

# Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México

Jaime Berumen,\* E.I. Miranda,\*\* G. Zafra,\*\*\* L. Casas,\* E. Segura,\* R.M. Ordoñez,\* J. Aguirre,\*\*\*\*  
M. Martínez,\*\*\*\* A. Rosas, \*\*\*\* V. Ibarra, \*\*\* L. Pedraza, \*\*\* A. Saad, \*\*\* A. Marroquín, \*\*\*\*  
M. Gutiérrez,\*\* A. Martínez,\*\* Patricio Garglio\*\*\*\*

## Resumen

En este trabajo presentamos la situación epidemiológica molecular actual en México con respecto a la presencia de secuencias de ADN de virus de papiloma humano (VPH) en pacientes afectadas por cáncer cervicouterino (CaCu) y en mujeres asintomáticas clínicamente normales. Encontramos, por PCR, que en un 82-85% de las neoplasias cervicales y en el 31% de las mujeres normales están presentes dichas secuencias. En cuanto a leucemias, otro cáncer de muy alta incidencia en México, investigamos la frecuencia de los rearrreglos *bcr-abl* y *e2a-pbx1* en pacientes con Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) y Leucemia Granulocítica Crónica (LGC) mediante la tecnología de RT-PCR. Encontramos que un 66% de los niños con pre B-LLA presentan el rearrreglo *e2a-pbx1*, un 46% de los adultos con LLA CALLA(+) presentan el rearrreglo *bcr-abl* y el 100% de los pacientes con LGC tuvieron el rearrreglo *bor-abl*. Esta tecnología y los resultados presentados permiten un mejor diagnóstico, pronóstico y terapia de las mencionadas neoplasias.

## I. Papilomavirus y cáncer cervicouterino

### Introducción

En las últimas dos décadas, en los países desarrollados ha disminuido notablemente la incidencia de cáncer cervicouterino (CaCu) y la mortalidad debida al mismo. Esta disminución se debe a la aplicación de campañas masivas de detección temprana de CaCu, junto con los avances terapéuticos en el campo. En México la situación es otra: la incidencia de este cáncer es muy alta y es una causa importante de muerte; aproximadamente el 30% de los tumores malignos de la mujer son cervicales.

Numerosas observaciones clínicas, así como estudios epidemiológicos, sugieren que un factor viral, transmitido sexualmente, está involucrado en el desarrollo del CaCu; un alto porcentaje de todos los casos presentan ADN del virus de papiloma humano (VPH). Este porcentaje varía de un país a otro.

\*Escuela Militar de Graduados de Sanidad

\*\*Hospital General de México.

\*\*\*Hospital Español

\*\*\*\*Departamento de Genética, CINVESTAV.

Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Jaime Berumen, Hospital Central Militar, Ejército Nacional y Periférico Nte. Irrigación, 11500 México, D.F. Tel. 557 3100

Se han identificado más de 70 tipos de VPH<sup>1</sup> que pueden clasificarse en grupos de acuerdo con el riesgo que representan para desarrollar CaCu. Hay tipos de alto riesgo, como los VPH-16 y -18, que frecuentemente se asocian con lesiones malignas; de bajo riesgo, como VPH-6 y -11, que rara vez participan en la carcinogénesis; y de riesgo intermedio como VPH-31, -33, -51 y otros. El genoma de estos virus consta de ocho genes y de una región reguladora. Seis de los genes son de expresión temprana y dos se transcriben tardíamente; estos últimos codifican proteínas de la cápside.<sup>2</sup> En los VPH de alto riesgo los genes tempranos E6, E7 y posiblemente E5 se consideran oncogénicos ya que participan en la transformación celular. Cuando el virus penetra en la célula epitelial, su material genético permanece en forma episomal y la transcripción de los oncogenes virales es regulada negativamente por el producto del gen E2.<sup>3-4</sup>

El genoma viral se puede romper e integrar al genoma celular. Normalmente la ruptura ocurre en el gen E2 con lo que se pierden las funciones de este gen que incluyen, entre otras, la represión de los genes E6 y E7; estos últimos codifican para proteínas que se unen e inactivan a las proteínas celulares antioncogénicas p53 y pRB, respectivamente. Además de la presencia de VPH, se requiere de alteraciones en genes celulares para que se presente el CaCu.<sup>1,2,5,6,7</sup>

No hay una respuesta sencilla a la pregunta de qué tan común es la infección por VPH en cérvix.<sup>8</sup> La respuesta depende, por un lado, del método empleado para detectar la infección y, por el otro, de la población en relación a factores demográficos y conductuales. La detección del genoma viral se hace generalmente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica muy sensible capaz de detectar secuencias de VPH aún estando presentes en número bajo.<sup>9</sup>

Con respecto al cáncer invasor, la proporción que contiene material genético de VPH es en general alta; algunos estudios reportan que hasta el 90% de los casos contienen secuencias virales.<sup>10,11</sup>

En neoplasia intraepitelial cervical (NIC) la prevalencia también es alta cuando se emplean métodos moleculares de detección. De hecho, hay trabajos que reportan que 60-90% de los casos

estudiados contienen secuencias virales aunque aproximadamente sólo la mitad de esas secuencias corresponden a tipos virales de alto riesgo? Al parecer, la prevalencia de ADN de VPH aumenta al progresar la lesión ya que en un estudio se observó en cérvix normal una positividad de 25%; en NICs de 80 a 88%; y en carcinoma de 91%.<sup>12</sup> También se observó un aumento en la positividad de VPH-16 con el avance de la lesión (35% en displasia; 84% en células neoplásicas), aunque esta tendencia no se observó para otros VPH de alto riesgo.<sup>12</sup>

Las mujeres clínicamente normales (asintomáticas) también pueden presentar ADN de VPH. El porcentaje varía de un trabajo a otro. En un extremo, algunos estudios reportan una positividad de 5% y en el otro están los que aseguran que la mayoría (85%) y aún la totalidad de las muestras, provenientes de mujeres con citología cervical normal, tienen secuencias de VPH.<sup>8,13</sup> Las diferencias tan grandes de prevalencia de un trabajo a otro pueden deberse a características intrínsecas de los grupos estudiados, así como a las diferentes técnicas empleadas.

Con base en lo anterior, en este trabajo presentamos un resumen de la situación epidemiológica actual en México con respecto a la presencia de VPH en pacientes afectadas por CaCu y en mujeres asintomáticas.

## Materiales y métodos

Por un lado, se realizó un estudio sobre prevalencia de VPH en dos grupos independientes de pacientes con carcinoma cervical (grupos a y b del cuadro I, con n=355 y n=182, respectivamente). Estas muestras se obtuvieron mediante biopsias provenientes de diferentes hospitales a lo largo de varios años (1987-1992). La edad de las pacientes varió entre 24 y 89 años con una media de 49.5 años.<sup>14,15</sup> Por otro lado, se estudió la prevalencia de VPH en exudados cervicales de mujeres con lesión cervical (herida leve o cambios macroscópicos en el cérvix, con aproximadamente la mitad de esas pacientes presentando citología anormal) y sin ella (grupos I y II del cuadro II, con n=109 y n=137, respectivamente).

**Cuadro I. Frecuencia de VPH en carcinomas cervicales determinada por PCR (%)**

	N	VPH16	VPH18	VPHX	Total
(a)	355	176 (49.6)	41 (11.6)	85(23.9)	302 (85.1)
(b)	182	86 (47.3)	22 (12.1)	40(22.0)	148 (81.3)

(a) y (b) representan 2 estudios realizados en forma completamente independiente.  
VPHX: Cualquier tipo de VPH diferente a VPH-6, 11, 16 ó 18.

La obtención del ADN se hizo mediante digestión del tejido con proteinasa K, seguida de extracciones con fenol-cloroformo. El ADN se cuantificó y una cantidad apropiada se empleó para realizar PCR tanto con oligonucleótidos consenso que amplifican parte del gen L1 de diversos tipos de VPH,<sup>16</sup> como con oligonucleótidos específicos para VPH-6,-11,-16 y -18. En el grupo (a) del cuadro I se confirmó el tipo de VPH por Southern blot;<sup>15</sup> en los otros grupos (b, Cuadro I; I y II, Cuadro II) se tipificó con enzimas de restricción. En paralelo, se hizo PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen de beta-globina (control positivo).

## Resultados y discusión

Se observa una prevalencia similar de secuencias de VPH en los dos grupos de pacientes con

carcinoma cervical invasor (véase a y b en el cuadro I). En ambos grupos la mayoría de las muestras resultaron VPH positivas (85.1% y 81.3%). Ninguna fue positiva para VPH-6 o VPH-11. Puede observarse que predominan las que contienen secuencias de VPH de alto riesgo y que aproximadamente la mitad de las muestras de CaCu contienen ADN de VPH-16 (49.6% y 47.3% para el grupo (a) y (b), respectivamente) más un porcentaje menor de VPH-18 (11.6% y 12.1%). En el resto de las muestras positivas (23.9% y 22.0%) se hallaron secuencias de otros tipos de VPH.

En las muestras de exudados cervicales el porcentaje de positividad para secuencias de VPH difiere cuando se comparan muestras con y sin lesión cervical (46.8% y 31.4%, respectivamente; véase el cuadro II). Más aún, si se comparan los resultados de lesiones cervicales obtenidos a partir de biopsias de CaCu, con los de exudados cervicales provenientes de mujeres clínicamente normales (asintomáticas), se observa que el porcentaje de positividad es bastante menor en estos últimos (véanse los cuadros I y II).

La alta prevalencia de secuencias de VPH en CaCu encontrada en México (81 -85%) es muy cercana a la encontrada en EUA, Europa y Asia (entre 90% y 95%).<sup>9,11,16</sup> También hay coincidencia en que la mayoría de las secuencias tipificadas son de VPH-16, seguidas por VPH-18.

En diferentes partes del mundo se ha estudiado la prevalencia de secuencias de VPH en mujeres clínicamente normales y los resultados varían mucho.<sup>12,13</sup> Dentro del enorme rango, que va del 5% al 100%, se encuentran los resultados que aquí se reportan: 46.8% y 31.4% en mujeres con y sin lesión, respectivamente (véase cuadro II). Se observa claramente cómo aumenta la positividad para VPH cuando aparece lesión y todavía más

**Cuadro II. Detección de VPH en muestras de exudado cervical en mujeres con lesión (grupo I) y sin lesión cervical (grupo II)**

Grupo	VPH*		% (+)
	(+)	(-)	
I (n=109)	51	58	46.8
II (n=137)	43	94	31.4

\* VPH tipificados: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 y 58

I= Con lesión: Herida o cambios en el aspecto macroscópico del cervix. Aproximadamente 50% con citología anormal (Papanicolaou+)

II= Sin lesión: Cervix normal a nivel macroscópico. Menos del 10% con citología anormal (Papanicolaou+)

cuando se desarrolla el cáncer. Esto sugiere que las secuencias virales son importantes para la aparición de la lesión y más aún para que se desarrolle el CaCu.

Los ensayos de PCR de las muestras normales se hicieron con oligonucleótidos que amplifican el gen L1 de VPH.<sup>16</sup> Actualmente se están repitiendo los experimentos con estos oligonucleótidos y con otros que amplifican parte de los genes E6 y E7.<sup>17</sup> Los resultados preliminares sugieren que algunas muestras VPH negativas, cuando se usan oligos para L1, son positivas cuando se amplifica la región E6/E7. Esto sugiere que un porcentaje aún mayor de las mujeres asintomáticas ("clínicamente normales") puede estar infectada con VPH de alto riesgo.

## II. Rearreglos genéticos en leucemias de alta incidencia en México

### Introducción

La leucemia se asocia con una disregulación en el control de la proliferación y diferenciación celular en el tejido hematopoyético.<sup>18</sup> El 81% de todas las leucemias reportadas se ubican en cuatro categorías: leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mieloblástica aguda (LMA) y leucemia granulocítica crónica (LGC).<sup>15</sup> En diferentes poblaciones la incidencia de leucemia es variable, pero en general representa la primera causa de muerte por cáncer en niños. En México esta neoplasia ocupa también la primera causa de mortalidad por cáncer en niños, aunque en adultos ocupa el sexto lugar entre las neoplasias.<sup>20</sup> En la población infantil la LLA es de mayor prevalencia, con el 75% de todos los casos de leucemias en niños. Contrariamente a lo que se observa en adultos, el 60-70% de los casos de LLA en niños son curables.<sup>21</sup>

Con frecuencia las leucemias se asocian con translocaciones cromosómicas. La translocación t(9;22)(q34;q11), que da lugar al cromosoma Filadelfia, se presenta en el 3-5% de los niños y el

20-50% de los adultos con LLA, lo cual les confiere un pobre pronóstico.<sup>22</sup> Esta translocación trae como consecuencia la unión anormal del gen bcr (del cromosoma 22) y abl (del cromosoma 9), y se puede detectar mediante RT-PCR. El gen híbrido se detecta en el 30-50% de los pacientes con LLA-B y en el 55% cuando se analizan sólo los casos de LLA CALLA(+).<sup>23,24</sup> La misma translocación ha sido observada en el 95-100% de los pacientes con LGC, lo cual se ha corroborado mediante RT-PCR (25). Otras alteraciones estructurales frecuentes en LLA llevan a la sobreexpresión del protooncogén c-myc y se presentan en el 3-5% de los casos de LLA-B en niños y en el 5-10% de las LLA-B en

En el 5-7% de los niños y <5% de los adultos con LLA se presenta la translocación t(1;19)(q23;p13); esta alteración se caracteriza a nivel molecular por la fusión del gen *e2a* (que codifica para el factor transcripcional E2A) localizado en el cromosoma 19 y el gen *pbx1* ubicado en el cromosoma 1. El transcrito de fusión ha sido detectado en el 95% de los pacientes con t(1;19)(q23;p13) mediante la técnica de RT-PCR. Los pacientes t(1;19) positivos presentan mayor riesgo de recaída y mal pronóstico.<sup>25</sup>

Aunque la translocación t(9;22) es idéntica en LLA y LGC, los estudios moleculares de los protooncogenes bcr y abl, que están rearrreglados en ambas enfermedades, muestran diferencias potencialmente importantes. En LLA el rearrreglo produce un transcrito híbrido de 6.5 a 7.0 Kb y una proteína híbrida de 190 kDa, en tanto que en LGC el transcrito de fusión es de 8.5 Kb y la proteína híbrida de 210 kDa. El potencial oncogénico de ambas proteínas de fusión ha sido demostrado por su capacidad para transformar células hematopoyéticas *in vitro*.<sup>27</sup>

En México aún no se conocen las frecuencias de estos rearrreglos moleculares; esto sería de gran importancia ya que en otros países el diagnóstico molecular de los diferentes tipos de leucemia se está aplicando en el tratamiento, monitoreo de los pacientes y la detección de enfermedad residual mínima.<sup>28</sup> Con base en lo anterior decidimos conocer la frecuencia de los mencionados rearrreglos en nuestros pacientes con LLA y LGC mediante la tecnología de RT-PCR.

## Materiales y métodos

Treinta y un pacientes: nueve niños con LLA: 4 hombres y 5 mujeres, margen de edad de 3 a 14 años. Trece adultos con LLA CALLA(+): diez hombres y tres mujeres; margen de edad de 18 a 52 años. Nueve pacientes con LGC: 4 hombres y cinco mujeres; margen de edad de 22 a 70 años.

Obtención de ARN. Se tomaron 20 ml de sangre periférica y se separaron las células mediante Ficoll-Hypaque. El ARN se separó esencialmente de acuerdo con la técnica de Chomczynski y Sacchi.<sup>29</sup> Secuenció mediante lectura a 260 nm y se almacenó a -70°C.

RT-PCR. Un microgramo de ARN en presencia del oligonucleótido,<sup>3</sup> y enzima reverso transcriptasa (RT), se incubó una hora a 37°C. Después se adicionó el oligonucleótido<sup>5</sup> y la enzima Taq ADN polimerasa. Se efectuaron 35 ciclos del PCR. El ADN se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio.

## Resultados y discusión

Se analizaron 31 pacientes para la búsqueda de los rearrreglos moleculares *e2a-pbx1* ó *bcr-abl* (Cuadro III). De 9 pacientes pediátricos con LLA, seis resultaron positivos para el rearrreglo *e2a-pbx1* por

RT-PCR, lo cual representa el 66% de los pacientes. El 34% de los pacientes restantes resultó negativo incluso en una segunda determinación. En ambos ensayos el gen beta-globin pudo detectarse fácilmente (control positivo). En este estudio todos los niños presentaron un inmunofenotipo pre-B. Por otra parte, de 13 pacientes adultos con LLA CALLA(+), seis resultaron positivos para el rearrreglo *bcr-abl*, lo cual representa el 46%. Por otro lado, B los 9 pacientes con LGC analizados (100%) resultaron positivos para el rearrreglo *bcr-abl*.

En México, el empleo de técnicas de biología molecular para el diagnóstico y monitoreo de los pacientes es aún incipiente y sólo algunos centros cuentan con esta tecnología. La elevada frecuencia (66%) del rearrreglo *e2a-pbx1* encontrada en este trabajo contrasta con lo reportado en otros países (5-30%).<sup>30</sup> Esto podría deberse a que el número de pacientes estudiados por nosotros es aún muy pequeño; sin embargo Privitera y cols.<sup>31</sup> recientemente reportaron una frecuencia del 59% en un número similar de pacientes con LLA-pre-B, lo que apoya la posibilidad de que la frecuencia esperada para tal alteración sea elevada, al menos en algunos países. Esto deberá corroborarse mediante la realización de un estudio a más largo plazo y con un mayor número de pacientes, que ya se lleva a cabo por nuestro grupo.

**Cuadro III. Prevalencia de los rearrreglos moleculares *e2a-pbx1* y *bcr-abl* en pacientes con Leucemia del Hospital General de México**

Tipo de leucemia	N*	<i>e2a-pbx1</i>	<i>bcr-abl</i>	%	Reportado en otros
					Países
					%
Pre B-LLA (niños)	9	6	0	66	5-30
LLA CALLA(+)(adultos)	13	0	6	46	50
LGC	9	0	9	100	100

\*N=No. de Pacientes

Se tomaron muestras de sangre periférica de 31 pacientes con leucemia. Parte de las muestras se utilizó para determinar el tipo de leucemia con base en la citomorfología. De la otra parte se separaron los glóbulos blancos, o bien los blastos por Ficoll-Hypaque. Se usó una porción de las células para determinar el inmunofenotipo por inmunofluorescencia. De otra porción (5 a 10 millones de células) se extrajo el ARN, se sintetizó el ADNc por RT y se realizó amplificación por PCR. Los resultados se valoraron mediante visualización en gels de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

Acorde con lo reportado por Maurer y cols., en un estudio retrospectivo que incluyó 314 pacientes CALLA (+),<sup>32</sup> el 46% de nuestros pacientes con LLA CALLA (+) presentó el transcrito bcr-abl. Lo anterior también concuerda con el estudio reciente de Bartram y cols.<sup>33</sup> Nuestros pacientes también presentan mal pronóstico, característico de adultos con LLA. Aún no se logra definir si la presencia de la translocación t(9;22) (q34;q1 1) por sí sola es el dato más significativo para el mal pronóstico de estos pacientes, ya que frecuentemente esta alteración se asocia con otros datos de mal pronóstico en LLA.<sup>34</sup> Con respecto a los pacientes con LGC, los datos son similares a los reportados.<sup>35</sup> En todo caso, hay que recordar que existen diferencias en el tipo de alteración molecular y en su frecuencia en los distintos países; como ejemplo basta con tomar el caso de las alteraciones del gen c-myc en el linfoma de Burkitt Africano comparado con el Americano.

Por último, es importante notar que el empleo de RT-PCR en la búsqueda de los transcritos de fusión *e2a-pbx1* y bcr-abl permite la detección de blastos residuales en la fase de remisión de los pacientes con LLA y LGC. Con esta tecnología se puede detectar una célula neoplásica entre 1 millón de células normales, mientras que la citogenética permite la detección de una célula neoplásica entre 100 células normales. Con base en lo anterior, la RT-PCR nos da herramientas para un monitoreo más fino y de esta manera predecir recaídas y modificar el tratamiento de estos pacientes<sup>28</sup>.

En conclusión, la tecnología de PCR nos ha permitido iniciar estudios de epidemiología molecular en neoplasias (CaCu y leucemias) de muy alta incidencia en México.

## Agradecimientos

P.G. y E.I.M. desean agradecer el apoyo del CONACYT y del PNUD.

## Referencias

- Zur **Hausen H** y de **Villiers E-M**, HPV. *Annu Rev Microbiol* 1994;48:427.
- Scheffner M. Functions of HPV proteins, *Curr Topics Microbiol and Immunol* 1994;186:83.
- Guido MC, **Zamorano R**, Gariglio P y García A. Early promoters of genital and cutaneous HPV are differentially regulated by the E2 gene product. *J Gen Virol* 1992;73:1395.
- Zur **Hausen H**. Molecular pathogenesis of cancer of the cervix and this causation by specific HPV types. *Mol Topics in Microbiol and Immunol* 1994;186:131.
- Ter Schegget J. y van der Noordaa J. Protein phosphatase 2A and the regulation of HPV gene activity. *Current Topics in Microbiol and Immunol* 1994;186:121.
- Ocadiz **R**, Saucedo R. Cruz M, Graef A y Gariglio P. High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1987;47:4173.
- Gariglio P. Ocadiz **R** y Saucedo R. HPV DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. *Cancer Cells*. 1987;5:343.
- Schiffman MH. Epidemiology of Cervical HPV Infections. *Current Topics in Microbiol and Immunol* 1994;186:54.
- Schiffman MH, Lorincz AT y Manos MM. Comparison of southern Blot Hybridization and PCR Methods for the Detection of HPV DNA. *J Clin Microbiol* 1991;29:573.
- Resnick RM y Manos MM. Detection and typing of HPV in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primer. *J Natl Cancer* 1990;82:1447.
- van den **Brule** AJC y Walboomers J. Difference in prevalence of HPV genotypes in cytologically normal cervical smears in associated with a history of CIN. *Int J Cancer* 1990;48:404.
- van den **Brule** AJC, **Meijer** CJLM y Walboomers JMM. General primer-mediated PCR permits the detection of sequenced and still unsequenced HPV genotypes scrapes and carcinomas. *Int J Cancer* 1990;45:644.
- Tidy JA, Parry GCN, Ward P, Coleman DV, Peto J, **Malcolm** ADB y Farrell PJ. High-rate of HPV type 16 infection in cytologically normal cervixes. *Lancet* 1989;25:434.
- Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL y García A. Genome amplification of HPV-16 and -18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 1994;56:640.
- Berumen J**, Unger E, Casas L y Figueroa P. Amplification of HPV types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Human Pathology*. 1995;26:676.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, **Yoshikura H** é Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:524.
- Fujinaga Y** y Shimada M. Simultaneous detection and typing of genital HPV DNA using the PCR. *J Gen Virol* 1991;72:1039.
- Metcalf D. Hemopoietic regulators and leukemia development: a personal retrospective. *Adv Cancer Res* 1994;63:41.
- Hernández JA, Land KJ, y **McKenna** RW. Leukemias, Myeloma and Other Lymphoreticular Neoplasms. *Cancer*. 1995;75:381.

20. Gariinkel LMA. Cancer Statistics and Trends in American Cancer Society. Textbook of Clinical Oncology. Murphy G. Ed. Second Edition. 1995;1.
21. Miller RW, Young JL y Novakovic B. Childhood Cancer 1995;75:395.
22. Van Rhee F, Marks DI, Lin F, Szydlo M, Hochhaus A, Trealeven J, Delord C, Cross NCP y Goldman MJ. Quantification of Residual Disease in Philadelphia-Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: Comparison of Blood and Bone Marrow Leukemia 1995;9:329.
23. Iwata S, Mizutany S, Nakazawa Sy Yata J. Heterogeneity of the Breakpoint in the ABL Gene in Cases with BCWABL Transcript Lacking ABL Exon a2. Leukemia 1994;8:1696.
24. Cortés JE y Kantarjian HM. Acute Lymphoblastic Leukemia: A Comprehensive Review with Emphasis on Biology and Therapy-Cancer 1995;76:2393.
25. Hochhaus A, Lin F, Reiter A, Skladny H, Mason PJ, Van Rhee F, Shepherd PCA, Allan NC, Hehlmann R, Goldman MJ y Cross N. Quantification of Residual Disease in Chronic Myelogenous Leukemia Patients on Interferon-alpha Therapy by Competitive Polymerase Chain Reaction. Blood 1996;87:1549.
26. Hunger SP. Chromosomal Translocations Involving the E2A Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia: Clinical Features and Molecular Pathogenesis. Blood 1996;87:1211.
27. Andrews DF y Collins SJ. Heterogeneity in expression of the bcr-abl fusion transcript in CML Blast Crisis Leukemia 1987;10:718.
28. Campana D y Pui Ch. Detection of Minimal Residual Disease in Acute Leukemia: Methodologic Advances and Clinical Significance. Blood 1995;85:1416.
29. Chomozynski P y Sacchi N. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate- Phenol-Chloroform Extraction. Anal Biochem 1987;162:156.
30. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, et al (eds) International Incidence of Childhood Cancer, IARC Scientific Publication 1988;87.
31. Privitera E, Kamps MP, Hayashi Y, Inaba T, Shapiro LH, Raimondl SC, Behm F, Hendershot L, Carroll AJ, Baltimore D y Look AT. Different molecular consequences of the 1; 19 chromosomal translocation in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. Blood. 1992;79:1781.
32. Maurer J, Janssen JWG, Thiel E, Van Denderen J, Ludwig WD, Aydemir U, Heinze B, Fonaseh C, Harbott J, Reiter A, Riehm H, Hoelzer D y Bartram CR. Detection of chimeric BCR-ABL genes in acute lymphoblastic leukemia by the polymerase chain reaction. Lancet 1991;337:1055.
33. Bartram CR. Detection of minimal residual leukemiaby the polymerase chain reaction: potential implications for therapy. Clin Chim Acta 1993;2175.
34. Westerbrook CA, Hooberman AL, Spino C, Dodge RK, Larson RA, Davey F, et al. Clinical significance of the BCR-ABL fusion gene in adult acute lymphoblastic leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study (8762). Blood. 1992;80:2983.
35. Versehraegen FC, Talpaz M, Cherryl F, Hirseh-Ginsberg, Pherwani R, Rios MB, Sanford Ay Kantarjian MH. Quantification of the breakpoint cluster region rearrangement for clinical monitoring in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia. Blood 1995;85:2705.