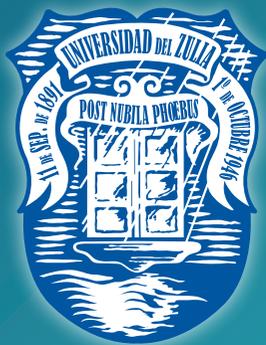


CIENTIA



Depósito Legal ppi 201502ZU4668

Vol. 23, N° 3
Julio-Septiembre 2015



**An International Refereed Scientific Journal of
the Facultad Experimental de Ciencias
at the Universidad del Zulia
Maracaibo - Venezuela**

Esta publicación científica en formato digital
es continuidad de la revista impresa
Depósito Legal: pp 199302ZU47
ISSN:1315-2076

CIENCIA 23 (3), 117-125, 2015
Maracaibo, Venezuela

Evaluación de la delección 5' abl mediante la técnica de hibridación in situ fluorescente (fish) en pacientes leucémicos venezolanos

María Gabriela Ferrer Villalobos^{1,}, Marisol Lizell Soto Quintana², Francisco José Álvarez Nava³, Alicia Elena Rojas de Atencio⁴, Karelis Magdalena Urdaneta Gutiérrez⁵, Jenny Zadi Cañizalez⁶, Richard Jackson González Bracho⁷ y Yasmin Villalobos⁸*

^{*1,2,3,4,5,6,7} Instituto de Investigaciones Genéticas, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela

Recibido: 29-09-14 Aceptado: 23-07-15

Resumen

En la literatura se han descrito casos de pacientes leucémicos que tienen delecciones en el gen *ABL*. En el caso específico de la LMC; se conoce que entre el 10-27% de los casos tienen grandes delecciones adyacentes al punto de ruptura del gen *ABL*. Estas delecciones ocurren corriente arriba del locus *ABL*, tienen puntos de ruptura variables y pueden extenderse hasta varias megabases, afectando el locus del gen *ASS*. El objetivo de esta investigación fue evaluar la delección 5'*ABL* en pacientes leucémicos venezolanos, mediante la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH). Se analizaron 30 muestras de médula ósea (19 LMC, 6 LMA y 5 LLA) y se tomaron 2 controles positivos y negativos. Para la validación de la FISH se calculó la Sensibilidad, Especificidad, Tasa de Falsos Positivos y Negativos. Para el análisis de muestras y controles se empleó la sonda de DNA locus específica *BCR-ABL Plus Translocation, Dual Fusion*(Cytocell). La FISH detectó la delección 5' *ABL* en 3 de 30 (frecuencia 10%) pacientes leucémicos. Estos hallazgos sugieren que la delección del gen *ABL* presenta una frecuencia comparable a la descrita mundialmente en pacientes con LMC, mientras que para los LLA se requieren más estudios que involucren un mayor número de pacientes.

Palabras clave: FISH; Delección 5' *ABL*; Sonda *BCR-ABL Plus Translocation Dual Fusión*.

Evaluation of the deletion 5' abl by the technique of fluorescence in situ hybridization (fish) in leukemic patients venezuelan

Abstract

In the literature there have been reports of leukemic patients with deletions in the *ABL* gene. In the specific case of the LMC; is known that between 10-27% of patients have large deletions adjacent to the breaking point of the *ABL* gene. These deletions occur upstream of the *ABL* locus have breaking points of variables and can range up to several megabases, affecting the *ASS* gene locus. The objective of this research was to evaluate the

* Autor para la correspondencia: mariagfv@gmail.com

5' deletion in Venezuelan ABL leukemic patients using the technique of fluorescent in situ hybridization (FISH). Were analyzed 30 samples of bone marrow (19 CML, 6 AML, and 5 LLA) and two positive and negative controls were taken. For validation of the FISH were calculated Sensitivity, Specificity, False Positive Rate and Negative. For the analysis of samples and controls was used DNA probe specific locus Plus BCR-ABL Translocation, Dual Fusion (Cytocell). FISH detected the 5' deletion ABL in 3 of 30 (10% frequency) leukemic patients. These findings suggest that deletion of the ABL gene present a frequency comparable to that described worldwide in CML patients, while LLA whereas for studies involving more a greater number of patients required.

Key words: FISH, delección 5' *ABL*; molecular complex *BCR-ABL*; probe *BCR-ABL Plus Translocation Dual Fusión*.

Introducción

Las leucemias conforman un grupo de enfermedades en las que la manifestación común es una proliferación no regulada y maligna de células endógenas de médula ósea (1). Desde el punto de vista clínico se reconocen cuatro tipos de leucemias: Leucemia Mieloide Aguda (LMA), Leucemia Mieloide Crónica (LMC), Leucemia Linfoide Aguda (LLA) y Leucemia Linfoide Crónica (LLC) (2). Se ha reportado que pacientes con LMC, LMA y LLA presentan el cromosoma Philadelphia (Ph).

El cromosoma Ph es una anomalía cromosómica adquirida que consiste en la t(9;22) (q34;q11.2). Se conoce que las células de la médula ósea del 95% de los pacientes con LMC tienen la translocación previamente descrita o una variante de esta anomalía, el 5% restante tienen la variante oculta. También se ha reportado que el 25-30% de las LLA del adulto, 5% de las LLA de la infancia y en menos del 3% de las LMA presentan el cromosoma Ph (3). La presencia de esta anomalía es citogenéticamente idéntica en los pacientes con LMC, LMA y LLA (4).

Molecularmente, el cromosoma Ph se caracteriza por la presencia del complejo molecular *BCR-ABL*, formado por la fusión de porciones de los genes *ABL* y *BCR*, ubicado en los cromosomas 9 y 22 respectivamente (5). La translocación añade un segmento 3' del gen *ABL* del cromosoma 9q34 a la región 5' del gen *BCR* en el cromosoma 22q11, creando un gen híbrido *BCR-ABL* que se transcribe en un mRNA *BCR-ABL* (6). En consecuencia, el fragmento 5' del *BCR* y el fragmento 3' del *ABL* están yuxtapuestas en un cromosoma 22 acortado (22q- o cromosoma Ph) (7).

En la literatura se han descrito casos de pacientes con LMC, LMA y LLA que tienen delecciones en el gen *ABL* y dicha alteración se ha relacionado con un mal pronóstico. En el caso específico de los pacientes con LMC, varios autores han descrito que entre el 10-27% de los pacientes tienen grandes delecciones adyacentes al punto de ruptura del gen *ABL*. Estas delecciones ocurren corriente arriba del locus *ABL*, tienen puntos de ruptura variables y pueden extenderse hasta varias megabases. Por lo tanto, esto afecta también el locus del gen de la Arginino Succinato Sintetasa (*ASS*) (8). Sin embargo, en Venezuela los pacientes con LMA y LLA esta frecuencia no está bien determinada y existen muy pocos estudios al respecto (9,10).

Actualmente, existen sondas locus específicas que permiten detectar la delección anteriormente mencionada tanto en metafases como en núcleos interfásicos (11). Con relación a esto último, varios investigadores han reportado que el uso de la sonda locus específica LSI *BCR-ABL* extra señal de Vysis, Inc (10) permite realizar una subclasificación de los pacientes leucémicos de acuerdo a la presencia o ausencia de la delección 5' *ABL*. En este contexto, la nueva sonda de DNA locus específica *BCR/ABL Plus Translocation, Dual Fusion* introducida por Cytocell, permite no solo la detección del complejo *BCR-ABL* sino también permite observar la delección de la región 5' *ABL* (12), lo cual es importante para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de las alteraciones hematológicas malignas.

No obstante, a pesar de lo antes mencionado, en Venezuela el avance tecnológico no es paralelo a la implementación de nuevos sistemas citogenéticos moleculares en el análisis de este tipo de pacientes. Actualmente, en nuestro país se ha realizado un

solo trabajo de este tipo (10). Por tal motivo, es necesario llevar a cabo otros estudios en este campo que permitan evaluar la delección 5' *ABL* mediante la FISH en pacientes leucémicos venezolanos.

Materiales y métodos

Se analizaron un total de 30 muestras de médula ósea provenientes de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre 15 a 78 años de edad ($X \pm DS$: $43,5 \pm 14,5$). De estos pacientes, 19 casos tenían diagnóstico clínico de LMC, 6 de LMA y 5 de LLA; ninguno de ellos había recibido tratamiento. Las muestras de estos sujetos fueron referidas desde los hospitales públicos y privados de la región zuliana al Instituto de Investigaciones Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia durante los años 2010-2013, con la finalidad de realizarles el cariotipo de rutina para diagnóstico y la técnica de FISH con fines de investigación. Para validar la técnica de FISH se analizaron al menos 400 núcleos en interfase de 2 muestras controles de médula ósea que presentaban la delección 5' *ABL* (controles positivos) con un cariotipo 46, XX o XY, t(9;22)(q34;q11.2) y 400 núcleos en interfase de 2 muestras controles de sangre periférica de individuos sanos (controles negativos) con un cariotipo 46, XX o 46, XY. A todas las muestras de los pacientes se les realizaron cultivo cromosómico según la técnica citogenética convencional (13).

Para detectar la delección 5' *ABL* mediante FISH, se utilizó la sonda de DNA locus específica *BCR/ABL* and *BCR/ABL Plus translocation, dual fusion* según el protocolo de hibridación suministrado por la casa comercial (12). La sonda anteriormente mencionada está compuesta por: La sonda *BCR* que abarca 171 kb en la parte centromérica al gen *BCR* y contiene los genes *GNAZ* y *RAB36*. Otra sonda *BCR* abarca 148 kb en la parte telomérica al gen *BCR*, 262 kb hacia el telómero. Ambas están marcadas en verde y orientadas para que los puntos de rotura abarquen la región menor (*mBCR*) y mayor (*MBCR*). Para el gen *ABL*, la sonda abarca 347 kb desde mitad del gen *FUB3* hasta 64 kb telomérico al gen *ABL* y está marcada en rojo. Además, hay una sonda adicional en azul que cubre la región de 212 kb centromérica a *ABL*, incluyendo al gen *ASS*. Esta

sonda adicional tiene un tamaño de 193 kb y abarca el gen *ASS* completo. El gen *BCR* (22q11.23) emite una coloración verde, el gen *ABL* (9q34) roja y el gen *ASS* (9q34) azul (12). Se contaron al menos 400 núcleos en interfase y de acuerdo a las señales fluorescentes observadas se clasificaron de acuerdo al catálogo (12).

Para determinar las tasas de falsos positivos y negativos de la técnica de FISH se utilizaron los criterios establecidos por Chase y col., 1997 (14). Para validar la técnica de FISH se determinó la sensibilidad y especificidad en las muestras controles. Para estos cálculos se utilizaron las fórmulas descritas por Fernández y Díaz, 2003(15).

Resultados y discusión

En el estudio citogenético convencional realizado a los pacientes con LMC se puede observar que 8 de 19 (42,11%) pacientes tenían cariotipo normal y 11 de 19 (57,89%) pacientes tenían la t(9;22) clásica. Sin embargo, se encontraron algunos casos mosaicos donde había la presencia de anomalías cromosómicas numéricas y/o estructurales adicionales a la t(9;22) (casos 1,16, y 17) (tabla 1).

Con relación a la formación del complejo molecular *BCR-ABL* en estos pacientes, se puede observar que 17 de 19 (89,5%) presentaban dicho complejo en más del 50% de los núcleos en interfase analizados ($81,4 \pm 32,5$).

El estudio citogenético reveló que 31,6% pacientes eran Ph negativos. Es decir, presentaron cariotipos normales sin la t(9;22). En todos estos pacientes excepto en dos casos (9 y 18), la técnica de FISH detectó la presencia del complejo molecular *BCR-ABL*. Las investigaciones moleculares han demostrado que la presencia de esta fusión en el cromosoma 22, es indistinguible a nivel molecular, de la que se encuentra en los pacientes con LMC Ph positivos (16,17,18). Estos casos citogenéticamente negativos pero molecularmente positivos se conocen como cromosoma "Ph oculto" (16,19, 20). En este estudio se detectó que 6 de 19 pacientes (31,6%) con LMC tenían el cromosoma Ph oculto es decir, no se observó el cromosoma Ph citogenéticamente pero se evidenció a través de la FISH la presencia del complejo molecular *BCR-ABL*. Estos hallazgos son similares a los reportados por otros autores

quienes publicaron una serie de pacientes con LMC Ph negativos pero con el complejo *BCR-ABL* positivo demostrado a través de la FISH (10, 16,21).

Tabla 1

Hallazgos Citogenético Convencional y Molecular (FISH) en pacientes leucémicos venezolanos

CASO	TIPO DE LEUCEMIA	CARIOTIPO	<i>BCR/ABL</i> +/-	DELECCIÓN 5' <i>ABL</i> +/-
1	LMC	43 ≈ 45, XX - 11, - 19, - 20 [3]/ 47 ≈ 50, XX, +13,+17,+21 [2] / 46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [4]	+	-
2	LMC	46, XY [26]	+	-
3	LMC	46, XX [25]	+	-
4	LMC	46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [15]	+	-
5	LMC	46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [10]	+	-
6	LMC	46, XY, t(9;22) (q34;q11.2) [10]	+	-
7	LMC	46, XX, t(9;22) (q34;q11.2) [10]	+	-
8	LMC	46, XY [20]	+	-
9	LMC	46, XX [20]	-	-
10	LMC	46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [15]	+	-
11	LMC	46, XY [20]	+	-
12	LMC	46, XY, t(9;22)(q34;q11.2) [20]	+	+
13	LMC	46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [10]	+	-
14	LMC	46, XY [16]	+	-
15	LMC	46, XY [15]	+	+
16	LMC	46, XX [10] / 46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [10]	+	-
17	LMC	46, XX, t(9;22)(q34;q11.2), i(17) [19]/46, XX, t(9;22) (q34;q11.2) [1]	+	-
18	LMC	46, XY [15]	-	-
19	LMC	46, XY, t(9;22) (q34;q11.2)[30]	+	-
20	LMA	36 ≈ 44, XY, -1, -4, -5, -9, -15, -17, -19, -21, [5]/ 46, XY [5]	-	-
21	LMA	39 ≈ 43, XX, -4,-11,-15,-17 [6]	+	-
22	LMA	43 ≈ 45, XY, -15, -18 [5]/ 46, XX [11]	+	-
23	LMA	46, XY [15]	+	-
24	LMA	42 ≈ 45, XY,-3, -13, -15 [3]/ 47 ≈ 49,XY, +12,+15[2]/ 46, XY [10]	-	-
25	LMA	46, XY [20]	-	-
26	LLA	46, XX, t(9;22)(q34;q11.2) [10]	+	+
27	LLA	42 ≈ 45, XX, -18,-19,-22 [10]	-	-
28	LLA	46, XY [15]	+	-
29	LLA	46, XX [20]	-	-
30	LLA	46, XY [13]	+	-

La presencia del complejo molecular *BCR-ABL* detectado mediante FISH sugirió que las alteraciones cromosómicas numéricas y estructurales diferentes a la *t(9;22)*, encontradas en algunos pacientes (casos 1 y 17) eran adicionales al cromosoma Ph. Se ha reportado que estas anomalías cromosómicas pueden aparecer en la médula ósea y sangre periférica en la mayoría de los pacientes con LMC, 2-6 meses antes del inicio de la crisis blástica (22). Es importante destacar, que los dos casos mencionados anteriormente (9 y 18), que no presentaron el complejo molecular *BCR-ABL*, deberían ser incluidos dentro de otros trastornos mieloproliferativos diferentes de la LMC al igual que los reportados por Soto y col., 2011 (10).

En cuanto a los hallazgos citogenéticos convencional y molecular (FISH) en pacientes con LMA (tabla 1). Dos pacientes presentaron cariotipos normales (casos 23 y 25), un paciente cariotipo hipodiploide (caso 21) y los tres casos restantes presentaron cariotipos mosaicos dos con dos líneas celulares (hipodiploides y normales) y el otro con tres líneas celulares (hipodiploides, hiperdiploides y normales).

Cabe destacar, que en ninguno de los pacientes se evidenció la *t(9;22)*. Sin embargo, la FISH permitió detectar la presencia de la fusión *BCR-ABL* en el 50% de los pacientes. Investigaciones previas han reportado que la presencia del cromosoma Ph o bien el complejo molecular *BCR-ABL* que se forma producto de este rearrreglo puede aparecer en menos del 3% de los pacientes con LMA de tipo Mo, M1 y M2 (23, 24) y además tiende a conferir un pronóstico desfavorable (23, 25,10).

Soto y col., (2011) encontraron el complejo *BCR-ABL* en 1 de 5 pacientes con LMA, utilizando la sonda ES de Vysis (10). Cabe destacar, que dicho paciente tenía la evidencia citogenética del cromosoma Ph. Por lo tanto, FISH corroboró la existencia del mismo a nivel molecular. Los hallazgos publicados por Soto y col., son similares a los del presente trabajo, porque en ambos se encontró la presencia del complejo molecular, a pesar de que no tenían la *t(9;22)*. Sin embargo, estos resultados difieren de los reportados por Dong y col., 2003, quienes no encontraron la presencia de la fusión *BCR-ABL* a través de la técnica de FISH en 66 pacientes con LMA Ph negativos (26).

En otro orden de ideas, los resultados del cariotipo en los pacientes con LLA (tabla 1), permitieron demostrar que 3 de 5 pacientes (60%) tenían cariotipos normales. De los dos casos restantes, un paciente (caso 27) mostró cariotipo hipodiploide y en el otro (caso 26) se observó la presencia de la *t(9;22)* en 10 de las metafases estudiadas. Es necesario acotar, que en estos pacientes el cariotipo es un factor predictor de pronóstico independiente. De esta manera, el análisis citogenético es un componente vital en el manejo clínico y terapéutico de estos pacientes (27). Se ha demostrado que los cariotipos hiperdiploides se asocian con buen pronóstico. A diferencia de esto, el pronóstico tiende a empeorar a medida que disminuye el número de cromosomas (cariotipo hipodiploide). Clones con 33-44 cromosomas ocurren raramente en LLA y explican aproximadamente el 0,8% de los casos.

A pesar de que solo un paciente con LLA mostró en el cariotipo el cromosoma Ph, la FISH reveló la presencia de la fusión *BCR-ABL* en el 60% de estos pacientes en más del 96% de los núcleos analizados, confirmando que los pacientes restantes tenían el cromosoma Ph oculto. Estos hallazgos son comparables a los reportados en la literatura donde se describe uno entre 27 pacientes con LLA el cual tenía cariotipo normal y la presencia del complejo molecular *BCR-ABL* en el 90% de las células analizadas (28). La presencia del cromosoma Ph en la LLA es de mal pronóstico; y de allí la importancia de detectarlo (27).

Del total de los pacientes leucémicos estudiados, se encontró la delección de la región 5' *ABL* en 2 pacientes con LMC (casos 12 y 15) y un paciente con LLA (caso 26). Las frecuencias obtenidas fueron de 10,5% y 20% respectivamente. En los pacientes con LMA no se evidenció esta delección.

Partiendo de los resultados obtenidos en esta investigación, se puede inferir que estos hallazgos son similares a los reportados previamente por Soto y col., 2011, quienes empleando la sonda ES de vysis en pacientes leucémicos, detectaron la delección 5' *ABL* en 1 de 16 pacientes con LMC Ph positivo (10). Por otra parte, Bennour y col., 2012, realizaron un estudio en 336 pacientes con diagnóstico de LMC, utilizando sondas home-brew 17L7 y 248J22 para detectar delección tanto 5' *ABL* como 3' *BCR*. Estos

investigadores encontraron 19 pacientes (5.7%) que tenían la delección 5' *ABL*, concluyendo que estas deleciones surgen simultáneamente con la t(9;22) (29). Cabe destacar, que a pesar de las diferencias en el tamaño de la muestra la frecuencia reportada fue similar. No obstante, a diferencia de lo antes mencionado hay otros estudios que encontraron frecuencias superiores al 57% (30,32, 33).

Con relación a los pacientes con LLA, Reid y col., 2003, realizaron un estudio con la finalidad de detectar la delección 5' *ABL* empleando un sistema de triple sonda (D-FISH). Este trabajo reportó que 1 de 67 (1.5%) pacientes Ph positivos presentó dicha delección. Esto sugiere que la ocurrencia de esta delección es rara en pacientes con LLA Ph positivos y no afecta el curso clínico agresivo de esta enfermedad (34). Asimismo, Soto y col., 2011 utilizando la sonda ES de vysis en pacientes con LLA, encontraron la delección 5' *ABL* y el complejo molecular *BCR-ABL* en 1 de 9 (11%) pacientes (10). Igualmente, Cetin y col., 2012, empleando la sonda anterior en un total de 208 pacientes con LLA, hallaron 3 pacientes (1.4%) con la delección 5' *ABL* (35). Las diferencias en las frecuencias obtenidas entre esta y las otras investigaciones pueden deberse a varios factores entre ellos: tipo de sonda empleada, tamaño de la muestra, hallazgos citogenéticos, existencia de variaciones geográficas de la población estudiada y pacientes mal referidos, entre otros.

Tomando en consideración todos los pacientes leucémicos analizados en este estudio la frecuencia de la delección 5' *ABL* fue del 10% (3 de 30 pacientes), lo cual es similar a un estudio previo reportado quienes encontraron una frecuencia total del 7% en pacientes leucémicos venezolanos (10).

En este estudio la FISH sugirió que la formación del complejo molecular *BCR-ABL* y la delección 5' *ABL* probablemente ocurrieron en un solo evento. Esto está apoyado sobre el hecho de que en estos pacientes todas las células analizadas tenían la delección con un patrón de hibridación. No se encontró evidencia de subclones sin la delección o con el patrón de hibridación esperado. Es probable que estas deleciones se hayan originado en la fase inicial de este rearrreglo, en los puntos de ruptura adyacentes a la translocación entre los cromosomas 9 y 22.

Hasta los actuales momentos no se ha determinado si la delección 5' *ABL* es considerada como un cambio cromosómico secundario que antecede la evolución hacia la fase acelerada o crisis blástica, o si la delección caracteriza un subgrupo de pacientes con LMC al momento del diagnóstico. Con los resultados obtenidos en esta investigación no se puede apoyar ninguna de las hipótesis anteriormente planteadas, ya que no se obtuvieron muestras secuenciales (al momento del diagnóstico y durante la crisis blástica) que permitiera determinar la presencia o ausencia de la delección en cada fase de la enfermedad o la existencia de variaciones en la proporción de células con la delección durante la progresión de la enfermedad.

Los pacientes con LMC que tienen deleciones de la región 5' *ABL* progresan a fase blástica o acelerada más rápidamente que aquellos pacientes que no la tienen y la supervivencia de estos pacientes con la delección es más corta que en los pacientes sin la delección (36 meses Vs ≥ 90 meses) (31). Por lo tanto, esta delección es un indicador de mal pronóstico en pacientes con LMC (8, 26, 30, 32, 34, 36). Los resultados obtenidos en este estudio parecen apoyar esta hipótesis, ya que los pacientes con LMC positivos para la delección se encontraban en crisis blástica, así como también el paciente con LLA, quien no tenía una respuesta favorable a ningún tratamiento. Sin embargo, se requieren más estudios que involucren un mayor número de pacientes y otros trastornos leucémicos diferentes de la LMC para investigar una posible correlación entre estas deleciones y la progresión hacia la crisis blástica.

Tomando en consideración lo antes expuesto la sonda *BCR-ABL Plus translocation dual fusión* produjo como resultado la identificación de un subgrupo de pacientes leucémicos que tenían delección de la región 5' del gen *ABL* incluyendo el gen de la *ASS*. Según Huntly y col., 2001, esta alteración puede representar una consecuencia de la inestabilidad genética dentro de la célula diana en el momento de la translocación Ph y el mal pronóstico puede reflejar una predisposición a posteriores alteraciones genéticas adicionales dentro del clon maligno (37).

Por otra parte, con la finalidad de validar los resultados se determinó la sensibilidad y

especificidad de la técnica de FISH en la detección de la delección 5' *ABL* así como también la TFP y TFN. Estos cálculos se realizaron a partir del análisis de al menos 400 núcleos en interfase provenientes de las muestras controles negativos y positivos. Se obtuvo un porcentaje de células positivas de $97,5 \pm 3,5$ y un porcentaje de células negativas de $99,5 \pm 0,7$. De esta manera, se halló una sensibilidad de 97,5% y una especificidad de 99,5%, con una TFP de 0,5 y una TFN de 2,5.

Según nuestro conocimiento no hay evidencia de alguna investigación previa en la cual se hayan obtenido datos para realizar una validación de esta técnica utilizando la sonda *BCR-ABL Plus translocation dual fusion* empleada en esta investigación, solo existen datos de la validación de la técnica para la detección del complejo *BCR-ABL*. Con relación a esto último, se ha reportado una gran variabilidad entre las TFPs Y TFNs. (10, 14, 16, 30,31, 38,39,40).

Las diferencias entre las TFP y las TFN en los diferentes trabajos reportados pueden deberse a las siguientes razones: El tamaño del núcleo, el cual va a depender del tipo de muestra analizada (medula ósea o sangre periférica) y del procedimiento citogenético utilizado para la obtención de las células (células directamente cosechadas o cultivadas, estimulación con fitohemaaglutinina, condiciones de preparación de la lámina, uso de shock hipotónico). El tamaño de la señal, lo cual a su vez va a depender del tipo de sonda utilizada y de los diferentes métodos de detección (utilización de amplificación de la señal o no). La evaluación de la señal o criterio utilizado para definir la señal de fusión, es decir, si las señales están separadas por poco diámetro, si están fusionadas o si se solapan. La posición genómica del punto de ruptura en el gen *ABL*. La fase en la cual se encuentra el núcleo en interfase a analizar (G1, S, G2). Así como también, las condiciones de la hibridación, intensidad de la señal, homogeneidad de la muestra, número de núcleos analizados, diferencias entre los microscopistas y las posibles diferencias en la estructura o grado de condensación de la cromatina (14, 36).

Las evidencias obtenidas en esta investigación sugieren que la técnica de FISH con la sonda *BCR-ABL Plus translocation dual fusiones* altamente sensible

(97,5%) y específica (99,5%) para la identificación de un subgrupo de pacientes que portan la delección 5' *ABL*. Además, esta técnica comparte las múltiples ventajas que ofrece en la detección del complejo *BCR-ABL* tales como la rapidez y la confiabilidad. Es una prueba cuantitativa, ya que permite cuantificar el número de células que porta la alteración cromosómica y cualitativa, ya que determina la presencia o ausencia de dicha alteración. Permite el análisis de un gran número de células. Es invaluable en aquellos casos en los cuales no hay metafases o éstas no están disponibles debido a su mala calidad, permite la detección de cromosomas Ph oculto y la reclasificación de casos de LMC mal diagnosticados.

Adicional a lo anteriormente mencionado, el protocolo de hibridación de la sonda es más sencillo y rápido que las empleadas con anterioridad, las láminas pueden ser almacenadas por un lapso de tiempo mayor, la sonda evita la superposición de las señales de hibridación (evita los falsos positivos y negativos) y tiene una excelente relación costo-beneficio. Esto último, es de gran utilidad para el pronóstico clínico de los pacientes con enfermedades hematológicas malignas. Por estas razones, es una técnica que complementa el análisis citogenético convencional y debería ser utilizada para el adecuado manejo clínico de pacientes con este tipo de trastornos.

Finalmente, la frecuencia de la delección 5' *ABL* en pacientes leucémicos venezolanos es similar a la descrita mundialmente; siendo más frecuente en pacientes con LMC que en LLA. Del mismo modo, la FISH conjuntamente con el empleo de la nueva sonda *BCR-ABL Plus translocation dual fusión*, es altamente sensible y específica para identificación de un subgrupo de pacientes leucémicos que portan dicha delección,

Agradecimientos

Esta investigación fue subvencionada por el CONDES-LUZ.

Referencias bibliográficas

1. BERNADETTE R. **Hematología: Fundamentos y aplicaciones**

- clínicas.** Médica Panamericana. Buenos Aires-Argentina. 455-485. 2004.
2. SHIRLYNB., MACKENZIES. **Hematología clínica.** El manual moderno. Santafé de Bogotá – México. 431-461. 1999
 3. FADERL S., TALPAZ M., STROV Z., O'BRIEN S., KURZROCK R., KANTARJIAN H. **N Engl J Med.**
 4. SANS J., BESSES P., VIVES J., CASTILLO R. **Hematología Clínica.** Harcourt, S.A. Barcelona-España. 134-135. 2001.
 5. RODRÍGUEZ M., CARDONA A., GRAJALES M., ENCISO L., RUIZ G., YEPES A., OSPINA V., GÁLVEZ K., GARCÍA J., ROSALES J., ROSALES M., ROSALES C., QUINTERO G., TIMANÁ J., CASAS C., COMBARIZA J., VARGAS E., MOLANO A. **Rev Venez Oncol.** 19(4): 287-296. 2007.
 6. ROMÁN J., JIMÉNEZ A., SAGLIO G., ROCCHI M., MALDONADO J., TORRES A. **Haematologica.** 86(1): 90-98. 2001.
 7. CORTÉS J., TALPAZ M., BERAN M. **Cancer.** 75(2):464-470. 1995
 8. HERENS C., TASSIN F., LEMAIRE V., BEGUIN Y., COLLARD E., LAMPERTZ S., CROISSIAU C., LECOMTE M., DE PRIJK B., LONGREE L., KOULISCHER L. **Br J Haematol.** 110(1): 214-216. 2000.
 9. ROBINSON H., MARTINEAU M., HARRIS R., BARBER K., JALALI G., MOORMAN A., STREFFORD J., BROADFIELD Z., CHEUNG K., HARRISON C. **Leukemia.** 19(1): 564-571. 2005.
 10. SOTO M; ÁLVAREZ F; ROJAS A., URDANETA K., CAÑIZALEZ J., GONZÁLEZ R. **Ciencia.** 19(1):5-16. 2011.
 11. ESPINET B., SALIDO M., SOLÉ F. 2007. Comunicación personal. <http://www.cytocell.com/>. Fecha de consulta: 12/06/2013.
 13. MOORHEAD P., NOWELL P., MELLMAN W., BATTIPS D., HUNGERFORD D. **Experimental Cell Research.** 20(1): 613-616. 1960.
 14. CHASE A., GRAND F., GUANG J., BLACKETT N., GOLDMAN J., GORDON M. **Genes, Chromosomes Cancer.** 18(1):246-253. 1997.
 15. FERNÁNDEZ P., DÍAZ P. “Metodología de la Investigación: Pruebas diagnósticas”. *Caderns de Atenció Primària.* 10: 120-124. 2003.
 16. CHEN Z., MORGAN R., BERGER C., PERARCE-BIRGE L., STONE J., SANDBERG. **Cancer Genet Cytogenet.** 70(1): 103-107. 1993.
 17. HSU W., PRESISLER H., SZEGO K., SPRUDZS R., GAO X. **Cancer Genet Cytogenet.** 104(1): 57-60. 1998.
 18. COSTA D., ESPINET B., QUERALT R., CARRIÓ A., SOLÉ F., COLOMER D., CERVANTES F., HERNANDEZ J., BESSES C., CAMPO E. **Cancer Genet Cytogenet.** 141(1): 114-119. 2003.
 19. MOREL F., HERRY A., LE BRIS M., MORICE P., BOUQUARD P., ABGRALL J., BERTHOU C., DE BRAEKELEER M. **Cancer Genet Cytogenet.** 141(1):115-120. 2003.
 20. ZAGARIA A., ANELLI L., ALBANO F., STORLAZZI T., LISO A., ROBERTI M., BUQUICCHIO C., LISO V., ROCCHI M., SPECCHIA G. **Cancer Genet Cytogenet.** 150(1): 81-85. 2004.
 21. DEWALD G., SCHAD C., CHRISTENSEN E., TIEDE A., ZINSMEITER A., SPURBECK J., THIBODEAU S., JALAL S. **Cancer Genet Cytogenet.** 71(1):7-14. 1993.
 22. GARCÍA J. Factores promóscito en Leucemia Mieloide Crónica Filadelfia Positiva en pacientes tratados con inhibidores de la tirosincinasa (Tesis Doctoral). Facultad de Medicina. Universidad de Granada. España. 238p. 2008.
 23. MRÓZEK K., HEINONEN K. **Cancer Genet Cytogenet.** 132(1): 171. 2001.
 24. GONZALEZ J. **Cancer Genet Cytogenet.** 98(1): 111-114. 1997.2

25. WELTERMANN A., FONATSCH C., HAAS O., GREINIX H., KAHLS P., MITTERBAUER G., JÄUER U., KAINZ B., GEISLER K., VALENT P., SPERR W., KNÖBL P., SCHWARZINGER I., GLEIB A., LECHERK. **Leukemia**. 18(1): 293-302.2004.
26. DONG S., YUN-SONG L., YEON-SOOK Y., YOUNG-REE K., SEOK S., YOUNG K., CHA JA S., SUNG S., HAE R., YONGSOO K., HAN I. **Genes, Chromosomes Cancer**. 37(3): 291-299.2003.
27. HARRISON C., FORONI L. **Hematology**. 62(1): 91-113.2002.
28. NORDGREN A., SCHOUMANS J., SÖDERHÄLL S., NORDENSKJÖLD M., BLENNOW E. **Br J Haematol**. 114(1): 786-793. 2001.
29. BENNOUR A., OUAHCHI I., BEN Y., ZAIER M., LAATIRI M., HARRABI I., MEDDEB B., ELLOUMI M., KHELIF A., SAAD A., SENNANA H. **Med Oncol**. 29(2):1151-1160.2012.
30. SINCLAIR P., NACHEVA E., LEVERSHA M., TELFORD N., CHANG J., REID A., BENCH A., CHAMPION K., HUNTLY B., GREEN A. **Blood**. 95(3):738-743.2000
31. WU W., XUE YQ., WU YF., PAN JL., SHEN J. **ZhonghuaXue Ye XueZaZhi**. 27(3):183-186.2006.
32. SMOLEYS., BROCKMANS., PATERNOSTER S., MEYER E., DEWALD G. **Cancer Genet Cytogenet**. 148(1): 1-6.2004.
33. QUINTÁS A., KANTARJIAN H., SHAN J., JABBOURE., ABRUZZPL., VERSTOVSEK S., GARCIA G., O'BRIEN S., CORTES J. **Cancer**. 15(1):5085-5093.2011.
34. REID A., HUNTLY B., HENNIG B., NIEDERWIESER D., CAMPBELL L., BOWN N., TELFORD N., WALKER H., GRACE C., DEININGER M., GREEN A., NACHEVA E. **Blood**. 99(6):2274-2275. 2003.
35. CETIN Z., YAKUT S., KARADOĞAN I., KUPESIZA., TIMURAGAĞLU A., SALIM O., TEZCAN G., ALANOĞLU G., OZBALCI D., HAZAR V., YESILİPEK MA., UNLAR L., LULECI G., BERKER S. **Genet Test Mol Biomarkers**. 16(5):318-323.2012.
36. COHEN N., ROZENFELD G., HARDAN I., BROK F., AMARIGLIO N., RECHAVI G., TRAKHTENBROT L. **Cancer Genet Cytogenet**. 128(1): 114-119.2000.
37. HUNTLYB., REID A., BENCH A., CAMPBELL L., TELFORD N., SHEPHERD P., SZERJ., PRINCE H., TURNER P., GRACE C., NACHEVA E., GREEN E. **Blood**. 98(6): 1732-1738.2001.
38. GRAND F., CHASE A., IQBAL S., NGUYEN D., LEWIS J., MARLEY S., DAVIDSON R., GOLMAN J., GORDON M. **Genes, Chromosomes, Cancer**. 23(1): 109-115.1998.
39. NAJFELD V. **Cancer Genet Cytogenet**. 132(1): 171.2002.
40. KOWALCZYK J., GAWORCZYK A., WINNICKA D., LEJMAN M., BABICZ M. **Cancer Genet Cytogenet**. 142(1):51-55.2003.



UNIVERSIDAD
DEL ZULIA

CIENCIA

Vol. 23 N° 3, Julio-Septiembre 2015

*Esta revista fue editada en formato digital y publicada
en Septiembre de 2015, por el **Fondo Editorial Serbiluz,**
Universidad del Zulia. Maracaibo-Venezuela*