



UNIVERSIDAD DE CUENCA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA
PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CUENCA 2013-
2017.**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PREVIO
A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE LICENCIADO
EN LABORATORIO CLÍNICO**

AUTOR:

MAURO JAVIER ARCENTALES CAYAMCELA

CI.0302100110

DIRECTORA:

DRA. SANDRA GIOCONDA PEÑA PATIÑO.

CI.0103439816

CUENCA-ECUADOR

2018



RESUMEN

Antecedentes:

La Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (*RT-PCR*), constituye una herramienta de diagnóstico importante en la detección de las translocaciones recíprocas entre los cromosomas, que consiste en utilizar el ácido ribonucleico para generar múltiples copias de una región específica mediante la enzima Taq polimerasa.

Objetivo General: Determinar la prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (*RT-PCR*) en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC).

Metodología: El diseño de la investigación fue observacional, descriptivo y retrospectivo realizado de diciembre de 2013 a diciembre de 2017 e incluyó un total de 121 pacientes con diagnóstico de LMC. Los resultados obtenidos fueron analizados y tabulados con el software SPSS versión 23.0 y Excel 2016; los mismos se encuentran representados en tablas y gráficos.

Resultados: La prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 fue de 38.84 % de los cuales los casos positivos en la ciudad de Cuenca fueron del 24,79 %, los pacientes del sexo masculino representaron el 30,58 % y el 9,92 % conformaron el grupo etario de 28-37 años.

Conclusión: Los pacientes con mayor predisposición a la enfermedad fueron los adultos jóvenes del sexo masculino, la ciudad de Cuenca presentó el mayor número de casos positivos y la implementación de la técnica RT-PCR fue el método de diagnóstico in vitro altamente sensible para la detección del gen de fusión BCR/ABL p210.

Palabras Clave: GEN DE FUSION, BCR/ABL, P210, LMC, RT-PCR, CUENCA.



ABSTRACT

Background: The Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), a tool for important diagnosis in the detection of reciprocal translocations between chromosomes, which consists of using ribonucleic acid to generate multiple copies of a specific region through the enzyme Taq polymerase.

General objective: General Objective: To determine the prevalence of the BCR / ABL p210 fusion gene by means of the Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique in patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML).

Methodology: Methodology: The design of the research was observational, descriptive and retrospective, carried out from December 2013 to December 2017 and included a total of 121 patients with a diagnosis of CML. The results obtained were analyzed and tabulated with the software SPSS version 23.0 and Excel 2016; they are represented in tables and graphs.

Results: The prevalence of the BCR / ABL p210 fusion gene was 38.84% of which positive cases in the city of Cuenca were 24,79 %, male patients accounted for 30,58 % and 9,92 % made up the age group of 28- 37 years.

Conclusion: The patients with greater predisposition to the disease were the young adults of the male sex, the city of Cuenca presented the highest number of positive cases and the implementation of the RT-PCR technique was the highly sensitive in vitro diagnostic method for the detection of the gene of fusion BCR / ABL p210.

Keywords: FUSION GENE, BCR / ABL P210, CML, RT-PCR, CUENCA.



INDÍCE

RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	3
CAPITULO I.....	11
1.1 INTRODUCCIÓN.....	11
1.2 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA	11
1.3 JUSTIFICACIÓN.....	12
CAPITULO II.....	13
2 FUNDAMENTO TEÓRICO	13
2.1 Leucemia.....	13
2.1.1 Historia.....	13
2.1.2 Clasificación de las Leucemias.....	13
2.1.3 Leucemia Mieloide Crónica.....	14
2.1.4 Datos epidemiológicos.....	14
2.1.5 Fases de la Leucemia Mieloide Crónica.....	17
2.1.5.1 Fase Crónica.....	17
2.1.5.2 Fase Acelerada.....	17
2.1.5.3 Fase Terminal o Crisis Blástica.....	18
2.1.6 Características del Gen Fusión BCR/ABL p210.....	18
2.1.7 Factores de Riesgo.....	19
2.2 Diagnóstico.....	20
2.2.1 Hemograma.....	20
2.2.2 Citogenética.....	20
2.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	21
2.2.4 Hibridación in Situ con Fluorescencia (FISH).....	23
2.2.5 Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) .	24
2.2.6 Next Generation Sequencing (NGS).....	24
2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (RT-PCR) aplicado en el diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica.....	25



2.3.1 Sensibilidad y Especificidad.....	27
2.3.2 Extracción del ARN.....	27
2.3.3 ADN Complementario (cDNA).	27
2.3.4 Electroforesis.....	28
CAPITULO III.....	29
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GENERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	29
CAPITULO IV	30
4. DISEÑO METODOLÓGICO.....	30
4.1 TIPO DE ESTUDIO.....	30
4.2 AREA DE ESTUDIO	30
4.3 UNIVERSO Y MUESTRA	30
4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	30
Criterios de Inclusión:	30
Criterios de Exclusión:.....	30
4.5 VARIABLE	30
4.6 MÉTODOS TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.	31
Aislamiento de Células Mononucleadas.	31
4.7 PROCEDIMIENTOS.	34
4.8 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS.....	35
4.9 ASPECTOS ÉTICOS	35
CAPÍTULO V	36
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	36
TABLA N° 1	36
TABLA N° 2.....	37
TABLA N° 3.....	38



TABLA N° 4.....	39
CAPITULO VI	40
6. DISCUSIÓN.....	40
8. RECOMENDACIONES	43
9. BIBLIOGRAFÍA.....	44
10. ANEXOS.....	61
ANEXO 1.....	61
Operacionalización de variables.....	61
ANEXO 2.....	62
Ciclos del Termociclador en la obtención del cDNA.....	62
ANEXO 3.....	63
Ciclos de Termociclador en la amplificación de productos de la primera PCR y la NESTED.....	63
ANEXO 4.....	64
Oficio para autorización	64
ANEXO 5.....	65
Oficio de autorización aprobado	65
ANEXO 6.....	67
Formulario de registro de pacientes.	67
ANEXO 7.....	68
Evidencia Fotográfica.	68



LICENCIA Y AUTORIZACIÓN PARA PUBLICACIÓN EN EL REPOSITORIO INSTITUCIONAL

Mauro Javier Arcentales Cayamcela en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del proyecto de investigación "REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CUENCA 2013-2017", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este proyecto de investigación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 03 de Octubre de 2018



Mauro Javier Arcentales Cayamcela

C.I: 0302100110



CLÁUSULA DE PROPIEDAD INTELECTUAL

Mauro Javier Arcentales Cayamcela, autor del proyecto de investigación "REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CUENCA 2013-2017", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 03 de Octubre de 2018

A handwritten signature in blue ink, written over a horizontal line. The signature is stylized and appears to read 'Mauro Javier Arcentales Cayamcela'.

Mauro Javier Arcentales Cayamcela.

C.I: 0302100110



DEDICATORIA

A Dios por la sabiduría que me ha dado a lo largo de la vida y la carrera. A mi esposa Adriana, a mis hijos Stephanie y Gabriel por ser quienes me impulsan a ser una mejor persona cada día.

Mauro J.



AGRADECIMIENTO

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas e instituciones facilitando las cosas para que este trabajo llegue a un feliz término. Por ello es muy grato para nosotras utilizar este espacio y expresarles nuestro agradecimiento. Principalmente a mis Padres por la confianza y el apoyo tanto moral y económico brindado para poder llevar a cabo esta investigación. Agradezco de manera muy especial y sincera a la Dra. Sandra Peña P. Directora de Tesis por su apoyo y confianza en mi trabajo. Gracias por su paciencia y sus consejos que de seguro me serán muy útiles toda la vida. Debo agradecer de manera especial al MSc. Alfredo Campoverde Cisneros, Gerente del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad Bioncogen por permitirme desarrollar este trabajo de investigación en su laboratorio, de la misma forma agradezco a la Bqf. Jennifer Chacón por su colaboración y valiosos aportes realizados durante el desarrollo de este trabajo.



CAPITULO I

1.1 INTRODUCCIÓN.

La Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (*RT-PCR*), constituye una herramienta de diagnóstico importante en la detección de las translocaciones recíprocas entre los cromosomas, que consiste en utilizar el ácido ribonucleico (ARN) para generar múltiples copias de una región específica mediante la enzima Taq polimerasa que permitirá producir nuevas cadenas de ADN mediante el uso de cadenas existentes como molde. En este trabajo investigativo se resalta la importancia de la técnica de la RT-PCR en la detección del gen de fusión BCR/ABL p210 en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 mediante la técnica biomolecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (RT-PCR) en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) del laboratorio privado durante el periodo diciembre de 2013 a diciembre de 2017.

1.2 PLANTEAMIENTO DE PROBLEMA

La LMC es una neoplasia hematológica que afecta principalmente a personas en edad media y edad adulta reduciendo el margen de vida, con la particularidad que de ésta enfermedad se derivan un sin número de alteraciones moleculares en casi todos los pacientes, de ahí surge la importancia de la detección temprana del gen de fusión BCR/ABL p210. (1)

Para el diagnóstico en el Laboratorio de Biología Molecular, se utiliza la técnica de RT-PCR para detectar el gen de fusión BCR/ABL que codifica la proteína p210, que está íntimamente relacionada con el funcionamiento de la tirosina quinasa. La presencia de esta proteína es del 95 % en los adultos con LMC, en la leucemia



linfoblástica aguda (LLA) del 20 a 40 % en los adultos y del 5 % en los niños, y por último en la leucemia mieloblástica (LMA) el 12 %. (2)

En la actualidad, en nuestro medio existen escasos laboratorios que utilicen esta técnica, por lo tanto, en la presente investigación se describirá la utilidad de la RT - PCR en el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y detección temprana de recaídas.

1.3 JUSTIFICACIÓN

Los análisis de Biología Molecular para la detección del gen de fusión BCR/ABL p210 permiten identificar la LMC, que altera el normal funcionamiento del sistema hematopoyético, consecuentemente ocasiona secuelas graves incrementando la incidencia y la mortalidad en los individuos que la padecen. Hoy en día, se han convertido en uno de los principales análisis para llegar al diagnóstico definitivo de la LMC.

La presente investigación tiene como eje central confirmar un diagnóstico presuntivo o definitivo de LMC en pacientes que acuden al Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad, mediante la aplicación de la técnica de RT-PCR. Esta técnica permitirá al mismo tiempo verificar la sensibilidad y especificidad de la presencia del gen de fusión para posteriormente ser implementada en laboratorios públicos y privados.



CAPITULO II

2 FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Leucemia.

Se conoce como leucemia al incremento constante, anormal y desordenado de los glóbulos blancos que invaden la médula ósea causando alteraciones en el desarrollo y desenvolvimiento de las células troncales hematopoyéticas, esta situación conduce a que el cuerpo humano quede expuesto a todo tipo de enfermedad sin la posibilidad de defenderse con eficiencia.(3)

2.1.1 Historia.

En 1827, fue reportado por Velpeau el primer caso de leucemias en un paciente que presentaba un número anormal de células blancas, además de esplenomegalia. En 1856, Virchow atribuyó a este tipo de alteración el nombre de leucemia. Otros investigadores como Ehrlich, contribuyó con el desarrollo de técnicas hematológicas de tinción; Neumann describió que la médula ósea originaba las células sanguíneas. En 1960, el cromosoma Filadelfia fue descubierto en los pacientes con LMC por Bowel y Hungerford. En 1973, Rowley analizó el cromosoma Ph (Philadelphia) como el resultado de la translocación recíproca entre el cromosoma 9 y el 22 t (9,22) (q34; q11) dando lugar al gen de fusión BCR/ABL productor de una proteína anómala con acción tirosin quinasa.(4)(5)

2.1.2 Clasificación de las Leucemias.

Principales tipos de leucemias según el tipo de célula afectada y velocidad de progresión de la enfermedad:

- Leucemia linfocítica aguda.
- Leucemia mielógena aguda.
- Leucemia linfocítica crónica.



- Leucemia mieloide crónica.(6)

2.1.3 Leucemia Mieloide Crónica.

Es un síndrome mieloproliferativo crónico caracterizado por la alteración de la célula madre pluripotencial afectando a las tres series hematopoyéticas, este es uno de los pocos casos donde la base molecular es la responsable de la enfermedad.(7)

2.1.4 Datos epidemiológicos

En el año 2017, la incidencia de la LMC en países subdesarrollados de los continentes África, América Latina, Asia fue de 0.4 a 2,0 casos por 100.000 habitantes por año, en países desarrollados de Norteamérica, Europa y Asia del Pacífico la incidencia fue de 3 a 15 casos por cada 100.000 habitantes por año y se espera para el año 2027 la aparición de 20.000 nuevos casos de LMC en todo el mundo. (8)

Según los registros nacionales y regionales de la Unión Europea se considera que la incidencia de la LMC es de 0.7-1.0 por 100.000 habitantes por año, la edad media es de 57-60 años con una relación predominante del sexo masculino de 1.2 a 1.7 con respecto al sexo femenino, y la prevalencia se estima de 10-12 casos por 100.000 habitantes cada año sin diferencias geográficas o étnicas importantes.(9) (10)

En los países bajos de la Unión Europea la incidencia de la LMC fue de 0.9 casos por 100.000 habitantes en el periodo de tiempo del año 2001 y 2012, con respecto a la edad y el sexo fue más notable en los hombres durante las últimas décadas de vida. (11)

La prevalencia de la LMC en Francia en el año 2016 fue de 17 casos por 100.000 habitantes, la edad promedio 60 años y con predominio en el sexo masculino. (12)



Entre los años 2008-2013 en Alemania se obtuvieron datos del sistema de salud de aproximadamente 10.5 millones de personas, la tasa de incidencia de la LMC del sexo femenino fue de 1.3 por 100.000 habitantes y 1.7 por 100.000 habitantes para el sexo masculino, se estima que en el año 2012 el total de casos fue de 9.000 pacientes y para el año 2040-2050 se incrementara el número a 20.000 pacientes.(13)

Investigaciones de la LMC en 92.5 millones de adultos de 20 países de la Unión Europea cuya edad media fue de 56 años, la máxima incidencia se mostró en Italia con 1.39 casos por 100.000 habitantes por año y un mínimo de 0.69 casos por 100.000 habitantes por año en Polonia. (14)

Datos obtenidos de pacientes con diagnóstico de LMC del Swedish Cancer Register y del Swedish Cause of Death Register de Suecia en el periodo de 1985-2012, la edad media fue 40 años y la prevalencia de 11.9 casos por 100.000 habitantes y se incrementara para el año 2020 a 22.0 casos por 100.000 habitantes (2587 pacientes con LMC).(15)

Entre los años 2009 a 2016 en seis regiones de Rusia se investigó en 10.1 millones de habitantes, la incidencia de la LMC con los siguientes resultados de 0.58 por 100.000 habitantes por año, la morbilidad era 10 veces menor en las personas mayores a 70 años en relación a la edad de 60 años. (16)

En la región de Medio Oriente y Norte de África (Egipto y países árabes), existe escasa información del número de casos de LMC, los estudios realizados estiman que la edad promedio de los pacientes con LMC es de 43 años (40 años para los hombres y 41 años para las mujeres) y la más alta incidencia está en el grupo de pacientes con la edad de 30-35 años, no se puede tener información específica de las tasas de incidencia debido a la gran diversidad de servicios médicos. (17)

En Indonesia, la incidencia de la LMC es de 1.5 casos por 100.000 habitantes por año con predominio en los hombres y se incrementa con la edad. La edad media



de los pacientes es de 55 a 60 años y se estima que la prevalencia se incrementara en los futuros 20 años a 250.000 posibles casos, además se menciona que la edad promedio en China es de 45-50 años, 36-38 años en Tailandia, 38-40 años en la India y de 37 años en Corea del Sur. (18)

En un estudio realizado en España se registró la incidencia anual de 1.08 casos por 100.000 habitantes donde la susceptibilidad predomina más en hombres (58%) que en mujeres y la edad promedio es de 54 años incrementándose la incidencia hasta los 65 años. (19)

En Norteamérica, han sido diagnosticados 5.050 casos cada año y la tasa de mortalidad es alrededor del 0,9 por 100.000 habitantes(1). La incidencia de la LMC durante el año 2015 en los Estados Unidos de Norteamérica es de 1-2 casos por 100.000 habitantes adultos, la edad media es 67 años en este periodo se diagnosticaron 7.000 casos nuevos de los cuales 1.100 casos son de estado crítico. La prevalencia es de 80 mil a 100 mil casos y el pico máximo que se espera es en el año 2030 de 180.000 casos. (20) (21)

En México, la incidencia de la LMC es menor a 1 por cada 100.000 habitantes por año, la edad promedio de los pacientes 65 años y es más frecuente con una relación 3 a 1 a la leucemia linfocítica crónica. (22) (23)

Las neoplasias más frecuentes en Costa Rica son las leucemias con una tasa de mortalidad de 23.8 por 100.000 habitantes en el sexo masculino y 19.5 por 100.000 habitantes en el sexo femenino.(24)

En Venezuela, la LMC la incidencia es de 1-2 casos por 100.000 habitantes por año, el rango de edad de los pacientes es de 30 a 70 años y este tipo de leucemia representa el 15 al 20% de todas las leucemias en adultos. (25)

En Bolivia, la LMC es la primera neoplasia predominante en hombres con una incidencia del 4.2/100.000 habitantes por año y en mujeres con una incidencia del



2.5/100.000 habitantes por año según datos de GLOBOCAN (proyecto de salud ejecutado por la International Agency for Research on Cancer cuyo objetivo es proporcionar información actual de la incidencia y mortalidad de los principales tipos de cáncer a nivel nacional e internacional).(26)

En Ecuador, la LMC es un síndrome cuya incidencia esta entre 1-2 casos por 100.000 habitantes independiente de la región geográfica, donde la susceptibilidad según los registros del Hospital de Sociedad de Lucha contra el Cáncer (SOLCA) predomina más en hombres que en mujeres y la edad promedio es de 54 años incrementándose posteriormente hasta los 65 años. La LMC se ubica dentro de los 10 tipos de cáncer más frecuentes ocupando el quinto lugar para los hombres y el sexto lugar para las mujeres conllevando a la incrementación de la mortalidad.(27)(19)(28) (29) (30)

2.1.5 Fases de la Leucemia Mieloide Crónica.

2.1.5.1 Fase Crónica.

La aparición es insidiosa entre el 80 % y 90 % de los casos, con el tiempo de duración entre 3 a 5 años acompañado de leucocitosis entre 40.000 células /mL y 300.000 células /mL. Además, en las etapas iniciales se presenta basofilia, eosinofilia, trombocitosis y alteraciones en el hematocrito que causan anemia. En las muestras de medula ósea y en sangre periférica se observa células maduras e inmaduras, en los estudios citogenéticos el cromosoma Ph es positivo para el 95 % de los pacientes. (24)(31)

2.1.5.2 Fase Acelerada.

El periodo de duración puede ser de varios meses, presenta leucocitosis sobrepasando el valor de 11.000 células /mL, basofilia, eosinofilia, anemia progresiva y trombocitosis. En las muestras de medula ósea y en sangre periférica se observa blastos y promielocitos llegando a alcanzar el 10 y 20 %. En los



estudios citogenéticos el cromosoma Ph es positivo además de otras anomalías cromosómicas en el 50 % de los casos. (24)(31)

2.1.5.3 Fase Terminal o Crisis Blástica.

Representa la etapa final de la LMC, el periodo de duración es de pocas semanas o meses que involucra la transformación del estadio crónico a un estado agudo con episodios de hemorragias e infecciones. En las muestras de médula ósea y en sangre periférica se evidencia blastos mieloides (70 %) y linfoides (30 %) mayor al 30 %. En los estudios citogenéticos el cromosoma Ph es positivo además de otras anomalías cromosómicas en el 80 % de los casos. (24)(31)

2.1.6 Características del Gen Fusión BCR/ABL p210.

Formación.

El gen BCR tiene 23 exones donde se diferencian dos regiones, la mayor (M-bcr) localizada entre los exones 12-16 con la longitud de 58 Kb y la región menor (m-bcr) localizado en el primer intrón entre los exones 1-2 con la longitud de 55 Kb. Los sitios frágiles en el gen BCR están en los exones: 1 (e1), 12 (b2), 13 (b3) y 19 (e19). En el gen ABL el sitio frágil está en el exón 2 (a2) del cromosoma 9, entre estos dos genes las roturas de los sitios frágiles producen los siguientes reordenamientos: el e1a2 con el peso molecular de 190 pares de bases (pb), b2a2 con el peso molecular de 210 pb, b3a2 con el peso molecular de 230 pb. (25)(32)

Función.

El gen BCR (break point cluster región) en condiciones normales aporta con la información para generar una molécula que puede actuar como proteína activadora de GTPasa (guanosina trifosfatasa), la desactivación de esta proteína se vincula con el mecanismo de señalización química en el interior de la célula conocido como interruptores celulares; otra función del gen BCR es que puede reaccionar como una quinasa responsable de alterar la función de otras proteínas. (33) (34)



El gen ABL (Abelson) es un oncogén, normalmente está inactivado y codifica una proteína con acción tirosinquinasa responsable de la monitorización de los procesos que incluyen el ciclo celular, también interviene en la regulación de otros genes.(35) (34)

La presencia del gen de fusión BCR/ABL incrementa la actividad tirosinquinasa que altera la función de las células primitivas pluripotenciales favoreciendo el proceso de proliferación neoplásica a nivel de las células hematopoyéticas.(36)

2.1.7 Factores de Riesgo.

La presencia de uno o más factores de riesgo no significa que la persona tendrá la probabilidad de padecer la enfermedad, incluso existen personas que padecen la enfermedad sin tener factores de riesgo conocidos.

Entre los factores conocidos están:

1. La exposición a altas dosis de radiación ionizante mediante investigaciones en la población japonesa en el año 1965 que estuvo expuesta a altas concentraciones de radiación liberada en las ciudades de Hiroshima y Nagasaki por las explosiones de las bombas nucleares, luego de haber transcurrido 11 años el 30 % de la población desarrollo LMC. (37)
2. La radioterapia, que se aplica a mujeres con carcinoma cervical de útero y en el tratamiento de la espondilitis anquilosante. (7)
3. Agentes químicos, como el benceno y formaldehído.(38) (39)
4. La edad, comprendida entre 30 a 70 años está relacionado directamente con la probabilidad de padecer LMC.(25)
5. Incidencia del sexo, con predominio en los varones con respecto a las mujeres. (40)
6. Los inhibidores de topoisomerasas II del ADN, son enzimas que predisponen a inducir procesos leucémicos mediante la translocación entre el cromosoma 9 y



el 22. (7)

7. Fármacos mielotóxicos, como fenilbutazona, cloranfenicol y citostáticos.(41)
8. Factores genéticos, que activan oncogenes e inactivan genes supresores.(41) (42)
9. Cromosomopatías como el síndrome de Down y Li-Fraumeni.(43) (44) (45)
10. Tabaquismo, la dosis dependencia del hábito de fumar puede aumentar el riesgo de padecer LMC. (46)
11. Prácticas dietéticas y ocupacionales, se comprobó en un estudio realizado en el país de la India a pescadores y agricultores de arroz teniendo como resultado mayor número de pacientes con LMC en los agricultores. (47)
12. Multifactorial.(48)

2.2 Diagnóstico.

2.2.1 Hemograma.

Los pacientes con LMC presentan anemias, leucocitosis, agranulocitosis y las trombopatias.(49)

Leucocitosis de sangre periférica ($>50 \times 10^9 / L$) que consiste en neutrófilos en diversas etapas de desarrollo, a menudo con un bulto de mielocitos y neutrófilos polimorfonucleares, mieloblastos y promielocitos: 1-5%, células pseudo Pelger-Huet \pm , eosinofilia, basofilia o ambas, monocitosis, el recuento de plaquetas puede ser normal o aumentado (fase crónica). (14)

Características histopatológicas. Aumento de la celularidad de la médula ósea debido a la proliferación granulocítica, prominentes eosinófilos, megacariocitos. (14)

2.2.2 Citogenética.

El Cromosoma Philadelphia $t(9; 22)$ es la translocación genética entre la banda q 34 del cromosoma 9 y la banda q 11 del cromosoma 22 dando origen al gen de



fusión BCR/ABL que está constituido por las secuencias del gen ABL (cromosoma 9) y del gen BCR (cromosoma 22), según el sitio de unión:

- la sub banda 1, de la banda 4 en la región 3 del brazo largo del cromosoma 9 en donde se localiza el oncogén ABL 1.
- la sub banda 2, de la banda 1 en la región 1 del brazo largo del cromosoma 22 en donde se localiza el BCR.

El producto del intercambio de material genético conduce a la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22, de esta manera se sintetizan tres tipos de proteínas de diferente peso molecular p190, p210, p230 de acuerdo a los diferentes fenotipos de la enfermedad.

El 90 % de casos con LMC está relacionado con el cromosoma Ph mediante procedimientos de citogenética convencional y el restante por FISH , RT-PCR o Southern Blot.(50)(51)

2.2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Desde el descubrimiento de la molécula del ADN en 1869 por Johan Friedrich Miescher las investigaciones no se detuvieron hasta que en 1953 se evidencio uno de los descubrimientos más impactantes por los investigadores Watson y Crick en la estructura del ADN. En la década de los años 70 el análisis del ADN recombinante y las enzimas de restricción indujeron a perfeccionar nuevos métodos más sensibles, específicos y reproducibles; en 1985 Kary Mullis perfecciona un tipo de tecnología conocida como PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite replicar millones de veces una secuencia o fragmento de ADN específico in vitro mediante varios ciclos repetitivos de tiempo y temperatura variable dando como resultado la amplificación de la secuencia molde o blanco utilizando una enzima ADN polimerasa, que en condiciones normales es sintetizada por la célula y en forma sintética proviene de la bacteria *Thermus*



aquaticus con la cualidad que puede trabajar a temperaturas muy elevadas (79 °C a 85 °C), de ahí su nombre comercial más conocido: taq polimerasa. La flexibilidad y versatilidad de esta técnica permite su utilización en múltiples campos, por ejemplo: en medicina forense, tecnología de alimentos, investigaciones ambientales, etc. (52)(53)(54) (55)

Existen varios tipos de PCR para diferentes usos (Tabla 1), la RT-PCR es una técnica cualitativa que utiliza el ADN complementario (cDNA) con el objetivo de identificar los transcritos formados por las diferentes translocaciones, además confiere mayor precisión y exactitud en el análisis de la estructura y composición de las diferentes proteínas resultantes de la fusión de los genes que son interpretados en el fenotipo de la leucemia, esta técnica se aplica en el diagnóstico, pronóstico y monitorización de la LMC.(56)

**Tabla 1:** Variantes de la PCR, características y aplicaciones.VARIANTES DE LA
PCR

TIPOS DE PCR.	CARACTERISTICAS.	APLICACIONES.
PCR ESTANDAR.	Amplificación de un segmento de DNA utilizando dos partidores; la detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de un segmento de DNA.
PCR MULTIPLE.	Amplificación de 2 o mas segmentos de DNA utilizando varios partidores en una sola reacción de amplificación; la detección de la amplificación es mediante geles de agarosa.	Detección cualitativa de varios segmentos de DNA en una sola reacción de PCR.
RFLP-PCR (RESRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS)	PCR estándar con paso posterior de digestión con enzimas de restricción.	Detección de polimorfismos genéticos (SNPs).
RT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE)	Síntesis de cDNA a partir de ARN mediante transcripción reversa, seguido de una PCR.	Expresión de genes. Detección de virus de ARN.
RT-PCR qPCR (REAL TIME)	PCR estándar donde se utilizan tinciones o sondas con fluorofóros para la detección de los fragmentos amplificados; puede ser tipo multiplex.	Detección cuantitativa de uno o varios segmentos de DNA en la muestra (cargas) o expresión de genes (asociada a una RT-PCR).

Tomado de: Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. (57)

2.2.4 Hibridación in Situ con Fluorescencia (FISH).

Esta técnica utiliza ADN desnaturalizado en una sola cadena unida con cDNA marcado con fluorocromos, tiene su importancia en el diagnóstico genético por el análisis de los cromosomas en metafase o en interfase en muestras de médula ósea o sangre periférica.(58)

En el análisis del gen BCR/ABL las sondas detectan la translocación entre el cromosoma 9 y el 22 t (9; 22). Se usan dos sondas: la primera en el punto de ruptura del gen BCR en la región 5', la segunda en el punto de rotura del gen ABL en la región 3'; estas dos regiones están marcadas con diferentes fluorocromos produciendo una señal de determinado color en los genes BCR (espectro verde) y ABL (espectro rojo) cuando la sonda se ha hibridado. En condiciones normales de



las células las señales de los genes de estudio se presentan cuatro señales y en condiciones de células leucémicas se presenta tres señales; la primera señal fusionada en el sitio del gen de fusión BCR/ABL (espectro amarillo) y las dos restantes representan genes normales.(50)(59)

2.2.5 Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Esta técnica garantiza resultados de alta calidad gracias a la sensibilidad en detección y cuantificación del gen BCR/ABL en los glóbulos blancos de pacientes con LMC.

La qRT-PCR requiere de protocolos estrictos en calidad y cantidad del ARN para estimar el nivel de expresión del gen BCR/ABL a partir del cálculo de la cantidad del ARNm en la muestra biológica .(60)

La técnica inicia con el ARNm que se sintetiza en cADN y a su vez se marcan con fluorocromos que están intercalados entre las bases del cADN que contiene secuencias específicas de la expresión del gen a investigación y por último es amplificado por PCR en tiempo real. En la interpretación se mide la fluorescencia que emiten las sondas específicas del ADN más los fluorocromos, con esta información se traduce en términos matemáticos para calcular la cantidad de ARNm en la muestra de análisis.(61)

Mediante las técnicas de biología molecular se ha demostrado que el gen de fusión BCR/ABL p210 está presente en el 99 % de los pacientes. (62)

2.2.6 Next Generation Sequencing (NGS)

En la actualidad es una poderosa herramienta de gran precisión en el diagnóstico molecular, al secuenciar de manera simultánea múltiples genes relacionados con las diferentes patologías e identificar nuevo genes y mutaciones.

Las ventajas incluyen el bajo costo, rapidez, eficiencia, alta sensibilidad en la secuenciación de miles de millones de secuencias de manera simultánea.(63)



La NGS utilizando la tecnología del ADN de alto rendimiento y la huella genética de la LMC hace posible detectar y cuantificar los niveles más bajos del gen de fusión BCR/ABL. Investigaciones recientes informan la identificación de un nuevo gen de fusión BCR/ABL estructurado por dos cortes de rotura, el uno en el intrón 14 del gen BCR y el otro corte de rotura en el intrón 2 del ABL en un extraño caso de LMC. Mediante la técnica de RT-PCR se identificó que este gen de fusión BCR/ABL mostraba en su ARNm una unión e14a3 que normalmente es indetectable por procedimientos rutinarios de qRT-PCR; también se demuestra que otras mutaciones en genes como TP53, FLT3, KIT, Y PAX5 están vinculados con el BCR/ABL que en conclusión revelan el alto índice de heterogeneidad en la LMC. (64)(65)(66)

2.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (RT-PCR) aplicado en el diagnóstico de Leucemia Mieloide Crónica.

El ARN normalmente su estructura es un hebra con alta sensibilidad al calor, debido a estos antecedentes la RT-PCR es una técnica que amplifica el ARN especialmente el ARN mensajero de genes con expresión elevada y expresión mínima mediante la síntesis previa del cADN, esta conversión se realiza por medio de la enzima llamada transcriptasa inversa (reverse transcriptase); esta enzima se purifica a partir de la bacteria *Escherichia Coli*, para posteriormente ser amplificado por PCR (Gráfico 1); los análisis in vitro demuestran que esta técnica es la que mayor garantías otorga en la detección de alteraciones en la expresión génica. (67) (68)

PCR Nested O Anidada

Se caracteriza por ser una técnica que incrementa la sensibilidad de la PCR para lo cual utiliza 4 cebadores, así como dos PCR: en la primera PCR se utilizan 2 cebadores externos y segunda PCR donde se utiliza cebadores internos dirigidos

a la región previamente amplificada se emplea cuando se inicia de una cantidad muy baja de ADN problema.(69)

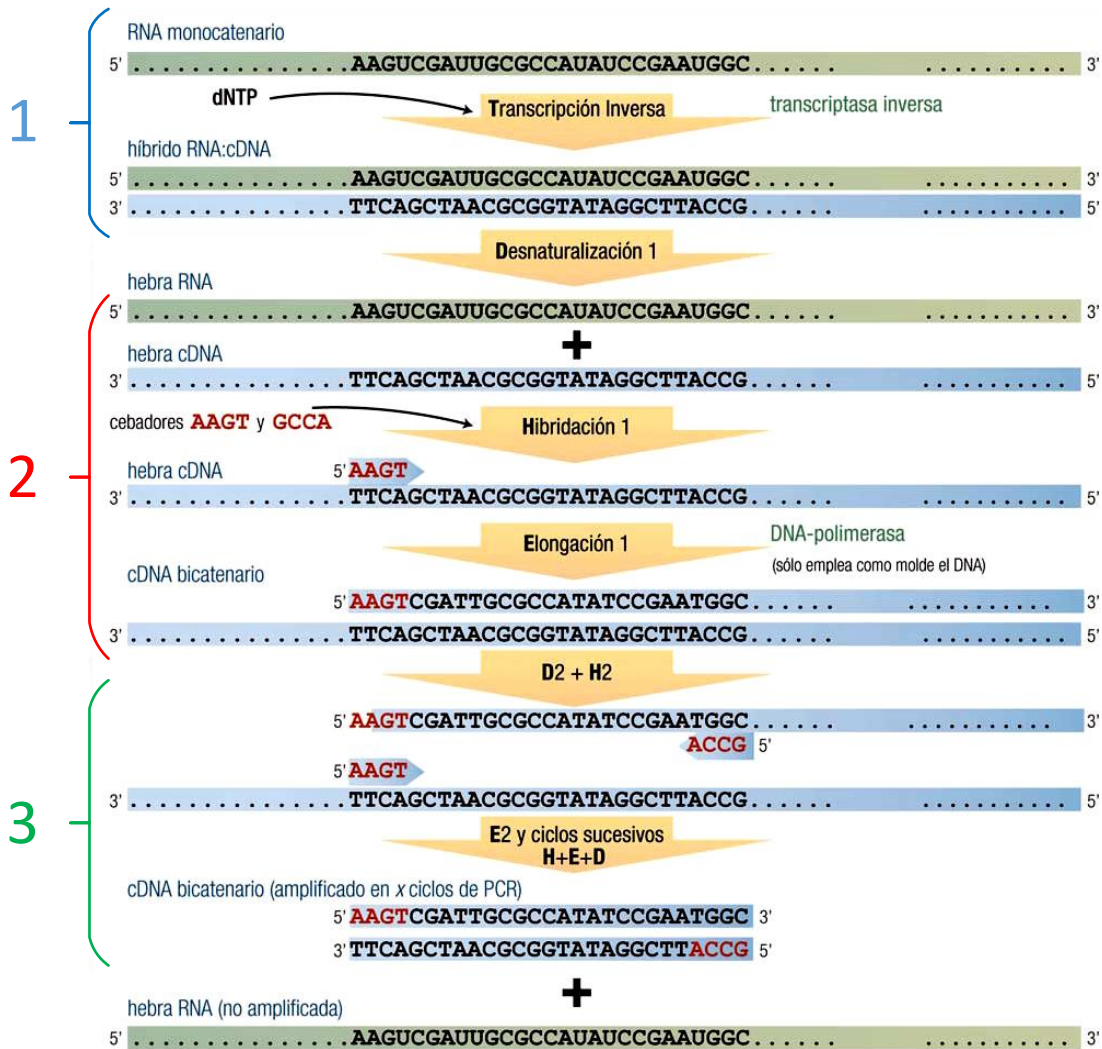


Gráfico 1: Técnica de RT-PCR. En la técnica se distinguen tres etapas: 1. Síntesis previa de cADN; 2. Primer ciclo de la PCR; 3. Segundo ciclo de la PCR.

Tomado de: Texto ilustrado e interactivo de Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud.(70)



2.3.1 Sensibilidad y Especificidad.

La RT-PCR es una herramienta óptima por la rapidez, especificidad y sensibilidad mayor al 99.9 %, alcanzando a detectar el gen de fusión BCR/ABL positivo de una célula en la población de 1.000 o más células esta propiedad es importante en el diagnóstico, pronóstico, evolución y tratamiento farmacológico, esta técnica es una de las pruebas de oro (Gold standard) importantes en el diagnóstico de LMC llegando a recibir certificaciones de la Comunidad Europea (CE) y de la Food and Drug Administration (FDA) en USA, (71)(72)(73)

2.3.2 Extracción del ARN.

El ARN direcciona la traducción para la producción de proteínas y el ADN proporciona la información genética. En la extracción del ARN la dificultad es la técnica y las sustancias contaminantes (ARNasa, proteínas, polisacáridos y ADN genómico).(74)

El ARN es una molécula muy lábil, que puede degradarse con facilidad por ARNasas y por temperaturas que superan los cuatro grados centígrados; para prevenir y conservar la integridad se utiliza inhibidores de ARNasa, temperaturas inferiores a cuatro grados centígrados que garantizan la calidad del ARN y la posterior síntesis del cADN. (75)

El método más común es el de Chomezynski y Sacchi para el aislamiento del ARN mediante la utilización del isocianato de guanidina para conservar la integridad, el fenol-cloroformo para formar dos fases donde la superior contiene el ARN que posteriormente es tratado con isopropanol para recuperar y purificar el ARN. (76)

2.3.3 ADN Complementario (cDNA).

El cDNA tiene la estructura de doble hebra conformado por una secuencia complementaria del ARNm proveniente de la hebra original por la acción de la enzima transcriptasa inversa; una de las propiedades del cDNA es recuperar ARN



que se encuentra en muy pocas cantidades en las diversas muestras biológicas y está libre de contaminantes.(77)

2.3.4 Electroforesis.

Es una de las técnicas más utilizadas en biología molecular para la separación de macromoléculas como el ADN y proteínas en un campo eléctrico con una solución buffer cuyo pH (potencial de hidrógeno) es de 8, donde los iones con carga positiva migran al cátodo y los iones con carga negativa hacia el ánodo.(78)

Los productos de la RT-PCR se observan en el gel de agarosa al 2 % con bromuro de etidio, el gel sirve de soporte y el bromuro de etidio es un colorante fluorescente que se fija intercalándose entre las pares de bases del ADN, la fluorescencia se revela cuando entra en contacto con la luz ultravioleta del espectro discerniendo bandas separadas de acuerdo al peso molecular del producto amplificado.(79)(80)



CAPITULO III

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la prevalencia del gen de fusión BCR/ABL P210 mediante la técnica biomolecular de Reacción en Cadena de la Polimerasa Transcriptasa Inversa (RT-PCR) en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad durante el periodo diciembre de 2013 a diciembre de 2017.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar el número de casos positivos y negativos del gen de fusión BCR/ABL p210 durante el periodo de estudio.
- Describir los datos socios demográficos.
- Relacionar los resultados con las variables género, edad y procedencia.



CAPITULO IV

4. DISEÑO METODOLÓGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional descriptivo retrospectivo en pacientes con LMC con resultados positivos para el gen de fusión BCR/ABL p210 en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad.

4.2 AREA DE ESTUDIO

Resultados de los pacientes que acuden de hospitales públicos y privados de las ciudades de Cuenca y Guayaquil al Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad.

4.3 UNIVERSO Y MUESTRA

El universo son pacientes con diagnóstico de LMC en el Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad durante el periodo diciembre de 2013 a diciembre de 2017, el muestreo es por conveniencia incluyendo todos los pacientes que tengan solicitud de examen para el gen de fusión BCR/ABL p210, el método utilizado para el diagnóstico fue la RT-PCR. La muestra fue recolectada en tubo con EDTA.

4.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de Inclusión:

Pacientes a partir de 18 a 75 años con diagnóstico de LMC.

Criterios de Exclusión:

Personas menores a 18 años y mayores a 75 años sin diagnóstico de LMC

4.5 VARIABLE

Las variables y su operacionalización se visualizarán en el Anexo 1.



4.6 MÉTODOS TÉCNICAS E INSTRUMENTOS.

MÉTODO.

Prueba Biomolecular RT-PCR para la detección del gen BCR/ABL p210 en LMC.

TÉCNICAS.

Aislamiento de Células Mononucleadas.

La extracción el ARN se realizó a partir de células mononucleadas presentes en 3 a 5 mL de sangre periférica o de medula ósea con EDTA y conservado a 4 °C.

Se adicionó al 1 mL de sangre 2 mL de solución fisiológica en un tubo Falcom de 14 mL, esta muestra fue homogenizada y transferida con una pipeta Pasteur estéril por las paredes de otro tubo Falcom que contenía 3 mL de Ficoll; este preparado se centrifugó a temperatura ambiente a 1.800 rpm por 15 minutos; se observó el anillo de glóbulos blancos este fue transferido con una pipeta Pasteur estéril a otro tubo Falcom que contenía 10 mL de solución salina, se realizó un vortex de 15 segundos; este preparado se centrifugó a temperatura ambiente a 1.800 rpm por 15 minutos; se decantó el sobrenadante dejando solo el pellet o botón para la extracción del ARN y se almacenó a -25 °C.

Extracción del ARN.

Técnica Trizol (fenol-cloroformo y guanidina tiocianato) descrita por Chomczynski.

Al pellet obtenido se realizó un vortex de 15 segundos, se agregó con una pipeta Pasteur estéril 1 mL de TRI Reagent Solution, se homogenizó; este preparado fue transferido a un tubo eppendorf, se adicionó 200 uL de cloroformo; vortex 15 segundos y se dejó en reposo 10 minutos a temperatura ambiente; se centrifugó a -4 °C por 15 minutos; se colocó 400 uL del sobrenadante en otro eppendorf que contenía 500 uL de isopropanol; se homogenizó y centrifugó a -4 °C por 15 minutos a 12.000 rpm; se decantó el sobrenadante y se agregó 1000 mL de



etanol al 70 %; se centrifugó a 4 °C por 5 minutos a 9.000 rpm; se desechó el sobrenadante y se colocó el tubo invertido sobre papel absorbente por 10 minutos para que se evapore los residuos; se rehidrató con 30 uL de agua ultra pura; se llevó al termo bloque por 10 minutos a 65 °C y posterior a este paso la muestra fue almacenada a -25 °C.

Obtención del cDNA.

Una alícuota de 30 uL de ARN fue sometida a retrotranscripción para obtener el cADN utilizando el kit Script Reverse Transcriptasa. Para la reacción de retro transcripción (RT) en primer lugar se mezclaron 4 uL de ARN total con 2 uL de una solución de 2 ug/ uL Randon Primer y 6.5 uL de agua tratada; esta mezcla fue incubada a 70 °C durante 10 minutos, luego se colocó en hielo y posteriormente se completó para constituir la mezcla final de reacción en un volumen de 21 uL que incluye además 5x First Strand Buffer (5x First S), dNTPS Mix (10mM), DTT (0.1 M) y ARNse OUT recombinant ribonuclease inhibidor (5,000 U). Esta mezcla se incubó a 42 °C durante 2 minutos, después se colocó en hielo y posteriormente se añadió 1 uL de SuperScrip III Reverse Transcriptase solo a la muestra, esta mezcla se incubó a 37 °C durante 60 minutos, después a 99 °C por espacio de 5 minutos y, finalmente 5 °C durante 5 minutos (Anexo 2) para ser almacenado en congelación a 4 °C previo a la siguiente reacción.

El proceso de amplificación se realizó por:

PCR.

Primera PCR.

Se empleó 3 uL el cDNA para realizar la amplificación de los transcritos BCR/ABL por PCR utilizando la mezcla de reactivos, el volumen total fue de 50 uL: Platinum Taq ADN Polymerase, agua tratada, Buffer 10X (200mM Tris-HCL, pH 8.0, 0.1mM



EDTA, 1 mM DTT, estabilizantes 50%, v/v glicerol), MgCl₂ (50mM), dNTPs (10mM), primers:

BCR-b1-A (GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC)

ABL-a3-B (GTTTGGGCTTCACACCATTCC)

El programa de amplificación fue: 2 min a 94 °C; 35 ciclos: 30 segundos a 94 °C, 60 segundos a 65 °C, 60 segundos 72°C; ninguna extensión final necesaria y parada de PCR a 4 °C (Anexo 3). (26)

Segunda PCR (NESTED o PCR ANIDADA)

Se emplea 1 uL del producto amplificado de la primera PCR, los reactivos y condiciones de ciclo son las mismas de la primera PCR (Anexo 3) excepto los primers:

BCR-b2-C CAGATGCTGACCAACTCGTGT

ABL-a3-D TTCCCATTGTGATTATAGCCTA

Los productos amplificados de las dos reacciones de PCR anteriormente descritas son analizados cualitativamente por electroforesis en gel de agarosa al 2 %, utilizando bromuro de etidio como colorante de revelado. La interpretación dependerá del peso molecular de cada isoforma expresado en pb, como se detalla en la Tabla 2.



Tabla 2. Tamaños de los productos amplificados de la PCR expresado en pb.

Isoformas BCR/ABL p210	Tamaños en pb PRIMERA PCR (A-B)	Tamaños en pb NESTED PCR (C-D)
b3a2	417	360
b2a2	342	285
b3a3	243	186
b2a3	168	111

Tomado de: Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. (81)

INSTRUMENTO.

- Protocolos de trabajo del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad.
- Base de datos del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad.

4.7 PROCEDIMIENTOS.

Autorización.

Autorización por parte del Gerente del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad, MSc. Alfredo Campoverde Cisneros, quien luego de su aprobación me facilitó el acceso y recolección de la información mediante la base de datos que es utilizada en el laboratorio. (Anexo 4 y Anexo 5)

Capacitación.

MSc. Alfredo Campoverde Cisneros, Bqf. Jennifer Chacón Vélez.



Supervisión.

Directora de la Tesis: Doctora Sandra Peña P.

Gerente del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad.

MSc. Alfredo Campoverde C.

4.8 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS

En la recolección de la información se utilizó un formulario para cada paciente y en la tabulación de datos se aplicó las siguientes herramientas estadísticas: frecuencia, prevalencia, medidas de tendencia central y dispersión. Los resultados fueron presentados en tablas y gráficos utilizando el software SPSS 23 y Microsoft Excel 2016. (Anexo 6)

4.9 ASPECTOS ÉTICOS

Para realizar la investigación Reacción En Cadena de Polimerasa Transcriptasa Inversa para Diagnóstico de la Leucemia Mieloide Crónica Cuenca 2013 - 2017, se contó con la autorización correspondiente por parte del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad, para la recolección de la base de datos de pacientes con el diagnóstico de LMC guardando discreción y respeto en la manipulación de información.



CAPÍTULO V

5. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se analizaron los resultados de 121 pacientes atendidos durante el periodo diciembre de 2013 a diciembre de 2017 en el laboratorio, con el objetivo de establecer la prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 en la Leucemia Mieloide Crónica (LMC).

TABLA N° 1: Prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210.

RESULTADOS	CASOS	PORCENTAJE
POSITIVO	47	38,84 %
NEGATIVO	74	61,16 %
TOTAL	121	100,00 %

Fuente: Primaria, registro de laboratorio.

Elaboración: El Autor.

De acuerdo a los datos recolectados de 121 pacientes con LMC, podemos observar que existió un 61,16 % de casos negativos correspondiente a 74 pacientes; frente a un 38,84 % de casos positivos para el gen de fusión BCR/ABL p210 presentado por 47 pacientes.

**TABLA N° 2: Prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 según el Género.**

RESULTADOS	FEMENINO		MASCULINO		TOTAL	
	CASOS	PORCENTAJE	CASOS	PORCENTAJE	CASOS	PORCENTAJE
POSITIVOS	10	8,26 %	37	30,58 %	47	38,84 %
NEGATIVOS	27	22,31 %	47	38,84 %	74	61,16 %
TOTAL	37	30,58 %	84	69,42 %	121	100,00 %

Fuente: Primaria, registro de laboratorio.

Elaboración: El Autor.

De acuerdo al género el mayor número de casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 se presentó en el género masculino, con 37 casos que corresponden al 30,58 %; mientras que en el género femenino se registraron 10 casos que representan el 8,26 %. Con este resultado se corrobora que existe mayor predisposición de presencia del gen BCR/ABL p210 en el género masculino.



TABLA N° 3: Prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 según la Edad.

ESTADÍSTICA: \bar{X} : 47,74 DS: 15,84 Varianza: 250,90						
EDAD- AÑOS	POSITIVOS		NEGATIVOS		TOTAL	
	CASOS	PORCENTAJE.	CASOS	PORCENTAJE	CASOS	PORCENTAJE
18-27	9	7,44 %	7	5,79 %	16	13,22 %
28-37	12	9,92 %	13	10,74 %	25	20,66 %
38-47	7	5,79 %	8	6,61 %	1	12,40 %
48-57	11	9,09 %	14	11,57 %	25	20,66 %
+58	8	6,61 %	32	26,45 %	40	33,06 %
TOTAL	47	38,84 %	74	61,16 %	121	100,00 %

Fuente: Primaria, registro de laboratorio.

Elaboración: El Autor.

La mayor frecuencia de casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 se encontró en el grupo de edad de 28-37 años con 12 casos que corresponden al 9,92 %, seguido del grupo de 48-57 años con 11 casos que corresponden al 9,09 %; el intervalo entre 18-27 años con 9 casos que corresponde al 7,44 %; en los pacientes cuya edad es superior a los 58 años se registraron 8 casos que corresponde al 6,61 % y por último se encuentra las edades de 38-47 con 7 casos que representan el 5,79 %. La media en relación a la edad se situó en 47,74, con una desviación estándar de 15,84 y una varianza de 250,90.



TABLA N° 4: Prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 según el Procedencia.

PROCEDENCIA	CUENCA		GUAYAQUIL		TOTAL	
	CASOS	PORCENTAJE	CASOS	PORCENTAJE	CASOS	PORCENTAJE
POSITIVOS	30	24,79 %	17	14,05 %	47	38,84 %
NEGATIVOS	38	31,40 %	36	29,76 %	74	61,16 %
TOTAL	68	56,19 %	53	43,81 %	121	100,00 %

Fuente: Primaria, registro de laboratorio.

Elaboración: El Autor.

De acuerdo a la procedencia el mayor número de casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 se presentan en ciudad de Cuenca con 30 casos que corresponden al 24,79 % y en la ciudad de Guayaquil se registraron 17 casos que corresponde al 14,05 %.



CAPITULO VI

6. DISCUSIÓN

La presente investigación aplicó un esquema porcentual para el análisis de los resultados, debido a que dicha estadística permite tener una idea más clara acerca de la realidad, sin embargo al interpretar los datos obtenidos y tratar de confrontarlos con reseñas similares, se evidenció que la información estadística manejada en las mismas es diferente a la utilizada en este estudio, puesto que en su mayoría aplican probabilidades o medias estadísticas para sus análisis; esto no permitió tener un buen contraste de datos entre sí, pero debido a la escases de estudios con datos porcentuales y actuales, se optó por citar el único artículo realizado en el Ecuador para discutir los datos en relación a la procedencia, haciendo uso de toda la información disponible en bases científicas y académicas a nivel nacional e internacional.

En el presente estudio la prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 fue del 38,84 %, lo cual es comparable con una investigación realizada en el año 2017 en Malasia (Sur oriente de Asia), en donde se analizaron 79 casos con una prevalencia del 39 % de casos positivos. (82) Por otra parte, difiere del resultado obtenido por Bonilla et al. Entre los años 2003 a 2007 en Colombia, en donde se analizaron 31 pacientes con una prevalencia del 96.8 % de casos positivos. (62)

De acuerdo al género, el mayor número de casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 se presentó en el género masculino, con el 30,58 %; mientras que en el género femenino registró el 8,26 %. Con este resultado se corrobora que existe mayor predisposición de presencia de gen BCR/ABL p210 en el género masculino. (83) Resultados similares se observan en varios estudios, uno de ellos realizado en Cuba (2012) en donde se analizaron 252 pacientes con predominio del género masculino en 142 casos (56.3 %) sobre el género femenino 110 casos (43.7 %) (84); en Bolivia (1999 – 2015) se estudiaron 272 pacientes con



predomino del género masculino en 166 casos (61 %) con respecto del género femenino 106 casos (31 %). (26)

En el año 2015, investigaciones efectuadas en la India y Siria arrojan datos similares, en el primer caso de una muestra de 270 pacientes se obtuvo predominio del género masculino en 128 casos (64 %) frente al género femenino 72 casos (36 %) (32); mientras que en Siria de un análisis de 44 pacientes, 25 casos (56.8 %) fueron para el género masculino frente a 19 casos (43.2 %) en el género femenino. (85)

La información obtenida en Rusia (2004 – 2013) difiere de las anteriores investigaciones, debido a que en este país de un muestreo de 1082 pacientes, el 51 % de casos positivos fue para el género femenino (551 pacientes) respecto de un 49 % para el género masculino (531 pacientes). (86)

La edad media de los pacientes analizados en este estudio fue 47,74 años, resultado análogo al obtenido por Navarro et al. (Brasil 2009 – 2015) en donde la edad media fue 48 años (87). Resultados parecidos reportan los estudios de Amaru et al. (Bolivia 2015) (26) y Ayatollahi et al. (Nor-este de Irán 2012 – 2013) cuya edad media fue de 44 años; así como el obtenido en el Instituto Pasteur de Irán (2001 – 2015) con una edad media de 46 años.(88)

El rango de edad con mayor disposición de casos positivos para el gen de fusión BCR/ABL p210, se situó entre los 28-37 años, correspondiendo al 9,92 % del total de los casos, resultado similar se evidenció en el estudio realizado por Morales et al (Guatemala 2012) donde la predisposición de pacientes con la presencia del gen investigado de acuerdo a la edad se expresó entre los 22 – 58 años (36). Otras investigaciones realizadas difieren con el presente estudio, la primera realizada por Rajesh, et al. (India 2011), entre los años 1976-2005 expone que las tasas más altas con casos positivos en relación a los grupos de edad se situaron entre los 55-74 años (89) y la segunda efectuada por Ávila et al. (Cuba 2014)



demuestra que la mayoría de casos positivos oscilan entre las edades de 30-49 años. (90)

De acuerdo a la procedencia, el mayor número de casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 se presentaron en la ciudad de Cuenca con el 24,79 % y en la ciudad de Guayaquil se registró el 14,05 %. Un estudio previo realizado por Jaramillo et al. En SOLCA de la ciudad de Cuenca en el año 2011, concluyó que la provincia del Azuay tiene mayor predisposición para los diferentes tipos de leucemia, encontrando un 55.41 % de casos positivos frente a la provincia de Guayas que reportó un 2.21 %. Estos datos concuerdan con los obtenidos en la presente investigación colocando a la ciudad de Cuenca con el mayor número de casos reportados. (30)



7. CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos en la presente investigación es posible plantear las siguientes conclusiones con respecto a los 121 pacientes analizados:

La prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 en los pacientes diagnosticados con LMC fue del 38,84 %, frente a un 61,16 % de casos negativos.

La mayor prevalencia del gen de fusión BCR/ABL p210 se presentó en el género masculino con un porcentaje del 30,58 % correspondiente a 37 casos, mientras que en el género femenino se obtuvo un porcentaje del 8,26 % equivalente a 10 casos.

El 9,92 % de los casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 pertenecieron al grupo etario de 28-37 años.

De acuerdo a la procedencia la población que presentó mayor número de casos positivos del gen de fusión BCR/ABL p210 fue la ciudad de Cuenca con el 24,79 % (30 casos).

8. RECOMENDACIONES

Considerando la importancia del gen de fusión BCR/ABL p210 en el diagnóstico de la LMC y la ausencia de información sobre su prevalencia en la ciudad de Cuenca, es oportuno realizar las siguientes recomendaciones:

Ampliar estudios a fin de conocer la estadística actual del gen de fusión BCR/ABL p210 a nivel de la ciudad e incluso del país.

Para apoyar de mejor manera al diagnóstico además del resultado obtenido con la RT-PCR se recomendaría la cuantificación de este gen de fusión mediante la qRT-PCR.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. Avila-Cabrera OM, Expósito-Delgado YC, González-Pinedo L, Espinosa-Estrada E, Hernández-Padrón C, Ramón-Rodríguez LG, et al. Aspectos diagnósticos, evolutivos y terapéuticos de la leucemia mieloide crónica. Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter. marzo de 2014;30(1):47-58.
2. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion BCR-ABL transcript types and evaluation of molecular response of the a2b2 and a2b3 transcripts to Imatinib resistance in north Indian chronic myeloid leukemia patients Mir R, Ahmad I, Javid J, Zuberi M, Yadav P, Shazia R, Masroor M, Guru S, Ray P C, Gupta N, Saxena A - Indian J Cancer [Internet]. [citado 22 de junio de 2016]. Disponible en: <http://www.indianjcancer.com/article.asp?issn=0019509X;year=2015;volume=52;issue=3;spage=314;epage=318;aulast=Mir>
3. Jaramillo Buñay MG, Juca Córdova DC, Loza Peñaloza JG. Frecuencia de leucemias y linfomas diagnosticados en el hospital de la sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA), de la ciudad de Cuenca durante el período 1996 a 2005. 2011 [citado 1 de julio de 2016]; Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3473>
4. Ortiz-Hidalgo C. Notas sobre la historia de la leucemia. Patol Rev Latinoam [Internet]. 2013 [citado 13 de septiembre de 2017];51(1):58-69. Disponible en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=42560>
5. Rodríguez M, Cardona AF, Grajales MA, Enciso L, Ruiz G, Yepes A, et al. Leucemia mieloide crónica en crisis blástica bases moleculares y diagnóstico. Rev Venez Oncol [Internet]. diciembre de 2007 [citado 13 de septiembre de 2017];19(4):287-96. Disponible en:



http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0798-05822007000400003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

6. Leucemia: MedlinePlus enciclopedia médica [Internet]. [citado 23 de agosto de 2016]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ency/article/001299.htm>
7. Avila-Cabrera OM, Expósito-Delgado YC, González-Pinedo L, Espinosa-Estrada E, Hernández-Padrón C, Ramón-Rodríguez LG, et al. Aspectos diagnósticos, evolutivos y terapéuticos de la leucemia mieloide crónica. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter.* marzo de 2014;30(1):47-58.
8. Tadwalkar S. The global incidence and prevalence of chronic myeloid leukemia over the next ten years (2017-2027). 7 de septiembre de 2017 [citado 11 de abril de 2018]; Disponible en: <https://www.omicsonline.org/proceedings/the-global-incidence-and-prevalence-of-chronic-myeloid-leukemia-over-the-next-ten-years-2017202771073.html>
9. Höglund M, Sandin F, Simonsson B. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia: an update. *Ann Hematol* [Internet]. 1 de abril de 2015 [citado 12 de abril de 2018];94(2):241-7. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00277-015-2314-2>
10. 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* [Internet]. 1 de julio de 2017 [citado 12 de abril de 2018];28(suppl_4):iv41-51. Disponible en: https://academic.oup.com/annonc/article/28/suppl_4/iv41/3958153
11. Thielen Noortje, Visser Otto, Ossenkoppele Gert, Janssen Jeroen. Chronic myeloid leukemia in the Netherlands: a population based study on incidence, treatment, and survival in 3585 patients from 1989 to 2012. *Eur J Haematol*



- [Internet]. 5 de julio de 2016 [citado 11 de abril de 2018];97(2):145-54. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ejh.12695>
12. Delord M. 100 Years of Chronic Myeloid Leukemia Prevalence in France. *Blood* [Internet]. 2 de diciembre de 2016 [citado 11 de abril de 2018];128(22):2380-2380. Disponible en: <http://www.bloodjournal.org/content/128/22/2380>
 13. Lauseker M, Gerlach R, Tauscher M, Hasford J. Improved survival boosts the prevalence of chronic myeloid leukemia: predictions from a population-based study. *J Cancer Res Clin Oncol*. julio de 2016;142(7):1441-7.
 14. Hoffmann VS, Baccarani M, Hasford J, Lindoerfer D, Burgstaller S, Sertic D, et al. The EUTOS population-based registry: incidence and clinical characteristics of 2904 CML patients in 20 European Countries. *Leukemia* [Internet]. junio de 2015 [citado 12 de abril de 2018];29(6):1336-43. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/leu201573>
 15. Gunnarsson N, Sandin F, Höglund M, Stenke L, Björkholm M, Lambe M, et al. Population-based assessment of chronic myeloid leukemia in Sweden: striking increase in survival and prevalence. *Eur J Haematol*. octubre de 2016;97(4):387-92.
 16. Kulikov SM, Vinogradova OI, Chelysheva EI, Tishchenko IA, Galaiko MA, Lazareva OV, et al. [Incidence of chronic myeloid leukemia in 6 regions of Russia according to the data of the 2009-2012 population-based study]. *Ter Arkh*. 2014;86(7):24-30.
 17. Mohamed Azzazi, Mervat Mattar. Part II of the Second Report of Arab Leukemia Net (ALN) Registry for Chronic Myeloid Leukaemia (CML) in the Middle East & North Africa Region(AFME). Additional Chromosomal
-



- Abnormalities(ACAs) in Egypt, a Multicenter Results. Oct 2014 [Internet]. 8:8-9. Disponible en: https://www.leukemia-net.org/content/home/elN_meetings/elN_frontiers_meeting/e10501/infoboxContent10502/NORE1401ELNFrontiers2014AbstractbookletPP2.pdf
18. Reksodiputro A H. Epidemiology Study and Mutation Profile of Patients with Chronic Myeloid Leukemia (CML) in Indonesia. J Blood Disord Transfus [Internet]. 2015 [citado 12 de abril de 2018];06(03). Disponible en: <https://www.omicsonline.org/open-access/epidemiology-study-and-mutation-profile-of-patients-with-chronic-myeloid-leukemia-cml-in-indonesia-2155-9864-1000271.php?aid=53370>
 19. Osorio S, Casado LF, Giraldo P, Maestro B, Andrade M, Redondo S, et al. Chronic myeloid leukaemia in Spain: Its presentation characteristics have changed. Spanish section of the EUTOS population-based registry. Rev Clin Esp. 6 de abril de 2016;
 20. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2016 update on diagnosis, therapy, and monitoring. Am J Hematol [Internet]. 1 de febrero de 2016 [citado 10 de abril de 2018];91(2):252-65. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ajh.24275>
 21. Granatowicz A, Piatek CI, Moschiano E, El-Hemaidi I, Armitage JD, Akhtari M. An Overview and Update of Chronic Myeloid Leukemia for Primary Care Physicians. Korean J Fam Med [Internet]. 1 de septiembre de 2015 [citado 12 de abril de 2018];36(5):197-202. Disponible en: <https://doi.org/10.4082/kjfm.2015.36.5.197>
 22. Alvarado-Ibarra M, Cardiel-Silva M, García-Camacho A, González-González L, Hernández-Ruiz E, Leyto-Cruz F, et al. Consenso de leucemia mieloide crónica por hematólogos del ISSSTE. Rev Hematol [Internet]. 15 de abril de
-



- 2016 [citado 10 de abril de 2018];17(1):34-62. Disponible en:
<http://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=65004>
23. C.V D Desarrollo de Medios, SA de. La Jornada: Afecta leucemia mieloide crónica a 5 mil 200 adultos en México [Internet]. La Jornada. 2014 [citado 10 de abril de 2018]. Disponible en:
<http://www.jornada.unam.mx/2014/09/23/sociedad/038n1soc>
24. Fallas MG. Leucemia Mieloide Crónica (Ph+): diagnóstico y tratamiento. Rev Médica Univ Costa Rica [Internet]. 2013 [citado 14 de septiembre de 2017];7(1):38-44. Disponible en:
<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/medica/article/view/10007>
25. Cañizalez JZ, Rojas de Atencio A, Urdaneta K, Atencio Rojas R, González R, Soto M, et al. Transcritos del gen BCR-ABL, en pacientes con leucemia Mieloide cronica en venezuela. Saber [Internet]. septiembre de 2015 [citado 14 de septiembre de 2017];27(3):422-9. Disponible en:
http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S131501622015000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es
26. Amaru Calzada A, Masias J, Ustarez E, Choque G, Peñaloza R, Mansilla S, et al. Frecuencia de transcritos BCR/ABL p210 en 272 pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) en Bolivia. Rev Médica Paz. 2016;22(1):13-9.
27. Lakhota M, Pahadiya HR, Prajapati GR, Choudhary A, Gandhi R. Spontaneous Soft Tissue Haematomas- A Rare Presentation of Chronic Myeloid Leukemic (CML). J Clin Diagn Res JCDR. julio de 2015;9(7):OD03-5.
28. Paz-y-Miño C, Eugenia Sánchez M, Araujo S, Ocampo L, Hugo Espín V, E. Leone P. Cytogenetic and Molecular Characterization of Hematological



- Neoplasm in an Ecuadorian Population. *Open J Blood Dis.* 2013;03(04):108-15.
29. González J. "Calidad de vida y cuidados paliativos de pacientes con diagnóstico de leucemia que acuden al hospital de SOLCA-Loja". :88. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec:9001/jspui/bitstream/123456789/16315/1/CALIDAD%20DE%20VIDA%20Y%20CUIDADOS%20PALIATIVOS%20DE%20PACIENTES%20CON%20DIAGNOSTICO%20DE%20LEUCEMIA%20QUE%20ACUDEN%20AL%20HOSPITAL%20DE%20SOLCA-LOJA.pdf>
30. Buñay M, Córdova D, Peñaloza J. Frecuencia de leucemias y linfomas diagnosticados en el hospital de la sociedad de lucha contra el cáncer (SOLCA), de la ciudad de Cuenca durante el período 1996 a 2005. :83. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/3473/1/ME101.pdf>
31. Quesada Dorta M, Pantaleón Florido G, Bello Álvarez D, Casanueva Calero K, Carnot Uría J. Resultados citogenéticos en pacientes con leucemia mieloide crónica. *Rev Cuba Med [Internet]*. diciembre de 2011 [citado 12 de septiembre de 2017];50(4):341-7. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0034-75232011000400002&lng=es&nrm=iso&tlng=es
32. Mir R, Ahmad I, Javid J, Zuberi M, Yadav P, Shazia R, et al. Simple multiplex RT-PCR for identifying common fusion BCR-ABL transcript types and evaluation of molecular response of the a2b2 and a2b3 transcripts to Imatinib resistance in north Indian chronic myeloid leukemia patients. *Indian J Cancer [Internet]*. 7 de enero de 2015 [citado 28 de octubre de 2017];52(3):314. Disponible en:



<http://www.indianjcancer.com/article.asp?issn=0019509X;year=2015;volume=52;issue=3;spage=314;epage=318;aulast=Mir;type=0>

33. Reference GH. BCR gene [Internet]. Genetics Home Reference. [citado 28 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/BCR>
34. Barcella M. Mapping BCR/-ABL 1 fusion points in chronic myeloid leukemia by next generation sequencing. 4 de febrero de 2014 [citado 28 de mayo de 2018]; Disponible en: <https://air.unimi.it/handle/2434/231153#.WwxV0UgvzIU>
35. Reference GH. ABL1 gene [Internet]. Genetics Home Reference. [citado 28 de octubre de 2017]. Disponible en: <https://ghr.nlm.nih.gov/gene/ABL1>
36. Morales O. Determinación de la frecuencia de los transcritos de fusión de BCR-ABL (e1a2,b2a2 y b3a2) por RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) y leucemia linfoblástica aguda tipo B (LLA-B). 2012.
37. Puerta JMP. Estudio clínico de la leucemia mieloide crónica filadelfia positiva del adulto en Andalucía. Aportación del registro andaluz a la mejora de la calidad asistencial de los pacientes con leucemia mieloide crónica [Internet] [<http://purl.org/dc/dcmitype/Text>]. Universidad de Granada; 2017 [citado 10 de abril de 2018]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=122329>
38. Puente A, Greace K, Sandoval Polanco C, Nitu M, Prades S, María A. Revisión de la relación existente entre la exposición ocupacional al formaldehído y leucemia. Med Segur Trab [Internet]. marzo de 2013 [citado 10 de abril de 2018];59(230):112-23. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0465-546X2013000100008&lng=es&nrm=iso&tlng=es



39. Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, et al. Carcinogenicity of benzene. *Lancet Oncol* [Internet]. 1 de diciembre de 2017 [citado 12 de abril de 2018];18(12):1574-5. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S147020451730832X>
40. Santoyo-Sánchez A, Ramos-Peñafiel CO, Saavedra-González A, González-Almanza L, Martínez-Tovar A, Olarte-Carrillo I, et al. Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia en dos centros de referencia del Valle de México. *Gac Médica México*. :5.
41. Duarte S, Pereira SC, Rodrigues É, Pereira A, Duarte S, Pereira SC, et al. Concomitant chronic myeloid leukemia and monoclonal B cell lymphocytosis - a very rare condition. *Rev Bras Hematol E Hemoter* [Internet]. junio de 2017 [citado 12 de abril de 2018];39(2):167-9. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S151684842017000200167&lng=en&nrm=iso&tlng=en
42. Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. *Metabolism* [Internet]. marzo de 2015 [citado 12 de abril de 2018];64(3 Suppl 1):S16-21. Disponible en: <http://europepmc.org/abstract/med/25468140>
43. Amo A. Relación de anomalías cariotípicas encontradas en 686 sujetos posibles poseedores de anomalías cromosómicas. *Rev Med Univ Navarra* [Internet]. Disponible en: <https://www.unav.edu/publicaciones/revistas/index.php/revistamedicina/artic le/view/6661>
44. Khan MH, Rabbani MG, Charaborty SK, Biswas RSR. Mosaic Down Syndrome with Chronic Myeloid Leukemia: A Case Report. *Bangladesh J Anat*



- [Internet]. 12 de junio de 2013 [citado 12 de abril de 2018];9(2):119-21.
Disponible en: <https://www.banglajol.info/index.php/BJA/article/view/15285>
45. Miranda-Filho A, Piñeros M, Ferlay J, Soerjomataram I, Monnereau A, Bray F. Epidemiological patterns of leukaemia in 184 countries: a population-based study. *Lancet Haematol* [Internet]. 1 de enero de 2018 [citado 12 de abril de 2018];5(1):e14-24. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352302617302326>
46. Qin L, Deng H-Y, Chen S-J, Wei W. Relationship between cigarette smoking and risk of chronic myeloid leukaemia: a meta-analysis of epidemiological studies. *Hematol Amst Neth*. mayo de 2017;22(4):193-200.
47. Hill AW, Perry MJ, Levine PH. Agricultural practices and age of chronic myeloid leukemia diagnosis in India. *Clin Epidemiol Glob Health* [Internet]. 31 de enero de 2018 [citado 11 de abril de 2018]; Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213398418300253>
48. Zelada J, Cantó G, Berkovits A, Diocares G, López A. Déficit adquirido de factor X en leucemia mielomonocítica crónica: reporte de un caso. *Rev Médica Chile*. noviembre de 2015;143(11):1490-3.
49. Rodríguez L, Julexis V, García Rodríguez M, Martínez G, Iris A, Díaz González G, et al. Enfermedad periodontal inflamatoria asociada a la leucemia mieloide crónica. Presentación de un caso. *Gac Médica Espirituana*. diciembre de 2015;17(3):174-80.
50. Velásquez J, Fonseca, Jacal M, Hernández M, Martínez D, Guerrero S, et al. Diagnóstico citogenético y seguimiento molecular en la leucemia mieloide crónica. *Rev Espec Méd-Quirúrgicas* [Internet]. 2013 [citado 12 de septiembre



de 2017];18(3):253-9. Disponible en: <http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumen.cgi?IDARTICULO=46120>

51. Mendoza S, Elena S. Detección molecular y cuantificación del transcrito BCR-ABL1 en pacientes paraguayos con leucemia mieloide crónica [Internet]. Universidad Nacional de Asunción. Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud; 2013 [citado 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IscScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=Ink&exprSearch=681481&indexSearch=ID>
52. Historia de la Reacción En Cadena de Polimerasa (PCR) [Internet]. News-Medical.net. 2016 [citado 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: [https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-Polymerase-Chain-Reaction-\(PCR\)-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/History-of-Polymerase-Chain-Reaction-(PCR)-(Spanish).aspx)
53. Dr. Kary Banks Mullis [Internet]. [citado 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://www.karymullis.com/pcr.shtml>
54. Cruz Alemán SA, Larios Roque AB, Caldera Suazo UJ. Estandarización de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendidos en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo febrero-octubre 2015. [Internet] [other]. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua; 2016 [citado 13 de septiembre de 2017]. Disponible en: <http://repositorio.unan.edu.ni/2443/>
55. Luigi T, Rojas L, Valbuena O. Reacción en cadena de la polimerasa para la identificación de Salmonella spp. usando el gen invA. Salus [Internet]. diciembre de 2015 [citado 14 de septiembre de 2017];19(3):41-6. Disponible en:



http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S13171382015000300008&lng=es&nrm=iso&tlng=es

56. Garrote Santana H, Lavaut-Sánchez K, Vigil A, María A, Díaz Alonso C, Fernández Martínez L, et al. Cinco décadas de la biología molecular y la citogenética aplicadas a la hematología cubana. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. marzo de 2017 [citado 28 de octubre de 2017];33(1):1-8. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S086402892017000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
57. Chen J, Zhou D-H, Nisbet AJ, Xu M-J, Huang S-Y, Li M-W, et al. Advances in molecular identification, taxonomy, genetic variation and diagnosis of *Toxocara* spp. *Infect Genet Evol* [Internet]. 1 de octubre de 2012 [citado 29 de mayo de 2018];12(7):1344-8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567134812001657>
58. Steegmann JL, Gómez Casares MT, Pérez Encinas MM, Grupo Español de Leucemia Mieloide Crónica, Asociación Española de Hematología y Hemoterapia. Manual para el control y el tratamiento de los pacientes con leucemia mieloide crónica [Internet]. Badalona, Barcelona: Euromedice; 2014. Disponible en: www.euromedice.net
59. Ozemri Sag S, Yakut T, Gorukmez O, Gorukmez O, Ture M, Karkucak M, et al. Qualitative and quantitative evaluation of the BCR-ABL fusion gene in chronic myelogenous leukemia by fluorescence in situ hybridization and molecular genetic methods. *Genet Test Mol Biomark*. octubre de 2015;19(10):584-8.
60. Larripa I, Ruiz MS, Gutiérrez M, Bianchini M. Recomendaciones metodológicas para el monitoreo molecular BCR-ABL1 en pacientes con



- leucemia mieloide crónica por pcr cuantitativa en tiempo real. Med B Aires [Internet]. febrero de 2017 [citado 29 de octubre de 2017];77(1):61-72. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S002576802017000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
61. Cañas RA, Pascual MB, Torre F de la. Una asignatura pendiente: la normalización de la RT-qPCR. Encuentros En Biol [Internet]. 2017 [citado 29 de octubre de 2017];10(162):212-4. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5998668>
62. Bonilla A, Alberto C, Torres JD, Muskus CE, Ramírez Gaviria G, Cuervo Sierra J, et al. Detection of p190BCR-ABL AND p210BCR-ABL fusion transcripts in patients with chronic myeloid leukemia (CML) using qualitative RT-PCR. Iatreia. 2014;27(4):398–409.
63. Rodríguez-Santiago B, Armengol L. Tecnologías de secuenciación de nueva generación en diagnóstico genético pre- y postnatal. Diagnóstico Prenat [Internet]. [citado 30 de octubre de 2017];56-66. Disponible en: <http://www.elsevier.es/es-revista-diagnosticoprenatal-327-articulotecnologiassecuenciacionnuevageneraciondiagnostico-S2173412712000273>
64. Alikian M, Ellery P, Forbes M, Gerrard G, Kasperaviciute D, Sosinsky A, et al. Next-Generation Sequencing-Assisted DNA-Based Digital PCR for a Personalized Approach to the Detection and Quantification of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia Patients. J Mol Diagn [Internet]. 1 de marzo de 2016 [citado 30 de octubre de 2017];18(2):176-89. Disponible en: [http://jmd.amjpathol.org/article/S1525-1578\(15\)00265-2/fulltext](http://jmd.amjpathol.org/article/S1525-1578(15)00265-2/fulltext)



65. Machova Polakova K, Kulvait V, Benesova A, Linhartova J, Klamova H, Jaruskova M, et al. Next-generation deep sequencing improves detection of BCR-ABL1 kinase domain mutations emerging under tyrosine kinase inhibitor treatment of chronic myeloid leukemia patients in chronic phase. *J Cancer Res Clin Oncol*. mayo de 2015;141(5):887-99.
66. Lyu X, Yang J, Wang X, Hu J, Liu B, Zhao Y, et al. A novel BCR-ABL1 fusion gene identified by next-generation sequencing in chronic myeloid leukemia. *Mol Cytogenet* [Internet]. 27 de junio de 2016 [citado 28 de octubre de 2017];9:47. Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s13039-016-0257-5>
67. Parra DEB, Guerrero ET, Coutiño GM, Sarmiento ASA, Guzmán RA, Castro RH. Reacción en cadena de la polimerasa (pcr) y sus aplicaciones en dermatología. *Dermatol Cosmética Médica Quirúrgica*. 2015;13(3):214–219.
68. Díaz-Alonso C, Garrote-Santana H, Amor-Vigil AM, Suárez-González Y, González-Mugica Romero R. Cuantificación de ácido ribonucleico para la realización de la técnica de RT- PCR. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter*. septiembre de 2013;29(3):298-303.
69. Perea Durán G. Factores pronósticos en leucemia mieloide aguda: utilidad de los estudios inmunofenotípicos y moleculares [Internet]. *Universitat Autònoma de Barcelona*; 2011 [citado 26 de julio de 2016]. Disponible en: <http://www.tdx.cat/handle/10803/51435>
70. Herráez Á, Sánchez ÁH. *Biología Molecular e Ingeniería Genética*. Elsevier Health Sciences; 2012. 207-208 p.
71. J. Farfán BM. *Biología molecular aplicada al diagnóstico clínico*. *Rev Médica Clínica Las Condes* [Internet]. 1 de noviembre de 2015 [citado 29 de octubre



- de 2017];26(6):788-93. Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0716864015001546>
72. Ramírez IH, Caicedo JAG. Diagnostico de leucemia mediante bcr/abl. *Memorias*. 2011;9(15):9–16.
73. Michele Bianchini, Irene Larripa. BCR-ABL1 transcripts quantification and molecular response evaluation in chronic myeloid leukemia. 2014 [Internet]. 18(2):154-8. Disponible en:
http://www.sah.org.ar/revista/resumen_ingles.asp?id=651
74. Alonso CD, Santana HG, Vigil AMA, González YS, Martínez LF, Moleón VR. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 1 de julio de 2015 [citado 29 de octubre de 2017];31(4). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/349>
75. Pineda JFS, Corona FO, Rojas ET. Evaluación de diferentes métodos de extracción de ARN a partir del hongo nativo *Xylaria* sp. *Rev Colomb Biotecnol*. 2017;19(1):42–52.
76. Martínez LF. Consideraciones sobre la fase preanalítica en los estudios moleculares de las hemopatías malignas. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. 6 de enero de 2017 [citado 29 de octubre de 2017];33(2). Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/487>
77. Cross NCP, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. *Leukemia* [Internet]. mayo de 2015 [citado 29 de octubre de 2017];29(5):999-1003. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4430701/>



78. Lourdes Pérez-Chabela M, Soriano-Santos J, Ponce-Alquicira E, Díaz-Tenorio LM. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS como herramienta en el estudio de las proteínas miofibrilares. Una revisión. Polyacrylamide gel electrophoresis-SDS as a tool to study myofibrillar proteins. A review.
 79. Cañizález JZ, Rojas de Atencio A, Urdaneta K, Atencio Rojas R, González R, Soto M, et al. Transcritos del gen BCR-ABL, en pacientes con leucemia mieloide crónica en Venezuela. SABER Rev Multidiscip Cons Investig Univ Oriente [Internet]. 2015 [citado 30 de octubre de 2017];27(3). Disponible en: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=427743080008>
 80. Cruz Alemán SA, Larios Roque AB, Caldera Suazo UJ. Estandarización de la PCR punto final, para la detección de la mutación JAK2 V617F en pacientes con diagnóstico clínico de Síndromes Mieloproliferativos Crónicos, atendidos en los servicios de hematología de los hospitales de referencia nacional en el periodo febrero-octubre 2015. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua; 2016.
 81. Dongen J van, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Leukemia [Internet]. diciembre de 1999 [citado 29 de mayo de 2018];13(12):1901-28. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/2401592>
 82. Kuan JW. The epidemiology of chronic myeloid leukaemia in southern Sarawak, Borneo Island. 2018;73(2):8.
 83. Osorio S, Casado LF, Giraldo P, Maestro B, Andrade M, Redondo S, et al. Leucemia mieloide crónica en España: sus características de presentación han cambiado. Sección española del registro poblacional EUTOS. Rev Clínica Esp [Internet]. 1 de agosto de 2016 [citado 28 de mayo de 2018];216(6):293-300.
-



Disponible en:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014256516000515>

84. María DCA. Frecuencia de los transcritos BCR-ABL en pacientes cubanos con leucemia mieloide crónica. :7.
85. Al-Achkar W, Moassass F, Youssef N, Wafa A. Correlation of p210 BCR-ABL transcript variants with clinical, parameters and disease outcome in 45 chronic myeloid leukemia patients. :6.
86. Ov N, Anatolievich TG, Too R, YUa Ya, ASD, E.R., et al. La táctica de detectar tipos frecuentes y raros de transcripción BCR-ABL quimérica en leucemia mieloide crónica. [Internet]. 2015 [citado 28 de mayo de 2018];8(2). Disponible en: <https://cyberleninka.ru/article/n/taktika-vyyavleniya-chastyh-i-redkih-tipov-himernogo-transkripta-bcr-abl-pri-hronicheskom-mieloidnom-leykoze>
87. Navarro LM, Trufelli DC, Bonito DR, Del Giglio A, Bollmann PW, Navarro LM, et al. Application of prognostic score IPSET-thrombosis in patients with essential thrombocythemia of a Brazilian public service. Rev Assoc Médica Bras [Internet]. octubre de 2016 [citado 18 de septiembre de 2017];62(7):647-51. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0104-42302016000700647&lng=en&nrm=iso&tlng=en
88. Ayatollahi H, Keramati MR, shirdel A, Kooshyar MM, Raiszadeh M, Shakeri S, et al. BCR-ABL fusion genes and laboratory findings in patients with chronic myeloid leukemia in northeast Iran. Casp J Intern Med [Internet]. 2018 [citado 28 de mayo de 2018];9(1):65-70. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5771363/>



89. Dikshit RP, Nagrani R, Yeole B, Koyande S, Banawali S. Changing trends of chronic myeloid leukemia in greater Mumbai, India over a period of 30 years. *Indian J Med Paediatr Oncol Off J Indian Soc Med Paediatr Oncol* [Internet]. 2011 [citado 28 de agosto de 2018];32(2):96-100. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237188/>
90. Avila-Cabrera OM, Expósito-Delgado YC, González-Pinedo L, Espinosa-Estrada E, Hernández-Padrón C, Ramón-Rodríguez LG, et al. Aspectos diagnósticos, evolutivos y terapéuticos de la leucemia mieloide crónica. *Rev Cuba Hematol Inmunol Hemoter* [Internet]. marzo de 2014 [citado 10 de abril de 2018];30(1):47-58. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S086402892014000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es



10. ANEXOS

ANEXO 1

Operacionalización de variables.

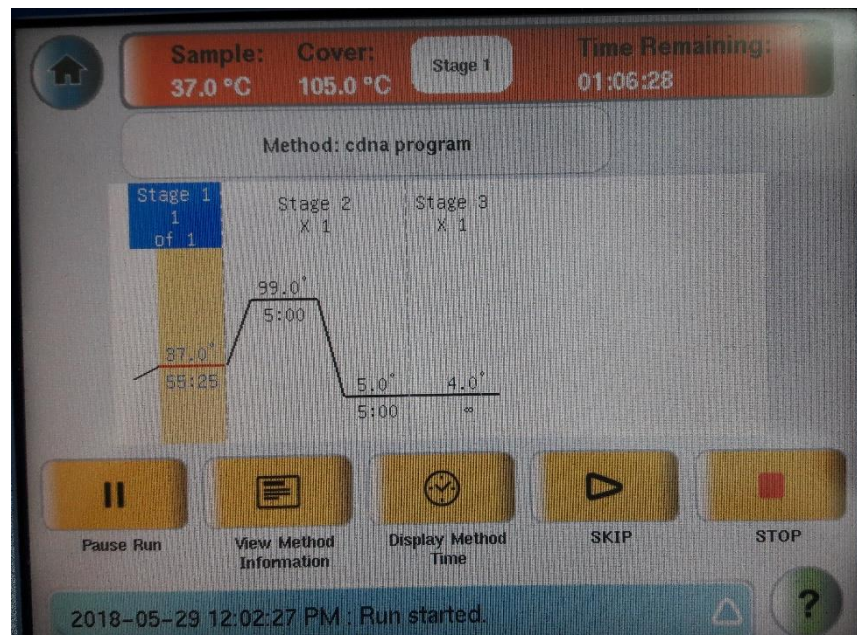
VARIABLE	DEFINICION	DIMENSION	INDICADOR	ESCALA
Género	Condición orgánica que distingue a las personas en hombres y mujeres.	Fenotipo	Masculino Femenino	Cualitativa Dicotómica Masculino y Femenino.
Edad	Tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo.	Años cumplidos.	Cédula.	Cualitativa Continua con intervalos de 10 años con una edad mínima de 18 años y una edad máxima de 75 años.
Procedencia.	Lugar donde la persona recibe el primer diagnóstico.	Ubicación Geográfica	Historia Clínica.	Cualitativa Nominal. Provincia.
GEN BCR-ABL P 210	Producto de la translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22 generando tres tipos de proteínas de diferente peso molecular, la proteína P210 se relaciona	Isoformas	Pares de bases.	Positivo. Negativo.



	con la LMC.			
--	-------------	--	--	--

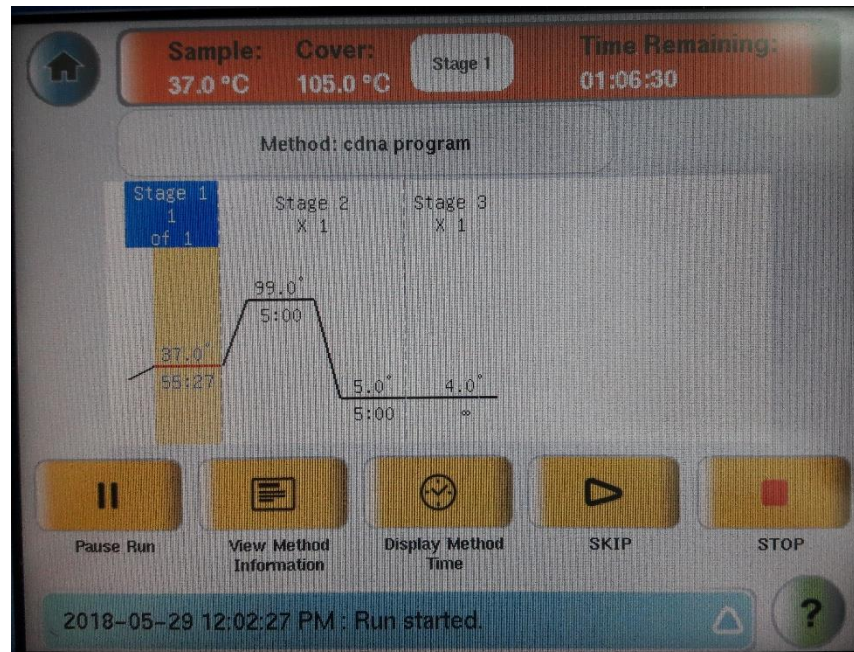
ANEXO 2

Ciclos del Termociclador en la obtención del cDNA.



ANEXO 3

Ciclos de Termociclador en la amplificación de productos de la primera PCR y la NESTED.





ANEXO 4
Oficio para autorización.

Cuenca, noviembre 28 del 2017.

Dr.

Manuel Alfredo Campoverde Cisneros.

Gerente del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad BIONCOGEN.

Presente. -

Asunto: Solicitud de autorización para tomar la base de datos de los pacientes del laboratorio y elaboración de tesis A3 (pregrado).

Yo, Mauro Javier Arcentales Cayamcela, con cédula N° 0302100110, alumno egresado de la Universidad de Cuenca, de la Carrera de Laboratorio Clínico, solicito a Ud. Me brinde la autorización respectiva para la elaboración de un proyecto de tesis de pregrado previo a la obtención del título de Licenciado en Laboratorio Clínico el mismo que lleva por nombre: **REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CUENCA 2017.**

Razón por la cual esperamos nos brinde su autorización.

Atentamente.

Mauro Javier Arcentales Cayamcela.

CI: 0302100110



ANEXO 5

Oficio de autorización aprobado.



Cuenca, 19 de Diciembre de 2017

Yo, Dr. Manuel Alfredo Campoverde Cisneros, Gerente del Laboratorio de Diagnóstico Molecular de Alta Especialidad Bioncogen, AUTORIZO la realización del tema de Tesis en mi laboratorio titulado ***“REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CUENCA 2018”***, planteado por el alumno Mauro Javier Arcentales Cayamcela, con número de cédula 0302100110, previo a la obtención de su título de LICENCIADO EN LABORATORIO CLÍNICO en la Universidad de Cuenca.

Es importante señalar que esta actividad no conlleva ningún gasto para el Laboratorio y que se tomarán las medidas necesarias para no interferir con el normal funcionamiento de las actividades propias del mismo.

Se acuerda también, facilitar la información tanto de protocolos como la base de datos de pacientes atendidos en el laboratorio con este diagnóstico.

Los resultados obtenidos en esta investigación serán proporcionados al Laboratorio como material bibliográfico.


.....
FIRMA DE ACEPTACIÓN
C.I. 010212215



ANEXO 6

Formulario de registro de pacientes.

UNIVERSIDAD DE CUENCA.

FORMULARIO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

**REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA TRANSCRIPTASA INVERSA
PARA DIAGNÓSTICO DE LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA CUENCA 2013-
2017.**

FORMULARIO #.....

FECHA:.....

CODIGO DEL PACIENTE.....

EDAD:.....AÑOS

FECHA DEL ANALISIS MOLECULAR.....

GENERO:

MASCULINO ()

FEMENINO ()

PROCEDENCIA:

GUAYAQUIL. ()

CUENCA. ()

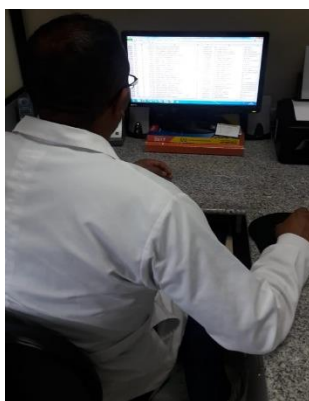
RESULTADO DEL ANALISIS MOLECULAR:

POSITIVO. ()

NEGATIVO. ()

ANEXO 7

Evidencia Fotográfica.



Búsqueda, tabulación y verificación de información de los pacientes.



of this method in 1991. As it has been recently demonstrated the patients by using BMF [1]. In these 111 patients, the recognition of RT-PCR products after BMF was significantly associated with the occurrence of a hematologic relapse. Moreover, the possibility of identifying patients at high risk of relapse will eventually allow testing of the efficacy of new therapeutic strategies aiming at the decrease of post-transplant relapse rates, such as adjuvant immunotherapy, antibody-based therapies, or interferon.

Results of PCR primer design and testing

Table 10 shows the position and sequence of each primer relative to the first exon of the BCR gene (a1) and the third exon of ABL gene (a3). The choice of reverse primers located on ABL exon 3 rather than on ABL exon 2, is based on the finding that in sporadic cases the BCR-ABL junction taking place between the BCR exon 1 and ABL exon 3 (also called exon a3) as a consequence of a translocation in ABL exon 2, resulting in the case of a3 junction (Figure 10).

Primers BCR-a1-A and primer ABL-a3-B were used in a first round of PCR using the standardized RT-PCR protocol. The sensitivity reached at this stage was 10⁻⁵. When a second round of amplification (nested PCR) was performed using the internal primers BCR-a1-C and ABL-a3-D, a reproducible sensitivity level of 10^{-7/10⁻⁸} was obtained (Table 11). The C and D primers used in a first round of RT-PCR showed a sensitivity of 10^{-7/10⁻⁸}. Finally, the nested RT-PCR employing ABL-a3-E as reverse primer in comparison with BCR-a1-C as forward primer, showed a sensitivity of 10^{-7/10⁻⁸}.

In all the reactions, after the first round of RT-PCR, the amplified products visualized on ethidiumbromide stained agarose gels showed only single bands of the expected molecular size (Figure 9 and Table 11). However, when testing patients expressing both p190 and p210 types of BCR-ABL transcripts, a very high molecular weight band (approximately 1000 bp) can be observed. This band corresponds to the amplification of the entire cDNA sequences included between the BCR exon 1 and ABL exon 3 in the c(11) types of transcripts. Finally, a band of approximately 500 bp can be observed on the gel after the nested RT-PCR reactions, representing the amplified product derived from the first round of RT-PCR (521 bp).

SECTION 5. t(9;22)(q34;q11) with the BCR-ABL p210 fusion gene

M. González Ojeda¹, A. Wernke², R. García-Sanz¹, Y. Torroni¹, M.C. Chillón¹ and J.A. Cabrer¹
¹Department of Hematology, Hospital Clínico Universitario, Salamanca, Spain, and ²Department of Hematology, Institut Paoli Calmettes, Marseille, France.

Background

The molecular consequence of t(9;22)(q34;q11) is the formation of two hybrid genes: BCR-ABL on the Ph chromosome and ABL-BCR on 9q³⁴[2,3]. The BCR-ABL fusion gene encodes a protein with elevated tyrosine kinase activity which seems to exert its effects by interfering with cellular signal transduction.

Table 10: Sites of PCR primers and log sensitivities of BCR-ABL genes in RT-PCR testing.

A → B	C → D	A → B + C → D	C → E2
521	381	381	445
347	207	207	271

Table 11: Sensitivity of RT-PCR testing.

Round	A → B	C → D	A → B + C → D	C → E2
1st	-3	-3	-4	-2
2nd	-3	-3	-4	-2
3rd	-4	-5	-3	-

PCR product is generally caused by a break.

Revisión bibliográfica de los protocolos de trabajo.



Observación de los primers utilizados en esta investigación.



Verificación del equipo y programas utilizados en el análisis del gen de estudio.