

Anormalidades cromosómicas clonales en enfermedades hematológicas malignas mediante FISH

Marisol Soto-Quintana., Alicia Rojas-Atencio, Hugo Chirino, Francisco Alvarez-Nava, Lennie Pineda-Del Villar, Karelis Urdaneta, Sandra González-Ferrer y Richard González.

Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Palabras clave: Enfermedades hematológicas malignas, hibridación *in situ* fluorescente.

Resumen. La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es un método rápido, sensible y confiable que permite la identificación de cromosomas completos o porciones de los mismos tanto en metafases como en núcleos en interfase. En este trabajo se analizaron 32 muestras de médula ósea de pacientes con enfermedades hematológicas malignas (11 LMA, 7 LLA, 12 LMC y 2 LLC). Estas fueron referidas a la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de La Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela durante los años 1994-1996. Todas las muestras se analizaron mediante técnicas citogenéticas convencionales y moleculares (FISH) utilizando sondas de cromosomas totales, α satélites y locus específicas. En los pacientes con LMA y LLA la técnica de FISH detectó anomalías cromosómicas clonales no detectadas por la técnica citogenética convencional. Así mismo, se identificó el complejo PML- α RARA en las leucemias promielocíticas agudas. En el caso de la LMC se demostró la presencia del complejo molecular ABL-BCR. En este trabajo se demuestra la utilidad del FISH en la detección de anomalías cromosómicas clonales, las cuales son importantes en el manejo clínico de pacientes con este tipo de patologías.

Clonal chromosomal abnormalities in malignant hematological diseases by FISH.

Invest Clin 1998; 39(2): 85- 96.

Key words: Malignant hematological diseases; fluorescent *in situ* hybridization.

Abstract. Fluorescent in situ hybridization (FISH) is a rapid, sensitive and reliable method for the identification of complete chromosomes, or segments of them, during metaphase or nuclear interphase. The present study shows the results of the analysis of 32 bone marrow aspirates from patients with malignant hematological diseases (11 AML, 7 ALL, 12 CML and 2 CLL), referred to the Medical Genetics Unit of the Faculty of Medicine, Zulia University, Maracaibo, Venezuela between 1994 and 1996. All samples were studied by conventional and molecular techniques (FISH), using probes of total chromosomes, α -satellites and locus specific. In patients with AML and ALL the FISH technique detected clonal chromosomal abnormalities, that were not found by the conventional cytogenetic technique. Furthermore, the PML- α RARA complex was identified in the promyelocytic acute leukemias. The presence of the molecular complex ABL-BCR was also demonstrated in CML. The present study demonstrates the usefulness of the FISH technique in the detection of clonal chromosomal abnormalities, which are important when considering the clinical care of patients with these pathologies.

Recibido: 27-6-97. Aceptado: 1-4-98.

INTRODUCCION

Las técnicas convencionales para el análisis citogenético han sido extensamente utilizadas para el manejo clínico de los pacientes con enfermedades hematológicas malignas; el mismo permite la identificación de anomalías cromosómicas clonales las cuales proveen información que ayuda al diagnóstico, pronóstico y monitoreo del estado de remisión de la enfermedad (1, 2, 3, 4). Sin embargo, en muchas ocasio-

nes estas no aportan una información completa debido principalmente a insuficiencia o ausencia de metafases analizables, particularmente en neoplasias hematopoyéticas con severa pancitopenia o después de la quimioterapia (4, 5). Por otro lado, dada su naturaleza no se puede aplicar en células en interfase, en células completamente diferenciadas, como los neutrófilos y en células con bajo índice mitótico como ocurre en los pacientes con Leucemia linfóide crónica (1). Por otra

parte, presenta otras limitaciones tales como la imposibilidad de visualizar microdeleciones, translocaciones crípticas, así como la identificación de cromosomas derivados y marcadores (6).

Todas estas limitaciones se superaron a raíz del advenimiento de la técnica de Hibridación *in situ* Fluorescente (FISH). Esta se fundamenta en el mismo principio del análisis del Southern blot, con la diferencia que se realiza sobre una lámina de vidrio. El ADN nuclear a analizar es desnaturalizado y posteriormente hibridado con una sonda específica marcada con biotina o digoxigenina y posteriormente, se realiza la detección con un colorante fluorescente conjugado con avidina o anticuerpos anti-digoxigenina según sea el caso (5, 7, 8).

El objetivo de este trabajo es demostrar la utilidad que tiene la técnica de FISH en la detección de anomalías cromosómicas clonales en pacientes con enfermedades hematológicas malignas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron 32 muestras de médula ósea de pacientes con enfermedades hematológicas malignas (11 LMA, 7 LLA, 12 LMC, 2 LLC). Estas fueron referidas a la Unidad de Genética Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia durante los años 1994-1996. El grupo de leucemias agudas se clasificó de acuerdo al grupo FAB (9).

Las muestras se cultivaron según la técnica descrita por Yunis en

1981 (10). Los cromosomas obtenidos se caracterizaron por el método de bandeado G previa utilización de tripsina y los cariotipos descritos de acuerdo al sistema internacional de nomenclatura citogenética (ISCN) 1985 (11).

El análisis mediante la técnica FISH se realizó utilizando el protocolo y las sondas suministradas por Oncor Inc. (Gaithersburg MD). Se utilizaron varios tipos de sondas: de cromosomas totales; para los cromosomas 3 y 8 marcadas con biotina y para los cromosomas 6, 7 y X marcadas con digoxigenina. Alfa satelites; para los centrómeros de los cromosomas 1, 11, 12, 13/21 y Y marcadas con biotina. La detección de todas estas sondas se realizó con fluoresceína. Locus-específicas; para observar los complejos moleculares ABL-BCR y PML- α RARA producto de la t(9;22) y t(15;17).

Sondas para los genes ABL y PML fueron marcadas con biotina y detectadas con fluoresceína (señal verde-amarilla), la de los genes BCR y α RARA marcadas con digoxigenina y detectadas con rodamina (señal roja). La contratinción se realizó con DAPI (azul).

El criterio para la selección de las sondas centroméricas se realizó en base a las anomalías cromosómicas (trisomías y monosomías) y en el caso de las sondas para cromosomas totales estas se utilizaron para corroborar anomalías cromosómicas estructurales, ambas reportadas más frecuentemente en las enfermedades hematológicas malignas.

Se estudiaron de 100-300 núcleos en interfase para cada sonda exceptuando la de cromosomas totales en las cuales se analizaron de 10-20 metafases por lámina, se fotografiaron al menos 3 campos por paciente utilizando película Kodak color de 35mm.

En el estudio convencional la calificación de clonalidad cromosómica se realizó dependiendo si se trataba de una anomalía estructural o numérica. Esto es, cuando se repetía dos veces la misma alteración si era una anomalía de tipo estructural o numérica del tipo hiperdiploidía o trisomía y tres veces si se trataba de hipodiploidías o células monosómicas (4, 12, 13),.

Para el estudio de FISH el criterio para considerar un clon anormal se estableció en nuestro laboratorio, tomando en cuenta los criterios reportados por Anastasi y cols. (1) mediante el análisis de 300 núcleos como mínimo por sonda provenientes de 6 individuos sin enfermedad hematológica maligna aparente. La decisión de la presencia de un clon monosómico se consideró cuando más del 10% ($X + 2DS$) de los núcleos de las muestras controles mostraban una sola señal de hibridación, un clon trisómico cuando más del 2% ($X + 2DS$) de los núcleos mostraban tres señales de hibridación. La fórmula $X + 2DS$ indica el umbral a partir del cual se considera la presencia de trisomía o monosomía (6). Los complejos ABL-BCR y PML- α RARA positivos cuando se observó una señal de fusión

roja/verde o algunas ocasiones una señal amarilla.

RESULTADOS

La Tabla I muestra los datos clínicos, y resultados citogenéticos y moleculares de 11 pacientes diagnosticados con LMA. Se observa que en los casos 1, 4-8, y 11 la técnica de FISH confirma los resultados obtenidos por la técnica citogenética convencional y en los casos 2 y 3 que corresponden a pacientes con leucemia promielocítica aguda se confirma molecularmente la presencia del complejo PML- α RARA. Además, la técnica molecular detecta anomalías cromosómicas clonales no detectadas por la técnica de citogenética convencional, los cuales corresponden a los casos No. 9 y 10.

En los pacientes con LLA presentados en la Tabla II se observa que en el caso No. 1, cuyo cariotipo presentaba líneas celulares hipodiploides, la única anomalía cromosómica clonal detectada fue la monosomía del cromosoma 7 (Fig.1). Así mismo, en los casos 4 y 5 no fue posible obtener metafases analizables. Sin embargo, al analizar los núcleos en interfase mediante la técnica de FISH, utilizando sondas α -satélites para los cromosomas 1, 11, 12 y 13/21 se pudo demostrar clonalidad para las trisomías 11 y 21 en el caso No. 4 y 11, 12, y 21 en el caso No. 5.

En el caso No. 7 se observó en el cariotipo un cromosoma 12 extra el cual estaba constituido solo por el centrómero y el brazo largo. Se utilizó una sonda α satélite para el mis-

TABLA I
 DATOS CLINICOS, CITOGENETICOS Y MOLECULARES DE PACIENTES
 CON LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

CASO	SEXO	EDAD	LMA	CARIOTIPO	FISH
1	M	43	M4	45,XY,-7	M. 7 70%
2	M	25	M3	46,XY,t(15q;17q)	C PR. 76%
3	F	7	M3	46,XY,t(15q;17q)	C PR. 58%
4	M	8	M2	45,XY,-8	M. B 32%
5	M	21	M2	45,XY,-11	M. 11 47%
6	F	27	M2	46,XX/47,XXX	T. X 24%
7	M	65	M6	46,XX/HIPERDIP.	T. 11 18% T. 12 7% T. 21 12%
8	M	33	M2	45,X/46,XY	M. Y 34%
9	F	42	M2	46,XX	T. 21 6%
10	F	27	M5	46,XX	M. 11 11%
11	M	13	M4	45,XY,-3	M. 3 29%

C PR.: Complejo PML- α RARA

TABLA II
 DATOS CLINICOS, CITOGENETICOS Y MOLECULARES DE PACIENTES CON
 LEUCEMIA LINFOIDE AGUDA

CASO	SEXO	EDAD	LLA	CARIOTIPO	FISH
1	F	15	L1	46,XX./HIPODIP.	M. 7 70%
2	M	10	L1	47,XY,+21/48,XY+8+21	T. 8 12% T. 21 88%
3	M	6	L2	46,XY./PSEUDOP.	M. 11 10% M. 12 9% T. 21 30%
4	F	8	L1	---	T. 11 20% T. 12 2% T. 21 40%
5	M	10	L2	---	T. 11 15% T. 12 6% T. 21 30%
6	F	10	L2	47,XX,+21,del(3q)(4q)	T. 21 98% D.3q 60%
7	F	12	L3	47,XX+12q	T. 12 80%

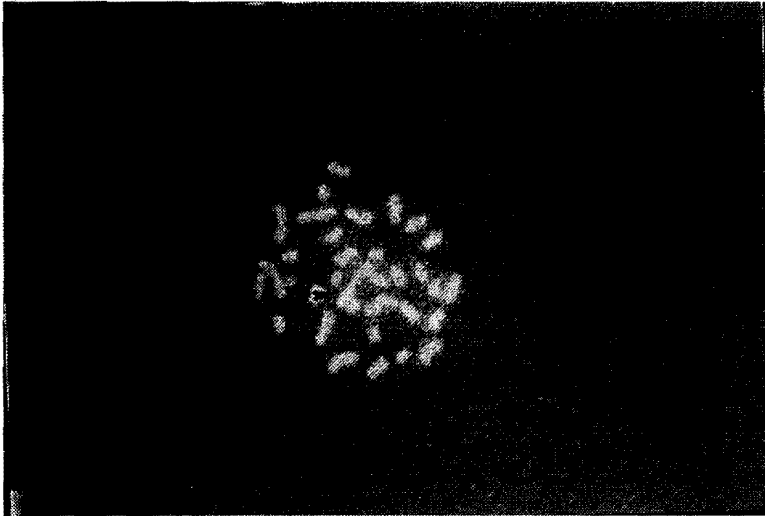


Fig. 1 Muestra una metafase donde se observa una monosomía del cromosoma 7. Se observa mediante FISH 1 sola señal fluorescente que corresponde al cromosoma 7.

mo confirmando tal trisomía en el 80% de los núcleos interfásicos analizados. En el resto de los casos el FISH confirmó los resultados de la técnica citogenética convencional (Tabla II).

En los 14 pacientes diagnosticados como leucemias crónicas el 85,7% (12/14) corresponden a LMC y 14,3 % (2/14) a LLC. Los pacientes con LLC resultaron cariotípicamente normales, se utilizó la sonda *α*satelite para el cromosoma 12, observándose dos señales. En los pacientes con LMC el 83,4% (10/12) mostraron en el cariotipo la translocación clásica 9;22 (Ph clásico), 8,3% (1/12) translocación 16;22 (Ph variante tipo simple) y 8,3% (1/12) la translocación 8;21. En todos se comprobó la presencia del complejo ABL-BCR (Tabla III).

DISCUSION

Por más de 20 años los estudios citogenéticos convencionales han sido utilizados para estudiar las anomalías cromosómicas en pacientes con enfermedades hematológicas malignas. En muchos países estos estudios se consideran como indispensables para el manejo clínico de este tipo de trastornos (13).

La hibridación *in situ* Fluorescente (FISH) es una técnica que surge con la finalidad de superar algunas limitaciones del estudio citogenético convencional y de alta resolución cromosómica. Esta técnica desarrollada por Rudkin y Stollar, y posteriormente, empleada en células en interfase por Cremer y col. (8, 14) ha tenido gran impacto en corto tiempo, tanto en los laboratorios de citogenética como de patología, debi-

TABLA III
DATOS CITOGENETICOS Y MOLECULARES DE PACIENTES
CON LEUCEMIAS CRONICAS

TIPO	CARIOTIPO				TIPOS DE SONDAS			
	NORMAL	t(9;22)	t(8; 21)	t(16; 22)	α-SAT.12		ABL-BCR	
					T	N	P	A
LLC	2	-	-	-	0	2	-	-
LMC	-	10	1	1	-	-	12	0

T: Trisomía; N: Normal; P: Presencia; A: Ausencia (del Complejo ABL-BCR)
 a-SAT.12: Sonda a satélite para cromosoma 12.

do principalmente a que es una técnica rápida, es muy alta su eficiencia de hibridación, detección, sensibilidad y especificidad. Así mismo, permite analizar un gran número de células en poco tiempo y se pueden obtener resultados citogenéticos en células en interfase, totalmente diferenciadas, en muestras que contienen pocas células, inclusive metafases no adecuadas para estudios citogenéticos de rutina (Fig. 2) tales como, muestras de pacientes después de haber recibido quimioterapia o trasplante de médula ósea (2, 5). Sin embargo, a pesar de las ventajas y del impacto que ha tenido la aplicación del FISH en el manejo clínico de pacientes con enfermedades hematológicas malignas, muy pocos estudios han comparado el análisis citogenético de interfase (FISH) con los estudios citogenéticos convencionales.

Larson y col. investigaron el valor predictivo de los datos citogenéticos en 148 adultos con LMA de novo. Sus resultados demuestran que aquellos pacientes con cariotipo normal presentan mejor pronóstico

que aquellos que no lo tienen. Posteriormente Hein y Mitelman corroboran estos hallazgos (15) y aclaran que existe un grupo de pacientes con cariotipo anormal que presentan buen pronóstico, por ejemplo, pacientes con inv/del (16), t(8;21), t(15;17), t(16;p16).

Rowley y col. (16) indican que el beneficio práctico más importante del análisis citogenético en pacientes con LMA es que ayuda a determinar tanto el diagnóstico como el pronóstico. Sin embargo, es necesario mencionar que en ocasiones el análisis citogenético convencional puede indicar un pronóstico errado o inadecuado debido generalmente a la poca cantidad de metafases estudiadas. El análisis citogenético mediante la utilización de FISH ha contribuido a esclarecer estos casos. Un ejemplo de ello lo constituyen los dos pacientes con LMA donde debido al insuficiente número de metafases analizadas se reporta como cariotipo normal, teniendo según el análisis citogenético convencional "buen pronóstico", pero al realizar la técnica de FISH, se logró demostrar



Fig. 2 Muestra una metafase inadecuada para estudio citogenético convencional. Se observa mediante FISH 2 señales fluorescentes que corresponden a los dos cromosomas 7.

la presencia de anomalías cromosómicas clonales (trisomía 21 y monosomía 11) indicativas de mal pronóstico.

En el 50% de pacientes con LMA, sub-tipo FAB M3, se encontró la translocación 15;17, la cual es patognomónica de este tipo de leucemia.

La translocación 15;17 es la evidencia citogenética de un rearrreglo molecular que involucra el gen α -RARA sobre el cromosoma 17, que codifica el receptor para el ácido retinoico y el gen llamado PML (leucemia promielocítica) sobre el cromosoma 15. Este complejo comprende la porción 5' del gen PML, el exón 3' y la porción remanente 3' del gen α -RARA (17, 18).

Este hallazgo es particularmente importante ya que este tipo de pacientes son susceptibles de ser tratados con derivados del ácido retinoico (17, 18). En este sentido la técnica puede ser empleada, no solo con fines diagnósticos sino también pronósticos y terapéuticos. En este estudio, los dos pacientes analizados presentaron tanto la evidencia citogenética como molecular de este complejo.

La LLC, es la leucemia más común en los Estados Unidos y Europa comprendiendo cerca del 30% de todas las leucemias. En 1984 Han y col. estudiaron 21 pacientes con esta enfermedad y señalaron que el 62% presentaban trisomía del cromosoma 12 como única anomalía o en combinación con otras anormali-

dades, por lo tanto consideraron que la trisomía 12 era el cambio más importante en la LLC (19). Sin embargo, Kwong y col. estudiaron 19 pacientes chinos con esa misma enfermedad utilizando FISH y encontraron solo 2/19 (10%) (20).

En este estudio, en los dos pacientes analizados no se encontró tal alteración, probablemente debido al pequeño número de casos estudiados o a diferencias biológicas entre poblaciones. Por lo tanto se requiere de otros estudios con un mayor número de casos para confirmar la incidencia real de trisomía 12 en nuestra población.

La LMC se caracteriza citogenéticamente por la presencia del cromosoma Philadelphia (Ph) producto de la t(9;22) (q34;q11.2) y molecularmente por la formación del complejo ABL-BCR originado de la fusión del proto-oncogen Abelson (ABL) ubicado en la región 9q34 con el gen BCR ubicado en la región 22q11.2. (16, 21-26).

Han sido reportados diferentes tipos de translocaciones en este trastorno las cuales incluyen: el cromosoma Ph clásico, el cual aparece en el 90% de todos los casos de LMC. El cromosoma Ph variante, que explica aproximadamente el 5% de los casos. Este último citogenéticamente puede ser de 2 tipos: variante Ph simple, cuando la translocación involucra al cromosoma 9 o al 22 con otro cromosoma. Variante Ph compleja, cuando involucra a los cromosomas 9 y 22 con otro(s) cromosomas. Esto es, involucra tres o más cromosomas, pero ellos inclu-

yen ruptura y puntos de fusión en 9q34 y 22q11.2. y el llamado Ph oculto, donde no se observa la anomalía cromosómica pero tienen el complejo molecular (22, 27, 28). Esto ocurre en el 5% de los casos de LMC y corresponden a translocaciones sub-microscópicas o a un bajo nivel de mosaicismo (22, 23).

En este estudio se demostró la presencia del complejo molecular ABL-BCR mediante la técnica de FISH en todos los pacientes con LMC. Es importante destacar, que en los casos donde se observó la traslocación 8;21 y 16;22, (Tabla III) la presencia del complejo molecular ABL-BCR sugirió que la t 8;21 era una anomalía adicional al cromosoma Ph oculto. La t 16;22 resultó una variante Ph tipo simple producto de una traslocación compleja críptica que involucraba a los cromosomas 9 y 22 con otro cromosoma.

Con los métodos citogenéticos convencionales, la observación de un cromosoma Ph puede ser evidencia de LMC, pero no es evidencia directa de la fusión ABL-BCR (23), y en estos casos es donde la aplicación del FISH es relevante.

Nuestros resultados demuestran la utilidad de la técnica de FISH para el análisis citogenético, ya que es una técnica rápida, sencilla, confiable y de muy alta resolución. Permite la detección de secuencias de ADN de interés, tanto en metafases como en núcleos en interfase, la demostración de clonalidad de tipo numérico, la visualización de los complejos ABL-BCR y PML- α RARA no detectados por téc-

nicas convencionales. Por lo tanto, su uso conjuntamente con el análisis citogenético convencional resulta indispensable para el adecuado manejo clínico de pacientes con enfermedades hematológicas malignas

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecimiento al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CONDES) de La Universidad del Zulia por el financiamiento de este trabajo (No. 0609-94).

A la Dra. María Díez de Ewald por la traducción del resumen en inglés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANASTASI J., LE-BEAU M., VARDIMAN J., WESTBROOK C.: Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by *in situ* hybridization with a chromosome-specific probe. *Am J Pathol* 1990; 136(1):131-139.
2. CHEN Z., MORGAN R., BERGER C., SANDBERG A.: Application of fluorescence *in situ* hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 63:62-69.
3. GONZÁLEZ R.: Las nuevas técnicas citogenéticas en el diagnóstico hematológico. *Sangre* 1996; 41(3):185-188.
4. ROONEY D., CZEPULKOWSKI B.: Human cytogenetics. A practical approach en: Rickwood D., Hames B. Eds. *The role of cytogenetic in the assessment of haematological disorders*. New York: Oxford University press., 1992. p. 19.
5. LE BEAU M.: Detecting Genetic Changes in human tumor cell: have scientists "Gone Fishing?". *Blood* 1993; 81(8):1979-1983.
6. PERÉZ A., SOLÉ F., WOESSNER S., FLORENSA L., BESSES C., ESPINET B., CABALLÍN M., GARCÍA L., SANS-SABRAFÉN J.: Estudio citogenético de 121 pacientes afectados de diversas neoplasias hematológicas mediante la técnica de hibridación *in situ*. *Sangre* 1996; 41(3):201-209.
7. MCNEIL J., JOHNSON C., CARTER K., SINGER R., LAWRENCE J.: Localizing DNA and RNA within nuclei and chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Gata* 1991; 8(2):41-58.
8. TRASK B.: Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Tig* May 1991; 7(5):140-154.
9. BENNET J., CATOVSKY D., DANIEL M.: Proposal for the classification of acute leukemias: French. American. British (F.A.B) cooperative group. *Br. J Haematol* 1976; 33:451-453.
10. YUNIS J.: New chromosomes techniques in the study of human neoplasia. *Human Pathology* 1981; 12(6):540-549.
11. ISCN (1985): An international system for human cytogenetic

- nomenclature, Harden D, Klinger H, eds.; published in collaboration with Cytogenet Cell Genet (Karger, Basel, 1985); also in Birth defect: original article series, vol, 21 No. 1 (March of dimes birth defects foundation, New York, 1985).
12. Fourth international workshop on chromosome in leukemia, 1982 (1984). *Cancer Genet Cytogenet* 33,254.
 13. LISKER R.: Hallazgos citogenéticos en padecimientos hematológicos malignos. *Rev Invest Clin (Méx)* 1987; 39:187-196.
 14. CREMER T., LANDEGENT J., BRUCKNER A., SCHOLL H., SCHARDIN M., HAGER H., DEVILLEE P., PEARSON P., VANDER PLOEG M.: Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in situ* hybridization techniques.: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet* 1986; 74:346.
 15. HEIM S., MITELMAN F.: Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer Supplement* 1992; 70(6):1701-1709.
 16. ROWLEY J., ASTER J., SKLAR J.: The clinical applications of new DNA diagnostic technology on the management of cancer patients. *JAMA* 1993; 270(19):2331-2338.
 17. BORROW J., GODDARD A., SHEERD D.: Molecular analysis of acute promyelocytic leukemia breakpoint cluster region on chromosome 17. *Science* 1990; 249:1577-1580
 18. KAKEZUCA A., MILLER W., UMESONA K.: Chromosomal translocations t(15;17) in human acute promyelocytic leukemia fuses RARA a novel putative transcription factor PML. *Cell* 1991; 66:663-674.
 19. HAN T., OZER H., SADAMORI N., EMRICH L., GOMEZ G., HENDERSON E., BLOOM M., SANDBERG A.: Prognostic importance of cytogenetic abnormalities in patients with chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 1984; 310:288-292.
 20. KWONG Y., PANG J., CHING L., LIU H., LIANG R., CHAN L.: Trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 72:83-85.
 21. AMIEL A., YARKONI S., FEJGIN E., GABER E., NAGLER A., MANOR Y., LISHNER M.: Clinical detection of BCR-ABL fusion by *in situ* hybridization in chronic myelogenous leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 65:32-34.
 22. CHEN Z., MORGAN R., BERGER C., PEARCE-BIRGE L., STONE J., SANDBERG A.: Identification of masked and variant Ph (complex type) translocations in CML and classic Ph in AML and ALL by fluorescence *in situ* hybridization with the use of bcr/abl cosmid probes. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 70:103-107.
 23. DEWALD G., SCHAD C., CHRISTENSEN E., TIEDE A.,

- ZINSMEISTER A., SPURBECK J., THIBODEAU S., JALAL S.: The application of fluorescent *in situ* hybridization to detect Mbc_r/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 71:7-14.
24. ROWLEY J.: A new consistent chromosomal abnormalities in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescent and giemsa stain. *Nature* 1973; 243:290-293.
25. SHIVELMAN F., LIFSHITZ B., GALE R., CANAANI F.: Fuse transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukemia. *Nature* 1985; 315:550-554.
26. TKACHUK D., WESTBROOK C., ANDREEFF M., DONLON T., CLEARY M., SURYANARAYAN K., HOMGE M., REDNER A., GRAY J., PINKEL D.: Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogenous leukemia by *in situ* hybridization. *Science* 1990; 250:559-562.
27. ASCAR H., STEWART J., BOID E., CONNOR M.: Identification of variant translocations in chronic myeloid leukemia by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93:115-118.
28. HURET L.: Complex translocations, simple variant translocations and Ph-negative cases in chronic myelogenous leukemia. *Hum Genet* 1990; 85:565-568.