

Validación de cebadores específicos para la detección de las variantes p190 y p210 del transcrito de fusión *BCR/ABL1* mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en pacientes pediátricos con leucemia mieloide crónica y su confirmación por secuenciación

Drs. Scarlet N. Valladares^{1a}, Migdelys A. Alejos^{2a}, María A. Duarte^{3a}, Alberto A. Frango^{4a}, Mariana C. Eleizalde^{5b}, Hector R. Rangel^{6c}, Ana F. Convit^{7a*}

RESUMEN

La leucemia mieloide crónica (LMC) representa el 2 %-3 % de las leucemias pediátricas, está asociada a una enfermedad más agresiva y tiene como característica la presencia del transcrito de fusión *BCR/ABL1*. A través de la RT-PCR, una técnica de biología molecular altamente sensible y específica, se detecta la translocación cromosómica más frecuente en pacientes pediátricos con LMC: *t(9;22)(q34;q11)*. La especificidad y eficacia de la RT-PCR depende en gran medida de los cebadores utilizados en la reacción y para ello la validación de estos es necesaria. La misma permite verificar la detección de la secuencia diana, así como la eficiencia y posible uso de los cebadores para el diagnóstico. La Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) se propuso validar cebadores específicos para la detección de la translocación más común en pacientes pediátricos con LMC mediante RT-PCR. Los productos obtenidos

de las variantes en estudio fueron secuenciados mediante el método de Sanger y analizados a través de las herramientas bioinformáticas PCR virtual, MultiAlin y BLASTN. Como resultado se obtuvo altos porcentajes de similaridad y cobertura de las variantes e1a2 y b3a2 para *BCR/ABL1p190* y *BCR/ABL1p210*, respectivamente. Adicionalmente las secuencias obtenidas fueron publicadas en GenBank. Esta validación demuestra que los cebadores empleados en la UDM-FJC son adecuados para el diagnóstico molecular en pacientes pediátricos con LMC, debido a que presentan una buena especificidad y eficiencia en la detección del transcrito de fusión más frecuente en este tipo de leucemia.

Palabras clave: Leucemias, transcritos de fusión, leucemia mieloide crónica, cebadores, validación, método de Sanger.

SUMMARY

Chronic myeloid leukemia (CML) represents 2 %-3 % of pediatric leukemia, is associated with a more aggressive disease and characterized by the presence of the *BCR/ABL* fusion transcript. Through RT-PCR, a highly sensitive and specific molecular biology technique, the most frequent chromosomal translocation is detected in pediatric patients with CML: *t(9;22)(q34; q11)*. The specificity and efficacy of RT-PCR depends to a large extent on the primers used in the reaction, therefore a validation of these is necessary. It allows to verify the detection of the

DOI: <https://doi.org/10.47307/GMC.2020.128.3.19>

¹Magíster en Ciencias, Mención Microbiología, ²Licenciada en Biología, ³PhD en Ciencias, Mención Inmunología, ⁴Licenciado en Bioanálisis, ⁵PhD en Ciencias Biológicas, ⁶PhD en Biología Celular, ⁷Magíster en Gerencia Pública.

^aUnidad de Diagnóstico Molecular, Fundación Jacinto Convit, Caracas, Venezuela. ^bInstituto de Estudios Científicos y Tecnológicos, Caracas, Venezuela. ^cLaboratorio de Virología Molecular, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Caracas, Venezuela.

Autor de correspondencia: *publicaciones@jacintoconvit.org

target sequence, as well as the efficiency and possible use of the primers for diagnostics. The “Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit” (UDM-FJC) set out to validate specific primers for the detection of the most common translocation in pediatric patients with CML using RT-PCR. The products obtained from the variants under study were sequenced using the Sanger method and analyzed using the virtual PCR, MultiAlin, and BLASTN bioinformatics tools. As a result, high percentages of similarity and coverage of the variants e1a2 and b3a2 were obtained for BCR/ABL1 variant p190 and BCR/ABL1 variant p210, respectively. Additionally, the sequences obtained were published in GenBank. This validation shows that the primers used in the UDM-FJC are suitable for molecular diagnosis in pediatric patients with CML, due to their adequate specificity and efficiency in detecting the most frequent fusion transcript in this type of leukemia.

Key words: *Leukemia, fusion transcripts, chronic myeloid leukemia, primers, validation, Sanger method.*

INTRODUCCIÓN

La leucemia mieloide crónica (LMC) es un tipo de desorden clonal mieloproliferativo que resulta de la transformación neoplásica de las células hematopoyéticas pluripotenciales, como consecuencia de la translocación t(9,22)(q34;q11) conocida como cromosoma Filadelfia (1,2). Esto ocurre debido a una yuxtaposición del gen *ABL1* del cromosoma 9 y del gen *BCR* del cromosoma 22, dando como resultado el transcrito de fusión *BCR/ABL1* (*Breakpoint Cluster Region-Abelson Leukemia virus*), que codifica proteínas con actividad tirosina quinasa (1,3,4).

La LMC es más frecuente en las edades comprendidas entre los 65 y 74 años, en las cuales presenta una incidencia del 21,4 %. Esto contrasta con lo observado en la población juvenil (>20 años) donde solo representa el 2,1 % (5). Por otra parte la LMC representa el 2 %-3 % de todas las leucemias en niños menores de 15 años y el 9 % de todas las leucemias en adolescentes entre 15 y 19 años, con una incidencia anual de 1 y 2,2 casos por millón en estos dos grupos etarios, respectivamente (6,7).

En Venezuela para el año 2018, se estimaron 1 609 nuevos casos de leucemia en la población general, con más de 1 074 fallecidos (8). No

obstante las cifras estadísticas actuales de incidencia en la LMC en pacientes pediátricos en el país se desconocen.

En la LMC las variantes más comunes del transcrito de fusión *BCR/ABL* son tres: las variantes b2a2 y b3a2 que dan lugar a una proteína de 210 kDa (*BCR/ABL1* p210), es la alteración más común en pacientes pediátricos con LMC y se presenta en más del 90 % de los casos; y la variante e1a2 (*BCR/ABL1* p190) que es poco frecuente (0,26-3,31 %) (3,9). En pacientes pediátricos la LMC presenta un desarrollo lento y un comportamiento muy agresivo. Se manifiesta por una fase crónica asintomática que se caracteriza por una sobreproducción de células mieloides inmaduras y granulocitos maduros, y que posteriormente avanza a una fase acelerada. Sin embargo, la mayoría de los pacientes pediátricos con LMC pasan de una fase crónica asintomática a una fase blástica; esta última tiene un curso fatal y presenta más de un 30 % de células blásticas en médula ósea (7,10). Es importante resaltar que la supervivencia de los pacientes con LMC ha aumentado debido al uso de inhibidores tirosina quinasa (TKI) (11-13).

El uso de una técnica molecular sensible y específica como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) es capaz de detectar de manera eficaz y rápida las variantes más comunes del transcrito de fusión *BCR/ABL1* en pacientes pediátricos con LMC. La presencia de este transcrito de fusión aporta información esencial de valor clínico diagnóstico, pronóstico, predicción de respuesta al tratamiento y progresión de la enfermedad en estos pacientes (14-16).

La especificidad y eficacia de la RT-PCR depende en gran medida de los cebadores utilizados. Estos pueden generar productos inespecíficos y formar estructuras secundarias o dímeros que disminuyen la eficiencia de la reacción (17), lo que puede afectar el resultado del diagnóstico de un paciente.

Para garantizar un resultado fiable es necesario validar los cebadores que se utilizan en la prueba. La validación de los cebadores se puede realizar a través de herramientas bioinformáticas y la evaluación experimental en el laboratorio a partir de la verificación de los productos obtenidos mediante la RT-PCR (18,19).

La secuencia de nucleótidos del producto obtenido mediante la RT-PCR se puede determinar en el laboratorio por el método de Sanger, que es la prueba de oro para secuenciación de ácidos nucleicos (20). Su resultado puede compararse con otras secuencias publicadas mediante herramientas bioinformáticas (18), con el fin de evaluar el porcentaje de identidad, cobertura, entre otros parámetros, que permiten la identificación de genes y variantes (21).

Debido a lo expuesto, la Unidad de Diagnóstico Molecular de la Fundación Jacinto Convit (UDM-FJC) —que brinda un servicio de diagnóstico molecular gratuito a la población oncológica pediátrica más vulnerable que acude a hospitales públicos del territorio nacional— se propuso validar los cebadores específicos previamente reportados en la literatura y que utiliza en la detección de las alteraciones cromosómicas más comunes del transcrito de fusión *BCR/ABL1* variantes p190 y p210, mediante RT-PCR en pacientes pediátricos con LMC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras

1.1 Muestras biológicas

Se utilizó ADNc de muestras de pacientes anónimos consideradas positivas por RT-PCR y usadas como controles positivos en el presente estudio. Estas fueron donadas a la UDM-FJC por el Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital y Hospital Miguel Pérez Carreño. El presente estudio guarda relación directa con la condición clínica que motivó la extracción original de la muestra.

2. PCR virtual

Las secuencias de los cebadores empleados en la UDM-FJC se describen en el Cuadro 1 y están reportados en la literatura. El sitio de hibridación de estos cebadores fue evaluado *in silico* mediante una PCR virtual con el software Sequence Extractor (22), usando secuencias de referencia como molde (Cuadro 2).

3. Reacción en cadena de la polimerasa y visualización de productos

La PCR se realizó por separado para cada variante del transcrito de fusión analizado en este estudio, con los cebadores descritos en el Cuadro 1. La calidad del ADNc se confirmó amplificando por PCR el gen constitutivo *GAPDH* con los cebadores *GAPDH*Up/Down (23) (Cuadro 1). La reacción se realizó en un termociclador (BIOER) programado con una desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 50 segundos a 64 °C, 1 minuto a 72 °C y una extensión final durante 5 minutos a 72 °C. Se incorporaron en la PCR, controles positivos (pacientes con la translocación en estudio), sanos (pacientes sin la translocación) y negativos (sin templado). Los productos fueron evaluados a través de electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % teñidos con bromuro de etidio (BrEt), visualizados con el equipo Axygen® Gel Documentation System y fotodocumentados con Axygen Imaging.

4. Purificación de los productos y secuenciación automatizada

Los productos de RT-PCR obtenidos por separado para cada variante del transcrito de fusión analizado, con el empleo de los cebadores previamente mencionados en el Cuadro 1, fueron purificados utilizando el Kit comercial FavorPrep GEL/PCR Purification Mini Kit (Favorgen Biotech Corp). Los productos purificados fueron visualizados con electroforesis en geles de agarosa y posteriormente secuenciados en el Laboratorio de Genética Molecular Genmolab, C.A (Miranda-Venezuela) con el empleo de cebadores sentido y antisentido listados en el Cuadro 1.

5. Análisis *in silico* de secuencias

Las secuencias obtenidas del laboratorio externo de secuenciación (Genmolab) fueron visualizadas empleando el software FinchTV Chromatogram Viewer. Posteriormente se realizó la secuencia consenso a partir de la obtenida con cada cebador para los transcritos de fusión en estudio, empleando la herramienta

Cuadro 1

Secuencia de los cebadores empleados para la amplificación por RT-PCR del gen *GAPDH* y las translocaciones *BCR/ABL1* variante p190 y *BCR/ABL1* variante p210

Gen y translocación*	Cebador	Secuencia 5'→3'
<i>GAPDH</i>	GAPDH-HUM-Up	CATCAAGAAGGTGGTGAA
	GAPDH-HUM-Down	GGGTCTTACTCCTTGGAG
<i>BCR/ABL1</i> p190 ⁽²⁴⁾	BCR/ABL1 BCR	ACCGCATGTTCCGGGACAAAAGC
	BCR/ABL1 CA3	TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTG CTTGG
<i>BCR/ABL1</i> p210 ⁽²⁵⁾	BCR/ABL1 B2B	ACAGCATTCCGCTGACCATCAAT AAG
	BCR/ABL1 CA3	TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTG CTTGG

* En superíndice la referencia bibliográfica de cada transcrito de fusión

Multiple Sequence Alignment (MultAlin) (26). Seguidamente las secuencias consenso fueron comparadas con secuencias reportadas por otros autores y almacenadas en el banco de secuencias GenBank del National Center for Biotechnology Information de Estados Unidos, por medio del programa Basic Local Alignment Search Tool – BLAST (27); con el fin de evaluar el porcentaje de identidad, cobertura, entre otros parámetros. Adicionalmente, para identificar los puntos de corte se realizó el alineamiento de las secuencias consenso para cada gen de fusión, con las secuencias de referencia reportadas, utilizando el software MultAlin.

RESULTADOS

Transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p190

La amplificación de la RT-PCR para la detección de la variante p190 del transcrito de fusión *BCR/ABL1*, reveló la presencia de una banda de 500 pb aproximadamente (Carril 4, Figura 1) que coincidió con el tamaño de 483 pb del amplicón, obtenido mediante PCR virtual. Para este análisis se empleó la secuencia de

referencia de la variante e1a2 (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenido con MultAlin se denominó FJC-BCR-ABL-p190 y publicó en GenBank bajo el número de acceso MH743144.1. Posteriormente con BLASTN se obtuvo una cobertura e identidad del 100 % al comparar FJC-BCR-ABL-p190 con otras secuencias del transcrito de fusión *BCR/ABL1* reportadas (AF113911). Asimismo se identificó el punto de corte de la secuencia consenso en el exón 1 de *BCR* (NG_009244.1) y exones 1 y 2 de *ABL1* (NG_009244.1), respectivamente y se confirmó la variante e1a2 de *BCR/ABL1* (Figura 2).

Transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p210

La amplificación de la RT-PCR para la detección de la variante p210 del transcrito de fusión *BCR/ABL1*, evidenció una banda de 380 pb aproximadamente (Figura 3) que coincidió con el tamaño de 379 pb que se obtuvo con la PCR virtual al emplear la secuencia de referencia de la variante b3a2 (Cuadro 2). La secuencia consenso obtenida con MultAlin se denominó FJC-*BCR/ABL1*-p210 y publicó en GenBank con el número de acceso MH401089.1. La

VALIDACIÓN DE CEBADORES ESPECÍFICOS PARA LA DETECCIÓN DE LAS VARIANTES P190 Y P210

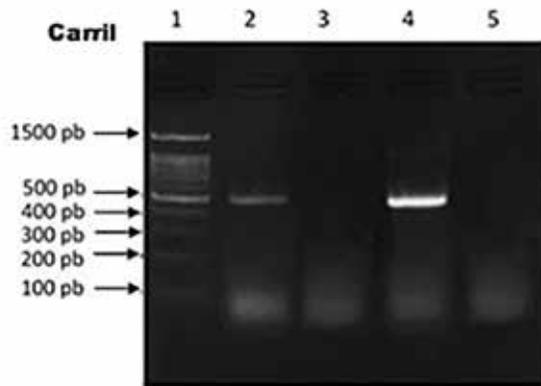


Figura 1. Amplificación del transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p190 mediante RT- PCR. Carriles: 1. Marcador de peso molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Control positivo (C+). 3. Paciente sano. 4. Paciente *BCR/ABL1* variante p190 positivo. 5. Control sin templado (NTC).

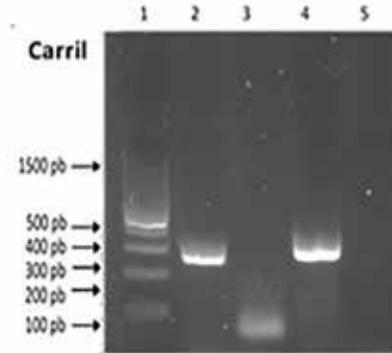


Figura 3. Amplificación del transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p210 mediante RT- PCR. Carriles: 1. Marcador de Peso Molecular (MPM) 100 pb (Invitrogen). 2. Paciente *BCR/ABL1* variante p210 positivo. 3. Paciente sano. 4. Control positivo (C+). 5. Control sin templado (NTC).

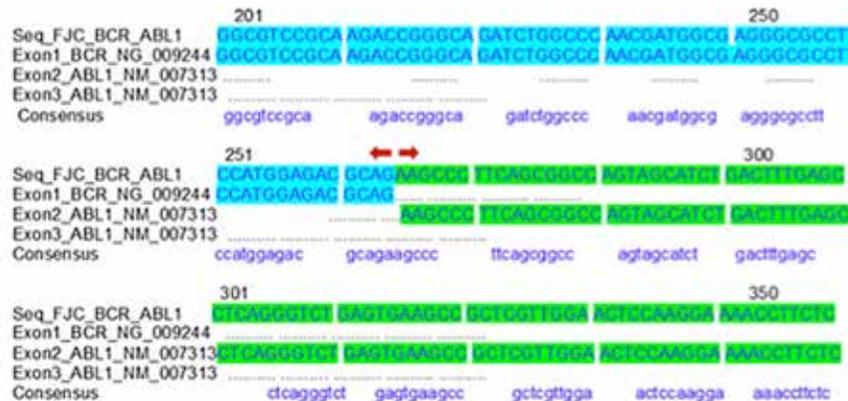


Figura 2. Alineamiento de la secuencia FJC-*BCR/ABL1* (MH401088.1) con las secuencias del exón 1 del gen *BCR* (NG_009244.1), los exones 2 y 3 del gen *ABL1* (NM_007313.2) y con la secuencia de referencia para la variante e1a2 del transcrito de fusión *BCR/ABL1* (AF113911.1), empleando el software MultAlin. Las flechas rojas indican el punto de corte entre ambos genes. La secuencia de nucleótidos resaltados en color azul corresponden al exón 1 del gen *BCR* y la secuencia de nucleótidos subrayados en color verde pertenecen al exón 2 del gen *ABL1*.

secuencia consenso se analizó con BLASTN y se obtuvo una cobertura e identidad del 99 % y 98 %, respectivamente, al comparar la secuencia consenso con otras reportadas para la variante b3a2 de *BCR/ABL1* (AJ131466.1, M25946.1, EU216071.1). Asimismo se identificó el punto

de corte de FJC-*BCR/ABL1*-p210 en el exón 14 de *BCR* (NG_009244.1) y exón 2 de *ABL1* (NG_012034.1), respectivamente, con lo que se confirmó la presencia de la variante b3a2 de *BCR/ABL1* (Figura 4).

Cuadro 2

Secuencias empleadas como molde para la PCR virtual

Secuencia de referencia	Número de acceso GenBank
<i>BCR/ABL1</i> variante e1a2	AF113911.1
<i>BCR/ABL1</i> variante b2a2	KU375572.1
<i>BCR/ABL1</i> variante b3a2	AJ131466.1

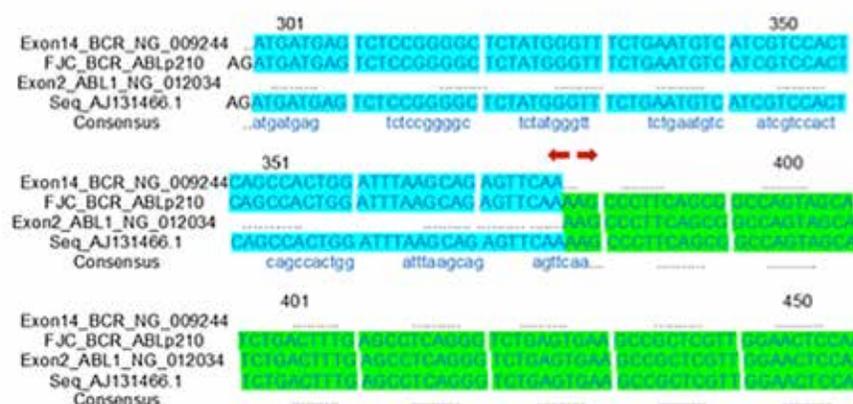


Figura 4. Alineamiento de la secuencia consenso FJC-*BCR/ABL1*-p210 (MH401089.1) con las secuencias de referencia del exón 14 del gen *BCR* (NG_009244.1), exón 2 del gen *ABL1* (NG_012034.1) y con la secuencia de referencia para la variante e1a2 del transcrito de fusión *BCR/ABL1* (AJ131466.1); empleando el software MultAlin. Las flechas rojas indican el punto de corte entre ambos genes. La secuencia de nucleótidos resaltados en color azul corresponde al exón 14 del gen *BCR* y la secuencia de nucleótidos subrayados en color verde pertenecen al exón 2 del gen *ABL1*.

DISCUSIÓN

La presencia del transcrito de fusión *BCR/ABL1* en la LMC es característico de la enfermedad (1-4). Esto ha permitido tratar a los pacientes con inhibidores tirosina quinasa, aumentando la supervivencia de los mismos (7). Debido a la diversidad de variantes que puede presentar el transcrito de fusión *BCR/ABL1* (11,12,28), se debe contar con una técnica de alta sensibilidad y especificidad como la RT-PCR, capaz de detectar de manera eficaz y rápida las variantes más frecuentes en pacientes pediátricos con LMC;

tales como las variantes e1a2 y b2a2/b3a2 que son de gran importancia. En estudios recientes se demuestra que la RT-PCR es la técnica de biología molecular que se continúa empleando para la detección de las variantes del transcrito de fusión más comunes en LMC en pacientes con la enfermedad (4,15,16). La eficiencia y especificidad de la RT-PCR depende en gran parte de la validación de los cebadores utilizados (17). Múltiples estudios a nivel internacional han reportado la importancia de la validación de los cebadores para su uso en RT-PCR (19,29).

Para la validación, una de las técnicas de laboratorio empleada es la secuenciación, la cual permite la identificación de genes y variantes (21). La secuenciación por el método de Sanger es la técnica estándar de oro que proporciona la información definitiva para confirmar las variantes de pequeño tamaño mediante programas bioinformáticos (21,30).

Con base a lo anterior la UDM-FJC se propuso validar los cebadores que emplea en la detección de las variantes p190 y p210 del transcrito de fusión *BCR/ABL1* en pacientes pediátricos con LMC, a través de la secuenciación por Sanger de los productos de RT-PCR de dichas translocaciones y el empleo de programas bioinformáticos.

En el caso de *BCR/ABL1* variante p190, los cebadores permitieron la detección de la variante e1a2 que es poco frecuente (1 %) en pacientes con LMC (3,9,31); y para el transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p210, los cebadores permitieron la identificación de la variante b3a2 que es la más frecuente (95 %) de los casos con LMC (3,9).

Un estudio realizado en 2008 en Venezuela en pacientes con LMC, reportó mediante RT-PCR la presencia del transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p210 en el 96,1 % de los pacientes. Asimismo se evidenció que de estos un 45,6 % presentaba la variante b2a2, mientras que la variante b3a2 y la co-expresión b2a2/b3a2 se encontraban en un 41,7 % y un 8,8 %, respectivamente. Por otra parte el 3,9 % presentaba la expresión de la variante e1a2 de *BCR/ABL1* p190 (32).

Es importante resaltar que existen estudios a nivel mundial sobre *BCR/ABL1* donde se secuencian los productos de la RT-PCR obtenidos para confirmar la especificidad de la reacción (33,34). Sin embargo existen pocos reportes de estas secuencias en Venezuela y publicadas en GenBank. En este sentido las secuencias obtenidas en el presente trabajo fueron publicadas en dicha base de datos, aportando información de relevancia para el avance de la investigación científica a nivel mundial.

En resumen, los cebadores previamente reportados en la literatura y utilizados en la UDM-FJC para la detección con RT-PCR de las variantes del transcrito de fusión *BCR/ABL1*, presentan una buena especificidad y eficiencia, y

pueden ser utilizados para el diagnóstico de este transcrito de fusión en pacientes pediátricos con LMC. Asimismo se debe mencionar que con el empleo de una PCR anidada se puede lograr una mayor sensibilidad en la detección de las variantes más frecuentes en esta enfermedad (30). Por ello la UDM-FJC implementará esta metodología para optimizar el protocolo de diagnóstico de las principales variantes del transcrito de fusión *BCR/ABL1* en los pacientes pediátricos con LMC que son atendidos en la unidad.

CONCLUSIÓN

Mediante la secuenciación por Sanger de los productos de RT-PCR y el empleo de herramientas bioinformáticas, la UDM-FJC confirmó y validó los cebadores empleados para la detección de las variantes del transcrito de fusión *BCR/ABL1* variante p190 y *BCR/ABL* variante p210 en los casos de pacientes pediátricos referidos a nuestro centro de diagnóstico molecular.

La determinación de dicho transcrito de fusión se emplea para el diagnóstico y clasificación molecular de la LMC en la población pediátrica, lo que contribuye fundamentalmente a la estratificación del riesgo de la enfermedad; y brinda al paciente una terapia personalizada que incide de manera importante en sus niveles de sobrevida.

Este estudio puede ser útil para otros laboratorios de diagnóstico molecular en el país, debido a que se confirma que los cebadores previamente reportados en la literatura y validados por la UDM-FJC presentan una buena especificidad y eficiencia en la detección de la translocación más frecuente en pacientes pediátricos con LMC.

Cabe destacar que las secuencias obtenidas y publicadas en GenBank por la UDM-FJC son una referencia de las translocaciones en pacientes pediátricos con LMC en Venezuela. La proporción de los diferentes tipos de leucemia crónica que prevalece en un país permite hacer comparaciones con otros países del mundo, en comportamiento y desenlace, lo que proporciona información útil de esta patología.

Agradecimientos

Los autores agradecen a los servicios de hemato-oncología del Banco Municipal de Sangre del Distrito Capital y del Hospital Miguel Pérez Carreño, así como a la Dra. María José Godoy-Calderón por la donación de las muestras de pacientes que fueron usadas como controles positivos en el presente estudio. Adicionalmente, reconoce al equipo de investigación de la Fundación Jacinto Convit, en especial a la Lic. Agniellys Ramírez, por apoyar en diversas tareas. El financiamiento de este trabajo fue realizado por la Fundación Jacinto Convit y Jacinto Convit World Organization, Inc.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Melo J. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*. 1996;88(7):2375-84.
- Sessions J. Chronic myeloid leukemia in 2007. *Am J Health Syst Pharm*. 2007;64(24 Suppl 15):S4-9.
- Quintás-Cardama A, Cortes J. Molecular biology of BCR-ABL1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2009;113(8):1619-1630.
- Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon F-X, Janssen JJWM, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2017;28(4):41-51.
- American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2020. Disponible en: www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2020.html.
- Hijiya N, Suttorp M. How I treat chronic myeloid leukemia in children and adolescents. *Blood*. 2019;133(22):2374-2384.
- Hijiya N, Schultz KR, Metzler Millot F, Suttorp M. Pediatric chronic myeloid leukemia is a unique disease that requires a different approach. *Blood*. 2016;127(4):392-399.
- Globocan WHO. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. *World Health Organ Int Agency Res Cancer*; Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/862-venezuela-bolivarian-republic-of-fact-sheets.pdf>. 2018.
- Baccarani M, Castagnetti F, Gugliotta G, Rosti G, Soverini S, Albeert A, et al. The proportion of different BCR-ABL1 transcript types in chronic myeloid leukemia. An international overview. *Leukemia*. 2019;33(5):1173-1183.
- Millot F, Guilhot J, Baruchel A, Petit A, Bertrand Y, Mazingue F, et al. Impact of early molecular response in children with chronic myeloid leukemia treated in the French Glivec phase 4 study. *Blood*. 2014;124(15):2408-2410.
- An X, Tiwari AK, Sun Y, Ding P-R, Ashby CR, Chen Z-S. BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors in the treatment of Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leuk Res*. 2010;34(10):1255-1268.
- Zafar I, Shahzadi S, Akhtar T, Aamer A, Khalid AM, Mudassar I. BCR-ABL Splice Variants In Three Phases Of CML: Association with disease biology and response to Imatinib. *Blood*. 2013;122(21):5191-5191.
- Hochhaus A, Saussele S, Rosti G, Mahon F-X, Janssen JJWM, Hjorth-Hansen H, et al. Chronic myeloid leukaemia: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2018;29(4):261.
- Ramírez-Pacheco A, Moreno-Guerrero SS, Medina-Sanson A. Herramientas moleculares y su utilidad en el cáncer pediátrico. *GAMO*. 2013;12(3):162-173.
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2018;93(3):442-459.
- Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2020 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol*. 2020;95(6):691-709.
- Kumar A, Chordia N. In silico PCR primer designing and validation. *Methods Mol Biol*. 2015:143-151.
- Bell J. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT. *BioTechniques*. 2008;44(6):834.
- Orozco-Ugarriza ME, Anaya PF, Martínez YO. Validación in silico de oligonucleótidos-primers para la detección específica de salmonella spp. mediante reacción en cadena de la polimerasa. *RIADS: Rev Investig Agropecu Desarro Sosten*; 2016.
- Totomoch-Serra A, Marquez MF, Cervantes-Barragán DE. Sanger sequencing as a first-line approach for molecular diagnosis of Andersen-Tawil syndrome. *F1000 Res*. 2017;6:1016.
- Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. *Diagn Prenat*. 2012;23(2):56-66.

22. Sequence Extractor - About Disponible en: <https://www.bioinformatics.org/seqext/about.html>.
23. Ponchel F, Toomes C, Bransfield K, Leong FT, Douglas SH, Field SL, et al. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.* 2003;3:18.
24. Wilson G, Frost L, Goodeve A, Vandenberghe E, Peake I, Reilly J. BCR-ABL transcript with an e19a2 (c3a2) junction in classical chronic myeloid leukemia. *Blood.* 1997;89(8):3064.
25. Anand M, Varma N, Rana K, Varma S, Malhotra P. Cytogenetic & molecular analyses in adult chronic myelogenous leukaemia patients in north India. *Indian J Med Res.* 2012;135(1):42.
26. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 1988;16(22):10881-10890.
27. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990;215(3):403-410.
28. Melo JV, Deininger MWN. Biology of chronic myelogenous leukemia--signaling pathways of initiation and transformation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2004;18(3):545-568, vii-viii.
29. Medrano MDC, Melchor OYL. Diseño, validación y aplicación de un set de primers para la detección de Hepatitis viral A. *Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos.* 2018;1(1).
30. van Dongen J, Macintyre E, Gabert J, Delabesse E, Rossi V, et al.. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia.* 1999;13(12):1901-1928.
31. Yaghmaie, M, Ghaffari, S.H, Ghavamzadeh, A, Alimoghaddam, K, Jahani M, Mousavi S, et al. Frequency of BCR-ABL fusion transcripts in Iranian patients with chronic myeloid leukemia. *Arch Ira Med.* 2008;11(3):247-251.
32. Carreño FJ, Lopez JL, Mata EK, Cardenas L, Costa OD, Mendez C, et al. Frequency of BCR/ABL Breakpoints in CML Venezuelan Patients: Contribution to a Possible Worldwide Distribution of BCR/ABL Transcripts Associated to Ethnicity. *Blood.* 2008;112(11):4280-4280.
33. Sudhakar N, Raghavan K, Rajkumar T, Nirmala K. RT-PCR and real-time PCR analysis of E2A-PBX1, TEL-AML1, mBCR-ABL and MLL-AF4 fusion gene transcripts in de novo B-lineage acute lymphoblastic leukaemia patients in south India. *J Genet.* 2011;90(2):349-353.
34. Zhang J, Goldman J, Cross N. Characterization of genomic BCR-ABL breakpoints in chronic myeloid leukaemia by PCR. *Br J Haematol.* 1995;90(1):138-146.