, obliga a reestudiar el diagnóstico del paciente. En otros casos la detección de otro cromosoma Ph' (los dos cromosomas 22 sufren rearrreglos en BCR) se asocia con estados avanzados de la enfermedad. Más aún, los desórdenes crónicos mieloproliferativos (cuadro 2) en etapas tempranas son difíciles de distinguir de una mieloproliferación, como son

las eritrocitosis, las leucocitosis y las trombocitosis. Por ello el detectar el cromosoma Ph' es un indicador inequívoco de una LMC, y sirve así para descartar los otros tipos de desórdenes crónicos mieloproliferativos (Kreipe et al.,1992).

Otro ejemplo lo brinda la LLA en niños, donde el tratamiento convencional no es eficaz en aquellos niños Ph'+, por lo que la detección del mismo permite el uso de terapias alternativas como el trasplante de médula ósea para combatir la enfermedad (Suryanarayan et al. 1991).

Se discutió anteriormente, que el cromosoma Ph' se halla en el 95% de los casos de LMC. Estos datos en su gran mayoría fueron detectados citogenéticamente y se han encontrado pacientes Ph' negativo que sí presentan el rearrreglo BCR-ABL, con lo cual la incidencia de rearrreglos en bcr puede aumentar. Por ejemplo, en la LLA, Maurer et al.(1991), informan una incidencia superior a la esperada en rearrreglos BCR-ABL (de 43% en adultos) al realizar diagnóstico molecular por PCR. Estos datos fueron debatidos por Saglio y Guerrazio (1991), sin embargo su crítica se dirige al muestreo , más que al poder de diagnóstico de la técnica.

## **10. TAMIZAJE DEL CROMOSOMA FILADELFIA, SU APLICACION E IMPORTANCIA EN COSTA RICA**

En nuestro país la incidencia de leucemias mieloides en los años de 1984 a 1990 fue: en mujeres 2.0 por 100.000 habitantes y en hombres 2.5 por 100.000 habitantes (tasas

ajustadas a la población mundial). En total se registraron 354 nuevos casos para ambos sexos durante ese período (Sierra et al., 1995).

La LMC y los demás SMP se caracterizan por una evolución lenta (varios años en muchos casos). Esto ofrece las condiciones necesarias para brindar un tratamiento al paciente. En la actualidad el tratamiento con interferón o el trasplante de médula ósea son los únicos tratamientos que erradican el cromosoma Ph'. En la LMC la eliminación de esta mutación determina el éxito o el fracaso del tratamiento, por ello el monitoreo de esta mutación es un factor clave.

Al igual que en muchos otros tipos de cáncer la aparición de mutaciones y de otros marcadores tumorales preceden a los síntomas clínicos; de esta forma los hematólogos pueden determinar el estado del paciente y suministrar, de forma racional los niveles de agentes antineoplásicos.

Durante varios años (1990-1993) la investigadora Isabel Castro, del INISA (UCR) llevó a cabo un proyecto para estudiar aberraciones cromosómicas en pacientes leucémicos. En la actualidad el Hospital de Niños posee un laboratorio donde se realizan exámenes citogenéticos para este fin, aunque su cobertura no alcanza a otros hospitales.

La detección y monitoreo de mutaciones complementa en gran medida el diagnóstico y terapia convencional. Sus alcances son en muchos casos concluyentes, tal es el caso del

cromosoma Ph'. El tamizaje de esta mutación debería realizarse en todos los pacientes afectados por una posible LLA, LMC y SMP; pues como ya se mencionó es un acompañante importante en las nuevas terapias. Si en Costa Rica se desea desarrollar el tratamiento y el diagnóstico de las leucemias, se debe incursionar en citometría de flujo, en citogenética y en análisis moleculares. Los dos primeros ya se han comenzado a brindar, es ahora el momento de la biología molecular; fundamentalmente el tamizaje del cromosoma Ph'.

## 11. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### 11.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de este trabajo consistió en aportar nuevos elementos al diagnóstico existente en el país. Es por ello que se buscó desarrollar técnicas moleculares para diagnosticar la presencia del cromosoma Ph'. Estas son necesarias e indispensables si se desea emplear las nuevas terapias para combatir las leucemias mieloides y SMP, en nuestro país.

### 11.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1) Implementar las técnicas de "Southern Blot" para genes de copia única por métodos radioactivos y no radioactivos en los laboratorios del INISA.
- 2) Evaluar el uso de métodos radioactivos y no radioactivos para el tamizaje del cromosoma Ph'. Se busca determinar cuál de ellos puede ser más factible de utilizar en los laboratorios de la Caja Costarricense del Seguro Social.
- 3) Informar en forma oportuna a los médicos de los resultados obtenidos, con el fin de que evalúen el diagnóstico clínico a la luz de los resultados moleculares.

## MATERIALES Y METODOS

### 1. POBLACION DE ESTUDIO:

Durante el periodo comprendido entre Enero de 1994 y Noviembre de 1995 se tomaron muestras de sangre periférica de 25 pacientes provenientes del Servicio de Hemato-Oncología del Hospital San Juan de Dios. Para este mismo periodo el servicio de Hemato-Oncología del Hospital México envió muestras de 16 pacientes (cuadro 7).

Cuadro 7. Total de muestras recibidas agrupadas según el diagnóstico clínico con el cual fueron referidas.

Diagnóstico Clínico	Número de Pacientes Referidos
Leucemia Mieloide Crónica	30
Compatibles como LMC	2
Síndromes Mieloproliferativos	7
Síndromes Mielodisplásicos	2

### 2. PREPARACION DE LAS MUESTRAS PARA EL ANALISIS MOLECULAR

#### 2.1 TOMA DE MUESTRAS:

Se obtuvo ADN de pacientes afectados por LMC o por alguna otra enfermedad crónica mieloproliferativa. Los pacientes afectados por otra enfermedad distinta a LMC, fueron referidos por ser casos atípicos, en los cuales un tamizaje para cromosoma Ph' eventualmente podría ayudar a orientar el diagnóstico clínico (cuadro 7).

A cada paciente se le tomaron 5ml de sangre periférica. Se empleó ACD como anticoagulante.

## 2.2 EXTRACCION DE ADN:

Las muestras se incubaron a 37°C con proteinasa K, por 12 horas. Luego se hizo la extracción del ADN según el procedimiento común de fenol:cloroformo (Sambrook et al., 1989). El ADN se precipitó con 2 volúmenes de etanol y 10ul de NaCl 5M.

## 2.3 DIGESTION DEL ADN CON ENZIMA DE RESTRICCIÓN *Bgl II*:

Se tomaron 15ug de ADN y se sometieron a digestión con la enzima de restricción *Bgl II*. Se emplearon 5 unidades de enzima por cada ug de ADN. Todas las digestiones se llevaron a cabo con ADN de alto peso molecular y siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante de la enzima, por 12 horas y a 37°C. Para verificar la calidad de la digestión se preparó un minigel al 0.7% de agarosa donde se corrió 5ul del producto de la digestión. Luego al adicionar bromuro de etidio al gel se realizó una inspección visual de la digestión de ADN, para ello se empleó una lámpara de luz ultravioleta.

## 2.4 ELECTROFORESIS:

Todo el ADN (15ug) completamente digerido se cargó en geles de agarosa al 0.7%. Se dejó corriendo la electroforesis

a 50mV por 10 horas. Se cargó además el marcador de peso molecular del bacteriófago Lambda cortado con la enzima de restricción *Hind III*. Se considera que la electroforesis es adecuada si los fragmentos de 9.4Kb y 6.6Kb se separan al menos 1cm, y la última banda del marcador de peso molecular (0.56 Kb) ha migrado entre 13 y 18 cm.

## 2.5 TRANSFERENCIA DEL ADN A UNA MEMBRANA DE NYLON "SOUTHERN BLOT":

- 1) El gel se sometió a un proceso de depurinización por 6 minutos con HCL 0.25M. Aunque este proceso se recomienda para geles donde se esperan RFLP superiores a 10Kb, se empleó debido a que en estos pacientes se presentan muchos RFLP anormales en rangos superiores a los 6.6 Kb, hasta 10Kb inclusive.
- 2) Se lavó el gel con agua destilada (500ml) en dos oportunidades (2 minutos cada vez).
- 3) Se añadieron 500ml de solución desnaturalizante (0.5M NaOH y 1.5 NaCl). Se dejó por 25 minutos. Luego se repitió este paso con solución fresca por 25 minutos.
- 4) Se colocó el gel en 500ml de solución neutralizante (0.5M Tris HCL y 1.5M NaCl), durante 20 minutos. Luego se cambió la solución y se repitió de nuevo este paso.
- 5) Se procedió a montar la transferencia según procedimientos ya descritos (Sambrook et al., 1989).



6) Se dejó 24 horas. A las 12 horas de transferencia se cambiaron las toallas absorbentes superiores, se adicionó un poco de solución 10X SSC y se dejó proseguir la transferencia.

7) La membrana de nylon se lavó una vez con 5X SCC para remover cualquier fragmento de agarosa y se horneó por 1 hora a 80°C. Luego se guardó a 4°C en una bolsa plástica sellada para evitar que se humedezca.

8) Es conveniente teñir el gel con bromuro de etidio para observar la calidad de la transferencia. No debe observarse ADN en fragmentos inferiores a 4.4Kb.

### **3. HIBRIDIZACION DE LA MEMBRANA CON LA SONDA**

#### **TRANSPROBE-1 POR METODOS RADIOACTIVOS:**

##### **3.1 DESCRIPCIÓN DE LA SONDA:**

La sonda Transprobe-1 (Oncogene Science, Inc.), es también conocida como UBCR o p1/bcr-3. Esta hibrida sobre toda la región del Mbcr, a excepción del fragmento de 1,6Kb interno que es delimitado por los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción *Hind III* (figura 6).

##### **3.2 MARCAJE DE LA SONDA CON P32:**

Se empleó el Sistema de Marcaje "Megaprimer DNA labelling system" (Amersham, Life Sciences). El método que emplea es conocido como "random nanomer primer labelling"

(Sambrook et al., 1989). El isótopo empleado fué alfa-dCTP32, 3000 Ci/mmol.

### 3.2 PROCEDIMIENTO PARA HIBRIDAR LA MEMBRANA DE NYLON

#### CON SONDAS MARCADAS CON P32:

- 1) La membrana se sumergió en 300ml de 2xSSC por 2 minutos (Ver apéndice 1).
- 2) Se colocó en un tubo de hibridizar. Se agregaron 50ml de solución de prehibridar. Se incubó a 65°C por 2-3 horas.
- 3) Se descartó la solución. Se adicionó 50ml de solución de hibridación con la sonda (100ng). La sonda se calentó a 100°C por 5 minutos, para desnaturalizarla y luego se colocó en hielo.
- 4) Se añadió a la membrana esta solución de hibridación con la sonda. Deben ser de 80-150ul de solución por cm<sup>2</sup> de membrana.
- 5) Se incubó a 65°C por toda la noche.
- 6) Se colocó la membrana en un contenedor con Solución de Lavado 1 (100ml). Este proceso se hizo a 65°C por 30 minutos (ver apéndice 1).
- 8) Se repitió este paso 2 veces.
- 9) Se colocó la membrana con la Solución de Lavado 2 (100ml) previamente precalentada a 65°C, por 30 minutos.
- 10) La membrana se transfirió a un contenedor con Solución de Lavado 1. Es importante asegurarse de no encontrar agregados de BSA. Si es así removerlos.

11) De nuevo se colocó la membrana a temperatura ambiente con 2xSSC por 5 minutos.

12) La membrana se secó 1 a 2 horas en papel Whatman 3MM, a temperatura ambiente.

13) Se expuso la membrana en un cassette de exposición con película para rayos X a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 3 días bajo el efecto de una pantalla intensificante.

14) Revelado de la película:

a) 5 minutos en revelador Kodak GBX.

b) 1 minuto en ácido acético al 3%.

c) 10 minutos en fijador GBX.

d) 15 minutos en agua.

e) Se secó a temperatura ambiente.

#### **4. HIBRIDIZACION DE LA MEMBRANA CON SONDA**

##### **TRANSPROBE-1 POR METODOS NO RADIOACTIVOS:**

##### **4.1 MARCAJE DE ADN-SISTEMA GENIUS "RANDOM PRIMED":**

Se siguió el procedimiento recomendado por la casa fabricante Boehringer Mannheim, "Genius 2 DNA labelling Kit".

##### **4.2 PREHIBRIDIZACION E HIBRIDIZACION:**

1) Se prepararon 5ml de solución de prehibridizar y se añadieron al filtro. Se procedió a incubar 2 horas a  $65^{\circ}\text{C}$ .

(Ver el apéndice 2).

- 2) La solución para prehibridizar se descartó.
- 3) Se desnaturalizó la sonda por 10 minutos a 100°C.
- 4) Se añadió a la solución de hibridizar (5ml) todo el contenido del tubo de microcentrífuga con la sonda ya marcada.
- 5) Se procedió a incubar por toda la noche la membrana a 65°C.
- 6) La membrana se lavó 2 veces con solución 2X precalentada a 65°C por 5 minutos.
- 7) Se lavó la membrana con solución 0.5X precalentada a 65° por 15 minutos y se repitió nuevamente.

#### 4.3 DETECCION DE LOS ACIDOS NUCLEICOS CON DIGOXIGENINA

##### Y LUMI-PHOS 530:

- 1) Se equilibró la membrana con el buffer filtrado Genius 1 por 1min.
- 2) Se dejó que el Lumi-Phos 530 alcance la temperatura ambiente (no usar frío).
- 3) Se utilizó un recipiente limpio y sobre el se colocó la membrana en contacto con la solución de Genius buffer 2, por 24 horas, en agitación constante.
- 4) Se diluyó la antidigoxigenina-fosfatasa alcalina 1:500 en nuevo Genius buffer 2, a una concentración final de 150mU/ml. Se mezcló suavemente.
- 5) Se descartó la otra solución donde estaba la membrana y se adicionó la solución que contiene Genius Buffer 2 y anti-DIG-alcalina fosfatasa. Se incubó por 30 minutos.

6) Se desechó la solución anterior. Se cambió la membrana a un recipiente limpio y se adicionó Genius buffer 1. Se dejó por 15 minutos. Este paso se repitió dos veces.

7) Se desechó la solución anterior y se adicionó Genius buffer 3.

8) Se colocó la membrana entre dos acetatos. Se adicionó Lumi-Phos 530 a la superficie superior de la membrana, 0.5ml por 100cm<sup>2</sup>. Las gotas se dejaron caer espaciadamente.

9) Se dejó humedecer la membrana. Se colocó la tapa superior del acetato sobre membrana y suavemente se eliminaron las burbujas de aire que pudieron quedar.

10) Se colocó la membrana en contacto con una película de rayos X. Se expuso por 2 horas.

11) Se procedió a revelar el film de rayos X (mismo procedimiento descrito para la procesos radioactivos).

## RESULTADOS

Durante el período comprendido entre enero de 1994 y noviembre de 1995 se tomaron muestras de sangre periférica de 25 pacientes provenientes del Servicio de Hemato-Oncología del Hospital San Juan de Dios. Para este mismo período el servicio de Hemato-Oncología del Hospital México envió muestras de 16 pacientes. De todos los pacientes se tomaron 5ml de sangre periférica. En los cuadros 8 y 9 se detallan los pacientes analizados en ambos hospitales, el resultado obtenido y el diagnóstico clínico con el cual fueron referidos.

En total fueron sometidos a análisis 41 pacientes, de ellos 32 (78%) tenían como diagnóstico clínico LMC o compatible con esta leucemia (Cuadros 8 y 9). Los demás pacientes, 9 (22%) poseían cuadros clínicos incluidos dentro de los desórdenes crónicos mieloproliferativos (síndromes mieloproliferativos, SMP) y síndromes mielodisplásicos (SMD). Estos últimos fueron remitidos por existir características clínicas que hacían dudar a los hematólogos de la causa de su posible dolencia.

Del subgrupo de pacientes afectados por LMC, en 28 casos se logró realizar un análisis satisfactorio con la sonda Transprobe-1 y la enzima de restricción *Bgl II*. En 20 (71%) casos se encontró la presencia de al menos un RFLP que indica la presencia del rearreglo entre los genes *c-ABL* y *BCR*

(cuadros 8 y 9;). Para 8 (29%) pacientes sólo se detectaron los RFLP normales, indicativo de un posible cromosoma Ph' negativo. De estos 8 casos negativos para rearrreglos entre BCR-ABL, en 2 el diagnóstico de LMC es dudoso o es compatible con algún otro desorden crónico mieloproliferativo. Otro paciente de estos 8 posibles Ph' negativo había sido sometido a un trasplante de médula ósea, previo a la toma de la muestra.

En las figuras 8 y 9 se presentan las zonas en MbcR donde hibrida la sonda Transprobe-1. En personas normales se generan 3 RFLP, de 4.8Kb, de 2.3Kb y de 1.1Kb. Cuando se ha sufrido un rearrreglo molecular entre los genes MbcR/c-ABL se generan RFLP normales y anormales. Los fragmentos anormales pueden tener en teoría tamaños superiores a 4.8 Kb o menores a 1.1 Kb. En el estudio realizado, los fragmentos anormales generados fueron superiores a 1.1Kb. En la figura 10 se observa una representación del patrón de RFLP normales en el caso de un paciente Ph' negativo y otro cuando la persona es portadora del cromosoma Ph'+. En la figura 11 se tiene una fotografía del resultado obtenido al aplicar P32 como sustancia para marcar la sonda Transprobe-1. La presencia de RFLP anormales es variada, hay de alto y bajo peso molecular, así como uno o dos RFLP anormales.

De los 9 pacientes no clasificados dentro de LMC, en 7 se realizaron análisis moleculares. En 3 casos se observó la presencia de RFLP distintos a los normales y se catalogaron como portadores del cromosoma Filadelfia. Los 4 restantes presentaron RFLP normales.

Cuadro 8. Pacientes referidos por el Hospital San Juan de Dios, el diagnóstico clínico con el cual fueron enviados y el resultado obtenido.

Código de paciente	Diagnóstico clínico	RFLP normales (Kb)	RFLP anormales (Kb)	Resultado	Métodos utilizados
SJD1	LMC	4.8/2.3/1.1	3.0	Ph'+	R
SJD2	AR	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
SJD3	LMC	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
SJD4	LMC	4.8/2.3/1.1	9.4	Ph'+	R/DIG
SJD6	LMC	4.8/2.3/1.1	7.5/5.0	Ph'+	R
SJD7	SMP	4.8/2.3/1.1	7.0/4.0	Ph'+	R
SJD8	LMC	4.8/2.3/1.1	7.5	Ph'+	R
SJD12	LMC	4.8/2.3/1.1	2.0	Ph'+	R
SJD13	LMC	4.8/2.3/1.1	7.0	Ph'+	R
SJD14	LMC	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
SJD15	LMC	4.8/2.3/1.1	4.9	Ph'+	R/DIG
SJD16	LMC	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
SJD18	LMC	1.1	3.0	Ph'+	R/DIG
SJD19	LMC	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
SJD20	LMC	4.8/2.3/1.1	1.8	Ph'+	R/DIG
SJD21	LMC?	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
SJD22	LMC	4.8/2.3/1.1	4.9	Ph'+	R
SJD23	TE	4.8/2.3/1.1	3.0	Ph'+	R
SJD24	LMC	4.8/2.3/1.1	4.4/4.6	Ph'+	R
SJD25	LMC?	4.8/2.3/1.1	4.6	Ph'+	R

Ph' + : Filadelfia Positivo  
 Ph' - : Filadelfia Negativo  
 ? : Hay duda del diagnóstico clínico  
 --- : Ausencia de RFLP anormales  
 R : Detección por métodos radioactivo (P32)  
 DIG : Detección por métodos no radioactivos (Digoxigenina)



Cuadro 9. Pacientes referidos por el Hospital México, diagnóstico clínico a la fecha del estudio y el resultado obtenido al usar la endonucleasa *Bgl II* .

Código de paciente	Diagnóstico clínico	RFLP normales Kb	RFLP anormales Kb	Resultado	Métodos utilizados
P156SP	LMC	4.8/2.3/1.1	6.6	Ph'+	R/DIG
P185sp	LMC	4.8/2.3/1.1	4.0	Ph'+	R/DIG
P190SP	LMC	4.8/2.3/1.1	6.0	Ph'+	R/DIG
P1M95	SMD VS. LMC	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
P2M95	Sind.Eosin.*	4.8/2.3/1.1	---	Ph'-	R
P3M95	LMC	4.8/2.3/1.1	6.0/2.0	Ph'+	R
P4M95	LMC	4.8/2.3/1.1	----	Ph'-	R
P6M95	LMC	4.8/2.3/1.1	9.0/15.0	Ph'+	R
P8M95	LMC	4.8/2.3/1.1	4.0	Ph'+	R
P10M95	LMC	4.8/2.3/1.1	----	Ph'-	R
P11M95	LMC	4.8/2.3/1.1	2.0	Ph'+	R
P12M95	SMP	4.8/2.3/1.1	9.4	Ph'+	R
P14M95	LMC	4.8/2.3/1.1	----	Ph'-	R
P15M95	LMC	4.8/2.3/1.1	3.0	Ph'+	R
P16M95	SMP	4.8/2.3/1.1	----	Ph'-	R

Ph'+ : Cromosoma Filadelfia positivo  
 Ph'- : Cromosoma Filadelfia negativo  
 \* : Síndrome Eosinofílico  
 --- : Ausencia de RFLP anormales  
 R : Método radioactivo (P32)  
 DIG : Método no radioactivo (Digoxigenina)

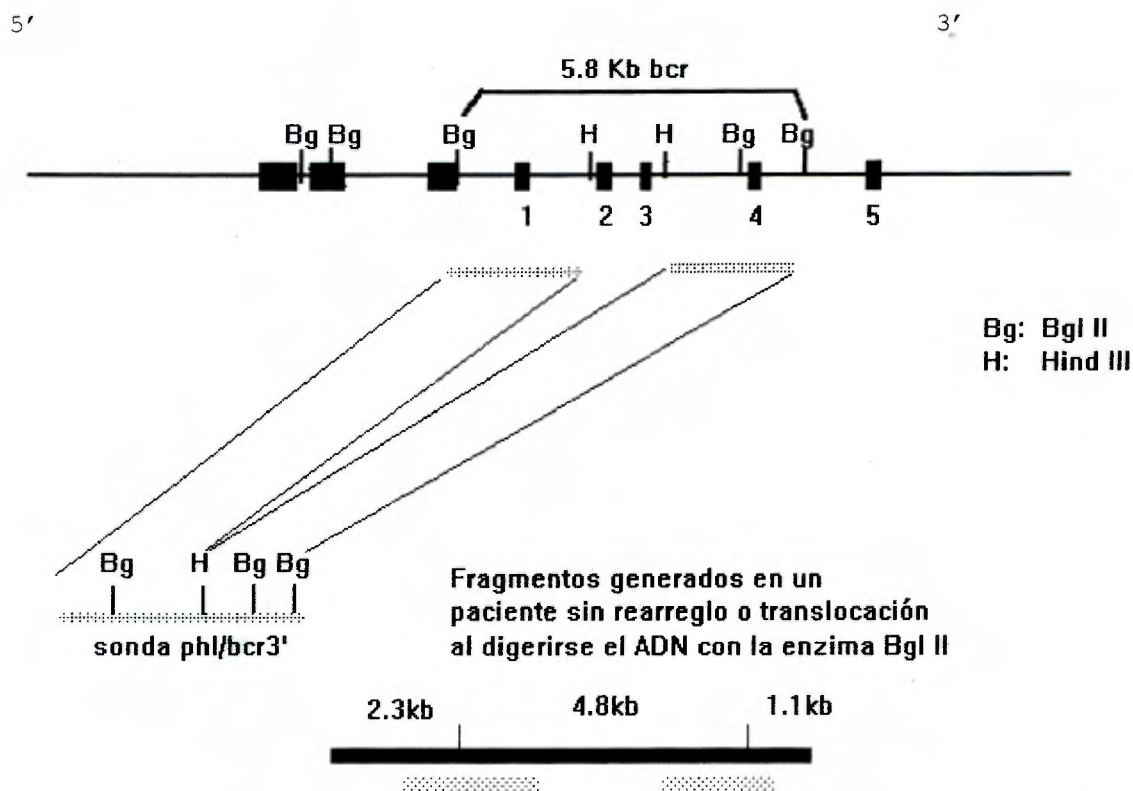


Figura 7. Mapa de restricción parcial de la región MbcR. En ella se representan los puntos de corte de las enzimas de restricción *Bgl II* e *Hind III*, así como las zonas donde hibrida la sonda phl/bcr3', también conocida como UBCR o Transprobe-1.

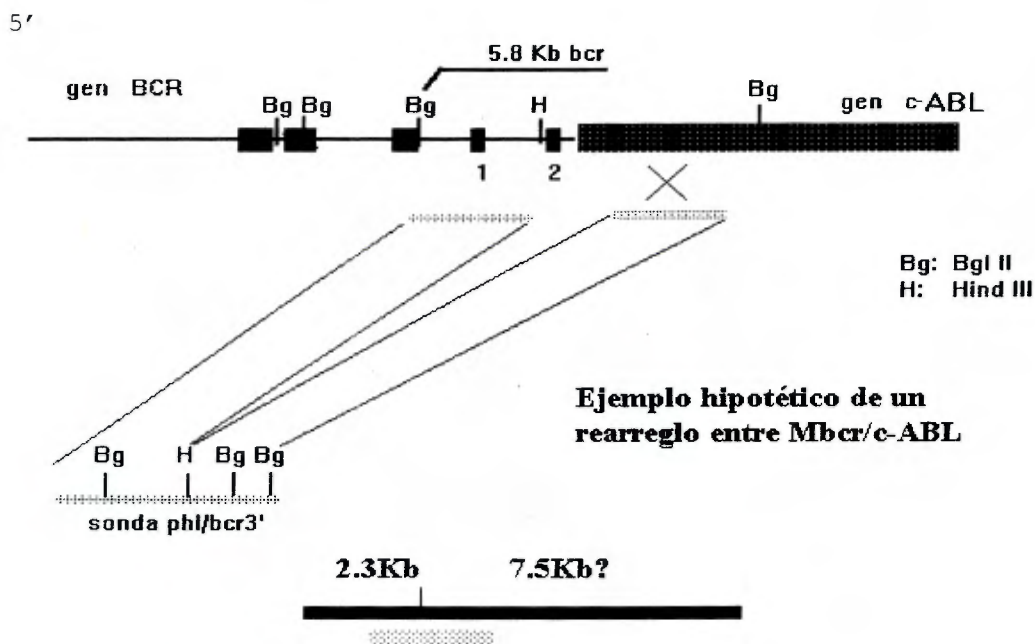


Figura 8. Ejemplo hipotético de un posible tipo de rearreglo molecular entre los genes BCR y c-ABL. El rearreglo se da en la región conocida como Mbcrc y se genera en este caso un RFLP anormal de 7.5 Kb.

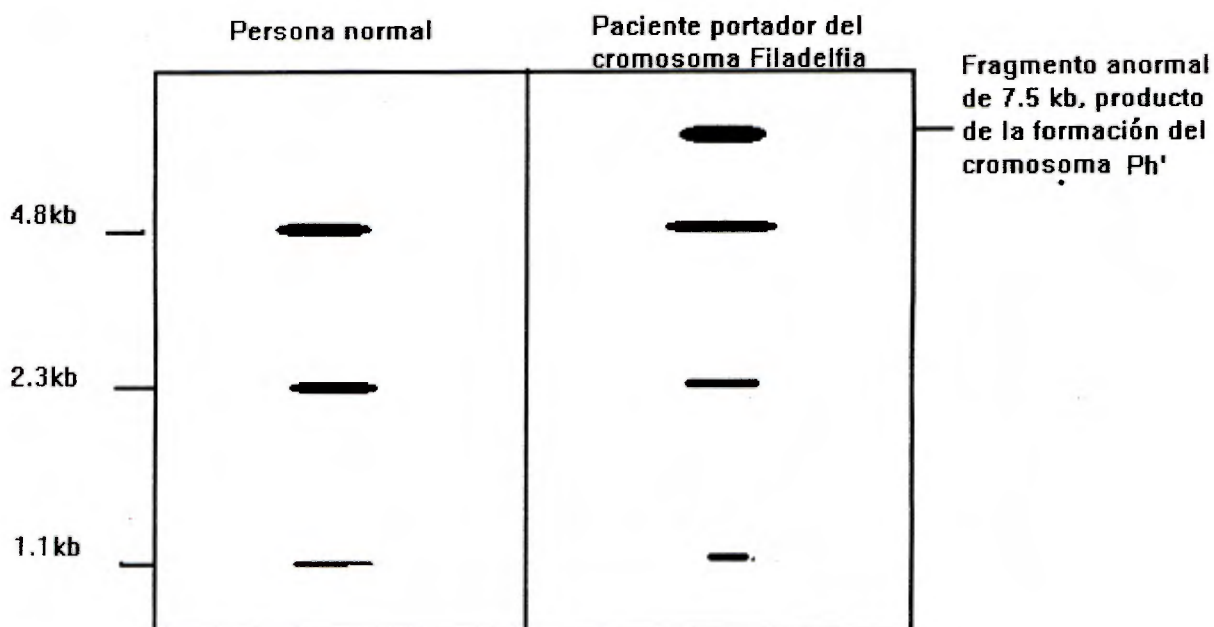


Figura 9. RFLPs generados en un paciente normal y en otro portador del rearrreglo entre los genes BCR y c-ABL. Estos RFLPs se presentan si se digiere el ADN con la endonucleasa *Bgl II*. En los pacientes portadores de un rearrreglo se presenta RFLP anormales de gran variedad de tamaños y pueden ser uno, dos o tres.

Como se puede observar en los cuadros 8 y 9, todos los pacientes fueron analizados por métodos radioactivos y sólo en siete de ellos se emplearon técnicas no radioactivas. La aplicación de dos metodologías distintas se justificó en la evaluación de ambas, con el fin de valorar cual de ellas puede ser más eficiente y fácil de realizar.

En los siete casos analizados por ambas metodologías los resultados fueron los mismos, aunque la intensidad de las señales de los RFLP fue ligeramente menor al emplearse digoxigenina. En la figura 11 se observa el patrón de RFLP normales y anormales generados al usar la enzima Bgl II e hibridar por métodos no radioactivos y radioactivos. Los ADN de la figura 11 son los mismos para el paciente Ph' positivo y el paciente Ph' negativo. Como se puede observar la intensidad de las bandas es superior para el método radioactivo, pero no por ello dejan de ser visibles en el método no radioactivo.

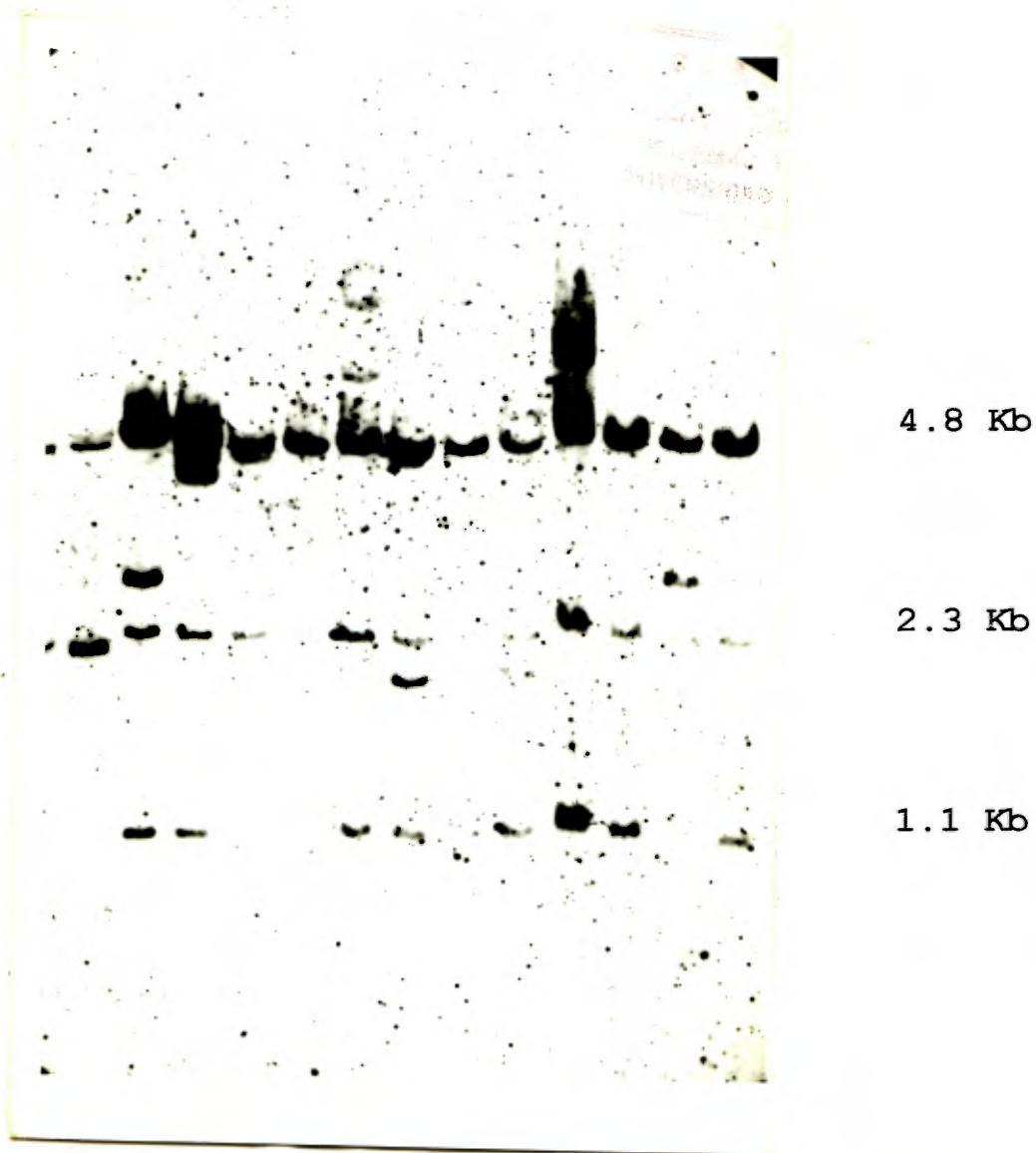


Figura 10. Autoradiografía obtenida al emplear la sonda denominada Transprobe-1 y marcada con P32. Los RFLP normales son de 4.8 Kb, 2.3 Kb y 1.1 Kb. Cualquier RFLP de tamaño diferente a los citados anteriormente indican un rearrreglo entre los genes *Mbcr/c-ABL*. Todos los ADN fueron digeridos con la enzima de restricción *Bgl* II y se utilizó 15ug de ADN.

METODO RADIOACTIVO (P32)

METODO NO RADIOACTIVO (Digoxigenina)

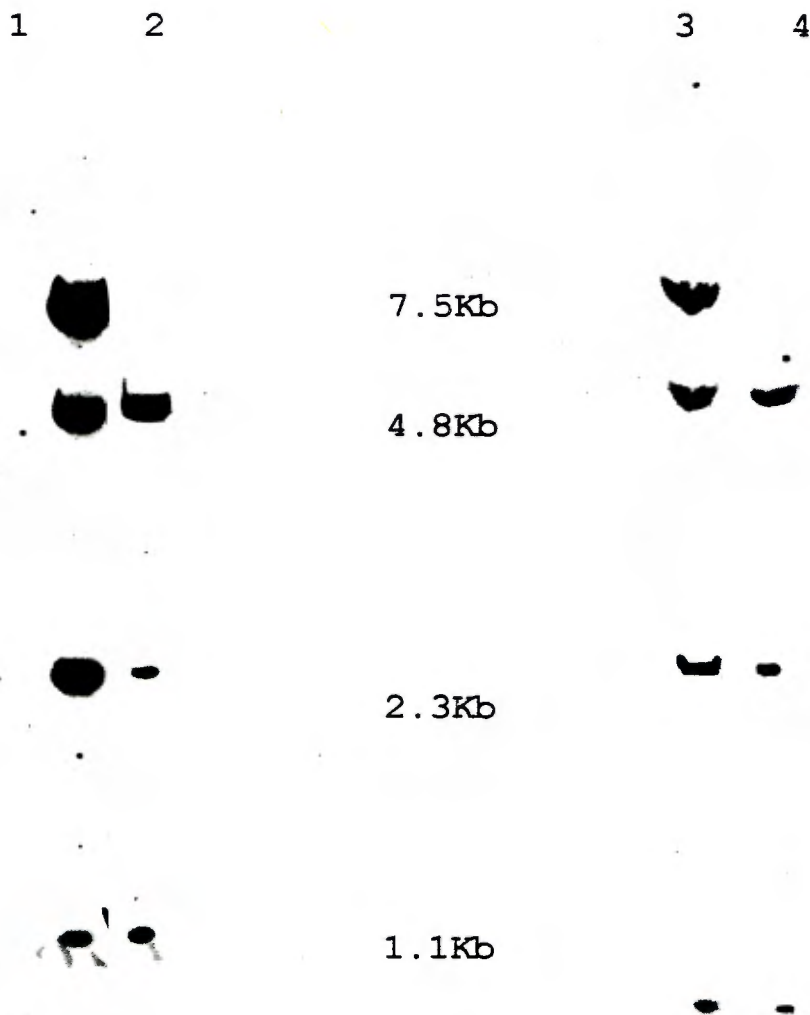


Figura 11. Comparación de los resultados obtenidos por el método radioactivo y no radioactivo. En los carriles 1 y 3 se observa el mismo ADN de una persona portadora del cromosoma Filadelfia. En los carriles 2 y 4 se presenta el ADN de un control negativo. En todos los casos el ADN fue digerido con la enzima de restricción *Bgl* II y se empleó 15ug de ADN.

## DISCUSION

Las enfermedades conocidas como Leucemia Mieloide Crónica, Trombocitemia Esencial y Policitemia Vera, se agrupan como Síndromes Mieloproliferativos (SMP). Hay además un grupo de enfermedades conocidas como Síndromes Mielodisplásicos (SMD). Cada una de ellas es una entidad patológica distinta, con una diferente evolución de la enfermedad en cada caso. El diagnóstico clínico por métodos convencionales en cada una de ellas puede dificultarse en un número significativo de pacientes. Es por ello que la citogenética y la genética molecular brindan un magnífico complemento al hematólogo. Para el caso particular del cromosoma Ph'+, esta mutación ha sido asociada en forma exclusiva a la LMC (dentro de los SMP y SMD) (Kreipe, et al., 1992). Un 95% de los pacientes afectados por LMC presenta esta mutación y sólo se reportan casos de pacientes portadores del cromosoma Ph'+ en LMA y LLA.

Existen tres alternativas para su detección, la citogenética, el "Southern Blot" y PCR. Todas ellas con ventajas y desventajas. Se seleccionó en esta tesis el empleo de "Southern Blot" por tres razones básicas: 1) Se requiere menos equipo especializado, por lo que se facilita su instalación en un laboratorio clínico fuera de la Universidad de Costa Rica; 2) se pueden emplear métodos radioactivos y métodos no radioactivos; 3) en el INISA para esa fecha se realizaba citogenética en leucemias. En el cuadros 10 y 11



se realiza una comparación entre los métodos anteriormente citados para realizar tamizaje para el cromosoma Ph'.

En general las tres metodologías expuestas son viables.

Pero el "Southern Blot" ofrece una mejor alternativa a corto y mediano plazo. Además una vez estandarizada la técnica, se requiere de poco tiempo para obtener resultados y su análisis es muy sencillo.

Las hibridaciones realizadas con la sonda UBCR, Trasprobe-1 o *ph1/bcr 3'*, del ADN previamente digerido con la endonucleasa *Bgl II*, mostraron resultados que discrepan con lo esperado según la literatura. De los 28 pacientes afectados por LMC y analizados, el 71% (20) mostraron rearrreglos moleculares en la región *Mbcr* y un 29% (8) fueron negativos. En la literatura solamente se refieren a un 5% de pacientes como Ph' negativos. Al analizar los motivos para esta discrepancia, encontramos que entre los diagnósticos clínicos de los pacientes Ph' negativos lo siguiente: 1) dos de ellos presentan cuadros clínicos compatibles con otras patologías, y 2) uno fue sometido a un trasplante de médula ósea antes de tomar la muestra. En los dos pacientes con un diagnóstico clínico dudoso se deben reevaluar los diagnósticos para verificar si se trata de un SMP.

En el paciente transplantado es muy probable que no se detecten rearrreglos (si es que existiesen) pues esta técnica no es tan sensible como el PCR. Esto nos dejaría un saldo de 5 pacientes Ph' negativos (20%).

Cuadro 10. Cuadro comparativo que ilustra las ventajas y desventajas al emplear como métodos de tamizaje para cromosoma Filadelfia, una sonda exclusiva para la región Mbc<sub>r</sub> en comparación con la citogenética convencional.

SONDAS PARA CROMOSOMA FILADELFIA	ANALISIS CITOGENETICO
<p>Técnica menos laboriosa, permite analizar un mayor número de pacientes.</p> <p>Puede emplearse sangre periférica o médula ósea como muestra.</p> <p>No se necesita realizar cultivo de células.</p> <p>Altamente específica y sensible para esa mutación.</p> <p>Como equipo de laboratorio requiere microcentrifugas, una cámara para electroforesis y micropipetas. No se requieren condiciones de esterilidad ni microscopios. Si se opta por métodos no radioactivos no se ocupa de un cuarto especial para radiación.</p> <p>De gran utilidad para diferenciar una LMC vs algún otro SMP.</p> <p>Sólo puede detectar rearrreglos en los genes c-ABL y BCR, y sólo aquellos que se dan en la región bcr de 5.8 Kb. No detecta el cromosoma Filadelfia típico de la LLA en niños.</p>	<p>Mayor número de horas por el cultivo de las células malignas y su análisis.</p> <p>Necesita médula ósea .</p> <p>Es necesario el cultivo celular.</p> <p>Puede detectar mutaciones en otros cromosomas, pero aproximadamente un 2.5-5% de los pacientes diagnosticados como Filadelfia negativos tienen rearrreglos submicroscópicos entre los genes c-ABL y BCR.</p> <p>Requiere de condiciones estériles, cabinas de flujo laminar y por ende un laboratorio dedicado para este fin.</p> <p>Util para diferenciar diagnósticos de LMC vs otro SMP.</p> <p>Capaz de detectar un mayor espectro de mutaciones en otros cromosomas. De mayor utilidad para monitorear pacientes en fase de transformación y etapa aguda de la enfermedad en la LMC.</p>

Cuadro 11. Comparación de la técnica de Southern Blot contra la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

"Southern Blot"	PCR
Es considerada como la prueba oro o de referencia.	Se emplea cada vez con más frecuencia en las publicaciones científicas. Es probable que se convierta en la prueba de referencia.
Se trabaja con ADN genómico.	Se requiere extraer el ARNm para luego convertirlo en ADNc.
Poca probabilidad de contaminación	Se debe ser muy cuidadoso para evitar contaminación.
Requiere más horas de trabajo.	Procesos más cortos.
De utilidad limitada para medir enfermedad residual.	De gran utilidad en transplantes de médula ósea.
No es útil para detectar rearrreglos entre BCR/ABL donde esta involucrada la región mbcr.	Con varios juegos de iniciadores se pueden estudiar rearrreglos en mbcr y Mbcr.
Si se desea conocer el punto de ruptura en bcr y c-ABL, el proceso involucra el empleo de varias sondas y endonucleasas distintas	Con pocos iniciadores se sabe cual fue el punto de ruptura.

Haber y colaboradores (1990) al realizar un tamizaje para el punto de ruptura en Mbcr en 68 pacientes afectados de LMC, encontraron que el uso de la misma metodología utilizada en este trabajo brinda un 10% de falsos negativos. Para confirmar estos resultados se requiere de otra enzima de

restricción conocida como *Xba I* . Esta enzima no posee un sitio de corte dentro del Mbcr, pero si corta en los extremos 5' y 3' de esta región (Figura 5). El empleo de ambas enzimas elimina los posibles falsos negativos. La sonda Transprobe-1 si se combina con *Bgl II* no presenta falsos positivos y en aquellos casos Ph' negativos, el empleo de *Xba I* sirve para confirmar la ausencia o presencia de un rearreglo en Mbcr. Otra enzima de restricción que puede ser usada en forma alternativa a *XbaI*, es *Bcl I* (Shtalrid et al.,1988). Esta última endonucleasa produce un RFLP similar en tamaño a *Xba I* , pues corta en los extremos 5' y 3' del Mbcr y no posee un sitio de corte interno en esta región.

En síntesis, se obtuvo un 20% de Ph' negativos, pero deben ser confirmados usando *Xba I* . Adicionalmente habría que estudiar más a fondo el cuadro clínico de estos pacientes para determinar si son una verdadera LMC. Es importante destacar un estudio realizado a nivel citogenético por Castro et al. (1993) en pacientes afectados por LMC en Costa Rica. Estos investigadores encontraron un 20% de Ph' negativos de un total de 46 pacientes analizados. Lo cual sugiere una alta incidencia de LMC con personas no portadores del cromosoma Ph', esto es anormal y más probablemente obedezca a un diagnóstico erróneo de estos pacientes.

De los 7 pacientes analizados no clasificados como LMC, se presentaron rearreglos en 3 de ellos. Esto nos indica la posible diagnóstico erróneo de la enfermedad. Generalmente

la presencia de un cromosoma Ph'+ en estos casos obliga al hematólogo a revisar su diagnóstico. Fue muy interesante observar que se enviaron muchos pacientes para análisis con dudas en lo referente al diagnóstico. Es en estos casos donde más se justifica el tamizaje molecular para cromosoma Ph''.

Otro cuestionamiento que puede realizarse, es si el uso de una sola sonda y en especial ésta, es suficiente para realizar un tamizaje de cromosoma Ph'. Como se indicó en la introducción hay otros sitios donde puede ocurrir una ruptura en el gen BCR. Un sitio es en el intrón que se halla en medio de los exones 1 y 2 del gene BCR. Este punto de ruptura es característico de la LLA y muy rara vez se presenta en la LMC. La sonda Transprobe-1 no incluye esta región y por ende no detecta rearreglos en esta zona, pero este tipo de rearreglo es muy raro de encontrar en la LMC (Nakamura et al., 1993).

En los rearreglos moleculares que involucran al Mbcr es frecuente encontrar deleciones internas en la región 3'. Las primeras sondas desarrolladas eran de esta región y daban hasta un 30% de falsos positivos (Popenoe et al., 1986; Haber et al., 1990; Dubé et al., 1989). La sonda Transprobe-1 posee secuencias en 5' y 3' de Mbcr, hibrida casi en toda la región Mbcr. Solamente no está incluido un fragmento interno de 1.6Kb que es delimitado por la endonucleasa *Hind III*. Este fragmento no ha sido incluido debido a la presencia de

secuencias repetidas, de esta forma se excluyen posibles falsos positivos.

La sonda Transprobe-1 ha sido diseñada para minimizar al máximo los falsos positivos (no he encontrado informes en la literatura que indiquen lo contrario) y falsos negativos. Su aplicación no requiere de otra sonda complementaria para esta región. Se puede emplear otra sonda si se desea mapear el punto de ruptura exacto en Mbc<sub>r</sub>, y generalmente se utiliza una sonda para la región *Hind III* / *Bgl II* 3' de Mbc<sub>r</sub>.

La sonda Transprobe-1 ha sido ampliamente usada en muchas investigaciones (Tilzer y Concepción, 1989; Haber et al., 1990, Morris et al., 1990; Sessarego et al., 1993; Dubé et al., 1989; Cortés et al., 1995). La aplicación de endonucleasas ha sido variada, pero en general predomina el uso de *Bgl II*. El uso de *Xba I*, *Bcl I*, *Eco RI* o *Hind III* se emplea como segunda opción para confirmar la ausencia de rearrreglos o mapear puntos de ruptura (Nguyen et al. 1993)

Si se emplea una sonda como Transprobe-1 o una cualquiera similar a esta y una sólo endonucleasa, no se puede excluir la posibilidad de falsos negativos. Hasta la fecha ningún estudio ha sido llevado a cabo para determinar el por qué de ello, aunque sí se han planteado algunas hipótesis al respecto:

- 1) RFLP anormales muy pequeños que salen de los geles,
- 2) RFLP anormales muy grandes que no pueden ser transferidos a una membrana de nylon, y

3) RFLP anormales que migran de igual manera que los normales (Haber et al., 1990).

El uso de otra enzima de restricción y/u otra sonda podría complementar el análisis en el caso de pacientes que resultasen Ph' negativos por métodos citogenéticos y además MbcR/ABL negativos con la sonda Transprobe-1 y la enzima *Bgl II*. Como he presentado en los resultados, sólo 5 de los pacientes lo requerirían. El empleo de otras sondas y endonucleasas con el fin de mapear el punto de ruptura no brinda un parámetro que pueda ser usado como factor pronóstico, y sería un gasto de recursos económicos que no es viable en nuestro medio. En la revisión bibliográfica presentada por Mills, y colaboradores en 1991, se expone claramente cómo la evidencia obtenida hasta esa fecha es contradictoria y no se demuestra que el punto de ruptura pueda ser usado en la clínica.

Un último punto que es importante discutir es lo referente a la selección de enzimas de restricción para detectar rearrreglos en MbcR. La enzima *Bgl II* es la más adecuada para este fin; al generarse tres fragmentos normales de diferente tamaño (4.8, 2.3 y 1.1 Kb) que se pueden separar fácilmente en una electroforesis. Además no son de gran tamaño por lo que no presentan dificultades para ser transferidos a una membrana de nylon. Existen dificultades metodológicas si se desean transferir fragmentos de muy bajo peso molecular (<1Kb) y alto peso molecular (>10Kb) al mismo

tiempo (Sambrook et al., 1989). El caso de *Bam HI* puede ser problemático debido a la presencia de raros polimorfismos en esta región y *Hind III* no es una buena elección dado que si ocurre un rearrreglo en la zona central delimitada por *Hind III*, éste no sería detectado (Dijke y Stam, 1989). Como segunda opción esta *Xba I* o *Bcl I*, dado que generan un sólo fragmento no superior a 6.0 Kb, y el cual hibrida toda la región de Mbc. Por lo cual se utilizan para confirmar un paciente aparentemente normal según el análisis realizado por la enzima *Bgl II*.

Durante este estudio no se pudo utilizar una segunda enzima de restricción como *Xba I* o *Bcl I*, por carencia de los recursos económicos necesarios para este fin. Se espera poder realizarlo en el futuro, dada la importancia de realizar un análisis confirmatorio para estos 5 pacientes. Sobre todo porque los resultados citogenéticos obtenidos por Castro et al. (1993), también arrojan un porcentaje similar de pacientes Ph' negativos. Si este porcentaje se mantuviera después de un segundo análisis, estaríamos realmente ante una clasificación errónea del 20% de los pacientes afectados por LMC.

En conclusión, el tamizaje del cromosoma Ph' característico de la LMC puede ser llevado a cabo en forma eficiente y ágil por métodos moleculares, al emplear una sonda como Transprobe-1 y dos endonucleasas. Un posible sistema de trabajo a seguir para este tamizaje se presenta en



la figura 13. Este diagrama está diseñado para optimizar los escasos recursos disponibles en el país. Como se puede observar la citogenética es parte del esquema, pues ambas metodologías se complementan. Según este esquema sólo los pacientes Ph' negativos al usar dos endonucleasas diferentes serían sometidos a un análisis citogenético. De esta forma se ahorran muchos recursos y se facilita el estudio de otras leucemias, donde los análisis moleculares aún no son viables, y la citogenética es muy útil.

El trabajo realizado incluyó además la aplicación de técnicas radioactivas y no radioactivas. Casi la totalidad de trabajos publicados emplean fósforo 32 como agente trazador de la sonda, sólo una publicación presentada por Tilzer y Concepción (1989), empleó biotina como agente revelador. En este estudio se utilizó digoxigenina como sustancia no radioactiva y demostró que es útil al igual que el fósforo 32 para marcaje de sondas y detección de genes de copia única. Ambas son viables, pero la aplicación de fósforo 32 implica un menor costo económico en reactivos y es más sensible. Pero se debe tomar en cuenta la disponibilidad de áreas especiales para su empleo y un sistema de importación eficiente y ágil, el cual permita su uso en pocos días luego de llegado al país, dada su vida media de 14 días. Es por ello que la metodología no radioactiva puede ser más ventajosa en un laboratorio de la CCSS. Otra ventaja que posee el uso de sustancias no radioactivas es el marcaje de

grandes cantidades de sonda y de esta forma una vez marcada puede emplearse varias veces. Esto por cuanto si se almacena a  $-20^{\circ}\text{C}$  es estable. En resumen las metodologías radioactivas y no radioactivas son viables, pero cada una presenta desventajas y ventajas. La selección de cual sistema se puede adaptar deberá hacerse después de analizar el conjunto de factores económicos y técnicos

La detección del cromosoma Ph'+ debe ser parte de la rutina de un laboratorio de Hemato-oncología. Afortunadamente los medios para alcanzar este ideal no son imposibles y en Costa Rica se disponen de varios laboratorios que podrían ofrecer este servicio, para posteriormente implantarlo en la CCSS.

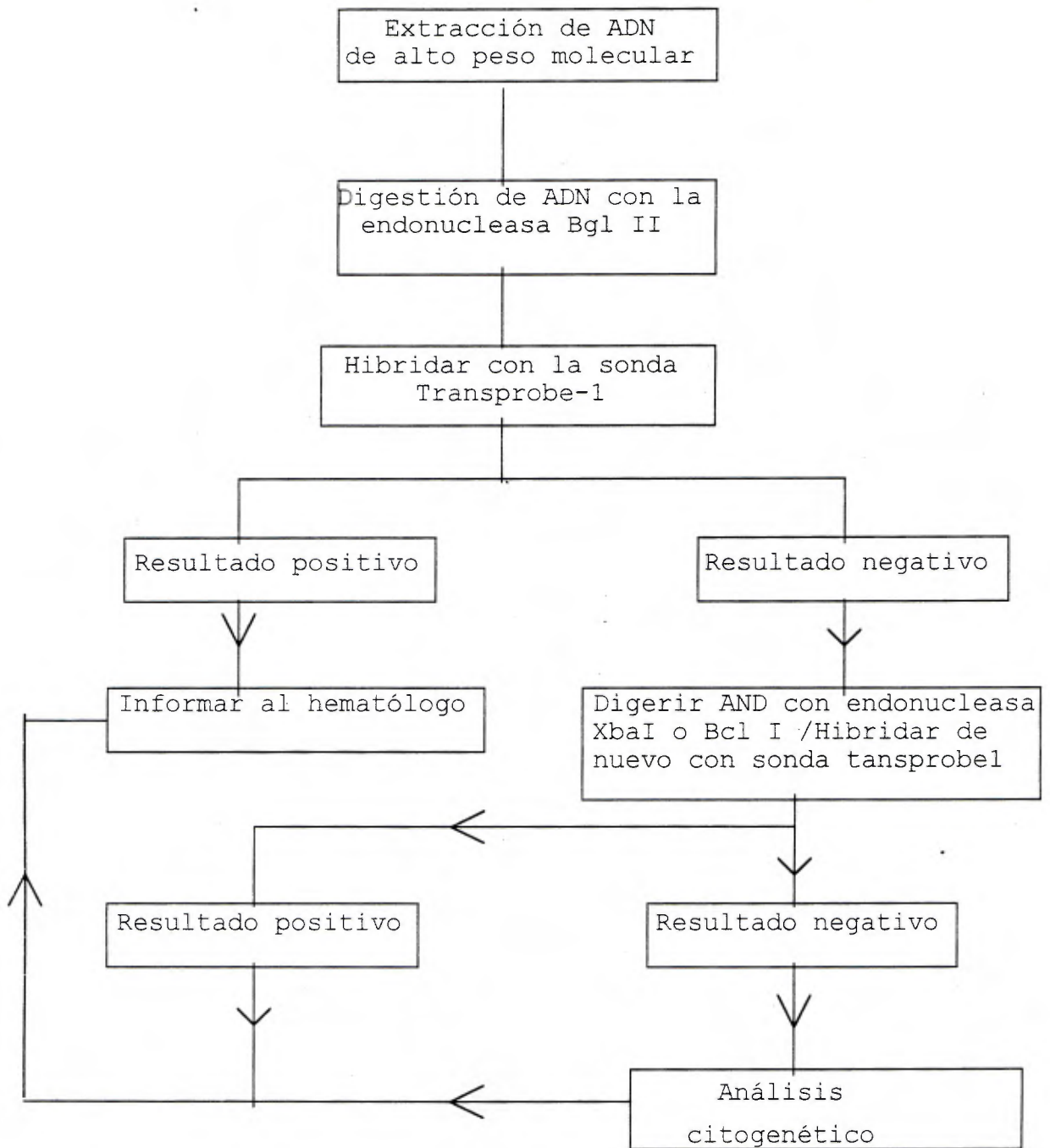


Figura 10. Procedimiento de laboratorio a emplear para detectar la presencia o ausencia del cromosoma Filadelfia en pacientes afectados por LMC.

## CONCLUSIONES

- 1) La detección molecular del cromosoma Filadelfia es de gran importancia para nuestro país. En este estudio se logró determinar al menos la presencia de 3 personas portadoras de este rearrreglo con un diagnóstico clínico distinto a LMC. Además su aplicación se vuelve imprescindible para monitorear el estado de pacientes sometidos a trasplantes de médula ósea u otros tratamientos.
- 2) El aplicar metodologías radioactivas y no radioactivas para la detección molecular del cromosoma Filadelfia es viable, lo cual aumenta la facilidad de ser desarrollada esta técnica en los laboratorios de la CCSS y en forma privada.
- 3) La sonda Transprobe-1 y su combinación con la endonucleasa *Bgl II* es una excelente forma de monitorear rearrreglos moleculares entre la región *Mbcr/ABL*. Pero se requiere del empleo de otra endonucleasa para confirmar aquellos resultados que son cromosoma *Ph'* negativos y *Mbcr/ABL* negativos. Se puede emplear en estos casos las endonucleasas *Xba I* o *Bcl I*, para confirmar la ausencia de este rearrreglo.

## BIBLIOGRAFIA

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. 1989.- Molecular biology of the cell.- 2ª edición, Garland Publishing, Inc. NY & London. 1300p.

Ahuja, H., Bar-Eli, M., Arlin, Z., Advani, S., Allen, S., Goldman, J., Snyder, D., Foti, A & Cline., M., 1991- The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myelocytic leukemia.- J Clin Invest 97:2042-2047.

Bagby, G. 1994.- Hematopoeisis, en Stamatoyannopoulos, Nienhuis, Majerus & Varmus (eds): The molecular basis of blood Diseases, 2ed.- W.B. Saunders Company 71-103.

Barch., M.J., editor. 1991.- The ACT Cytogenetics Laboratory Manual.- Segunda edición.- Raven Press, New York, 625p.

Bedi, A., Barber, J., Bedi, G., El-Deiry, W., Sidransky, D., Vala., M., Akhtar, A., Hilton, J., & Jones, J., 1995.- BCR - ABL mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damaged: a mechanism of resistance to multiple anticancer agents.- Blood, 86(3):1148-1158.

Castro, I., Montero, C., & Jiménez, C. 1993.- Características cromosómicas asociadas con leucemias y otras hematopatías en Costa Rica.- Rev. Biol. Trop., 41(3): 385-392.

Chen, S., Chen, Z., Font, P., Auriol, L., Larsen, D., & Berger, R. 1989.- Structural alterations of the BCR and ABL in Ph+ positive acute leukemias with rearrangements in the BCR gene first intron: further evidence implicating ALU sequences in the chromosome translocation.- Nucleic Acids Research, vol 17(3): 7631-7642.

Cordero, R. 1986.- Hematología Clínica.- Editorial de la Universidad Estatal a Distancia, San José, Costa Rica. 448p.

Cortes, J., Talpaz, M., Beran, M., O'Brien, S., Rios, M., Stass, S., & Kantarjian, M., 1995.- Philadelphia chromosome negative chronic myelogenous leukemia with rearrangement of the breakpoint cluster region.- Cancer, 75: 464-470.

Costello, R., Lafage, M., Toiron, Y., Brunel, V., Sinty, D., Arnoulet, C., Mozziconacci, J., Bobadallah, R., Gastaut, A., & Gabert, A., 1995.- Philadelphia chromosome negative chronic myeloid leukaemia: a report of 14 new cases.- *British Journal of Haematology*, 90: 346-352.

Crisan, D., Chen, S., & Weil, S., 1994.- Polymerase chain reaction in the diagnosis of chromosomal breakpoints.- *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 8(4): 725-750.

Daley, G.Q., Van Etten, R. & Baltimore, D. 1990.- Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the 210bcr-abl gene of the Philadelphia Chromosome.- *Science* 247:769-892.

DeClue, J., & Lowy, D., 1994.- Molecular aspects of oncogenesis, en Stamatoyannopoulos, Nienhuis, Majerus & Varmus (eds): *The molecular basis of blood Diseases*, 2ed.- *Hardcourt Brace*, 789-834.

Delage, R., Ritz, J. & Anderson, K., 1990.- The evolving role of bone marrow transplantation in the tretment of chronic myelogenous leukemia.- *Hematology/Oncology Clinics of North American*, vol. 4(2): 369-388.

Dijke, T., & Stam, K., 1989.- *Human Chromosome, manual of basic techniques*.- Editado por Ram S. Verma & Arvind Babu, capítulo 6.- Editorial Pergamon Press, Inc.- Nueva York, USA.- Pag 166-189.

Dreazen, O., Canaani, E., & Gale, R., 1988.- Molecular biology of chronic myelogenous leukemia.- *Seminars in Hematology*, 25(1): 35-49.

Dubé, I., Dixon, J., Beckett, T., Grossman, A., Weinstein, M., Benn, P., Mckeithan, T., Norman, C., & Pinkerton, P., 1989.- Location of breakpoints wihtin the major breakpoint cluster region (bcr) in 33 patients with bcr reagements-positive chronic myeloid leukemia with complex or absent philadelphia chromosome.- *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1: 106-111.

Dubrovic, A., Trainor, K.J. & Morley A.A. 1988.- Detection of the molecular anormality in chronic myeloid leukemia by use of the Polymerasa Chain Reaction.- *Blood* 72(6):2063-2065.

Fainstein, E., Marcelle, D., Rosner, A., Canaani, E., Gale, R.P., Drezzen, O., Smith, S.D. & Croce, C.M. 1987.- A new fused transcript in Philadelphia chromosome positive acute lymphocytic leukemia.- *Nature*, 330: 386-388.

Fainstien, E., Cimino, G., Gale, R.P., Alimena, G., Berthier, R., Kishi, K., Goldman, J., Zaccaria, A., Berrebi, A. & Canaani, E. 1991.- p53 in chronic myelogenous leukemia in acute phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:6293-6297.

Foti, A., Ahuja, H.G., Allen, S.L., Koduru, P., Schuster, M.W., Schulman, P., Bar-Eli M., & Cline M.J., 1991.- Correlation between molecular and clinical events in the evolution of chronic myelocytic leukemia to blast crisis.- *Blood*, 77(11): 2441-2444.

Gaidano, G., Serra, A., Guerrasio, A., Rege-Cambrin, G., Mazza, U., & Saglio, G., 1994.- Genetic analysis of p53 and RB1 tumor supressor genes in blast crisis of chronic myeloid leukemia.- *Ann Hematol*, 68: 3-7.

Gaiger, A., Henn, T., Horth, E., Geissler, K., Mitterbauer, G., Greinix, H., Mannhalter, C., Haas, O., Lechner, K., & Lion, T., 1995.- Increase of BCR-ABL chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression.- *Blood*, 86(6): 2371-2378.

Groeffen, J., Hermans, A., Grosveld, G. & Heisterkamp, N. 1989.- Molecular analysis of chromosome breakpoints.- *Nucl Acid Res and Mol Biol*, 36:281-300.

Haber, L.M., Childs, C.C., Hirsch-Ginsberg, C., Nellis, K., Kantarjian, H.M., Trujillo, J.M., & Stass, S. 1990.- Strategy for breakpoint cluster region analysis in chronic myelocytic leukemia in a routine clinical laboratory.- *Am J Clin Pathol*, 94:762-767.

Haluska, F., Tsujimoto, Y., & Croce, C. 1987.- Oncogene activation by chromosome translocation in human malignancy.- *Ann. Rev. Genet.* 21: 321-45.

Harris, C., & Hollstein, M., 1993.- Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene.- *The New Eng J. of Med.* 329(18): 1318-1327.

Heim, S. & Mitelman, F. 1991.- *Cancer Cytogenetics*.- Alan R. Liss, Inc., New York, 3<sup>rd</sup> printing of the first edition, 1987.

Hirama, T. & Koeffler, P., 1995.- Role of the Cyclin-Dependent Kinase inhibitors in the development of cancer.- *Blood*, 86 (3): 841-854.

Jiang, X., Trujillo, J., Dao D., & Liang, J., 1989.- Studies of bcr and abl gene reagentes in chronic myelogenous leukemia patients by conventional and pulsed field electrophoresis using gel inserts.- *Cancer Genet. Cytogenet.* 42: 287-294.

Jong, R., Hoeve, J., Heinsterkamp, N., & Groeffen, J. 1995.- Crkl is complexed with tyrosine-phosphorylated cbl in Ph+ leukemia.- *The Journal of Biological Chemistry*, 270(37): 21468-21471.

Kantarjian, H., Talpaz, M., Dhingra, K., Estey, El, Keating, M., Ku, S., Trujillo, J., Huh, Y., Stass, S & Kurzrock, R., 1991.- Significance of the p210 versus p190 molecular abnormalities in adults with philadelphia chromosome-positive acute leukemia.- *Blood* 78(9): 2411-2418.

Kantarjian, H., Deisseroth, A., Kurzrock, R., Estrov, Z., & Talpaz, M. 1993. 1993.- Chronic myelogenous leukemia: A concise update.- *Blood*, 82(3): 691-703.

Kawasaki, E.S., Clark, S.S., Coyne, M.Y., Smith, S.D., Chaplin, R., Witte, O.N. & McCormick. 1988.- Diagnosis of chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias by detection of leukemia-specific mRNA sequences amplified in vitro.- *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5698-5702.

Kern, S., Pietenpol, J., Thiagalingam, S., Seymour, A., Kinzler, W. & Vogelstein, B. 1992.- Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression.- *Science*, 256: 827-830.

Kreipe., H., Felgner, J., Jaquet, K., Heidorn., K., Radzun, H., & Parwaresch., R., 1992.- DNA analysis to aid in the diagnosis of chronic myeloproliferatives disorders.-*Am J Clin Pathol*, 98:43-54.



Kipreos, E.T., Lee, G.J. & Wang, J.Y. 1987.- Isolation of temperature sensitive tyrosine kinasa mutants of v-abl by screening with antibodies for phosphotyrosina.- Proc Natl Acad Sci USA, 84: 75-91.

Kipreos, E.T. & Wang, Y.J., 1992.-Cell cycle-regulated binding of c-abl tyrosine kinasa to DNA.- Science 256:382-385.

Kurzrock, R., Gutterman, J.U., & Talpaz, M. 1988.- The molecular genetics of philadelphia chromosome-positive leukemias.- The New Eng J Med, 319(15):990-998).

Kurzrock, R., & Talpaz, M., 1991.- The molecular patholog& of chronic myelogenous leukemia.- Bristish Journal of Haematology, Suppl 1, 79: 34-37.

Leibowitz, D., Schaefer-Rego, K., Popenoe, D., Mears, G., & Bank, A., 1985.- Variable breakpoints on the Philadelphia chromosome in chronic myelogenous leukemia.- Blood, 66(1): 243-245.

Leibowitz, D. 1990.-Molecular diagnosis of chronic myelocytic leukemia.- edited by J. Cossman in Molecular Genetics in Cancer Diagnosis.-editorial Elsevier, New York. pp:179-188.

Liu, E., Hjelle, B., & Bishop, M. 1988.- Transforming genes in chronic myelogenous leukemia.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1952-1956.

Lugo, T.G., Pendergast, A.M., Muller, A.J. & Witte, O.N. 1990.- Tyrosine kinasa activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products.- Science, 247:1079-1082.

Malinen, T., Palotie, A., Pakkala, S., Peltonen, L., Ruutu, T., & Jansson, S., 1991.- Acceleration of chronic myeloid leukemia correlates with calcitonin gene hypermethylation.- Blood, 77(11):2435-2440.

Marx, J., 1984.- Oncogenes amplified in cancer cells.- Science vol 223 : 40-41.

Masucci, M., & Ernberg, I., 1994.- Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system.- Trends in Microbiology, 2(4): 125-130.

Maurer, J., Janssen, J.W., Thiel, E., van Denderen, J., Ludwig, W., & Aydemir, U. 1991.- Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction.- *The Lancet*, 337(8749): 1055-1058.

Mills, K., Benn, P., & Birnie, G., 1991.- Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature.- *Blood*, 78(5): 1155-1161.

Morris, C., Heisterkamp, N., Kennedy, M., Fitzgerald, P., & Groeffen, J., 1990.- Ph<sup>-</sup> negative chronic myeloid leukemia: molecular analysis of abl insertion into Mbc on chromosome 22.- *Blood*, 76(9): 1812-1818.

Nakai, H., Misawa, S., Horike, S., Maekawa, T., Kashima, K., & Ishizaki, K. 1995.- Hemizygous expression of the wild type p53 allele may confer a selective growth advantage before complete inactivation of the p53 gene in the progression of chronic myelogenous leukemia. *British Journal of Haematology*, 90: 147-155.

Nakamura, Y., Hirose, S., & Aoki, N., 1993.- Consistent involvement of the half part of the first intron in adult Philadelphia positive leukemia without M-bcr rearrangement - *British Journal of Haematology*, 83: 53-57.

Nelkin, B.D., Przepiorka, D., Burke, P.J., Thomas, E.D., & Baylin, S.B., 1991.- Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia.- *Blood*, 77(11):2431-2434.

Pierce, J. 1989.- Oncogenes, growth factors and hematopoietic cell transformation.- *Biochem Biophys Acta*, 989:179-208.

Poppeno, D.W., & Schaefer-Rego, K. 1986.- Frequent and extensive deletion during the 9,22 in CML.- *Blood*, 68(5): 1123-1128.

Radich, J., Gehly, G., Goolye, T., & Bryant, E. 1995.- Polymerase chain reaction detection of the bcr-abl fusion transcript after allogeneic marrow transplantation for chronic myeloid leukemia:

results and implications in 346 patients.- Blood, 85(9): 2632-2638.

Richardson, A. 1991.- The ACT cytogenetics laboratory manual.- 2° edición, editor M.J. Barch.- Editorial Raven Press, New York.- Capitulo 8.

Rifkind, R., Bank, A., Marks, P.A., Kaplan, K.L., Ellison, R.R., & Lindenbaum, J. 1988.- Hematología Clínica.- Traducción de la tercera edición en Inglés "Fundamentals in Hematology".- Nueva Editorial Interamericana, México, D.F., 233p.

Risser, R., & Hooland, G., 1989.- Structures and activities of activated abl oncogenes.- Current Topics in Microbiology, 147: 129-153.- Edit P.K. Bogt.

Rubin, Ch. M., Carrino, J., Dickler, M.N., Leibowitz, D., Smith, S.D. & Westbrook, C.A. 1988.- Heterogeneity of genomic fusion of BCR and ABL in philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia.- Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2795-2799.

Saglio, G., Guerrasio, A., Rosso, C., Zaccaria, A., Tassinari, A., Serra, A., Rege-Cambrin, G., Mazza, U., & Gavosto, F., 1990.- New type of bcr/abl junction in philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia.- Blood, 76(9): 1819-1824.

Saglio, G., & Guerrazio, A. 1991.- Detection of Ph' positive acute lymphoblastic leukemia by PCR (Letter).- Lancet, 338(8772): 958.

Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T., 1989.- Molecular cloning, a laboratory manual.- 2 ed. Cold Harbor Laboratory Press.

Sessarego, M., Martinelli, G., Chiamenti, A., Defferrari, R., Fugaza, G., Bruzone, R., Ajmar, F. & Pignatti, P., 1993.- Molecular analysis of six variant philadelphia chromosome translocations in chronic myeloid leukemia.-Cancer Genet. Cytogenet. 67: 50-54.

Shtalrid, M., Talpaz, M., & Kurzrock, R. 1988.- Analysis of the breakpoint within the bcr gene and their correlation with the clinical course of

Philadelphia positive Chronic Myelogenous  
Leukemia.- Blood 72(2):485-490.

Shtivelman, E., Lifshitz, B., Gale, R., & Canaani, E., 1985.- Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia.- Nature, 315: 550-554.

Sierra, R., Rosero-Bixby, L., Antich, D., & Muñoz, G.- 1995.- Cáncer en Costa Rica: epidemiología descriptiva.- Editorial de la Universidad de Costa Rica.- 87pp.

Smith, G., 1994.- Virus strategies for evasion of the host response to infection.- Trends in Microbiology, 2(3): 81-87.

Strife, A & Clarkson, B. 1988.- Biology of chronic myelogenous leukemia: Is discordant maturation the primary defect?.- Seminars in Hematology, 25(1): 1-19.

Stuart, A. 1987.- Genetic and phenotypic markers of tumors.- Editado por Stuart A., L. Franti, R. Verma.- Plenum Press, New York.

Suryanarayan, K., Hunger, S.P., Kohler, S., Carroll, A., Crist, W., Link, M., & Cleary, M., 1991.- Consistent involvement of the BCR gene by 9;22 breakpoint in pediatric acute leukemias.- Blood, 77(2):324-330.

Thompson, J., Brodsky, I., & Yunis, J., 1992.- Molecular quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation.- Blood, 79(6): 1629-1635.

Tilzer, L. & Concepción, E., 1989.- Detection of the gene rearrangement in chronic myelogenous leukemia with biotinylated gene probes.- Am J. Clin. Pathol., 91: 464-467.

Tronick, S. & Aaronson S., 1991.-Oncogenes.- Cossman, J. ed in Molecular Genetics in Cancer Diagnosis.-editorial Elsevier, New York. pp: 29-48.

van der Plas, D.C., Hermans, A.B.C., Smith, E.M., & Smadja, N. 1989.- Cytogenetic and molecular analysis in philadelphia-negative CML.- Blood, 73(4):1038-1044.

Verma, R.S., Macera, M.J., Benn, P., & Groffen, J. 1989.- Molecular characterization of variant translocations in chronic myelogenous leukemia.- *Oncogene*, 4:1145-1148.

Watson, J., Hopkins, N., Roberts, J.W., Steitz, J., & Weiner, A. 1987.- *Molecular biology of the gene*.- 3 edición, The Benjamin /Cummings Publishing Company, Inc., vol II, cap 25-26-27.

Wetzler, M. & Talpaz, M. 1992.- *Chronic myelogenous leukemia*.- Gardiner Gadwell Communications, Ltd. United Kingdom.

Witte, O. 1993.- Role of the BCR-ABL oncogene in human leukemia: fifteenth Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award lecture.- *Cancer Research*, 53:485-489.

Witte., O. 1994.- Mechanisms of leukemogenesis, cap 24.- en Stamatoyannopoulos, Nienhuis, Majerus & Varmus (eds): *The molecular basis of blood Diseases*, 2ed.- W.B. Saunders Company ,

Zhang, J., Goldman, J., Cross, C., 1995.- Characterization of genomic bcr-abl breakpoints in chronic myeloide leukaemia by PCR.- *British Journal of Haematology*, 90: 138-146.

Zvi, K., Prokocimer, M., Peller, S., Kahn, Y., Zechavi, G., Manor, Y., Cohen, A., & Rotter, V., 1989.- Rearrangements in the p53 gene in philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia.- *Blood*, 74(7): 2318-2324.

## APENDICE 1

## PREPARACION DE SOLUCIONES PARA LA HIBRIDIZACION EL POR MÉTODO RADIOACTIVO:

- 1) Solución para Prehibridación:
  - 2.5xSSC
  - 10% de Denhardtts
  - 0.1% SDS
- 2) Solución de Hibridación:
  - 2.5xSSC
  - 10% Dextran Sulfato
  - 50ug/ml de Salmon Sperm
  - 10ul/ml de Poly A
  - 0.1% de Pirofosfato de Sodio
  - 0.1% de SDS
- 3) Solución de Lavado 1:
  - 2.5xSSC
  - 0.1% de SDS
  - 0.1% de pirofosfato de sodio
- 4) Solución de Lavado 2:
  - 0.1xSSC
  - 0.1% de SDS
  - 0.1% de pirofosfato de sodio
- 5) Solución madre 20X SSC
  - 3M NaCl
  - 0.3M de Citrato de Sodio, PH: 7.0

## APENDICE 2

SOLUCIONES REQUERIDAS PARA TRABAJAR CON EL METODO NO  
RADIOACTIVO

- 1) Solución de pre-hibridación:  
5X SSC, 1% (w/v) Agente Bloqueador (cat n°1096-176, Boeheringer Mannheim). 0.1% de N-lauroylsarcosine, 0.02% de SDS.
- 2) Solución de hibridación:  
La misma de pre-hibridar, sólo se adiciona la sonda marcada.
- 3) Solución de lavado 2X.  
2X SSC, al 0.1% de SDS
- 4) Solución de lavado 0.5X  
0.5X SSC, al 0.1% de SDS
- 5) Buffer Genius 1  
100mM Tris HCl, 150mM NaCl, pH 7.5 (+20°C)  
Se debe filtrar a través de una membrana de 0.45um antes de usar.
- 6) Buffer Genius 2  
2% (w/v) de Agente Bloqueador, disuelto en Genius 1.  
Es una solución que no debe ser filtrada. Es estable 2 semanas a 4°C.  
Al prepararse no debe llevarse a ebullición.
- 7) Buffer Genius 3  
100mM Tris HCl, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>; pH 9.5 (+20°C).
- 8) Preparación del anticuerpo:  
Se diluye la anti-Dig-alcalina fosfatasa 1:5000 en Genius 2, para una concentración de 150U/ml. Anti-digoxigenina-alcalina-fosfatasa (cat n°1093-274, Boeheringer Mannheim).