

## 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)

Morales, O<sup>1</sup>., Carranza, C<sup>2</sup> y Saravia, P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos de Guatemala

<sup>2</sup>Instituto de Investigación y Educación para las Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM)

### Resumen

El objetivo principal de este estudio fue determinar la frecuencia de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa (RT-PCR) en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LMC y LLA-B para ayudar a la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca. La relación entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia asociada a sus características demográficas establece una relación significativa en base al grupo etario el cual presenta una tendencia poblacional que muestra dos picos de incidencia, los cuales corresponden al rango de 30-40 años en la expresión de *b2a2* o *b3a2* en pacientes con LMC y al de 5-10 años en la expresión de *e1a2* en pacientes con LLA-B ( $P=0.022$ ). La relación entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y las características clínicas demuestra una diferencia significativa respecto a la distribución del recuento plaquetario según el tipo de transcrito patológico expresado ( $P=0.012$ ). La expresión del transcrito *e1a2* se encuentra relacionada a una actividad trombopoyética apreciablemente menor, mientras que el incremento del recuento plaquetario corresponde a la detección del transcrito *b2a2*.

Estudios efectuados en diferentes regiones geográficas establecen diferencias significativas entre la frecuencia de expresión de los reordenamientos del gen quimérico *BCR-ABL*. En el presente estudio se determinó que la frecuencia de expresión de los distintos transcritos quiméricos del gen *BCR-ABL* en 35 muestras de médula ósea procedentes de pacientes guatemaltecos con LMC y LLA-B corresponde a una baja frecuencia para el transcrito *e1a2* (11%) con respecto a la frecuencia de los transcritos *b2a2* (43%) y *b3a2* (43%) y con una frecuencia de coexpresión del 3% representada por los transcritos *b2a2/b3a2*. Pudo identificarse la predominancia del transcrito *e1a2* en pacientes con LLA-B y de los transcritos *b2a2* y *b3a2*, así como su coexpresión (*b2a2/b3a2*) en pacientes con LMC, sin embargo no se encontraron diferencias significativas en la frecuencia de expresión del transcrito *b2a2* comparado con *b3a2* ( $p=0.369$ ). Se encontró que los hallazgos obtenidos de estudios efectuados en diferentes regiones geográficas del mundo en pacientes con LLA-B coinciden con la frecuencia reportada en la población leucémica guatemalteca con esta patología detectándose en el 100% de pacientes con LLA-B la expresión del transcrito patológico *e1a2*. Se puede concluir que la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* entre la población guatemalteca con LMC concuerda con la reportada en estudios efectuados en países latinoamericanos, donde la población pertenece a un grupo mayoritariamente mestizo y es inversa a la reportada en países occidentales y orientales en donde existe predominio de poblaciones caucásicas y asiáticas, debido a que en dichos estudios se reporta frecuentemente una diferencia significativa entre la frecuencia de expresión de *b2a2* (30-40%) comparado con la expresión de *b3a2* (50-60%). Esto sugiere que la población leucémica guatemalteca que expresa los transcritos de fusión del gen quimérico *BCR-ABL* presenta una conducta biológica diferente respecto a la reportada en la población asiática y caucásica producto de la variabilidad genética entre poblaciones como posible explicación para las diferencias observadas en este estudio.

Palabras clave: *BCR-ABL*, RT-PCR, leucemia mieloide crónica y leucemia linfoblástica aguda tipo B.

## Determination of the frequency of the fusion transcripts in bone marrow from patients with chronic myeloid leukemia (CML) and acute lymphoblastic leukemia type B (B-ALL).

### Abstract

At the molecular level translocation  $t(9;22) (q34, q11)$ , known as the Philadelphia chromosome (Ph +), originates chimeric gene *BCR-ABL* coding for the expression of three fusion transcripts corresponding to *b2a2*, *b3a2* and *e1a2*. It has been shown that there is a relationship between the type of transcript pathological and clinical-demographic characteristics of leukemic patients. In Guatemala, there are no data regarding the frequency of *BCR-ABL* transcripts in the diagnosis of leukemia, so now the genetic characterization of leukemic Guatemalan population with this condition has been impossible to make. The main objective of this study was to determine the frequency of fusion transcripts *BCR-ABL* by means of the chain reaction technique of reverse transcription polymerase (RT-PCR) in bone marrow samples from patients with CML and ALL-B to help the genetic characterization of leukemic Guatemalan population. In the present study we determined that the frequency of expression of different transcripts chimeric *BCR-ABL* gene in 35 bone marrow samples from patients with CML and ALL-B corresponds to a low frequency for *e1a2* transcript (11%) with respect to the frequency of the *b2a2* transcript (43%) and *b3a2* (43%) and with a frequency of 3% coexpression represented by *b2a2/b3a2* transcripts. Identified the predominance could *e1a2* transcript in patients with ALL-B and *b2a2* and *b3a2* transcripts and their coexpression (*b2a2/b3a2*) in CML patients, however no significant differences in the frequency of expression of *b2a2* and *b3a2* compared ( $P= 0.369$ ). It was found that the findings of studies conducted in different geographical regions of the world for patients with ALL-B match with the frequency reported in the Guatemalan in leukemic population with this condition detected in 100% of patients with transcript expression pathological *e1a2*. We conclude that the frequency of *BCR-ABL* transcripts between the Guatemalan population CML agrees with that reported in studies conducted in Latin American countries, where the population is mainly mestizo group and is inverse to that reported in Western and Eastern countries where there is predominance of Caucasian and Asian populations, because in such studies frequently reported a significant difference between the expression frequency of *b2a2* (30-40%) compared with *b3a2* expression (50-60%). This suggests that the Guatemalan population expressing leukemic fusion transcripts of chimeric *BCR-ABL* gene has a different biological behavior compared to that reported in Asian and Caucasian population product of genetic variability among populations as a possible explanation for the differences observed in this study.

Key words: *BCR-ABL*, RT-PCR, Chronic myeloid leukemia, type B acute lymphoblastic leukemia.

## Introducción

La aplicación de técnicas de biología molecular en el estudio de neoplasias hematológicas ha permitido conocer mejor la patogénesis de estas enfermedades, favoreciendo el análisis cromosómico de las diversas alteraciones numéricas y estructurales con el fin de identificar marcadores genéticos para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de la enfermedad (Herrera, Calbacho, Heras, Ramos, López, & Odriozola, 2006).

Dentro de las anomalías cromosómicas estructurales de mayor relevancia clínica está el gen quimérico *BCR-ABL*, que es resultado de la translocación  $t(9;22)(q34;q11)$  que da lugar al cromosoma Philadelphia (*Ph+*) y que constituye la primera anomalía cromosómica identificada en leucemia (Novell, & Hungerford, 1960). El gen quimérico *BCR-ABL* es el resultado de una fusión cabeza-cola de los genes *BCR* y *ABL*, cuando parte del gen *ABL* localizado en el cromosoma 9 es transferida e insertada dentro del gen *BCR* del cromosoma 22 (Fialkow, Jacobson, & Papayannopoulou, 1977; Olopade, & Pichert, 2001). Este rearrreglo cromosómico *BCR-ABL* codifica una proteína de fusión que aumenta la actividad de tirosina cinasa, activando múltiples señales de transducción celular que desencadenan un elevado potencial neoplásico y por lo cual es asociado a un pronóstico adverso (Hermans, Heisterkamp, von Lindern, van Baal, Meije et al., 1987). Se presenta en niños y adultos con leucemia linfoblástica aguda del tipo B entre 2 a 5% y 10 a 20%, respectivamente y en más del 95% en pacientes con leucemia mieloide crónica (de Klein, Van Kessel, Grosveld, Bartram, Hagemeijer et al., 1982; Heisterkamp, Stam, Groffen, de Klein, & Grosveld, 1985). Molecularmente es posible distinguir tres transcritos (*b2a2*, *b3a2* y *e1a2*), en donde los puntos de ruptura más frecuentes en el gen *BCR* ocurren en los exones 1(*e1*), 12(*b2*), 13(*b3*) y 19(*e19*) y el punto de ruptura en el gen *ABL* habitualmente se produce en el exón 2(*a2*). Cuando se da la unión de los exones *b3a2* y/o *b2a2* (Región *M-bcr*) se codifica para una proteína de 210kD ( $p210^{BCR-ABL}$ ) la cual se presenta en el 20% a 40% de los pacientes con LLA-B y es característica en más del 95% de pacientes con LMC. Si los exones *e1* y *e2* son removidos por el corte y empalme (Región *m-bcr*) la unión de *e1a2* se transcribe en una proteína de 190kD ( $p190^{BCR-ABL}$ ), la cual se detecta en el 60% a 80% de los pacientes con LLA-B y en menos del 10% para aquellos con LMC. Es posible observar una tercer proteína de fusión próxima a 3' del extremo

distal del gen *BCR* denominada  $p230^{BCR-ABL}$ , la cual resulta de la fusión de los exones *e19a2* (Región  *$\mu$ -bcr*), cuya expresión se encuentra mayormente asociada a leucemias crónicas neutrófilas y trombocitosis (Arana et al., 2002; Jiménez et al., 2008; Pane et al., 1996; Ribera et al., 2006). El tema tratado en esta investigación fué la determinación de la frecuencia de los transcritos de fusión de *BCR-ABL* por RT-PCR en muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LLA-B y LMC con el fin de contribuir a la caracterización genética de la población leucémica guatemalteca. La importancia de este estudio fue establecer la relación existente entre la frecuencia de los transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y el tipo de leucemia asociada a sus características demográficas y recuento plaquetario. Para ello se utilizó la técnica molecular de reacción de la cadena de polimerasa (RT-PCR) de transcripción reversa empleando un PCR anidado en muestras de médula ósea de pacientes con LMC y LLA-B lo que permitió determinar su predominancia o coexistencia en la población leucémica del país. Una de las principales contribuciones del estudio es el establecimiento de la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* entre la población leucémica guatemalteca respecto a las frecuencias reportadas en estudios realizados en diferentes regiones geográficas del mundo. Esto permitió realizar comparaciones con los resultados de estudios similares efectuados en otros países, los cuales reportan diferencias entre la frecuencia de expresión de los reordenamientos de *BCR-ABL* y sus características demográficas.

## Materiales y métodos

Se seleccionaron 35 pacientes originarios de Guatemala con diagnóstico de LMC o LLA-B, *BCR-ABL* positivos, referidos al Instituto de Investigación y Educación para las Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM) de los cuales se obtuvieron 3 cm<sup>3</sup> de sangre medular mediante punción aspirativa en cresta ilíaca posterosuperior o esternón. Las muestras fueron obtenidas previo consentimiento informado del paciente o tutor y se recolectaron con anticoagulante EDTA, separando las células mononucleares mediante centrifugación de gradiente con Ficoll-Paque Premium® (GE Healthcare, Bio Sciences). Las células obtenidas se almacenaron en 1000 ml de amortiguador (RNA later®) a -20° C hasta su utilización. Al concentrado de células mononucleares se le realizó extracción de ARN con

el estuche comercial RNAqueous® 4PCR Kit (Applied Biosystems, Ambion) y para obtener el ADN complementario (cADN) se procedió a realizar el proceso de RT-PCR con el estuche comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystems, Ambion) siguiendo las instrucciones recomendadas. Se efectuó la comprobación de la integridad de la RT-PCR mediante la detección del gen *ABL-1* utilizando el estuche comercial Novagen® y dos secuencias de cebadores (*ABL-F*, 5'TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G3' y *ABL-R*, 5'TTC AGC GGC CAG TAG CAT CTG ACT3') para la detección del producto de interés en 270 pares de bases (pb) (Artigas, Melo, Roa, Páez, Vittini et al., 2002). Una vez obtenido el ARN total y la comprobación de su integridad se procedió a efectuar dos rondas de reacción de PCR para la detección de los transcritos de fusión del gen quimérico *BCR-ABL* empleando simultáneamente un control negativo de la extracción y un control positivo (K562). La primera ronda de reacción consistió en la adición de 2 ul de ARN total a 23 ul de la mezcla de reacción [2.5 ul de amortiguador 10X, 1 ul de la mezcla de dNTP (10 mM), 1 ul de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 ul de Taq Gold (5 U/L), 14.3 ul de agua bidestilada, 1.5 uL del cebador CML-C (5'GAA GTG TTT CAG AAG CTT CTC C3'), 2 ul del cebador CML-D (5'TGA TTA TAG CCT AAG ACC CGG A3') y 0.5 ul del cebador ALL-C (5'ACC ATC GTG GGC GTC CGC AAG A3')]. La PCR fue realizada en un termociclador Mastercycle gradient Eppendorf® por 30 ciclos, a 94° C por 30 segundos, 60° C 1 minuto y 72° C 1 minuto, seguidos de una extensión final de 5 minutos a 72° C. El producto de esta reacción fue reamplificado con cebadores internos agregando 2 ul del producto de reacción de la primera ronda de PCR a 23 uL de la segunda ronda de reacción [2.5 ul de amortiguador 10X, 1.3 ul de la mezcla de dNTP (10 mM), 1.5 ul de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0.2 ul de Taq Gold (5 U/L), 10.7 ul de agua bidestilada, 2.5 uL del cebador CML-A (5'TGG AGC TGC AGA TGC TGA CCA ACT CG3'), 3.3 ul del cebador CML-B (5'ATC TCC ACT GGC CAC AAA ATC ATA CA3') y 0.85 ul del cebador ALL-A (5'AGA TCT GGC CCA ACG ATG GCG AGG GC3')]. La amplificación fue llevada a cabo por 30 ciclos, a 94° C por 30 segundos, 55° C 1 minuto y 72° C 1 minuto, seguidos de una extensión final de 7 minutos a 72° C. Los productos de reacción obtenidos fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio observándose el transcrito *b3a2* (p210) en 304 pb,

el transcrito *b2a2* (p210) en 234 pb y el transcrito *e1a2* (p190) en 196 pb (Edmans, Kirk, Lee, & Radich, 1994; Lee, Kirk, Edmans, & Radich, 1995; Cerveira, Ferreira, Dória, Veiga, Ferreira et al., 2000). El análisis estadístico se realizó empleando pruebas no paramétricas. Todas las variables clínico demográficas del estudio se clasificaron en variables cualitativas y cuantitativas. Al término de la fase de captura de datos, los mismos fueron ingresados y analizados por el software de gestión estadística *SPSS versión 14.0* (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) para su análisis bajo un enfoque simple univariado para las cuales se determinó la frecuencia, porcentajes y cruce de variables de interés (género, procedencia, grupo etario, recuento plaquetario, leucocitario y hemoglobina) haciendo uso de tablas de contingencia en base al tipo de leucemia y tipo de transcrito patológico expresado. Se determinó la relación entre variables de interés empleando la prueba no paramétrica de *Kruskall Wallis* y se efectuaron comparaciones pareadas con la prueba de *Mann Whitney* para establecer la significancia estadística entre ambas. Resultados con un  $P < 0.05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## Resultados

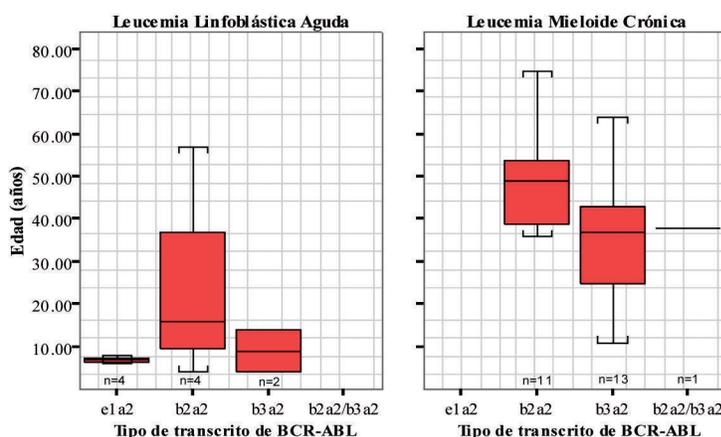
Los resultados muestran que la frecuencia de los transcritos de fusión del gen quimérico *BCR-ABL* obtenida en 35 muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LMC y LLA-B presentan una baja frecuencia para el transcrito *e1a2* (11%) con respecto a la frecuencia de los transcritos *b2a2* (43%) y *b3a2* (43%) y con una frecuencia de coexpresión del 3% representada por los transcritos *b2a2/b3a2*. La relación LMC/LLA fue de 2.5:1 (25 pacientes con LMC y 10 con LLA-B) respecto a la expresión del gen quimérico *BCR-ABL*. En cuanto al tipo de leucemia se encontró predominio del transcrito de fusión *e1a2* en muestras con LLA-B contrario a las muestras con LMC las cuales presentan mayor heterogeneidad expresándose con mayor frecuencia los transcritos *b2a2* (31%) y *b3a2* (37.3%).

Tabla 1. Frecuencia de los transcritos de fusión del gen quimérico BCR-ABL en base al género en pacientes con LLA y LMC por RT-PCR

Parámetro	LLA		LMC		Total de Casos
	<i>n</i> * (M/F)	M/F %	<i>n</i> * (M/F)	M/F %	
<b>Tipo de Transcrito</b>					<b><i>n</i>* (%)</b>
<i>e1a2</i>	4 (2/2)	5.5/5.5	0 (0/0)	0/0	4 (11%)
<i>b2a2</i>	4 (4/0)	12/0	11 (5/6)	14/17	15 (43%)
<i>b3a2</i>	2 (1/1)	2.9/2.9	13(10/3)	28.7/8.6	15 (43%)
<i>b2a2/b3a2</i>	0 (0/0)	0/0	1 (1/0)	3/0	1 (3%)
<b>Total</b>	10 (7/3)	20.4/8.4	25(16/9)	45.7/25.6	35 (100%)

\*=Numero de Casos, M= Masculino, F = Femenino

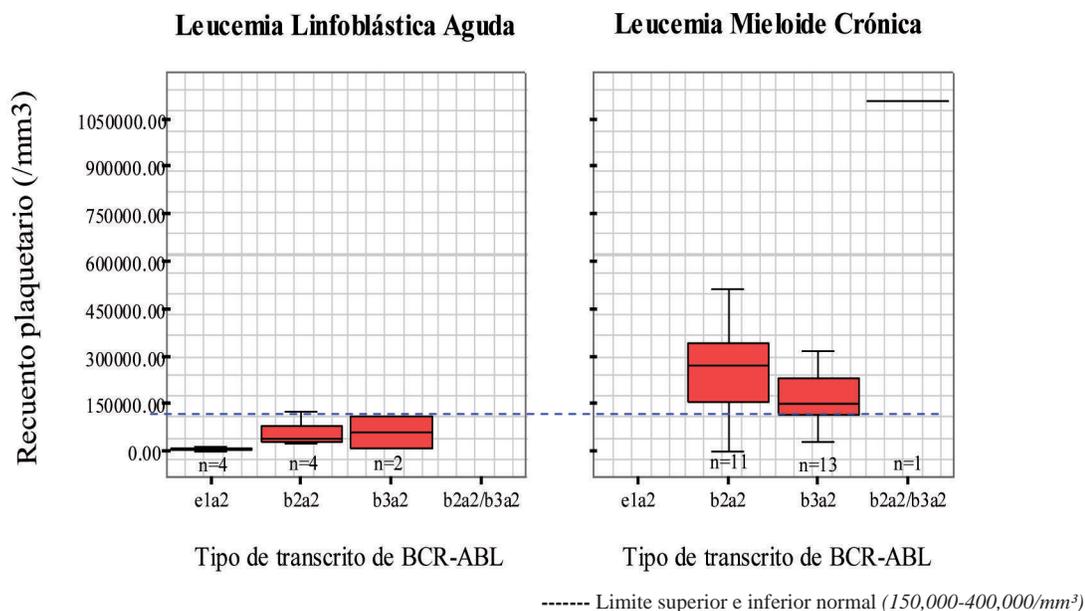
La distribución de la frecuencia en base al género demuestra una relación masculino/femenino de 1.9:1 (23 hombres y 12 mujeres), observándose predominancia del género masculino respecto al femenino en la expresión del gen quimérico *BCR-ABL*. No se observó diferencia significativa en la expresión del tipo de transcrito respecto a la variable de género ( $P=0.612$ ) (Cuadro 1 y 2). El promedio de edad es de  $14\pm 15.83$  años para LLA y de  $40\pm 18.05$  años para LMC con una media global que corresponde a  $33\pm 21.05$  años. Respecto al tipo de transcrito es posible observar una diferencia significativa en la expresión del gen quimérico de *BCR-ABL* en relación al grupo etáreo ( $P=0.022$ ), mostrando un incremento en la incidencia del transcrito *e1a2* en pacientes menores de 18 años ( $7\pm 0.82$  años), contraria a pacientes que exhiben el transcrito *b2a2* ( $40\pm 24.24$  años), *b3a2* ( $32\pm 15.46$ ) y la coexpresión de *b2a2/b3a2*, los cuales muestran un pico de incidencia en el grupo etáreo de los 30 a los 40 años (Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución del grupo etario en base al tipo de transcrito del gen quimérico BCR-ABL en pacientes con LLA y LMC

En cuanto a las características clínicas del paciente asociadas al tipo de transcrito de *BCR-ABL* no se observó diferencia significativa respecto al recuento leucocitario ( $P=0.079$ ). Sin embargo la media de presentación es de  $119,423 \pm 37,043$  células por milímetro cúbico ( $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) para el transcrito *e1a2*, de  $124,073 \pm 158,099$   $\text{cel}/\text{mm}^3$  para *b2a2* y de  $22,384 \pm 48,534$   $\text{cel}/\text{mm}^3$  para *b3a2* encontrando recuentos leucocitarios incrementados en la expresión de estos transcritos en comparación al recuento normal leucocitario el cual oscila entre 4,000 a 10,500  $\text{cel}/\text{mm}^3$  (Almaguer, 2003) (Cuadro 2). Según el tipo de transcrito patológico el porcentaje de hemoglobina presenta una media de  $8.20 \pm 4.00$  gramos por decilitro (g/dl) para *e1a2*, de  $9.95 \pm 2.85$  g/dl para *b2a2* y de  $11.96 \pm 3.36$  g/dl para *b3a2*, sin ninguna diferencia estadísticamente significativa ( $P=0.135$ ). No obstante los valores reportados en el grupo de estudio se encuentran por debajo del límite normal que es de 12 a 16 g/dl para el género femenino y de 14 a 18 g/dl en el masculino (Almaguer, 2003) (Cuadro 2). La distribución del recuento plaquetario demuestra una diferencia significativa según el tipo de transcrito

patológico expresado ( $P=0.012$ ). Se encontraron recuentos plaquetarios por debajo del recuento normal (150,000-400,000  $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) para el transcrito *e1a2* ( $8,895 \pm 6,641$   $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) en relación a los transcritos *b2a2* ( $199,806 \pm 163,437$   $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) y *b3a2* ( $16,2267 \pm 91,257$   $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) los cuales se encuentran dentro del rango de normalidad (Almaguer, 2003). Así mismo se establecieron comparaciones pareadas entre ambos tipos de transcritos no encontrando diferencias significativas entre *b2a2* y *b3a2* ( $P=0.604$ ), a diferencia de las comparaciones realizadas entre *e1a2* y *b2a2* ( $P=0.009$ ) o *e1a2* y *b3a2* ( $P=0.004$ ) los cuales presentan una diferencia estadísticamente significativa (Cuadro 2). Se detectaron recuentos plaquetarios elevados en LMC en comparación a los recuentos detectados en LLA-B, cuyos recuentos se encuentran por debajo del límite inferior normal (Gráfica 2). Referente al paciente con LMC que presentó coexpresión de los transcritos *b2a2/b3a2*, la cuenta plaquetaria se encontró por encima del rango normal (1,108,000  $\text{cel}/\text{mm}^3$ ) y el porcentaje de leucocitos fue de 32,900  $\text{cel}/\text{mm}^3$  con 10.7 g/dl de hemoglobina.



Grafica 2. Distribución del recuento plaquetario en base al tipo de transcrito del gen quimérico BCR-ABL y tipo de leucemia expresado

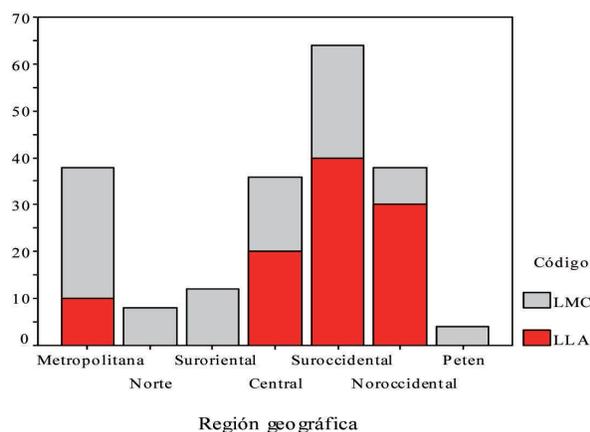
Tabla 2. Características clínicas del paciente relacionadas en base al tipo de transcrito del gen quimérico BCR-ABL en pacientes con LLA y LMC por RT-PCR

Parámetro	<i>e1a2</i>	<i>b2a2</i>	<i>b3a2</i>	<i>P</i> ♣
<i>Numero de Casos n (%)</i>	4 (11%)	15 (43%)	15 (43%)	
	◆ <i>e1a2</i> y <i>b2a2</i> <i>P</i> = 0.010 <sup>1</sup>	◆ <i>b2a2</i> y <i>b3a3</i> <i>P</i> = 0.369 <sup>2</sup>	◆ <i>e1a2</i> y <i>b3a2</i> <i>P</i> = 0.001 <sup>1</sup>	0.004 <sup>1</sup>
<i>Género</i>				0.612 <sup>2</sup>
<b>Femenino (F)</b>	2 (5.5%)	6 (17%)	4 (11.5%)	
<b>Masculino (M)</b>	2 (5.5%)	9 (26%)	11(31.6%)	
<i>Edad (años)</i>	◆ <i>e1a2</i> y <i>b2a2</i> <i>P</i> = 0.028 <sup>1</sup>	◆ <i>b2a2</i> y <i>b3a3</i> <i>P</i> = 0.221 <sup>2</sup>	◆ <i>e1a2</i> y <i>b3a2</i> <i>P</i> = 0.009 <sup>1</sup>	0.022 <sup>1</sup>
<b>Media ± SD</b>	7 ± 0.82	40 ± 24.24	32 ± 15.46	
<b>Mediana (rango)</b>	7 (6-8)	46 (4-81)	34 (4-64)	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.12	0.61	0.48	
<i>Plaquetas (150,000-400,000 cel/mm<sup>3</sup>)</i>	◆ <i>e1a2</i> y <i>b2a2</i> <i>P</i> = 0.009 <sup>1</sup>	◆ <i>b2a2</i> y <i>b3a3</i> <i>P</i> = 0.604 <sup>2</sup>	◆ <i>e1a2</i> y <i>b3a2</i> <i>P</i> = 0.004 <sup>1</sup>	0.012 <sup>1</sup>
<b>Media ± SD</b>	8,895 ± 6,641	199,806 ± 163,437	162,267 ± 91,257	
<b>Mediana (rango)</b>	7,970 (2,000-18,000)	184,000 (1,069-516,000)	143,000 (10,000-316,000)	
<b>Q1 (25)</b>	3,415	430,000	109,000	
<b>Q2 (50)</b>	7,970	184,000	143,000	
<b>Q3 (75)</b>	15,570	342,000	234,000	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.74	0.82	0.56	
<i>Leucocitos (4,500-10,500 cel/mm<sup>3</sup>)</i>				0.079 <sup>2</sup>
<b>Media ± SD</b>	119,423 ± 37,043	124,073 ± 158,099	22,384 ± 48,534	
<b>Mediana (rango)</b>	124,845 (73,000-155,000)	60,310 (1,050-567,740)	6,170 (1,500-185,000)	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.31	1.27	2.17	
<i>Hemoglobina (F=12-16 y M=14-18 g/dl)</i>				0.135 <sup>2</sup>
<b>Media ± SD</b>	8.20 ± 4.00	9.95 ± 2.85	11.96 ± 3.36	
<b>Mediana (rango)</b>	8.95 (2.7-12.2)	10.3 (5.6-15.8)	11.6 (5.8-19.1)	
<b>Coefficiente de variación</b>	0.49	0.29	0.28	

◆ = Prueba Mann Whitney ♣ = Prueba Kruskal Wallis 1 = Diferencia Significativa 2 = Diferencia no significativa

En relación a la distribución de *BCR-ABL* respecto a las regiones geográficas metropolitana, norte, nororiente, suroriente, central, suroccidental, noroccidental y Petén se observó que la zona suroccidental presenta la mayor frecuencia de expresión en ambos tipos de leucemia (LLA-B =40% y para LMC=24%) seguida de la región metropolitana con una frecuencia que corresponde al 10% en LLA-B y del 28% en LMC (Gráfica 3). Para la LLA-B el transcrito *b2a2* y *e1a2* representan la mayoría de casos evaluados perteneciendo a las regiones nor y suroccidentales, no encontrando ningún caso de

estudio en las regiones norte, nororiente, suroriente y Petén. Por el contrario para las LMC el transcrito *b2a3* y *b3a2* representan la totalidad de los casos como se mencionaba anteriormente predominando su expresión en la región metropolitana y suroccidental sin ningún hallazgo en la región nororiental y con una baja frecuencia en las demás regiones geográficas de Guatemala.



Grafica 3. Porcentaje de expresión del gen quimérico BCR-ABL en pacientes con LLA y LMC por región geográfica de Guatemala

## Discusión

Existe una fuerte relación entre el tipo de transcrito de fusión del gen *BCR-ABL* y el fenotipo de leucemia. El transcrito *e1a2* que transcribe una proteína de 190kD ( $p190^{BCR-ABL}$ ) es característico de pacientes con LLA, mientras que los transcritos *b3a2* y/o *b2a2* que codifican para una proteína de 210kD ( $p210^{BCR-ABL}$ ) son considerados marcadores genéticos de la LMC (van Rhee et al., 1996). El presente estudio permitió establecer en la población leucémica guatemalteca la predominancia del transcrito *e1a2* ( $p190$ ) en pacientes con LLA-B y de *b2a2* o *b3a2* ( $p210$ ), así como su coexpresión (*b2a2/b3a2*) en pacientes con LMC. De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó la frecuencia de los distintos transcritos del gen *BCR-ABL* en 35 muestras de médula ósea procedentes de pacientes con LMC y LLA-B, obteniendo una baja frecuencia para el transcrito *e1a2* (11%) respecto a la frecuencia de los transcritos *b2a2* (43%) y *b3a2* (43%). La coexpresión de ambos transcritos *b2a2* y *b3a2* es detectable únicamente en un porcentaje minoritario de pacientes leucémicos, siendo reportados en otros estudios del 1.4% al 11% de la población leucémica (Henegariu et al., 1997). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos en la presente investigación, en la cual la frecuencia de coexpresión de *b2a2/b3a2* fue del 3%. No se reportó ningún caso de coexpresión entre  $p190$  (*e1a2*) y  $p210$  (*b2a2* y *b3a2*). No obstante,

otros estudios demuestran que  $p190$  no está restringida únicamente a pacientes con LLA y existen reportes de pacientes con LMC en crisis blástica en los cuales se reporta la coexpresión de  $p190$  y  $p210$  en más del 70% de los casos, la cual se explica debido a la presencia de múltiples líneas celulares con diferente expresión de los transcritos de fusión del gen *BCR-ABL* y/o debido al mecanismo de corte y empalme alternativo durante su formación transcripcional (Adler et al., 2009; Balatzenko et al., 2001; van Rhee et al., 1996; Lichty, Keating, Callum, Yee, Croxford et al., 1998; Perego et al., 2000). La distribución de la frecuencia de *BCR-ABL* respecto a la variable de género muestra un mayor grado de expresión en el género masculino sin diferencia significativa respecto al tipo de transcrito ( $P=0.612$ ). Referente al grupo etáreo se observa una tendencia poblacional que muestra dos picos de incidencia, los cuales corresponden de los 30 a 40 años en pacientes con LMC que expresan los transcritos *b2a2* y *b3a2* y de los 5 a los 10 años en pacientes con LLA-B que expresan el transcrito *e1a2*. Estas características demográficas se presentan acorde al fenotipo de leucemia que se exhibe y son similares a resultados obtenidos en otros estudios (van Rhee et al., 1996). Es importante establecer la relación existente entre la expresión del tipo de transcrito del gen quimérico *BCR-ABL* y la actividad trombopoyética, debido a que el incremento de la actividad plaquetaria influye en el curso de la enfermedad y se asocia clínicamente a una menor supervivencia (Mills et al., 1991; Dobrovic et al., 1990). El análisis de la relación existente entre la frecuencia de expresión de los transcritos patológicos del gen quimérico *BCR-ABL* y los recuentos plaquetarios demostró una diferencia significativa ( $P=0.012$ ). Según lo esperado, se encontró que los recuentos plaquetarios con LMC son más altos en comparación con recuentos de pacientes con LLA-B. La expresión del transcrito *e1a2* se encuentra relacionada a una actividad trombopoyética apreciablemente menor ( $8895 \pm 6641$  cel/mm<sup>3</sup>) respecto al rango normal esperado, mientras que la expresión del transcrito *b2a2* se encontró asociada a valores superiores ( $199806 \pm 163437$  cel/mm<sup>3</sup>) con respecto al rango normal (150,000-400,000 cel/mm<sup>3</sup>) (Almaguer, 2003). Los datos reportados difieren de aquellos obtenidos en otros estudios, en los cuales pacientes con el transcrito *b3a2* poseen conteos plaquetarios elevados en comparación con los presentados por pacientes con *b2a2* (Balatzenko et al., 2001; Bianchi et al., 1995; de Lemos et al., 2005; Martiat et al.,

1989; Perego *et al.*, 2000). Sin embargo, otros estudios no establecen una relación significativa entre el recuento plaquetario y el tipo de transcrito patológico del gen quimérico *BCR-ABL* (Shepherd *et al.*, 1992; Rozman *et al.*, 1995). Una de las razones por las cuales podría explicarse la diferencia entre los resultados obtenidos en esta investigación respecto a otros estudios efectuados, es la selección de la muestra. En el presente estudio el tamaño de la población leucémica guatemalteca con esta patología es poco significativo en comparación a estudios efectuados en otros países, los cuales poseen muestras poblacionales estadísticamente representativas. Esto les permitió la utilización de pruebas estadísticas más robustas para establecer la relación causal entre el tipo de transcrito patológico expresado y el incremento de la actividad trombopoyética. Al igual que otros estudios efectuados no existe diferencia significativa entre el tipo de transcrito y el nivel de hemoglobina ( $P=0.135$ ) (Opalka *et al.*, 1992; Perego *et al.*, 2000; Rozman *et al.*, 1995; Shepherd *et al.*, 1992). Sin embargo, los valores obtenidos se encuentran por debajo del recuento de normalidad hemoglobínica establecida tanto para hombres como para mujeres (12 a 16 g/d para el género femenino y de 14 a 18 g/dl en el masculino) (Almaguer, 2003). Se ha observado que la disminución del recuento de hemoglobina en pacientes leucémicos se debe al incremento descontrolado de células sanguíneas inmaduras que originan descensos en los recuentos de las líneas celulares hematopoyéticas encargadas de la producción de células maduras, siendo esta la posible explicación de la anemia encontrada en los pacientes leucémicos evaluados (Benjamin *et al.*, 2004). No fue posible establecer una relación estadísticamente significativa entre la frecuencia de expresión de los diferentes transcritos del gen quimérico *BCR-ABL* y su hallazgo en las diversas regiones geográficas de Guatemala (metropolitana, norte, nororiente, suroriente, central, suroccidental, noroccidental y Petén) ( $P=0.798$ ). Sin embargo se observó que la región suroccidental presenta la mayor frecuencia de aparición en ambos tipos de leucemia (LLA-B= 40% y para LMC= 24%) seguida de la región metropolitana (LLA-B= 10% y en LMC= 28%). Estudios efectuados en diferentes regiones geográficas establecen diferencias significativas entre la frecuencia de expresión de los reordenamientos del gen quimérico *BCR-ABL*. Se han reportado diferentes porcentajes de expresión de las frecuencias de *b3a2* en comparación con *b2a2*

en diversos estudios realizados en pacientes con LMC. Según lo reportado en estos estudios, la distribución de la frecuencia del tipo de transcrito patológico expresado de *BCR-ABL* en poblaciones occidentales es del 40% para la expresión de *b2a2* y del 60% para la expresión de *b3a2*, con una coexpresión de *b2a2/b3a2* del 5% al 10%. Así mismo, estudios efectuados en poblaciones orientales revelan frecuencias de expresión del 60% para *b3a2* y del 30% para *b2a2*, con una coexpresión de *b2a2/b3a2* del 2% al 5%, observándose diferencias significativas en la expresión de *b3a2* respecto a *b2a2* en ambos grupos poblacionales y un incremento de la frecuencia de la expresión de *b3a2* respecto a la frecuencia de expresión de *b2a2*. Comparativamente podemos observar que la población leucémica guatemalteca con esta patología no presenta diferencias entre la frecuencia de expresión de los transcritos *b2a2* con respecto a *b3a2* (Cuadro 2). Se detectó que la frecuencia de expresión de los transcritos patológicos de *BCR-ABL* en la población leucémica guatemalteca concuerda a la reportada en países latinoamericanos como México (Arana *et al.*, 2002; Rosas *et al.*, 2003; Meza *et al.*, 2007; Ruiz-Arguelles *et al.*, 2004), para los cuales la distribución de la frecuencia de los transcritos de *BCR-ABL* se encuentra en el rango de 40% al 50% tanto para la expresión de *b2a2* como para *b3a2* y con una coexpresión de *b2a2/b3a2* del 5% al 10%. No obstante existen diferencias en la frecuencia de expresión con otros reportes tales como los obtenidos en Ecuador, donde la frecuencia reportada para el transcrito *b2a2* es del 95% mientras que se detecta un 5% para el transcrito *b3a2* (Paz *et al.*, 2002). Se encontró que los hallazgos obtenidos de estudios efectuados en diferentes regiones geográficas del mundo en pacientes con LLA-B coinciden con la frecuencia reportada en la población leucémica guatemalteca con esta patología detectándose en el 100% de pacientes con LLA-B la expresión del transcrito patológico *e1a2* (Paz *et al.*, 2002; Melo, 1996; Hermans *et al.*, 1987). El presente estudio permitió la determinación de la frecuencia de los distintos transcritos del gen quimérico *BCR-ABL*, encontrándose que la población guatemalteca con esta patología manifiesta una expresión similar a la encontrada en poblaciones latinoamericanas (*b2a2* y *b3a2*= 40-50%) la cual difiere a las reportadas en poblaciones occidentales y orientales (caucásicos y asiáticos) debido a que en dichos estudios se reporta frecuentemente una diferencia significativa entre la frecuencia de expresión de *b2a2* comparado con la expresión de

*b3a2* en pacientes con LMC. Así mismo, dichos estudios reportan que la frecuencia de la expresión de *b3a2* es apreciablemente mayor respecto a la frecuencia de expresión del transcrito *b2a2*. Esto sugiere que la población leucémica guatemalteca con esta patología presenta una conducta biológica diferente a las poblaciones asiáticas y caucásicas producto de la variabilidad genética entre poblaciones como posible explicación para las diferencias observadas entre los pacientes guatemaltecos y los estudios realizados en otras regiones geográficas del mundo (Eisenberg *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1989; Paz *et al.*, 2002; Emad *et al.*, 2010; Arana *et al.*, 2002; Melo, 1996; Hermans *et al.*, 1987). Esta información es una contribución importante para la realización de la caracterización genética de la población leucémica del país con esta patología.

### Agradecimiento

Este estudio fue realizado gracias al apoyo del Instituto de Investigación y Educación para las Enfermedades Genéticas y Metabólicas (INVEGEM) y a la Fundación Rozas Botrán.

### Referencias

- Adler, R., Vielhmann, D., Kuhlisch, E., Martiniak, Y., Rottgers, S., Harbott, J. *et al.* (2009). Correlation of *BCR-ABL* transcript variants with patients characteristics in childhood chronic myeloid leukemia. *European Journal of Haematology*, 82, 112-118.
- Almaguer, C. (2003). Interpretación clínica de la biometría hemática. *Medicina Universitaria*, 5, 35-40.
- Arana, R., Sánchez, E., Ignacio, G., De La Fuente, E., Garces, O., Morales, E. *et al.* (2002). *BCR-ABL* p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Clinical & Laboratory Haematology*, 24, 145-150.
- Aurer, I., Butturini, A., & Gale, R. (1991). *BCR-ABL* rearrangements in children with Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leucemia. *Blood*, 78, 2407-10.
- Balatzenko, G., Vundinti, B., & Guenova, M. (2001). Correlation between the type of *BCR-ABL* transcripts and blood cell counts in chronic myeloid leukemia: a possible influence of *mdr1* gene expression. *Hematology Reports*, 3:e3, 5-8.
- Benjamin, L., Ebert, A., & Todd, R. (2004). Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood*, 104, 923-932.
- Bianchi, C., Cairoli, R., Marengo, P., Muti, G., Del Monte, U., & Perego, R. (1995). Detection by polymerase chain reaction of *BCR-ABL* transcripts in myeloproliferative diseases at time of diagnosis and for monitoring chronic myelogenous leukemia patients after bone marrow transplantation. *European Journal of Cancer*, 31A, 197-201.
- Branford, S., Hughes, T., & Rudzki, Z. (2002). Dual transcription of *b2a2* and *b3a2 BCR-ABL* transcripts in chronic myeloid leukaemia is confined to patients with a linked polymorphism within the BCR gene. *British Journal of Haematology*, 117, 875-877.
- Cerveira, N., Ferreira, S., Dória, S., Veiga, I., Ferreira, F., Mariz, J. *et al.* (2000). Detection of prognostic significant translocation in childhood acute lymphoblastic leukemia by one-step multiplex reverse transcription polymerase chain reaction. *British Journal of Haematology*, 109, 638-640.
- Dobrovic, A., Trainor, K., & Morley, A. (1988). Detection of the molecular abnormality in chronic myeloid leukemia by use of the polymerase chain reaction. *Blood*, 72, 2063-2065.
- de Klein, A., Van Kessel, A., Grosveld, G., Bartram C., Hagemeijer, A., Bootsma, D. *et al.* (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature*, 300, 765-767.
- de Lemos, J., de Oliveira, C., Scerni, A., Bentes, A. *et al.* (2005). Differential molecular response of the transcripts *B2A2* and *B3A2* to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genetical Molecular Research*, 4, 803-811.
- Eisenberg, A., Silver, R., Soper, L., Arlin, Z., Coleman, M., Bernhardt, B. *et al.* (1988). The location of breakpoints within the breakpoint cluster region (*bcr*) of chromosome 22 in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*, 2, 642-647.

- Emad I., Osman, & Kamal, H. (2010). Frequencies of *BCR-ABL* fusion transcripts among Sudanese chronic myeloid leukemia patients. *Genetics and Molecular Biology*, 33, 229-231.
- Fialkow, P., Jacobson, R., & Papayannopoulou, T. (1977). Chronic myelocytic leukemia: clonal origin a stem cell common to the granulocyte, erythrocyte, platelet and monocyte/macrophage. *American Journal of Medicine*, 63, 125-130.
- Goh, H., Hwang, J., Kim, S., Lee, Y., Kim, Y., & Kim, D. (2006). Comprehensive analysis of *BCR-ABL* transcript types in Korean CML patients using a newly developed multiplex RT-PCR. *Translational Research*, 248, 249-56
- Hasan, SK., Sazawal, S., Kumar, B., Chaubey, R., Mishra, P., Mir, R. *et al.* (2006). Childhood CML in India: b2a2 transcript is more common than b3a2. *Cancer genetic Cytogenetic*, 169, 76-7.
- Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A., & Grosveld, G. (1985). Structural organization of the *BCR* gene and its role in the Ph translocation. *Nature*, 315, 758-761.
- Henegariu, O., Heerema, N., Dlouhy, S., Vance, G., & Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. *Biotechniques*, 23, 504-511.
- Hermans, A. Heisterkamp, N., von Lindern, M., van Baal, S., Meije, D., van der Plas, D. *et al.* (1987). Unique fusion of *BCR* and *ABL* genes in Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia. *Cell*, 51, 33-44.
- Herrera, P., Calbacho, M., Heras, C., Ramos, M., López, J., & Odriozola, J. (2006). Monitorización de la enfermedad mínima residual en la leucemia mieloide crónica mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Methods and Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 28, 47-54.
- Ito, T., Tanaka, H., Tanaka, K., Ito, K., Kyo, T., Dohy, H. *et al.* (2004). Insertion of a genomic fragment of chromosome 19 between *BCR* intron 19 and *ABL* intron 1a in a chronic myeloid leukaemia patient with *BCR-ABL* (*e19a2*) transcript, *British Journal of Haematology*, 126, 750-5.
- Lee, A., Kirk, J., Edmans, S., & Radich, J. (1995) Multiplex PCR of *BCR/ABL* fusion transcripts in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia, *Genome Research*, 4, 283-287.
- Lee, M., Le Maistre, A., Kantarjian, H., Talpaz, M., Freireich, E., Trujillo, J. *et al.* (1989) Detection of two alternative *BCR-ABL* mRNA junctions and minimal residual disease in Philadelphia chromosome positive chronic myelogenous leukemia by polymerase chain reaction. *Blood*, 73, 2165-2170.
- Lichty, B., Keating, A., Callum, J., Yee, K., Croxford, R., Corpus, G. *et al.* (1998). Expression of p210 and p190 *BCR-ABL* due to alternative splicing in chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, 103, 711-715.
- Martiat, P., Ifrah, N., Rassool, F., Morgan, G. *et al.* (1989). Molecular analysis of Philadelphia positive essential thrombocythemia. *Leukemia*, 3, 563-565.
- Melo, J. (1996). The diversity of *BCR-ABL* fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88, 2375.
- Meza, J., Gutiérrez, M., Vásquez, A., Delgado, J., Esparza, M., González, J. *et al.* (2007) Prevalence of the *BCR-ABL1* transcripts in Mexican patients with chronic myelogenous leucemia. *Review of Clinical Investigation*, 59, 338-341.
- Milis, K., Benn, P., & Birnie, G. (1991) Does the breakpoint within the major breakpoint cluster region (M-bcr) influence the duration of the chronic phase in chronic myeloid leukemia? An analytical comparison of current literature. *Blood*, 78, 1155-1161.
- Millot, F., Traore, P., Guilhot, J., Nelken, B., Leblanc, T., Leverger, G. *et al.* (2005). Clinical and biological features at diagnosis in 40 children with chronic myeloid leukemia. *Pediatrics*, 116, 140-3.
- Mondal, B., Bandyopadhyay, A., Majumdar, S., Mukhopadhyay, A., Chandra, S., Chaudhuri, U. *et al.* (2006). Molecular Profiling of Chronic Myeloid Leukemia in Eastern India, *American Journal of Hematology*, 81, 845-849

- Nowell, P., & Hungerford, D. (1960) A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, *132*, 1497.
- Olopade, I., & Pichert G. (2001). Cancer genetics in oncology practice. *Annals of Oncology*, *12*, 895-908.
- Opalka, B., Wandl, U., Stutenkemper, R., Kloke, O. *et al.* (1992). No correlation between the type of *Bcr-Abl* hybrid messenger RNA and platelet counts in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, *80*, 1854-1855.
- Paz, C., Burgo, R., Morillo, S., Santos, J., Fiallo, B., & Leone, P. (2002). *BCR-ABL* rearrangement frequencies in chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia in Ecuador, South America. *Cancer Genetics & Cytogenetics*, *132*, 65-67.
- Perego, R., Costantini, M., Cornacchini, G., Gargantini, L., Bianchi, C., Pungolino, E. *et al.* (2000). The possible influences of b2a2 and b3a2 *BCR-ABL* protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukemia. *European Journal of Cancer*, *36*, 1395-1401.
- Rosas, A., Martinez, M., Ayala, M., Vela, J., Bahena, P., Vadillo, M. *et al.* (2003). Análisis del tipo de transcrito BCR-ABL y su relación con la cuenta plaquetaria en pacientes mexicanos con leucemia mieloide crónica. *Gaceta Médica de México*, *139*, 553-559.
- Rozman, C., Urbano, A., Cervantes, F., Rozman, M., Colomer, D., Féliz, P. *et al.* (1995). Analysis of the clinical relevance of the breakpoint location within M-bcr and the type of chimeric mRNA in chronic myelogenous leukemia. *Leukemia*, *9*, 1104-1107.
- Ruiz, G., Garcés, J., Reyes, V., & Ruiz, G. (2004). Frequencies of the breakpoint cluster region types of the BCR-ABL fusion gene in Mexican Mestizo patients with chronic myelogenous leukemia. *Journal of Clinical Research*, *56*, 605-8
- Shepherd, P., Bond, C., & Allan, N. (1992). Molecular breakpoints and platelet counts in chronic myeloid leukemia. *Blood*, *80*, 556-557.
- Shepherd, P., Suffolk, R., Halsey, J., & Allan, N. (1995). Analysis of molecular breakpoint and mRNA transcript in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *British Journal of Haematology*, *89*, 546-54.
- Udomsakdi-Auewarakul, C., U-Pratya, Y., Boonmoh, S., & Vatanavicharn, S. (2000). Detection of molecular variants of BCR-ABL gene in bone marrow and blood of patients with chronic myeloid leukemia by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Journal of the Medicine Association of Thailand*, *83*, 928-35.
- van Rhee, F., Hochhaus, A., Lin, F., Melo, J., Goldman, J., & Cross, N. (1996) p190 *BCR-ABL* mRNA is expressed at low levels in p210-positive chronic myeloid and acute lymphoblastic leukemias. *Blood*, *87*, 5213-5217.
- Yaghmaie, M., Ghaffari, S., Ghavamzadeh, A., Alimoghaddam, K., Jahani, M., Mousavi, S. *et al.* (2008). Frequency of *BCR-ABL* Fusion Transcripts in Iranian Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *Iranian Archive of Medicine*, *11*, 247 - 251.