



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MUTACIONES EN EL DOMINIO CINASA DE *BCR-ABL* EN PACIENTES CON  
LMC Y RESISTENCIA CLÍNICA AL TRATAMIENTO CON IMATINIB.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**ADRIANA DEL CASTILLO MORENO**



**MÉXICO, D.F.**

**2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Alicia Beatriz Cervantes Peredo

**VOCAL:** Profesor: María Benita Leonor Fernández Salgado

**SECRETARIO:** Profesor: Rosa María Arana Trejo

**1er. SUPLENTE:** Profesor: León Patricio Martínez Castilla

**2° SUPLENTE:** Profesor: Nora Andrea Gutiérrez Nájera

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO,  
O.D.

**ASESOR DEL TEMA:** QFB ROSA MARÍA ARANA TREJO

**SUSTENTANTE:** ADRIANA DEL CASTILLO MORENO

Ha sido un largo, largo camino y muchas personas me han acompañado desde el inicio de la carrera hasta el examen profesional... Dedico este trabajo a todas aquellas personas que se cruzaron en mi camino, durante la carrera y la realización de esta tesis, sola no lo hubiera logrado o por lo menos no hubiera sido tan divertido...

Dedico este trabajo con mucho amor a mis papás y hermanas y a mi hermosa familia....

Gracias...

a mis papás que siempre me apoyaron y tuvieron fé en mi; y a mis hermanas por su cariño

a Rosy por su paciencia inagotable

a Alicia por sus valiosas enseñanzas

a Ely, a Lucía Flores y a todos en el HGM

a mis amigos y compañeros de la FQ por su compañía durante este recorrido en mi vida

a la UNAM, mi segundo hogar, por abrirme las puertas al mundo Por mi raza hablará el espíritu

al gran motorcito de mi vida, mi familia, por todo su apoyo y todo su amor  
Te amo Edgar, te amo Valentina

Y gracias a Dios por darme todo lo necesario para ser feliz...

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>RESUMEN.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1. MARCO TEÓRICO.....</b>   | <b>2</b>  |
| 1.1. CLASIFICACIONES.....  | 2         |
| 1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS Y CRÓNICAS.....                       | 2         |
| 1.1.2. CLASIFICACIÓN DE SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS.....                | 3         |
| 1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO DE LA LMC.....                         | 5         |
| 1.2.1. FASES DE LA LMC.....  | 7         |
| 1.3. CITOGENÉTICA DE LMC.....  | 10        |
| 1.3.1. FISH.....   | 13        |
| 1.4. BIOLOGÍA MOLECULAR.....   | 15        |
| 1.4.1. GEN <i>ABL</i> .....  | 15        |
| 1.4.2. GEN <i>BCR</i> .....  | 16        |
| 1.4.3. GEN DE FUSIÓN <i>BCR-ABL</i> .....  | 17        |
| 1.4.4. RT-PCR.....   | 21        |
| 1.5. TRATAMIENTO.....  | 24        |
| 1.5.1. QUIMIOTERAPIA ORAL.....   | 24        |
| 1.5.2. INTERFERÓN.....   | 26        |
| 1.5.3. TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE MÉDULA ÓSEA.....                                   | 28        |
| 1.5.4. INHIBIDORES DE CINASAS.....   | 29        |
| 1.6. RESITENCIA A MESILATO DE IMATINIB.....  | 35        |
| 1.6.1. MUTUACIONES PUNTUALES.....  | 38        |
| <b>OBJETIVOS .....</b>   | <b>41</b> |
| <b>2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>   | <b>42</b> |
| 2.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....   | 42        |
| 2.1.2. PACIENTES Y MUESTRAS.....   | 43        |
| 2.1.3. EXTRACCIÓN DE RNA.....  | 43        |
| 2.1.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR)..... | 45        |
| 2.1.6. SECUENCIACIÓN.....  | 49        |
| <b>3. RESULTADOS.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>4. DISCUSIÓN.....</b>   | <b>58</b> |
| <b>5. CONCLUSIONES.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>6. REFERENCIAS.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>APÉNDICE.....</b>   | <b>70</b> |

## **RESUMEN.**

La leucemia mieloide crónica (LMC) se caracteriza por la presencia del rearrreglo citogenético [t(9;22)(q34;q11)], conocido como cromosoma Filadelfia (Ph) que molecularmente forma el gen de fusión ***BCR-ABL*** el cual se traduce en una proteína quimérica con actividad aumentada de cinasa de tirosina. En la actualidad, como tratamiento de primera línea se utiliza el mesilato de imatinib (Glivec), el cual es un inhibidor de cinasas de tirosina; este tratamiento produce remisión hematológica y citogenética completa. Sin embargo, los pacientes no siempre presentan una respuesta favorable al tratamiento o después de un tiempo de recibirlo adquieren resistencia al mismo. En la mayoría de los casos, dicha resistencia es causada por mutaciones puntuales y se caracteriza por la pérdida de la respuesta hematológica, molecular y citogenética, incremento del transcrito ***BCR-ABL*** y la progresión de la enfermedad a fase blástica. El cromosoma Ph<sup>+</sup> y/o el rearrreglo ***BCR-ABL*** no es exclusivo de los pacientes con LMC, también puede presentarse en la leucemia linfoblástica aguda (LLA) en la que es considerado de muy alto riesgo.

Este trabajo consiste en la estandarización de una metodología para el estudio de mutaciones en el dominio cinasa del gen de fusión ***BCR-ABL*** en pacientes con LMC o LLA Ph<sup>+</sup>, que se encuentran en distintas fases de la enfermedad.

## **1. MARCO TEÓRICO.**

### **1.1. CLASIFICACIONES.**

#### **1.1.1. CLASIFICACIÓN DE LAS LEUCEMIAS AGUDAS Y CRÓNICAS.**

A principios del siglo XX, la leucemia se clasificaba en base a la morfología celular; posteriormente en base a técnicas histoquímicas utilizando tinciones especiales para los distintos componentes celulares. Actualmente, la leucemia se divide en aguda versus crónica y mieloide versus linfoide, dependiendo del linaje predominante y estado de diferenciación de las células hematopoyéticas.<sup>1</sup>

Las leucemias crónicas tienen un curso indolente, evolución larga y ausencia de células muy indiferenciadas, lo que las distingue de las leucemias agudas. En el caso de la leucemia mieloide crónica, la proliferación es en todas las células hematopoyéticas con predominio de las granulocíticas.<sup>2</sup>

Los pacientes con leucemias agudas, anteriormente, vivían menos tiempo que aquéllos con leucemias crónicas ya que son de curso más agresivo, sin embargo, en la actualidad esto es diferente debido a los tratamientos cada vez más eficaces.<sup>2</sup>

### **1.1.2. CLASIFICACIÓN DE SÍNDROMES MIELOPROLIFERATIVOS CRÓNICOS.**

Los desórdenes hematológicos se organizan fenotípicamente en linfoides y mieloides, aunque dicha distinción puede no ser precisa desde el punto de vista de línea clonal. En 1951, Dameshek fue el primero en acuñar el término desorden mieloproliferativo (MPD) para enfatizar la interrelación clínico-patológica entre la leucemia mieloide crónica, trombocitopenia esencial, policitemia vera, mielofibrosis con metaplasma mieloide y eritroleucemia. Los desórdenes mieloproliferativos crónicos se pueden definir como el conjunto de patologías hematológicas que tienen como característica común la proliferación descontrolada de los precursores medulares mieloides de alguna de las células sanguíneas. En general, afectan la maduración de dichos precursores en fases avanzadas de la diferenciación, como dato distintivo con respecto a los padecimientos agudos.<sup>3</sup>

El sistema de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para la clasificación de los neoplasmas mieloides separa la leucemia mieloide aguda (LMA) de los desórdenes mieloides crónicos (CMD) basado en la presencia o ausencia, respectivamente, de las características citomorfológicas y citogenéticas definidas de LMA, que incluyen 20% o más de blastos y ciertas alteraciones citogenéticas incluyendo la  $t(8;21)(q22;q22)$  y la  $t(15;17)(q22;q12)$ , ya sea en médula ósea o sangre periférica. En cuanto a los CMD, la OMS considera tres categorías: desórdenes mielodisplásicos (MDS), MPD y MDS/MPD; así como también mastocitosis sistémica (SM).<sup>3</sup>

Los síndromes mieloproliferativos crónicos (MPD) se caracterizan por una proliferación clonal de células mieloides diferenciadas, sin que la maduración de las células mieloides se vea afectada significativamente. La OMS clasificó a los MPD en siete categorías (Tabla 1.1); la mastocitosis y enfermedad mieloproliferativa con alteración en 8p11 son dos casos definidos con características clínicas y biológicas similares a las observadas en varios MPD. Además, la leucemia mielomonocítica crónica (CMML) y la mielomonocítica juvenil (JMML) representan MPD con características que se traslapan con MDS.<sup>3,4,5</sup>

Tabla 1.1. Síndromes mieloproliferativos (MPDs).<sup>4</sup>

|                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| Clasificación de la OMS:            | Leucemia mieloide crónica (LMC)   |
|                                     | Leucemia neutrofílica crónica (LNC)                                       |
|                                     | Leucemia eosinofílica crónica (CEL) y<br>síndrome hipereosinofílico (HES) |
|                                     | Policitemia vera (PV)   |
|                                     | Mielofibrosis idiopática mieloide (ET)                                    |
|                                     | Trombocitopenia esencial  |
|                                     | MPD no clasificados   |
| MPD adicionales:                    | Mastocitosis  |
|                                     | Síndrome mieloproliferativo 8p11  |
| Mieloproliferativo/mielodisplásico: | Leucemia mielomonocítica crónica (CMML)                                   |
|                                     | Leucemia mielomonocítica juvenil (JMML)                                   |

## **1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO DE LA LMC.**

La leucemia mieloide crónica (LMC) pertenece a los síndromes mieloproliferativos crónicos, que se origina a partir de una célula pluripotencial hematopoyética anormal, resultando así una proliferación clonal de células progenitoras mieloides malignas. Fue el primer cáncer humano asociado con una anomalía citogenética, el cromosoma Filadelfia (Ph), el cual corresponde a una traslocación recíproca balanceada entre los cromosomas 9 y 22.<sup>6</sup>

En 1845, Bennett en Escocia y Virchow en Alemania, publicaron descripciones de pacientes con esplenomegalia, anemia severa y grandes concentraciones de granulocitos en la sangre de la autopsia, además otros casos fueron reportados por Craige y colaboradores. En 1847 Virchow introdujo la designación *weisse Blut* y *leukemie (leucemia)*. En 1878 Neumann propone que la médula ósea, además de ser el lugar de producción de las células sanguíneas, es el sitio donde se origina la leucemia y usó el término *leucemia mieloide*. Observaciones subsecuentes amplificaron las características clínicas y de laboratorio de la enfermedad, pero pocos fundamentos fueron ganados hasta el descubrimiento de Nowell y Hungerford, reportado en 1960, donde dos pacientes con la enfermedad poseían una aparente pérdida del brazo largo del cromosoma 21 ó 22, una anomalía confirmada y designada como *cromosoma Filadelfia*. Esta observación llevo a una nueva aproximación para el diagnóstico, un marcador para el estudio de la patogénesis de la enfermedad. La disponibilidad de una técnica de bandeado más sensible para definir la estructura de los cromosomas llevaron a la descripción, por Rowley en

1973, de que la aparente pérdida del material del cromosoma 22 era en realidad parte de una traslocación recíproca balanceada entre los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(q34;q11)].<sup>8,9,10</sup>

La frecuencia de la LMC es de 1-2 casos por cada 100,000 individuos por año y constituye aproximadamente 15-20% de las leucemias en adultos. La edad media en que se presenta es entre los 45-55 años, siendo del 12 al 30% pacientes mayores de 60 años. Sin embargo, afecta a individuos de todas las edades, incluyendo niños, y su frecuencia es relativamente la misma en todas las poblaciones.<sup>11,12,13</sup>

En cuanto a la etiología de la LMC, es variada pero la radiación ionizante y la exposición ocupacional al benceno son factores importantes para el desarrollo de la enfermedad; más no existe evidencia de predisposición genética o virus oncogénicos asociados.<sup>6,9,14</sup>

El diagnóstico de LMC en ocasiones se realiza cuando el paciente se encuentra asintomático durante revisiones médicas de rutina, encontrando un aumento en los leucocitos superior a 100 000 por mm<sup>3</sup> cuando normalmente es de 30 000 leucocitos por mm<sup>3</sup>. En la exploración física se encuentra esplenomegalia mínima o moderada en 95% de los casos y hepatomegalia en la mitad y es común hallar adenomegalia moderada. La linfadenopatía y algunos tumores mieloides extramedulares (sarcoma granulocítico) son inusuales excepto en las fases tardías de la enfermedad, y cuando están presentes el pronóstico es pobre. Otros síntomas que presentan los pacientes son malestar general, fatiga, pérdida de peso, o aquéllos

producidos por la esplenomegalia, tales como saciedad temprana, dolor y una masa o dolor localizado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen, y en algunas ocasiones sangrado. Como auxiliares del diagnóstico se recurre a la determinación del cromosoma Filadelfia, o bien a los niveles de fosfatasa alcalina leucocitaria.<sup>2,16</sup>

Como indicadores pronósticos y marcadores de la evolución de la enfermedad se toman en cuenta el recuento plaquetario y el de glóbulos blancos. Cuando los valores son menores a  $450 \times 10^9/L$  y  $10 \times 10^9/L$ , respectivamente, se dice que hay una respuesta hematológica completa.<sup>17</sup>

### **1.2.1. FASES DE LA LMC.**

Las tres fases de la progresión de la leucemia mieloide crónica son la fase crónica, fase acelerada y crisis blástica.<sup>18</sup>

La fase crónica es la fase inicial en la cual muchos pacientes son diagnosticados. Usualmente su inicio es insidioso y los principales síntomas incluyen esplenomegalia, fatiga y pérdida de peso. En sangre periférica muestra leucocitosis, predominantemente neutrófilos en diferentes estados de maduración, así como basofilia y eosinofilia. Los blastos representan menos del 2% de los glóbulos blancos. La cuenta plaquetaria puede ser normal o aumentada.<sup>18</sup>

Después de un periodo de aproximadamente 36 meses, 75-80% de los pacientes muestran datos de progresión de la enfermedad a la fase acelerada, la cual es un estado intermedio de la evolución de la LMC, y la enfermedad comienza a ser refractaria a la terapia, la

mediana de supervida es de 12 meses. Se caracteriza por un incremento en el tamaño del bazo y en el total de glóbulos blancos de los cuales 10-19% son blastos, menos del 20% de basófilos circulantes, trombocitopenia persistente y/o la aparición de anormalidades citogenéticas adicionales al cromosoma Ph<sup>+</sup>.<sup>11,18</sup>

La crisis blástica es la fase final de la enfermedad con una supervida promedio de 12 semanas y puede estar o no precedida por la fase acelerada. Los pacientes experimentan un empeoramiento y presentan síntomas relacionados con trombocitopenia, anemia y aumento en el tamaño del bazo. Los criterios de la OMS para el diagnóstico de crisis blástica incluyen: exceso de blastos de 20% en sangre periférica o médula ósea, y/o proliferación de blastos extramedularmente, y/o acúmulos en secciones histológicas de médula ósea. Los blastos pueden estar comprometidos con un linaje celular bien definido y ser linfoides o mieloides, dándole la característica de fase blástica linfoide o mioide y el comportamiento clínico similar al de una leucemia aguda linfoblástica o mieloblastica respectivamente.<sup>11,18</sup>

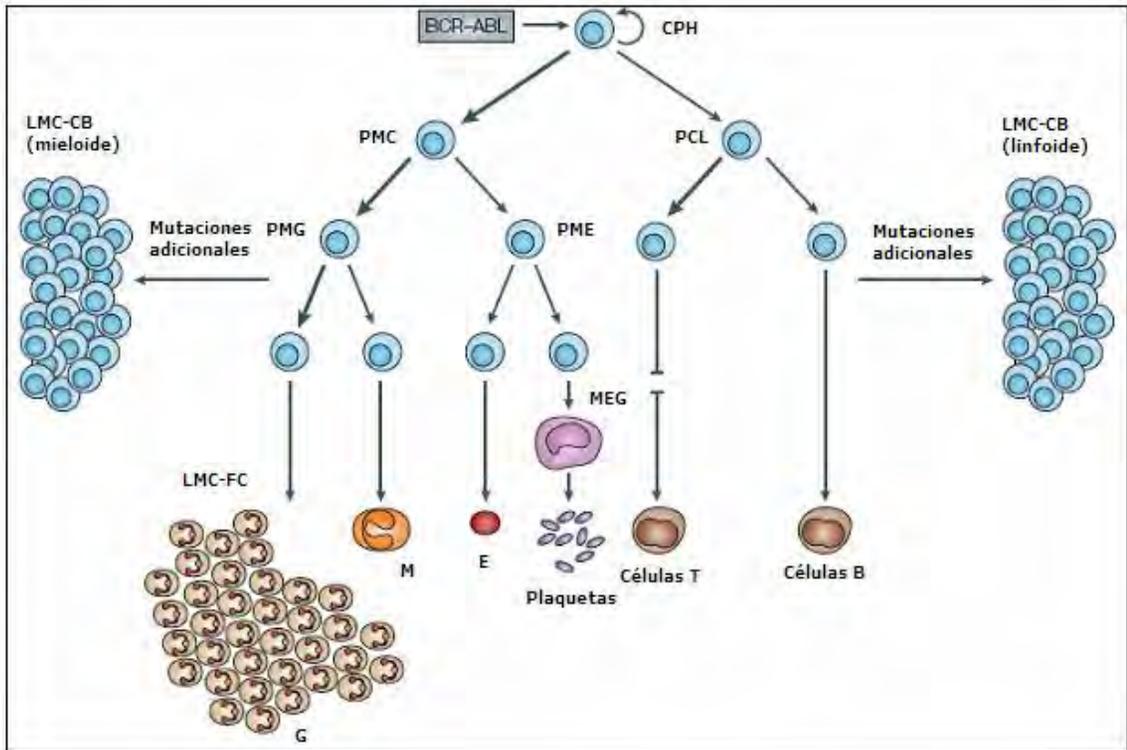


Fig. 1.1. La expresión de *BCR-ABL* se da en la célula pluripotencial hematopoyética (CPH), la cual puede diferenciarse en progenitores mieloides comunes (PMC), los cuales a su vez se diferencian en progenitores de macrófagos y granulocitos (PMG) y progenitores de megacariocitos y eritrocitos (PME). CPH también se diferencia en progenitores comunes linfoides (PCL), que son progenitores de linfocitos T y B. La fase crónica (LMC-FC) se caracteriza por una expansión masiva de granulocitos (G), y la adquisición de mutaciones adicionales causa la progresión a la crisis blástica (LMC-CB) caracterizada por la acumulación de blastos.<sup>7</sup>

### 1.3. CITOGENÉTICA DE LMC.

A nivel citogenético, el cromosoma Filadelfia (Ph), identificado por el cariotipo convencional en médula ósea, se ha utilizado para la cuantificación porcentual de células Ph-positivo (Ph+) después del tratamiento, convirtiéndolo en el **“estándar de oro”** para el diagnóstico, pronóstico y como marcador de la evolución en la LMC.<sup>11,18,19</sup>

En el análisis citogenético con bandeado GTG se observa una traslocación balanceada recíproca entre los cromosomas 9 y 22 (fig. 1.2), lo que resulta en un acortamiento del cromosoma 22 (cromosoma Filadelfia). Con técnicas de alta resolución se identifican las sub-bandas de la t(9;22) en 9q34.1 y 22q11.2. Generalmente los estudios citogenéticos, se llevan a acabo en muestras de aspirado de médula ósea y la detección del cromosoma Ph es en, aproximadamente, 95% de los pacientes con LMC al momento del diagnóstico.<sup>11,19,20</sup>

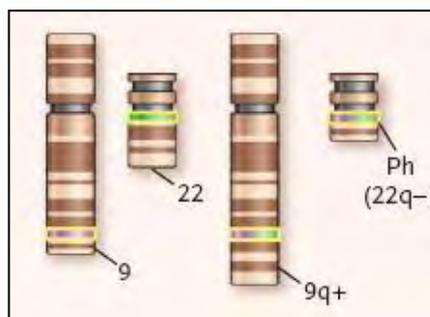


Fig. 1.2. Esquema del cromosoma Filadelfia por la traslocación balanceada entre los cromosomas 9 y 22.<sup>9</sup>

Como indicador pronóstico y marcador de evolución, se han diseñado criterios de respuesta citogenética, en un principio se utilizaron para evaluar el efecto del fármaco interferón alfa ( $INF\alpha$ ), pero actualmente se utiliza para cualquier esquema o combinación de fármacos en LMC. Los criterios de respuesta se dividen en respuesta citogenética completa, parcial o menor. La respuesta citogenética completa (RCC) se define por la ausencia del cromosoma Ph, la respuesta parcial (RCP) por la disminución de dichas células de 1 a 33%, la respuesta menor por una disminución de 33 a 66% y la respuesta mínima de 67 a 95%. Se considera respuesta nula cuando hay >95% de metafases Ph+. La respuesta mayor es la suma de la RCC y RCP. Para el seguimiento de pacientes tratados con inhibidores de cinasa de tirosina es necesario que el estudio se haga siempre en médula ósea y se revisen mínimo 20 metafases.<sup>11,17,21</sup>

Durante la fase crónica, aproximadamente en un 95% de los pacientes, el cromosoma Ph está presente en todas las células al momento del diagnóstico, siendo éste el patrón citogenético más frecuente. Sin embargo, se pueden encontrar otros eventos, como mosaico de células Ph+ y normales, anomalías estructurales secundarias o cambios numéricos, estos últimos identifican a los pacientes dentro del grupo de alto riesgo, asociados a un mal pronóstico y con mayor riesgo de transformación blástica.<sup>22</sup>

El cromosoma Ph también se encuentra presente en algunos pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), la cual es un desorden heterogéneo derivado de la transformación de células hematopoyéticas de linaje linfoide. La presencia del cromosoma Ph es más frecuente en adultos, aunque también llega a presentarse en

niños, y es considerado de muy alto riesgo. Citogenéticamente, el cromosoma Ph<sup>+</sup> es indistinto de la t(9;22) de la LMC; la única diferencia es la presencia de células normales por la restricción de linaje sólo a células linfoides leucémicas.<sup>15</sup>

La mayoría de los pacientes desarrolla alteraciones citogenéticas adicionales durante la evolución de la enfermedad a la fase acelerada o crisis blástica aún antes de presentarse datos clínicos, lo cual ayuda a identificar a pacientes con alto riesgo de evolucionar a la crisis blástica. Es importante identificar aquéllas alteraciones que son inestables y sin significado pronóstico. En la crisis blástica, 70 a 80% de los casos cursan con alteraciones cromosómicas secundarias estables y se asocian con manifestaciones clínicas de fase acelerada, siendo las más comunes un segundo cromosoma Filadelfia (30%), trisomías 8 (33%), 19 (12%), isocromosoma 17q (20%), pérdida del cromosoma Y (8%), trisomía 21 (7%) y monosomía 7 (5%).<sup>9,18,20,22</sup>

En pacientes sometidos a trasplante de médula ósea (TMO), el análisis citogenético es útil para la detección de enfermedad residual post-trasplante, donde el cromosoma Ph funciona como marcador de la enfermedad. Su identificación oportuna puede ayudar a la aplicación de terapias específicas para controlar y evitar la repoblación leucémica.<sup>11</sup>

Para la detección de enfermedad mínima residual (EMR), el análisis citogenético no es adecuado, ya que su sensibilidad no es tan alta comparado con la de técnicas moleculares. Sin embargo, una ventaja importante y única de esta técnica es que al momento del diagnóstico es posible evidenciar otras alteraciones que soportan el

desorden mieloproliferativo, tales como monosomías o deleciones, y que se van presentando durante la evolución de la enfermedad hacia la fase acelerada o la crisis blástica.<sup>11,19</sup>

### **1.3.1. FISH.**

En el 5% restante de los pacientes con LMC, donde no se encuentra el cromosoma Ph clásico al diagnóstico, la mitad son traslocaciones enmascaradas que se pueden detectar por técnicas de citogenética molecular como FISH (hibridación *in situ* fluorescente).<sup>11,19,23</sup>

En la técnica de FISH, se realiza la hibridación con una o dos sondas de secuencia específica de DNA (genes ***BCR*** y ***ABL***) marcadas con un fluorocromo a su secuencia blanco en los cromosomas en células en metafase o interfase, la marca se visualiza en el microscopio de epifluorescencia (fig. 1.3). Se utiliza una sonda de doble color la cual marca 300 kb para los genes ***BCR*** y ***ABL*** y el marcaje del gen de fusión ***BCR-ABL*** originado por la yuxtaposición de los genes se observa con una sola señal de fusión; también se utiliza una sonda de doble color y doble fusión que marca 650 kb en ***ABL*** y 600 kb en ***BCR***, dando un patrón de señal de ***BCR*** nativo, ***ABL*** nativo y ambos genes de fusión.<sup>11,17,24</sup>

Esta técnica es una de las más utilizadas en la práctica clínica para el diagnóstico y estudio de la LMC, detecta alrededor del 95% de células con la traslocación. Es una técnica muy sensible para el diagnóstico pues detecta alrededor del 5% de los casos con traslocaciones enmascaradas que no se detectan por citogenética

convencional y casos raros con variantes en los puntos de ruptura. También se puede monitorear la presencia del cromosoma Ph después del tratamiento cuando no hay células en metafase y determinar si se ha erradicado.<sup>11,19,20</sup>

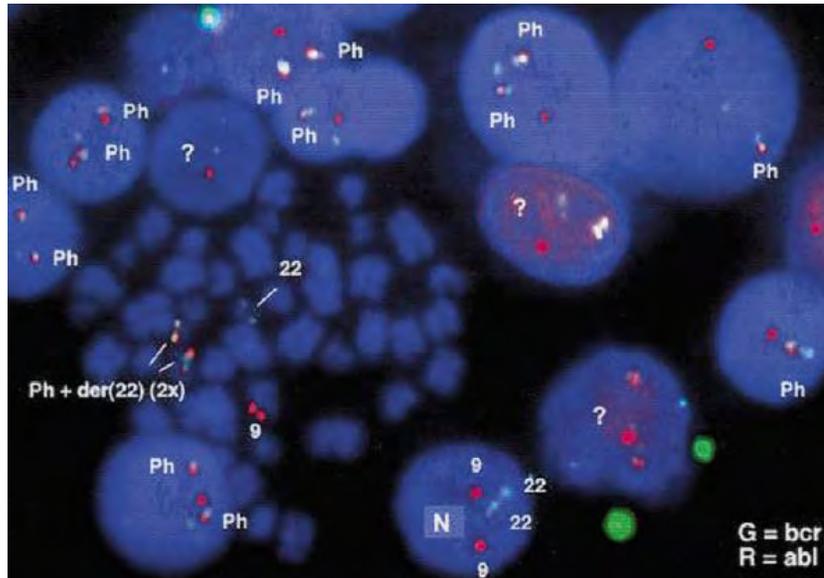


Fig. 1.3. FISH donde se muestra la presencia del cromosoma Ph (*BCR* en verde y *ABL* en rojo) en metafases y núcleos interfásicos.<sup>1</sup>

Una ventaja del FISH sobre la citogenética convencional, es que el estudio puede realizarse en núcleos en interfase, y no necesariamente se requiere observar cromosomas, lo que puede hacer al método semi-cuantitativo al contar el número de señales positivas. Sin embargo, es posible tener resultados falsos positivos por la presencia de células residuales, sobre todo en sangre periférica. Cuando el porcentaje de células Ph+ es menor de 10% y no se revisa un número suficiente de metafases o núcleos en interfase o cuando existe alguna traslocación entre *ABL* y otros genes, pueden obtenerse resultados falsos negativos.<sup>11,19</sup>

## 1.4. BIOLOGÍA MOLECULAR

### 1.4.1. ABL.

El gen *ABL* se encuentra en el cromosoma 9, codifica para una proteína no receptora de cinasa de tirosina, ABL, la cual se expresa constitutivamente en la mayoría de los tejidos. ABL es una proteína de 145 kd con dos isoformas, 1a y 1b, originadas por un procesamiento alternativo en el primer exón, de las cuales la isoforma 1b contiene un sitio de modificación de miristilización. Se pueden distinguir varios dominios; tres homólogos de *SRC* (SH1-SH3) localizados en el extremo amino, el dominio SH1 lleva la función de cinasa de tirosina (Y-cinasa), los dominios SH2 y SH3 interactúan con otras proteínas. Estos dominios tienen la capacidad de ensamblarse en una estructura autoinhibitoria, donde SH2 y SH3 actúan como un seguro que mantiene a la cinasa inactiva. En la isoforma 1b el grupo miristosilo actúa como un gancho en el seguro formado. En la región carboxilo hay cuatro sitios de unión a SH3 ricos en prolina (PP), tres señales de localización nuclear (NLS), una señal de exportación nuclear (NES), un dominio de unión a DNA (DBD), y un dominio de unión a actina (ABD). Este dominio de unión a actina contiene sitios de unión para formas de actina filamentosas y monoméricas (fig. 1.4).<sup>7,14</sup>

En la célula, la proteína ABL se encuentra tanto en el núcleo como en el citoplasma y tiene la capacidad de pasar entre ambos compartimentos. La proteína se relaciona con la señalización de factores de crecimiento y receptores de adhesión de la superficie celular para regular la estructura del citoesqueleto, con la regulación

del ciclo celular, la respuesta al estrés genotóxico y la transmisión de información acerca del ambiente extracelular a través de la señalización de integrinas.<sup>7,14</sup>

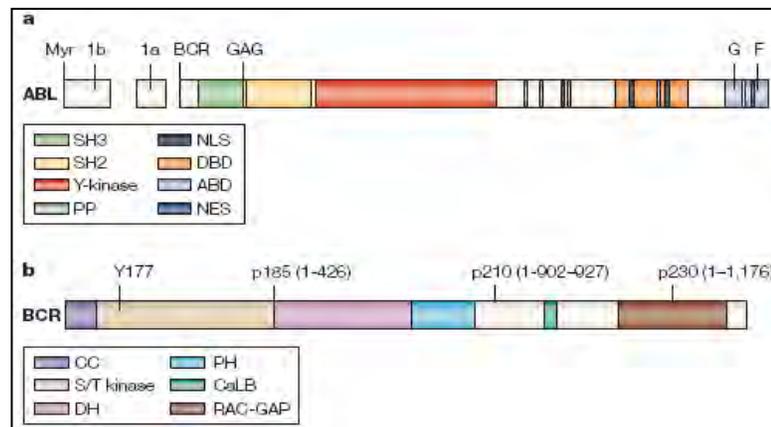


Fig. 1.4. Esquema de las proteínas ABL y BCR con sus diferentes dominios y los sitios de ruptura en los diferentes genes de fusión **BCR-ABL**.<sup>7</sup>

### 1.4.2. BCR.

El gen **BCR** se encuentra en el cromosoma 22, codifica para una proteína de 160 kd la cual se expresa constitutivamente y codifica para una cinasa de serina-treonina. En el extremo amino se encuentra un dominio de oligomerización cola-coleada (CC) que permite la formación de dímeros o tetrámeros *in vivo*. El centro de la molécula contiene un dominio homólogo al factor de intercambio de nucleótido de guanina Dbp/CDC24 (DH) y un homólogo de *plestrina*. También tiene un sitio de unión a lípidos dependiente de calcio (CaLB) y en el extremo carboxilo un dominio RAC-GAP. La proteína BCR puede fosforilarse en varios residuos de tirosina, especialmente en el residuo de tirosina 177 (Y177) el cual se une a la proteína de unión al receptor de factor de crecimiento (**GRB2**), que es una molécula

adaptadora importante implicada en la activación de la vía de transducción de señales de *RAS* (fig. 1.4).<sup>7,14</sup>

### **1.4.3. BCR-ABL.**

La fusión de los genes *ABL* y *BCR*, ocurre mediante la **yuxtaposición de la secuencia 3' del protooncogen *ABL* con la secuencia 5' del gen *BCR***. De esta fusión se origina un mRNA quimérico y la síntesis de la proteína quimérica, una cinasa de tirosina con incremento en su actividad.<sup>18</sup>

Los puntos de ruptura en el gen *ABL* pueden ocurrir tanto corriente arriba del exón 1b, como corriente abajo del exón 2b o con más frecuencia entre ambos. En el transcrito híbrido de la molécula de RNA mensajero, el gen *BCR* se fusiona con el exón a2 del gen *ABL*, los puntos de ruptura de *BCR* pueden ser tres diferentes. La mayoría de los pacientes con LMC y un tercio de los pacientes con LLA Ph+ presentan la ruptura en un área de 5.8 kb abarcando los exones b1 a b5, conocida como la región mayor de ruptura (*M-bcr*); a causa de un procesamiento alternativo, los transcritos formados pueden ser b2a2 ó b3a2, dando como resultado una proteína de 210 kd (p210). En los pacientes con LLA Ph+ y en casos raros de LMC caracterizados por monocitosis prominente, la ruptura de *BCR* se da en una región de **54.4 kb entre los exones e2' y e2, llamada región menor de ruptura (*m-bcr*)**, el mRNA resultante es e1a2 o e1a3, el cual se traduce a una proteína de 190 kd (p190). Un tercer punto de ruptura se da en la región micro de ruptura en el exón 19, originando el transcrito e19a2 y una proteína de 230 kd (p230), la cual se asocia con la leucemia neutrofílica crónica Ph+ (fig. 1.5).<sup>10,14,15</sup>

La heterogeneidad en los diferentes puntos de ruptura nos indica que en la proteína quimérica la parte *ABL* generalmente es constante mientras que la parte *BCR* no; de estas observaciones se deduce que *ABL* es el gen que lleva el principio transformante y los diferentes tamaños de la secuencia de *BCR* dictan el fenotipo de la enfermedad.<sup>14</sup>

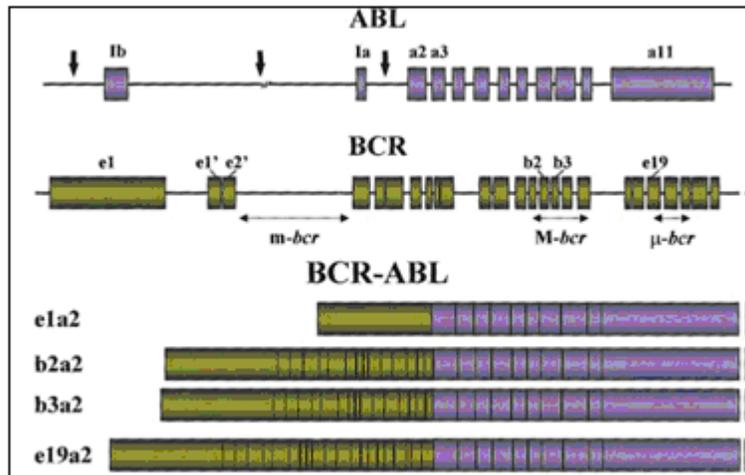


Fig. 1.5. Esquema de los genes *ABL* y *BCR* donde se indican los puntos de ruptura *M-bcr*, *m-bcr* y *μ-bcr* y sus respectivas proteínas quiméricas.<sup>14</sup>

El mecanismo por el que el cromosoma Ph se forma y el tiempo que requiere para la progresión de la enfermedad se desconoce; se ha propuesto que la proximidad de los genes *BCR* y *ABL* en interfase favorece la traslocación. La proteína quimérica se encuentra en el citoplasma y la principal razón de que sea retenida ahí es la activación constitutiva de la cinasa de tirosina, sin embargo se ha observado que en ciertos casos es capaz de entrar al núcleo por la exposición a agentes genotóxicos.<sup>9,14,18</sup>

La proteína BCR-ABL fosforila varios sustratos, por lo que activa múltiples cascadas de señalización que afectan el crecimiento y diferenciación de las células mieloides principalmente. Algunos de los sustratos son *CRKL*, p62Dok, paxilina, *CBL* que activa vías de *RAS*, *RAF*, *PI3K*, *JUN*, *MYC* y *STAT*.<sup>14</sup>

#### **1.4.3.1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE *BCR-ABL*.**

Existen tres principales mecanismos que han sido implicados en la transformación celular de *BCR-ABL*, éstos son la alteración de la adhesión de células a la médula ósea, la activación constitutiva de la división mitótica y la disminución de la apoptosis, los cuales son modificados por *BCR-ABL* mediante distintos cambios en su cascada de señalización.<sup>14</sup>

La proteína quimérica forma dímeros o tetrámeros unidos mediante su dominio CC y se autofosforila en el residuo de tirosina 177 (Y177). Esta acción genera un sitio de alta afinidad para la proteína GRB2, la cual por medio de su unión con SOS activa la vía de Ras, y por medio de la unión con GAB2, la cual es fosforilada por *BCR-ABL*, activa la vía de PI3K, ambas vías llevan a la disminución de la adhesión celular en la médula ósea y favorecen su migración, al mismo tiempo provocan un aumento en la proliferación celular y en la supervivencia de las células.<sup>7,14</sup>

*BCR-ABL* también regula negativamente a ICSBP, JUNB y SIPA1, provocando el aumento en la proliferación y supervivencia celular. ICSBP regula negativamente la proliferación y supervivencia de células mieloides mediante la diferenciación de monocitos. JUNB

inhibe la proliferación y supervivencia celular, en parte por un antagonismo con la vía de Ras. Y SIPA1 mantiene a RAP1 inactivo, lo que impide la interacción de BRAF con la vía de Ras, impidiendo así la proliferación y supervivencia celular. Las proteínas adaptadoras CRKL y SHC también pueden mediar la activación de la vía de Ras; Ras y la ruta de MAPK son acoplados por Raf, el cual cataliza la fosforilación de MEK1 y MEK2 activándolos (fig. 1.6).<sup>7,25</sup>

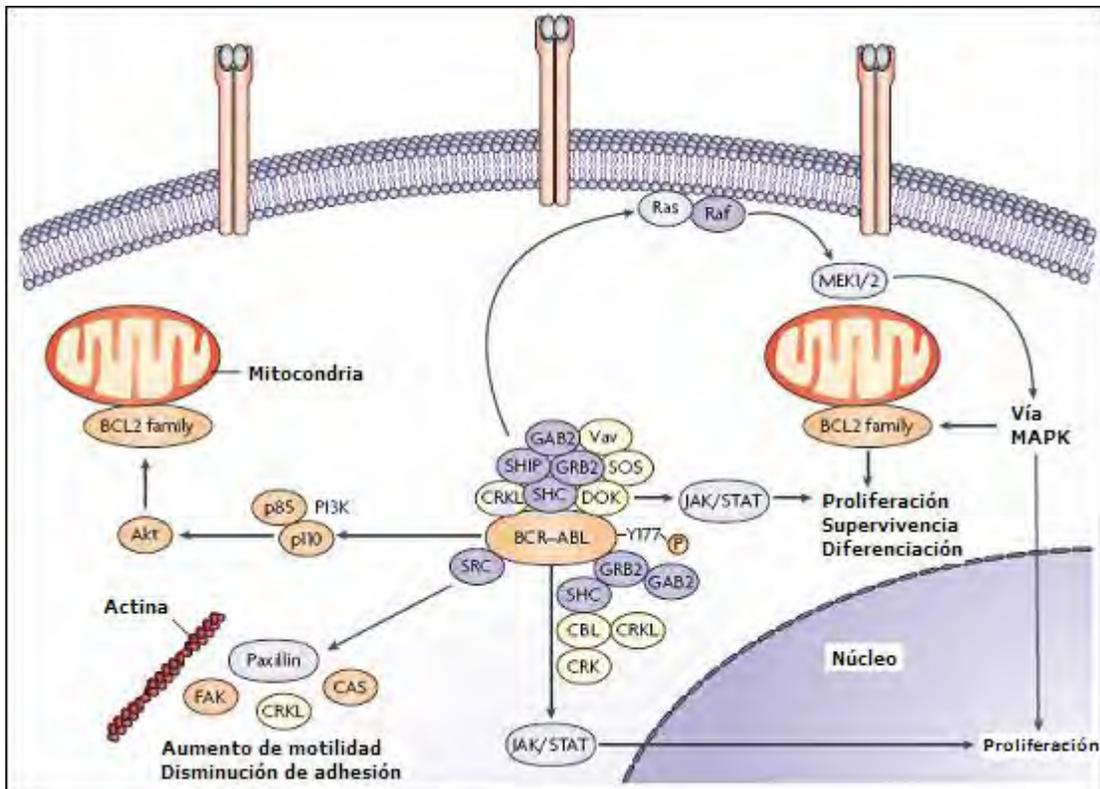


Fig. 1.6. Cascada de señalización de la proteína BCR-ABL en la célula.<sup>25</sup>

*BCR-ABL* se asocia con componentes de adhesión celular, como actina, paxilina y FAK, la activación de CRKL-FAK-PYK2 lleva a una disminución en la adhesión celular. *BCR-ABL* activa rutas que llevan a

una respuesta atípica de factores quimiotácticos, los cuales llevan a un aumento en la migración celular (fig. 1.6).<sup>25</sup>

*BCR-ABL* se asocia con proteínas de supervivencia que interactúan con la familia de BCL2 y también se asocia con la cinasa Janus y la ruta de JAK-STAT, todas estas proteínas aumentan la proliferación y supervivencia celular (fig. 1.6).<sup>25</sup>

#### **1.4.4. RT-PCR.**

Para el diagnóstico de la LMC lo más accesible es realizar un estudio de citogenética en médula ósea y una RT-PCR (transcriptasa reversa acoplada a reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés) en médula ósea o sangre periférica. El primer estudio identifica el cromosoma Filadelfia y alteraciones secundarias y el segundo estudio la presencia de los genes de fusión y la determinación del tipo de ruptura que presente el paciente. Para el monitoreo de los pacientes se realizan estudios de citogenética y RT-PCR durante el tratamiento, en etapas tempranas es útil para observar la respuesta al tratamiento y de esta manera poder cambiar o ajustar la dosis de tratamiento al paciente. Para la detección de enfermedad mínima residual, la RT-PCR es la técnica más sensible, pues llega a detectar 1 célula leucémica en  $10^4$ - $10^6$  células normales.<sup>19</sup>

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fue diseñada por Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993; esta técnica tiene como objetivo la amplificación directa de un segmento de un gen a partir de una muestra de DNA. La técnica de

RT-PCR, amplifica a partir de muestras de cDNA, utilizando previamente una reacción de transcriptasa reversa. La técnica de RT-PCR es el resultado de la aplicación práctica de tres conceptos: síntesis de cDNA, desnaturalización, hibridación específica con oligonucleótidos y replicación por una DNA polimerasa.<sup>26,27</sup>

Una gran ventaja de esta técnica es su habilidad para determinar específicamente los tipos de genes fusionados que codifican para las proteínas p190 ó p210.<sup>17,19</sup>

Otra variante de la RT-PCR es la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RQ-PCR) para cuantificar el gen en estudio. Cuando se monitorea en tiempo real, existe un incremento en una señal de fluorescencia mientras la polimerización se lleva a cabo, los productos de PCR pueden ser verificados por la fluorescencia generando una curva de fusión del amplicón en función de la temperatura, la cual detecta la traslocación **BCR-ABL** a nivel de RNA utilizando sondas de DNA amplificado y permite determinar el cociente entre los transcritos **BCR-ABL/ABL**. Los niveles de **BCR-ABL** en la sangre se pueden correlacionar con el resultado del estudio citogenético y su determinación temprana predice la subsecuente respuesta citogenética. Sin embargo, las respuestas moleculares completas, es decir la nula detección de **BCR-ABL** por RQ-PCR, no son frecuentes.<sup>17,39</sup>

Es importante mencionar que los transcritos de **BCR-ABL** han sido detectados a muy bajas concentraciones en personas sanas, la mayoría de ellas sin presentar síntomas de la enfermedad. Sin embargo, cuando se realizan determinaciones periódicas en estos

individuos, se observa que estos niveles no se incrementan lo cual indica que se trata de falsos positivos relacionados con la especificidad y sensibilidad de la técnica de RQ-PCR.<sup>5,9</sup>

Para el seguimiento de los tratamientos se utiliza el término de respuesta molecular, el cual se refiere al número de transcritos **BCR-ABL** residuales determinados por RT-PCR. Una respuesta molecular completa (RMC) se da cuando la presencia de los transcritos no es detectable por esta técnica y la respuesta molecular mayor (RMM) se da cuando el número de transcritos **BCR/ABL** con respecto a un gen control normal es menor o igual a 0.1%.<sup>17,19</sup>

## **1.5. TRATAMIENTO.**

El objetivo principal del tratamiento es citoreducir la cantidad de leucocitos en la médula ósea. Existen diversos tratamientos para los pacientes con LMC, inicialmente se utilizaba la quimioterapia oral administrando busulfán o hidroxiurea, sin embargo este tipo de tratamiento sólo lograba una remisión hematológica. A principios de la década de los **90's** se comenzó a utilizar el interferón alfa, el cual consigue un aumento en la sobrevida de los pacientes, mejora considerablemente su calidad de vida y alcanza una respuesta citogenética mayor. Pero, fue a principios del siglo XXI cuando se sintetizó el mesilato de imatinib, el cual logra desaparecer al cromosoma Ph y actualmente se utiliza como tratamiento de primera línea para los pacientes con LMC. Sin embargo, la mejor opción sigue siendo el trasplante alogénico de médula ósea, el cual es considerado el único tratamiento capaz de curar la LMC, aunque por las complicaciones es considerado la opción de cuarta línea para adultos con LMC.<sup>6</sup>

### **1.5.1. QUIMIOTERAPIA ORAL.**

#### **1.5.1.1. BUSULFÁN.**

El busulfán fue introducido en la década de los 50, es una agente alquilante que actúa inhibiendo la síntesis de DNA, ejerce su efecto principalmente a nivel de la célula madre. Al parecer la acción citotóxica no abarca los tejidos linfoides ni el epitelio gastrointestinal. El busulfán se administra usualmente en cursos o bien en forma continua; las dosis se ajustan individualmente a cada paciente y se

mantiene una estrecha supervisión clínica y control hematológico. Con dosis altas también puede haber supresión de plaquetas, elementos eritroides, y en algunos pacientes surge pancitopenia intensa y duradera. Debe realizarse un monitoreo cuidadoso del recuento leucocitario. Se observa remisión clínica en 85% - 98% de los pacientes después del primer ciclo de tratamiento y produce remisiones largas definidas por el control de leucocitosis, trombocitosis y reducción de síntomas. El descenso de leucocitos se observa entre los 10 y 14 días de iniciado el tratamiento, la respuesta plaquetaria sigue dentro de las 2 a 6 semanas y la regresión de la esplenomegalia toma varios meses. Se obtienen periodos largos de control hematológico, pero persiste la clona maligna Ph+, por lo que se considera que no alcanza una remisión auténtica. Los efectos tóxicos dependen de sus propiedades mielosupresoras, las células de la médula pocas veces regresan a la normalidad. Se han señalado casos ocasionales de náuseas, vómito, diarrea, impotencia o esterilidad, malformaciones fetales y amenorrea; además el busulfán es leucemógeno.<sup>6,22,29</sup>

### **1.5.1.2. HIDROXIUREA (HDX).**

La hidroxiurea fue introducida en la década de los 70. Inhibe específicamente la síntesis de DNA actuando sobre la enzima ribonucleótido reductasa, requerida para la síntesis de deoxiribonucleótidos. Actúa en la fase S del ciclo celular deteniéndolo en la interfase G1-S. La dosis diaria recomendada es de 50 mg/kg de peso en dosis divididas hasta la disminución de la cuenta de leucocitos, una vez conseguida, la dosis diaria disminuye hasta 20 mg/kg de peso; el mantenimiento de esta dosis controla el nivel de leucocitos y

minimiza los eventos adversos. La reducción de glóbulos blancos es rápida y no produce supresión prolongada en médula ósea y cuando se sobredosifica tiende a recuperarse rápidamente, este tratamiento debe mantenerse de forma continua, lo que logra una remisión hematológica, pero no citogenética. Su toxicidad es menor que la del busulfán; y su principal efecto tóxico es la depresión hematopoyética que incluye la leucopenia, anemia megaloblástica y a veces trombocitopenia. Otras reacciones adversas son perturbaciones gastrointestinales y reacciones dermatológicas leves; con menor frecuencia se observan estomatitis, alopecia y manifestaciones neurológicas.<sup>6,22</sup>

### **1.5.2. INTERFERÓN (INF).**

Los interferones constituyen un grupo de glicoproteínas sintetizadas por células eucariontes como respuesta a una amplia gama de estímulos que incluyen células extrañas al organismo, células malignas, antígenos virales y bacterianos. Poseen actividad biológica pleiotrópica, entre las que se incluyen un efecto antiproliferativo, inmunomodulador, antiviral e inductor de la diferenciación. Los INF humanos se clasifican en función de sus diferentes fuentes de producción, secuencias de aminoácidos, propiedades bioquímicas y antigénicas en tres grupos: interferón-alfa ( $\text{INF}\alpha$ ), interferón-beta ( $\text{INF}\beta$ ) e interferón-gama ( $\text{INF}\gamma$ ). Se dividen en dos clases principales: la clase I agrupa al  $\text{INF}\alpha$  e  $\text{INF}\beta$ , cuyos genes se localizan en el cromosoma 9 y poseen una homología de 25% en aminoácidos, son estables en medio ácido, comparten un receptor común y son sintetizados por leucocitos y fibroblastos respectivamente. La clase II o  $\text{INF}\gamma$ , es lábil en medio ácido, es una

molécula estructuralmente diferente a las anteriores, con un receptor específico, producido por linfocitos T y cuyo gen se localiza en el cromosoma 6.<sup>22,29</sup>

Los INF fueron las primeras citocinas aprobadas para uso clínico. Se utilizan en el tratamiento de enfermedades virales y en un amplio número de tumores sólidos (carcinoma renal, sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, etc.) y neoplasias hematológicas (LMC, linfoma nodular, mieloma múltiple, etc.). El mecanismo antitumoral puede estar mediado por su actividad citostática directa (reducción de la proliferación celular) mediante la modulación de oncogenes, deben ser directamente citotóxicos llevando a la lisis celular o producir su efecto antitumoral indirectamente por modulación de la respuesta inmune, provoca la reducción de angiogénesis inducida por tumores y la inducción a la diferenciación de células neoplásicas. En la LMC el INF $\alpha$  tiene un efecto selectivo sobre células leucémicas, llevando a la supresión parcial de la clona Ph+. Lo cual lleva a la mayor duración de la fase crónica, que ayuda a la desaparición de los síntomas modificando su curso natural. La dosis recomendada es de 3-5 mU/m<sup>2</sup> al día, el tratamiento se inicia a dosis bajas y es escalonado hasta obtener la dosis recomendada. Se ha documentado que proporciona una remisión hematológica en 70-80% de los casos y una respuesta citogenética mayor en 10-30% de los pacientes tratados. Con la adición de citarabina se obtiene un mayor porcentaje de pacientes con remisión citogenética mayor, de 18-24% a 28-41%. El INF provee un alargamiento de la fase crónica y una buena calidad de vida, sin embargo, su utilización implica un gran costo.<sup>6,20,22</sup>

### **1.5.3. TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE MÉDULA ÓSEA.**

El objetivo del tratamiento con transplante de médula ósea (TMO) es la destrucción completa de las células neoplásicas por quimioterapia intensiva y el posterior restablecimiento de la función medular utilizando una médula ósea normal. Existen tres tipos de transplante: singénico, alogénico y autólogo. El transplante singénico es aquel en el que el donante y el receptor son genéticamente idénticos; el transplante alogénico es aquel en el que el donante y el receptor tienen origen genético diferente y el transplante autólogo es cuando se administra quimioterapia o radioterapia para eliminar las células leucémicas de médula ósea del paciente y la reposición de la propia médula del paciente previamente tratada para eliminar las células leucémicas. En la LMC la única opción curativa es el transplante alogénico, aunque se asocia con una mortalidad sustancial y morbilidad potencial entre aquéllos que sobreviven largos periodos.<sup>12,22</sup>

El TMO alogénico consiste en la curación de la enfermedad mediante la destrucción de la médula ósea leucémica a través del empleo de dosis letales de tratamiento quimioterapéutico, seguido de la recuperación de la hematopoyesis a partir de células normales del donante con HLA idéntico o lo más parecido posible al receptor. Se ha observado que dosis altas de quimioterapia con busulfán y ciclofosfamida seguidos del transplante alogénico de médula ósea es curativo en fase crónica. Sin embargo, el transplante únicamente se realiza para adultos menores de 55 años con donadores compatibles en el sistema HLA y sólo un 15-20% son candidatos. De los pacientes con transplante, un 60% tiene supervivencia prolongada sin afección

y parecen estar curados, obteniendo los mejores resultados en personas menores de 40 años de edad. El momento óptimo para el trasplante es en la primera remisión en fase crónica, debido a que los pacientes responden adecuadamente a la terapia de acondicionamiento que erradica la clona leucémica, permite a las células tallo normales transplantadas repoblar la médula ósea del paciente. En los casos donde hay recaída post-TMO, ésta puede ser atribuida a una clona leucémica que ha sobrevivido al régimen de acondicionamiento la cual se reactiva y expande.<sup>6,11,22</sup>

#### **1.5.4. INHIBIDORES DE CINASAS.**

##### **1.5.4.1. PRIMERA GENERACIÓN.**

###### **1.5.4.1.1. MESILATO DE IMATINIB (GLIVEC).**

El mesilato de imatinib es un inhibidor de cinasas de tirosina (fig. 1.7), especialmente de las proteínas ABL o relacionadas, del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*PDGFR*) y del receptor KIT. Está indicado como tratamiento de primera línea en pacientes con diagnóstico reciente de leucemia mieloide crónica y para pacientes con LMC en crisis blástica, en fase acelerada o en fase crónica. En general, se recomienda este tratamiento como inicial para estos pacientes, siendo el trasplante alogénico de médula ósea reservado para aquellos pacientes que no respondan al tratamiento o sean intolerantes. Algunas excepciones serían los niños y adolescentes que tengan un donador compatible, en cuyo caso la muerte asociada al trasplante es de 10-15%. También está indicado

para el tratamiento de los pacientes adultos con tumores malignos del estroma gastrointestinal (TEGI) irresecables o metastásicos.<sup>9,13,29</sup>

La eficacia del imatinib fue demostrada en el proyecto IRIS (*Internacional Randomized Study of Interferon and STI571*), en el cual se llevó a cabo la comparación de imatinib 400 mg contra  $\text{INF}\alpha$  con citarabina. Después de 19 meses, se encontró que el imatinib fue significativamente mejor que el  $\text{INF}\alpha$ , obteniéndose una respuesta hematológica completa en 95% contra 56% de los pacientes y una respuesta citogenética mayor en 85% contra 22% de los pacientes.<sup>15,31</sup>

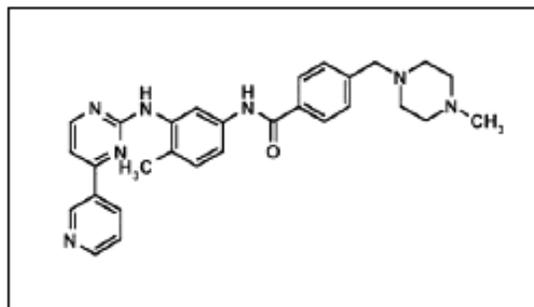


Fig. 1.7. Estructura química del mesilato de imatinib.<sup>30</sup>

La dosis prescrita debe ser administrada vía oral con bastante agua durante una comida y es de 400 mg una sola vez al día para la fase crónica, mientras que la dosis diaria de 800 mg se aplica en dos tomas de 400 mg, con el desayuno y la cena. La dosis recomendada para pacientes con LMC en fase acelerada o crisis blástica es de 600-800 mg/día. El tratamiento debe administrarse durante todo el tiempo que el paciente continúe presentando beneficio. El aumento de la dosis de 400 a 600 u 800 mg en pacientes con enfermedad en fase crónica o de 600 mg a un máximo de 800 mg diariamente en

pacientes en fase acelerada o crisis blástica, puede considerarse ante la ausencia de reacciones medicamentosas adversas severas y neutrocitopenia no relacionada con leucemia severa o trombocitopenia en las siguientes circunstancias: progresión de la enfermedad (en cualquier momento); fracaso para alcanzar una respuesta hematológica satisfactoria después de por lo menos 3 meses de tratamiento, imposibilidad para obtener una respuesta citogenética después de 12 meses de tratamiento, o pérdida de una respuesta hematológica o citogenética previamente alcanzada.<sup>29,32,33</sup>

Las células con el rearrreglo **BCR-ABL** se pueden agrupar basándose en su sensibilidad al mesilato de imatinib. Se dividen en sensibles, cuando su IC<sub>50</sub> es menor o igual a 1000 nM; en sensibilidad intermedia, cuando su IC<sub>50</sub> es menor o igual a 3000 nM; y en insensible, cuando IC<sub>50</sub> es mayor a 3000 nM.<sup>43</sup>

El mecanismo de acción del mesilato de imatinib es por la unión del fármaco, mediante puentes de hidrógeno e interacciones de Van der Waals, a la proteína BCR-ABL en el dominio cinasa de su conformación inactiva. De esta manera bloquea parcialmente el sitio de unión del ATP y estabiliza a la molécula en su forma inactiva (fig. 1.8). La vía de transducción de señales queda, por lo tanto, bloqueada ya que la transferencia del fosfato del ATP es evitada. La fosforilación de proteínas en las vías de transducción de señales tiene un papel crítico en varios procesos biológicos, incluyendo crecimiento celular, diferenciación y apoptosis. El tratamiento con imatinib lleva a un arresto en el crecimiento y favorece la apoptosis de células que expresan **BCR-ABL**.<sup>31,34,44</sup>

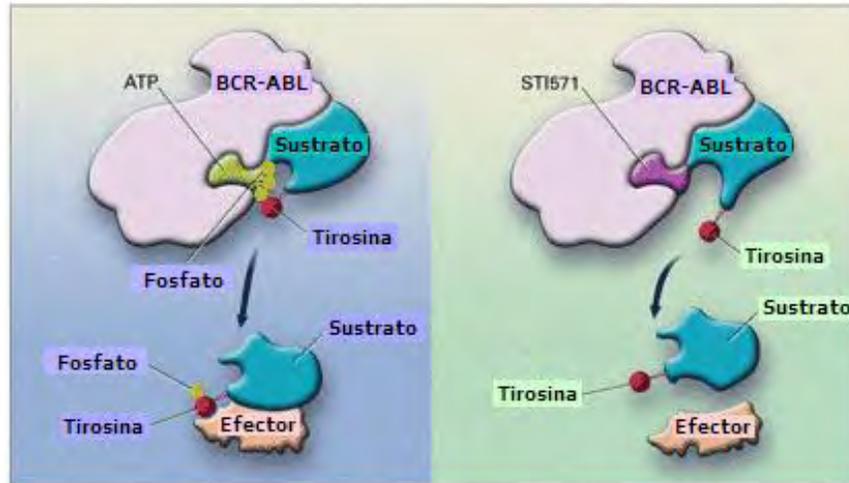


Fig. 1.8. Imagen del mecanismo de acción del imatinib, donde éste se une a la proteína para evitar la fosforilación de su sustrato.<sup>50</sup>

#### 1.5.4.2. SEGUNDA GENERACIÓN.

En los inhibidores de cinasa de segunda generación se incluyen moléculas cuyo blanco es la integridad y/o estabilidad de la proteína BCR-ABL, así como sus vías de señalización necesarias para la transformación maligna de la célula.<sup>25</sup>

##### 1.5.4.2.1. DASATINIB (SPRYCEL).

El dasatinib es un inhibidor de las cinasas pertenecientes a la familia SRC y un potente inhibidor de la cinasa *BCR-ABL*, así como también de *KIT*, *PDGFR* y el receptor de efrina-cinasa de tirosina. Se utiliza para el tratamiento de la LMC en todas las fases en adultos que presentan resistencia o intolerancia al tratamiento con imatinib, y es la primera opción en pacientes con LLA Ph+. Es aproximadamente 300 veces más afín que el imatinib a BCR-ABL, sin embargo, entre los efectos secundarios suele presentar mielosupresión y derrame pleural.

Se administra dos veces al día con una dosis de 70 mg y entre sus efectos adversos están la retención de fluídos, neutropenia, mielosupresión, trombocitopenia, diarrea y dolor de cabeza.<sup>25,31,36,37,38,39</sup>

Inhibe la actividad de *BCR-ABL* mediante su unión al dominio cinasa de *ABL* en su conformación tanto activa como inactiva, pero no induce la muerte en células quiescentes. Es eficaz independientemente de la existencia de mutaciones presentes en la proteína que impiden la acción del imatinib, con excepción de la mutación T315I.<sup>36,38,39</sup>

#### **1.5.4.2.2. NILOTINIB (TASIGNA).**

El nilotinib es una molécula análoga al imatinib, sintetizado mediante el diseño racional de fármacos. Es 20 veces más afín a *BCR-ABL* y menos afín a *KIT* y *PDGFR* que el imatinib, lo cual lo hace 30 veces más potente. También actúa como inhibidor de las cinasas *ARG* y *EPHB4*. Actúa en la conformación inactiva de la proteína y es eficaz a pesar de las mutaciones que impiden la acción del imatinib, con excepción de la mutación T315I. Esta indicado en los casos de resistencia o intolerancia al imatinib y en la fase blástica de la LMC.<sup>25,35,36,38</sup>

#### **1.5.4.3. TERCERA GENERACIÓN.**

Actualmente se encuentran en estudio nuevos fármacos inhibidores de cinasa, los cuales actúan sobre diversos blancos en la

cascada de señalización. Algunos de los nuevos fármacos intentan superar la resistencia provocada a causa de la mutación T315I.<sup>25</sup>

El **bosutinib** es un inhibidor de cinasas pertenecientes a la familia SRC, que se utiliza para el tratamiento de tumores sólidos y también tiene como blanco a **BCR-ABL**. Inhibe la fosforilación de las proteínas y por lo tanto la proliferación celular, y es eficaz para pacientes con LLA Ph+. No inhibe a **KIT** ni a **PDGFR** y no es capaz de superar la mutación T315I. **MK-0457** es un inhibidor competitivo de ATP que actúa sobre la cinasa aurora. Inhibe la actividad de **BCR-ABL** y la proliferación *in vitro* de células con la mutación T315I. Otro compuesto en estudios es **ON012380**, el cual es un agente que no tiene como blanco el sitio de unión a ATP, y también ha demostrado actividad contra las células con la mutación T315I, tanto *in vitro* como *in vivo*.<sup>25,31,38</sup>

## **1.6. RESISTENCIA AL MESILATO DE IMATINIB.**

A pesar de la eficacia y seguridad del tratamiento con mesilato de imatinib, la resistencia o recaída ocurre en cierto número de pacientes, sobretodo en aquéllos que se encuentran en fase acelerada o crisis blástica. Las recaídas ocurren en casi todos los pacientes en crisis blástica y en aproximadamente de 15 a 20% de pacientes en fase crónica durante los primeros 2 a 3 años de tratamiento, pero son significativamente menos frecuentes en pacientes con remisión citogenética completa.<sup>34,38</sup>

Existen dos tipos de resistencia: la resistencia primaria y la resistencia adquirida o secundaria, que dependen de la fase en la que se encuentre el paciente. La resistencia primaria se da cuando no hay respuesta hematológica al imatinib. La resistencia secundaria o adquirida se da cuando al inicio del tratamiento hay una respuesta hematológica y/o citogenética, pero con el paso del tiempo dicha respuesta se pierde.<sup>44</sup>

Se han propuesto diversas hipótesis acerca del desarrollo de la resistencia (fig. 1.9), que se sugiere es multifactorial. Los mecanismos propuestos se pueden dividir en aquéllos donde el blanco terapéutico *BCR-ABL* podría ser efectivo y aquéllos donde *BCR-ABL* no es efectivo. Dentro de la primera categoría se propone un aumento en el flujo del fármaco causado por las bombas de membrana por diversos transportadores, especialmente por polimorfismos en el transportador de cationes orgánico humano 1 (hOCT1, por sus siglas en inglés) y la sobreexpresión de la ATPasa ABCB1, ambos tienen como sustrato al imatinib; también puede haber una amplificación de

*BCR-ABL* ya sea por un aumento en los transcritos de *BCR-ABL* por amplificación génica o por una baja concentración del fármaco incapaz de terminar con la actividad de la cinasa; y por último, la causa más frecuente es por mutaciones puntuales. En la segunda categoría, puede haber protección del microambiente de la médula ósea, la **presencia de células quiescentes que forman una "reserva", o por una** independencia de la célula de *BCR-ABL*, es decir que la célula no necesite de la señalización de *BCR-ABL* para sobrevivir, especialmente debido a los cambios genéticos que se presentan en la crisis blástica. En esta segunda categoría los inhibidores de cinasa serían poco efectivos.<sup>9,38,40,41</sup>

La resistencia también se puede dar por variaciones en la biodisponibilidad, ya que el imatinib es un fármaco de administración oral puede haber alteraciones en su absorción, metabolismo (distintas concentraciones de la enzima CYP3A4 que metaboliza al imatinib) y unión a proteínas, también se ve afectado por inactivación enzimática. En cuanto a la unión a proteínas, estudios de farmacodinamia *in vitro* sugieren que la expresión de la glicoproteína P, que se encarga de generar la resistencia a múltiples agentes antineoplásicos, y la enzima alfa-glicoproteína ácida (AGP), pueden favorecer la resistencia por su unión con imatinib; sin embargo esto todavía es muy debatido.<sup>17,41,44</sup>

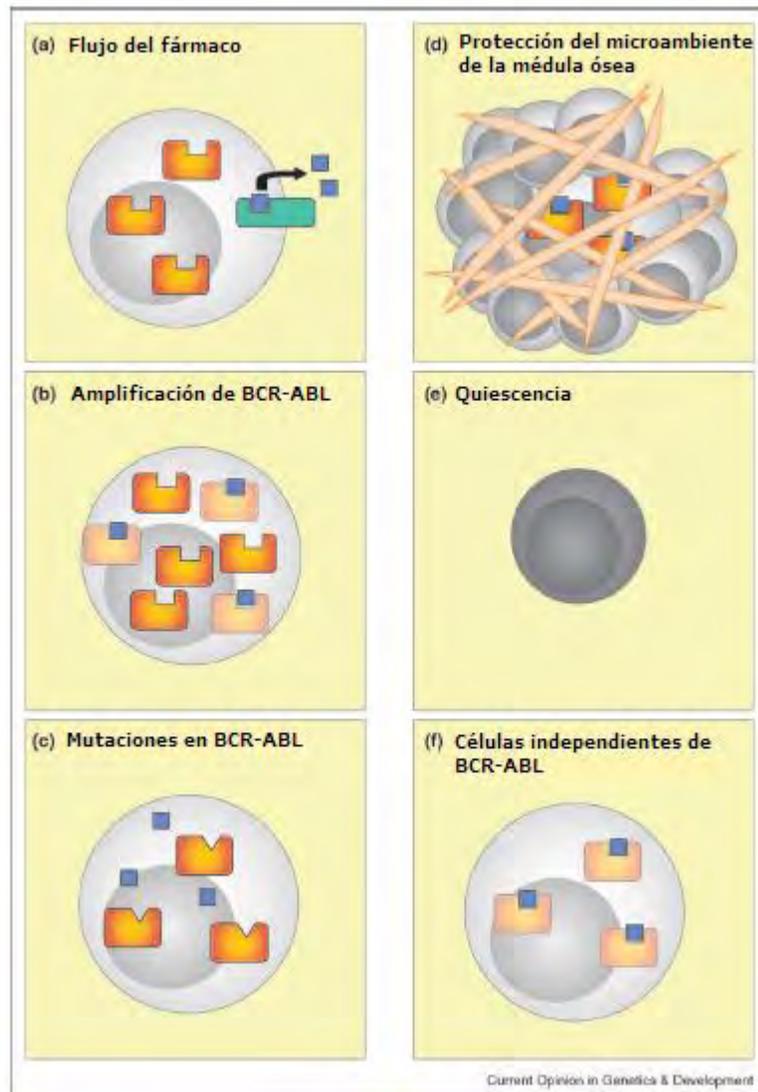


Fig. 1.9. Mecanismos potenciales que desarrollan la resistencia al imatinib, en naranja se muestra a *BCR-ABL*; en azul se muestra al mesilato de imatinib. (a) Un aumento en el flujo del fármaco a causa de los transportadores en la membrana. (b) Un aumento en los transcritos de *BCR-ABL* por amplificación génica, lo que provoca que la concentración del inhibidor sea insuficiente. (c) Mutaciones en *BCR-ABL* haciendo a las células insensibles al tratamiento. (d) Protección del microambiente de la médula ósea. (e) Presencia de células quiescentes *BCR-ABL* positivas. (f) Independencia de las células de *BCR-ABL*, por lo que no necesite de la señalización para sobrevivir.<sup>38</sup>

### 1.6.1. MUTUACIONES PUNTUALES.

En la práctica clínica la causa más frecuente de resistencia al imatinib es la presencia de mutaciones puntuales en el dominio cinasa de *BCR-ABL*, siendo de un 60 a 90% de los pacientes que presentan resistencia. Sin embargo, en un estudio *in vitro* se encontró que la sobreexpresión de *BCR-ABL* es la causa más frecuente de resistencia identificada en líneas celulares, una posible explicación a esta diferencia es que la sobreexpresión es dañina para la célula, por lo que su viabilidad y proliferación disminuye.<sup>34,41,45</sup>

Se han descrito más de 100 mutaciones puntuales (fig. 1.10), las cuales provocan el cambio de aminoácidos, capaces de modificar la conformación de la proteína o de afectar puntos de contacto críticos, y así evitar que el imatinib se una a la proteína. La mayoría de las mutaciones caen en 4 regiones principales del dominio cinasa: el loop de unión a fosfato para ATP (P-loop), el sitio de contacto, el sitio de unión SH<sub>2</sub> (loop de activación) y el dominio catalítico.<sup>34,41,43,44</sup>

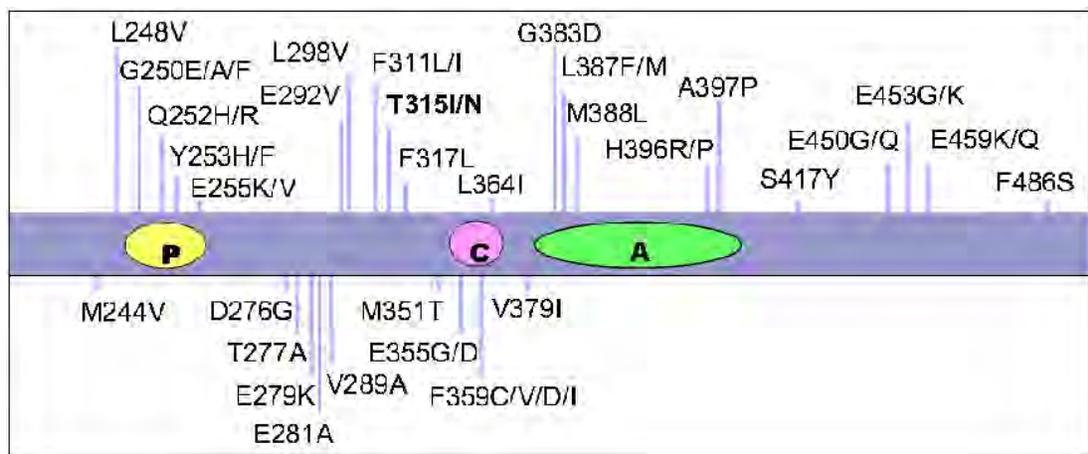


Fig. 1.10. Esquema de la proteína ABL dónde se muestran algunas mutaciones en el dominio cinasa.<sup>51</sup>

Aproximadamente 85% de las mutaciones están asociadas con sustitución de aminoácidos en sólo 7 residuos: en P-loop están M244V, G250E, Y253F/H y E255K/V; en el sitio de contacto está T315I; y en el dominio catalítico están M351T y F359V. La región con mutaciones más frecuente es P-loop (que abarca del residuo 244 al 255), con 36 a 48% del total de las mutaciones.<sup>43,44</sup>

Las diferentes mutaciones llevan a diferentes niveles de resistencia, lo cual influye en el fenotipo de la enfermedad; por ejemplo las mutaciones localizadas en el P-loop indican un mal pronóstico. El nivel de resistencia también varía dependiendo de las diferentes sustituciones de aminoácidos en el mismo residuo y ciertas mutaciones parecen ocurrir más frecuente en diferentes fases de la enfermedad. Las diferentes mutaciones requieren diferentes estrategias, tales como escalar la dosis del fármaco para la resistencia moderada, terapia combinada o transplante de médula ósea para la alta resistencia y en algunos casos el cese de imatinib es útil. En pacientes LLA Ph+, una vez que se desarrolla la resistencia el curso de la enfermedad generalmente es rápido y agresivo.<sup>9,13,15,41</sup>

Una de las mutaciones puntuales más importantes es la mutación T315I, ya que confiere resistencia completa frente a todos los inhibidores de cinasa disponibles, es de mal pronóstico y corresponde del 10% al 15% de todas las mutaciones clínicamente observables. La mutación T315I se encuentra en un sitio crítico para la unión del fármaco, elimina un enlace de hidrógeno crucial para la unión al imatinib y altera la conformación del sitio de unión del ATP.<sup>38</sup>

Actualmente, una gran incógnita es el momento de la aparición de las mutaciones, todavía no es seguro si están presentes antes de que la resistencia se presente clínicamente o aparecen durante el curso de la enfermedad. Se cree que las mutaciones se encuentran en una baja concentración antes de la aparición de la resistencia y estas células mutadas van proliferando sobre las demás células hasta que alcanzan una concentración suficiente para crear la resistencia clínica.<sup>44</sup>

La resistencia no es exclusiva del mesilato de imatinib, otros inhibidores de cinasa han presentado mecanismos similares, por lo que es probable que esta resistencia adquirida sea común en la terapia dirigida.<sup>38</sup>

## **OBJETIVOS**

- Implementar la metodología para la detección de mutaciones por secuenciación directa en muestras de pacientes con LMC.
- Identificar las mutaciones presentes en el dominio cinasa del gen quimérico *BCR-ABL* en pacientes con LMC en diferentes fases de la enfermedad.
- Correlacionar los hallazgos de mutaciones en el gen quimérico *BCR-ABL* con el estado clínico y evolución de los pacientes.

## 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 2.1. MATERIAL Y MÉTODOS.

A continuación se presenta de manera general el procedimiento que se siguió:

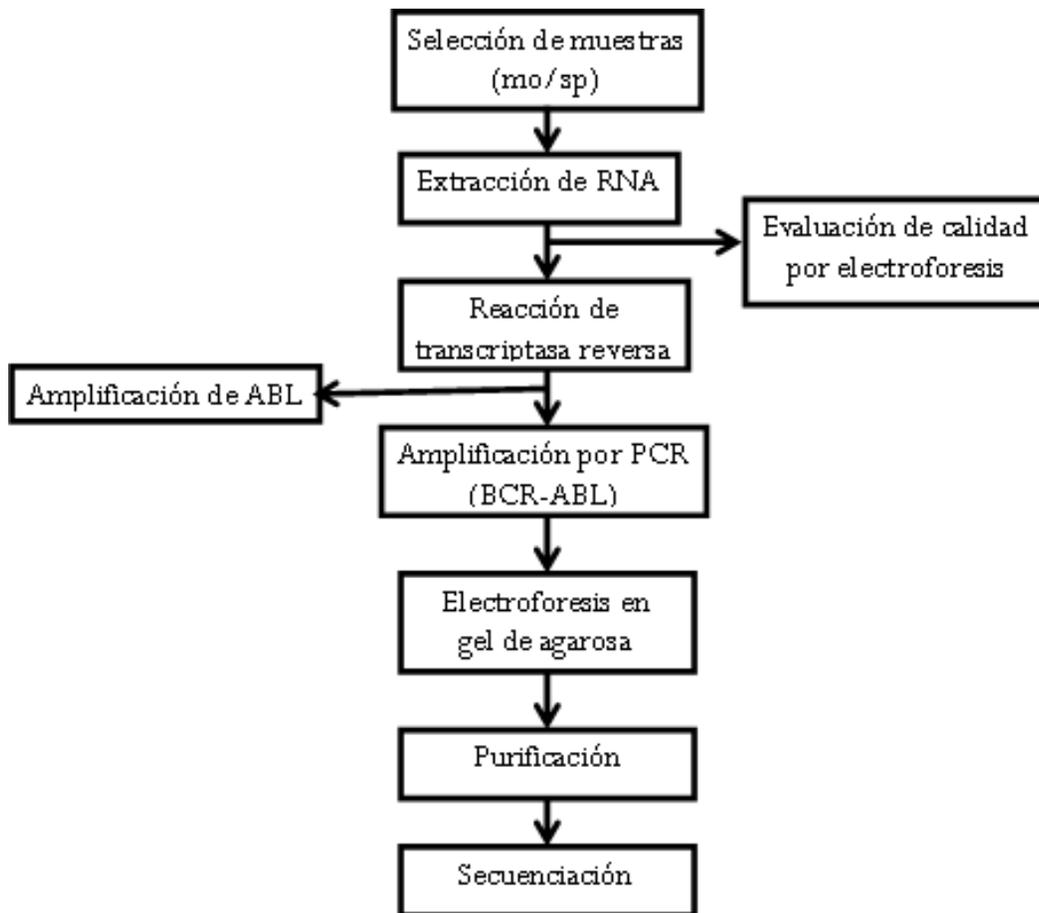


Fig. 2.1 Esquema general de trabajo.

### **2.1.2. PACIENTES Y MUESTRAS.**

Se seleccionaron veinte muestras de médula ósea de pacientes con leucemia mieloide crónica, leucemia linfoblástica aguda Ph+ y leucemia mieloblástica aguda Ph+. Se incluyeron muestras basales y muestras de pacientes que presentaron recaída o resistencia al tratamiento. Las muestras 16 y 17 pertenecen al seguimiento del mismo paciente, con un intervalo de tiempo de 2 meses, el cual presentó una recaída postransplante.

### **2.1.3. EXTRACCIÓN DE RNA.<sup>56</sup>**

Se realizó extracción de RNA de las muestras de médula ósea mediante un método orgánico utilizando el reactivo trizol®. Como tratamiento previo se lava la muestra para la obtención de glóbulos blancos, una vez obtenido el botón de leucocitos, éstos se lisan para la liberación del material genético, se realiza la extracción orgánica del RNA con trizol® y cloroformo y por último su purificación.

La metodología que se llevó a cabo es la siguiente:

- Se colocan de 3 a 5 mL de muestra de médula ósea en un tubo cónico de propileno de 15 mL estéril. Se agrega un volumen igual de solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos para RNA (BLGR-RNA), se centrifuga a 3 000 rpm durante 6 minutos a temperatura ambiente, se decanta y se resuspende el botón con BLGR-RNA. Se repite este procedimiento dos o tres veces hasta obtener el botón concentrado de glóbulos blancos.

- El botón obtenido se resuspende en 1 mL de BLGR-RNA y se transfiere a un tubo de 2 mL. Se centrifuga a 10 000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente, se decanta y el botón limpio se resuspende en 100  $\mu$ L de BLGR-RNA.
- Se añaden 750  $\mu$ L del reactivo trizol® y se agita hasta resuspender completamente el botón, se agregan 200  $\mu$ L de cloroformo y se agita vigorosamente. Se deja reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Se centrifuga a 10 000 rpm durante 30 minutos a 4 °C y se obtienen una fase acuosa, una fase orgánica y una interfase. La fase acuosa se transfiere cuidadosamente a otro tubo de 2 mL.
- Se añaden 600  $\mu$ L de isopropanol a -20 °C para precipitar el RNA y se incuba durante 2 h a -20 °C.
- Se centrifuga a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se decanta y se lava con 600  $\mu$ L de etanol al 75%.
- Se centrifuga a 10 000 rpm durante 20 minutos a 4 °C, se decanta y se resuspende el botón de RNA en 15  $\mu$ L de agua estéril con dietilpirocarbonato (DEPC). Se incuba a 60 °C durante 10 a 15 minutos. Para conservar se guarda a -20 °C.

Para comprobar la extracción exitosa del RNA y su nivel de integridad, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y su posterior visualización con bromuro de etidio y lámpara de luz UV. Esta técnica se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas negativamente para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño.<sup>34</sup>

#### 2.1.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPTASA REVERSA (RT-PCR).<sup>19</sup>

Se llevó a cabo una reacción de transcriptasa reversa para la obtención de cDNA a partir del RNA que se extrajo. Se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones:

| <b>Reactivos</b>                                    | <b>Volumen (<math>\mu</math>L)</b> |
|---|------------------------------------|
| H <sub>2</sub> O/DEPC                               | 6.5                                |
| Random  | 1.0                                |
| dNTPs (25mM)  | 0.5                                |
| RNA   | 4.0                                |
| *65 <sup>0</sup> C/5 min, hielo/1 min               |                                    |
| Solución amortiguadora 10x                          | 4.0                                |
| DTT   | 2.0                                |
| Inhib. RNAsa  | 1.0                                |
| *37 <sup>0</sup> C/2 min                            |                                    |
| TR (MuLV)   | 1.0                                |
| *37 <sup>0</sup> C/50 min, 70 <sup>0</sup> C/15 min |                                    |

Con el cDNA que se obtuvo se realizó una PCR sencilla del gen *ABL* como control de calidad interno. También se realizó una PCR múltiple para la detección e identificación del tipo de rearrreglo del gen *BCR-ABL*, con amplificación del gen *BCR* como control interno de calidad.

Para la búsqueda de mutaciones se amplificó una región del dominio cinasa del gen **BCR-ABL**. Se realizó una PCR semianidada para aumentar la sensibilidad de la técnica. Las secuencias de los oligonucleótidos que se utilizaron para la PCR anidada son las siguientes:<sup>48</sup>

**Nombre del oligo. Secuencia**

|               |                           |
|---------------|---------------------------|
| B2B (exón 12) | ACAGCATTCCGCTGACCATCAATAA |
| AN4+ (exón 4) | TGGTTCATCATCATTCAACGGTGG  |
| A7- (exón 7)  | AGACGTCGGACTTGATGGAGAACT  |

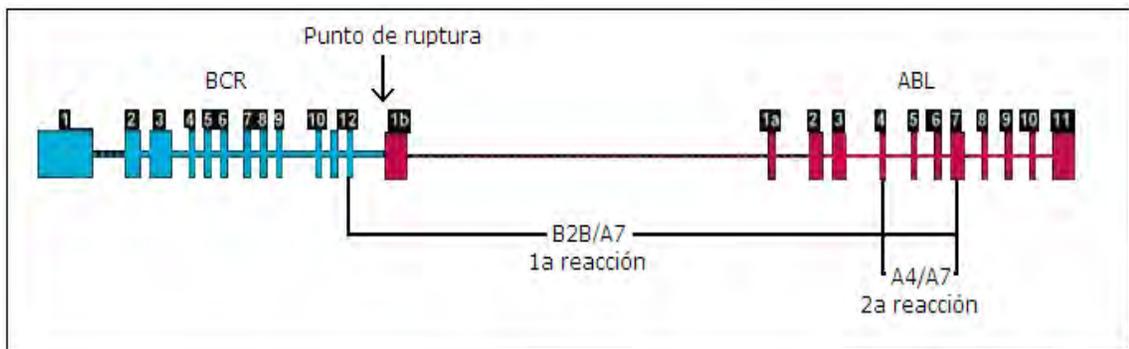


Fig. 2.2. Esquema de la localización de los oligonucleótidos utilizados.

En la primera reacción se amplificó un segmento del gen que abarca el punto de ruptura de la traslocación (fig. 2.2), como resultado de esta reacción se obtuvo un producto de aproximadamente 1293 pb. Las condiciones y la mezcla para la reacción se presentan a continuación:<sup>42</sup>

| <b>Reactivos</b>           | <b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|----------------------------|---|
| H <sub>2</sub> O           | 14.7                                      |
| Solución amortiguadora 10x | 2.5                                       |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)   | 1.5                                       |
| dNTPs (25mM)               | 0.2                                       |
| B2B/A7 (10mM)              | 2.0                                       |
| Taq                        | 0.1                                       |
| cDNA                       | 4.0                                       |
| Total                      | 25  |

|                         | <b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b> | <b>Tiempo (s)</b> |
|-------------------------|--|-------------------|
| T. de desnaturalización | 96   | 30                |
| T. de alineamiento      | 60   | 45                |
| T. de elongación        | 72   | 45                |
| *Durante 30 ciclos      |  |                   |

En la segunda reacción se amplificó el dominio cinasa del gen *ABL* donde se encuentra la mayoría de las mutaciones reportadas (fig. 2.2), en esta reacción se obtuvo un producto de aproximadamente 676 pb. Se hizo la siguiente mezcla bajo las siguientes condiciones:<sup>42</sup>

| <b>Reactivos</b>  | <b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b> |
|---|---|
| H <sub>2</sub> O  | 16.7                                      |
| Solución amortiguadora 10x                              | 2.5                                       |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)                                | 1.5                                       |
| dNTPs (25mM)  | 0.2                                       |
| A4/A7 (10 Mm.)  | 2.0                                       |
| Taq   | 0.1                                       |
| Producto de PCR de la 1 <sup>a</sup><br>reacción (1:10) | 2.0                                       |
| Total   | 25  |

|                         | <b>Temperatura (<math>^{\circ}\text{C}</math>)</b> | <b>Tiempo (s)</b> |
|-------------------------|--|-------------------|
| T. de desnaturalización | 96   | 30                |
| T. de alineamiento      | 61   | 45                |
| T. de elongación        | 72   | 45                |

\*Durante 30 ciclos

La detección de los productos de PCR se llevó a cabo mediante un corrido electroforético en gel de agarosa al 1.5% y su posterior visualización con bromuro de etidio y lámpara de luz UV. Posteriormente, se purificaron utilizando el kit comercial QIAEXII (QUIAGEN).

### 2.1.6. SECUENCIACIÓN.<sup>57</sup>

Ya obtenidos los productos purificados de PCR, se llevó a cabo su secuenciación utilizando el método enzimático o de Sanger. Dicho método consiste en la interrupción controlada de la síntesis de una hebra complementaria del DNA durante su replicación, catalizada por una enzima DNA polimerasa y marcada con fluorocromos para su detección. Para esta reacción se utilizó el reactivo Big Dye®, bajo las siguientes condiciones:

- Se colocan 4 µL del producto purificado, 1 µL de oligonucleótido (*forward* o *reverse*) 1 mM y 2 µL del reactivo de BigDye®.
- Se programa el termociclador con el siguiente ciclo de reacción:

|                         | <b>Temperatura (°C)</b> | <b>Tiempo</b> |
|-------------------------|-------------------------|---------------|
| T. de inicio            | 96                      | 5 min         |
| T. de desnaturalización | 96                      | 30 s          |
| T. de alineamiento      | 50                      | 15 s          |
| T. de elongación        | 72                      | 3 min         |

\*Durante 25 ciclos

- Mientras la reacción se lleva a cabo, se hidratan las columnas con 800 µL de agua estéril, evitando la formación de burbujas. Se retira el exceso de agua y se centrifuga a 3 000 rpm durante 3 minutos. La columna se transfiere a otro tubo de 1.5 mL.
- Una vez terminada la reacción, el producto obtenido se completa a un volumen de 20 µL con agua y se transfiere a la columna hidratada. Se centrifuga a 3000 rpm durante 3 minutos. La columna se desecha y la muestra se seca mediante

centrifugación al vacío durante 20 a 30 minutos. Las muestras se guardan protegidas de la luz.

Posteriormente las muestras se llevaron a secuenciar al Instituto de Fisiología de la UNAM. Las secuencias obtenidas se compararon con la secuencia X16416 del gen ***ABL*** y la secuencia X02596 del gen ***BCR***, de la base de datos del Banco de Genes del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).<sup>52</sup>



### 3. RESULTADOS.

En la tabla 3.1 se muestra un resumen de los datos y características de los pacientes y los resultados que se obtuvieron.

Se procesaron veinte muestras y se obtuvieron productos de PCR de entre 600 y 700 pb (fig. 3.1) de las cuales se analizaron las secuencias de once [11/20 (55%)] (fig. 3.3). Como control negativo se utilizó la línea celular K562 con transcrito *BCR-ABL+* tipo b3a2 sin mutaciones, a esta línea celular se le aplicó el mismo procedimiento que a las muestras y se obtuvo un electroferograma con buena intensidad en las señales y el cual no presentó ninguna mutación (fig. 3.2). Los electroferogramas de las once muestras secuenciadas que se obtuvieron con buena intensidad en las señales, se analizaron y no se encontraron mutaciones en ninguna de las muestras.

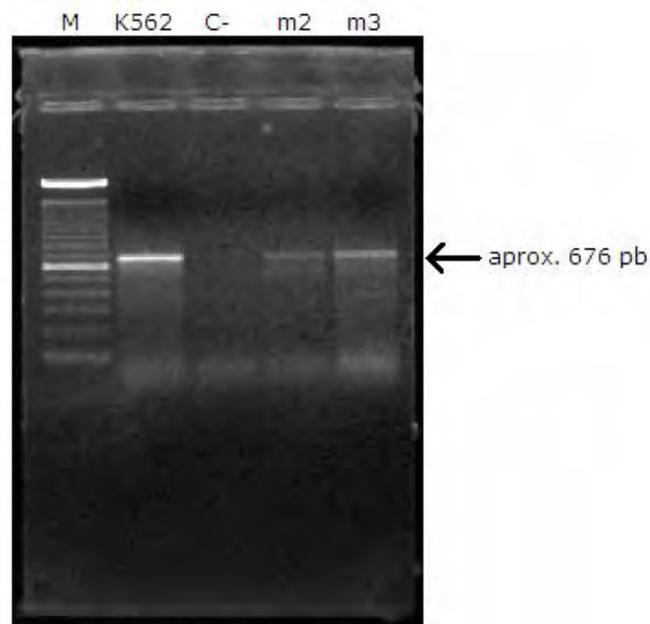


Fig. 3.1. Electroforesis en gel de agarosa 1.5% dónde se muestra el producto de PCR anidada de aproximadamente 676 pb. M, marcador; C-, control negativo; m, muestra.

| <b>Muestra</b> | <b>Diagnóstico</b> | <b>Estado del paciente</b> | <b>Cariotipo</b>      | <b>Transcrito</b> | <b>Secuencias</b> | <b>Mutación</b> |
|----------------|--------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|-----------------|
| <b>K562</b>    | Control            | ---                        | ---                   | b3a2              | +                 | ---             |
| <b>1</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XX                 | Negativo          | -                 | -               |
| <b>2</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XY,Ph+             | b2a2              | +                 | Negativo        |
| <b>3</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XX/46,XX,Ph+       | b3a2              | +                 | Negativo        |
| <b>4</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XY/46,XY,Ph+       | b3a2              | +                 | Negativo        |
| <b>5</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XX/46,XX,Ph+       | b3a2              | NV                | -               |
| <b>6</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XY/46,XY,Ph+       | b2a2              | NV                | -               |
| <b>7</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XY/46,XY,Ph+       | b3a2              | +                 | Negativo        |
| <b>8</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XY,Ph+             | b3a2              | +                 | Negativo        |
| <b>9</b>       | LMC                | Basal                      | 46,XY,Ph+             | NV                | -                 | -               |
| <b>10</b>      | LMC                | RC                         | 46,XX                 | b2a2              | +                 | Negativo        |
| <b>11</b>      | LMC                | RC                         | 46,XX                 | b2a2              | +                 | Negativo        |
| <b>12</b>      | LMC, CB            | Recaída                    | 46,XY/46,XY,Ph+       | b3a2              | +                 | Negativo        |
| <b>13</b>      | LMC, CB            | Recaída                    | 46,XY/46,XY,Ph+       | b3a2              | NV                | -               |
| <b>14</b>      | LMC, pos-TMO       | Recaída                    | 46,XX/46,XX,Ph+       | NV                | -                 | -               |
| <b>15</b>      | LMC, pos-TMO       | Recaída                    | 46,XX,Ph+             | b3a2              | NV                | -               |
| <b>16</b>      | LMC, pos-TMO       | RC                         | 46,XX/46,XY           | Negativo          | -                 | -               |
| <b>17</b>      | LMC, pos-TMO       | Recaída                    | 46,XX/46,XY/46,XY,Ph+ | b2a2              | +                 | Negativo        |
| <b>18</b>      | LLA, pos-TMO       | Recaída                    | 46XY/46XY,Ph+         | e1a2              | +                 | Negativo        |
| <b>19</b>      | LAM Ph+            | RC                         | 46,XY                 | e1a2              | NV                | -               |
| <b>20</b>      | LAM Ph+            | Recaída                    | 46,XX/46,XX,Ph+       | e1a2              | +                 | Negativo        |

Tabla 3.1. Resultados. LMC, leucemia mieloide crónica; TMO, trasplante de médula ósea; CB, crisis blástica; RC, remisión citogenética; LLA, leucemia linfoblástica aguda; LAM, leucemia mieloide aguda; Ph, cromosoma Phuladelphia; NV, no valorable.

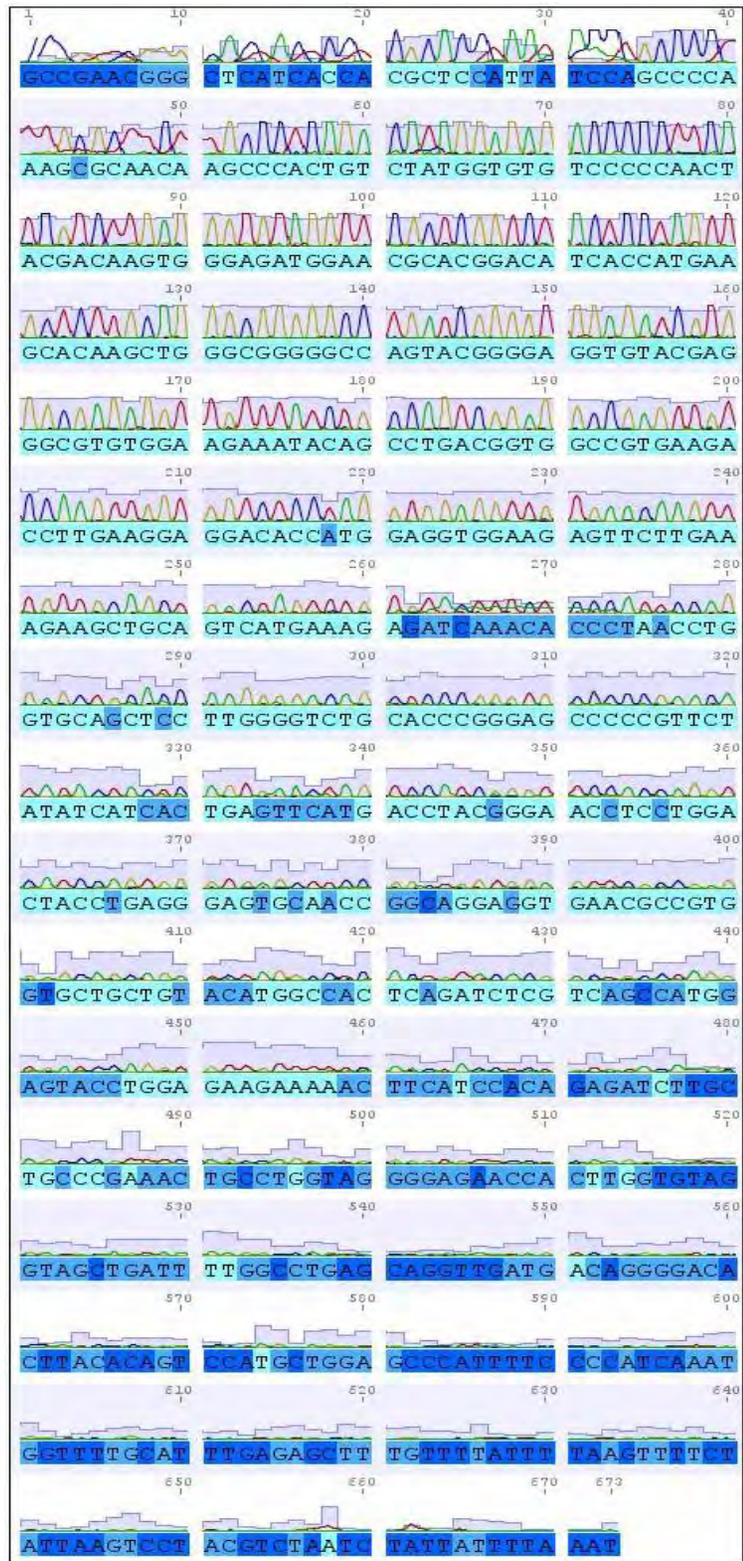


Fig. 3.2. Electroferograma del control K562 donde no hay mutaciones puntuales.

Las muestras de los casos 2 al 9 pertenecen a pacientes con diagnóstico de LMC con cromosoma Filadelfia (Ph+), estas muestras se tomaron antes de iniciar algún tipo de tratamiento (muestras basales) y se pretendía determinar si las mutaciones se encontraban presentes al inicio de la enfermedad, ya que no se sabe si están antes o son adquiridas después de comenzar el tratamiento.<sup>44</sup> La muestra del caso 1 tuvo un cariotipo normal y también fue negativa para el rearrreglo **BCR-ABL** por RT-PCR, por lo que probablemente se trata de una enfermedad mieloproliferativa crónica diferente. Las muestras de los casos 5, 6 y 9 no fueron valorables para la detección de mutaciones; y las secuencias de las muestras 2, 3, 4, 7 y 8 se analizaron y no se encontró ninguna mutación en su secuencia. Se sugiere que las personas que adquieren resistencia al imatinib, se debe a que poseen células con mutaciones en baja concentración y, mientras el medicamento elimina las células Ph+ sin mutación, la concentración de las células mutadas se incrementa y provoca la resistencia<sup>44</sup>.

Las muestras de los casos 10 y 11 provienen de pacientes que se encuentran en remisión clínica con cariotipo normal. Ambos pacientes fueron positivos para el rearrreglo **BCR-ABL** por RT-PCR y en su secuencia no se encontraron mutaciones. Los pacientes en remisión clínica pueden continuar por dos caminos: que sigan con el tratamiento y permanezcan en remisión o que desarrollen resistencia al medicamento ya sea a causa de la presencia de mutaciones u otro mecanismo.<sup>44</sup>

Las muestras de los casos 12 y 13 pertenecen a pacientes que tuvieron evolución de la enfermedad a fase blástica a pesar del tratamiento con imatinib, presentaron Ph+ en su cariotipo sin ninguna de las alteraciones adicionales características de la evolución y fueron positivos para el rearrreglo *BCR-ABL*. En estas muestras se esperaba observar algún tipo de mutación que pudiera estar relacionada con la falta de respuesta al tratamiento y la evolución de la enfermedad; pero en el caso 12 no se observaron mutaciones en la secuencia, por lo que probablemente la resistencia haya sido provocada por un mecanismo alternativo<sup>38,41</sup> y el caso 13 no fue valorable para la detección de mutaciones.

Las muestras 14 a 18 corresponden a pacientes que fueron sometidos a transplante de médula ósea (TMO) por LMC o LLA, todos ellos Ph+ basal. Las muestras 16 y 17 son del mismo paciente, la primera tomada en remisión clínica y la segunda en recaída dos meses después. La muestra 18 corresponde a un paciente con diagnóstico LLA Ph+, el cual es considerado de muy alto riesgo, tratado con TMO y con imatinib que presentó una recaída; estos pacientes también son tratados exitosamente con el inhibidor de cinasas, pero de igual forma pueden hacerse resistentes.<sup>15</sup> En estos casos de TMO todos tuvieron recaída con Ph+ en el cariotipo y en el estudio molecular y se pretendía correlacionar la presencia de las mutaciones con la recaída. Pero los casos 14 y 15 no fueron valorables para el estudio de mutaciones; el caso 16 fue negativo para el rearrreglo *BCR-ABL* y los casos 17 y 18 fueron negativos para las mutaciones. En estos pacientes que les realizaron el transplante de médula ósea, es probable que la recaída fuera a causa de la

quiescencia de células Ph+, las cuales después de cierto tiempo comienzan a dividirse y provocan la recaída del paciente.<sup>38</sup>

Las muestras de los casos 19 y 20 corresponden a dos pacientes con diagnóstico de LAM Ph+, el primero en remisión clínica y el segundo en recaída, esto es poco frecuente y de muy mal pronóstico. Ambas muestras fueron positivas para el rearrreglo **BCR-ABL** por RT-PCR, pero el electroferograma de la muestra 19 no fue valorable, pues las señales eran muy débiles. Las señales del electroferograma de la muestra 20 de buena intensidad mostraron que no había ninguna mutación.

En la figura 3.3 se muestra, como ejemplo, el electroferograma de la muestra 3, dónde se señalan las mutaciones más frecuentes en la región amplificada del dominio cinasa del gen **BCR-ABL**.



Fig. 3.3. Electroferograma de la muestra 3, que no tuvo mutaciones, y dónde aquí se señala la localización de las mutaciones más frecuentes de la región amplificada en el dominio cinasa del gen quimérico *BCR-ABL*.

#### **4. DISCUSIÓN.**

La LMC es actualmente el prototipo de enfermedad que puede ser controlada con terapias blanco dirigidas que son altamente específicas y relativamente eficaces, en este caso los inhibidores de cinasa de tirosina. Sin embargo, las células leucémicas pueden desarrollar resistencia al medicamento por diferentes mecanismos, uno de ellos es la adquisición de mutaciones en el dominio cinasa de *BCR-ABL*. Es por ello que en este trabajo se realizó la estandarización de la técnica de PCR y secuenciación directa para detectar estas mutaciones en pacientes con LMC en diferentes fases de la enfermedad y así poder conocer la incidencia y el tipo de mutaciones en los pacientes recibidos en el Hospital General de México.

Se secuenciaron once muestras de las cuales cinco corresponden a muestras basales, dos a pacientes en remisión clínica y cuatro a pacientes en recaída pos-TMO tratados con imatinib; ninguna de estas muestras presentó mutaciones en la región amplificada del dominio cinasa del gen *BCR-ABL*. Sin embargo, se logró establecer la estandarización de la metodología para su posterior utilización.

Un factor importante que influye en los resultados es el momento en el que se tomó la muestra, ya que si el paciente se encontraba en fase crónica es probable que la concentración de células con mutación se encontrara disminuida y la técnica de secuenciación directa no haya podido detectarlas (sensibilidad del 10-20%),<sup>45,53</sup> como en el caso de las muestras basales y las de pacientes en remisión clínica. En las muestras de pacientes en recaída a pesar

del tratamiento con imatinib se esperaba encontrar la presencia de mutaciones, aunque es posible que dicha resistencia sea provocada por un mecanismo alternativo, principalmente debido a la sobreexpresión de la proteína por amplificación génica,<sup>58</sup> u otros como la presencia de células independientes de *BCR-ABL*, por polimorfismos en el transportados hOCT1 o la ATPasa ABCB1, etc.<sup>38,41</sup>

En cuanto a la frecuencia de las mutaciones presentes en pacientes resistentes a los inhibidores de cinasa, es importante recalcar que se reporta del 60 al 90%,<sup>34</sup> y de éstas mutaciones hay algunas que se presentan con mayor frecuencia que otras. En la tabla 4.1 se muestran las mutaciones más frecuentes y sus porcentajes, la T315I es la que se encuentra en mayor porcentaje con 14%;<sup>38</sup> también es importante mencionar que en la región P-loop se encuentran la mayoría de estas mutaciones (M244V, 4%; L248V, 2%; G250E, 10%; Q252H, 2%; Y253H, 11%; E255K, 11%) y son consideradas de mal pronóstico<sup>42</sup>. La frecuencia de las mutaciones también depende de la fase en la que esté el paciente; la mutación T315I es más frecuente en la crisis blástica (21%) y menos frecuente en la fase crónica (7.5%); mientras que la mutación M351T es más frecuente en la fase crónica (16.5%) y menos frecuente en la fase blástica (4%).<sup>58</sup> En el caso de los pacientes con diagnóstico de LLA Ph+, la presencia de mutaciones tiene una frecuencia de 60-70% y es considerada de alto riesgo; en estos pacientes las mutaciones más frecuentes son T315I, E255K, Y253H y G250E.<sup>58</sup>

En la tabla 4.1 también se muestra una clasificación de la resistencia de las mutaciones frente a los inhibidores de cinasa. La mutación T315I, que es la más frecuente también es la más

resistente, en este caso ocurre un cambio de citosina (c) por timidina (t) y el aminoácido polar treonina (T) cambia por el aminoácido no polar isoleucina (I), lo que provoca una pérdida de un puente de hidrógeno en el sitio crítico para la unión con imatinib y demás inhibidores.<sup>38</sup> Esta es la única mutación que no es sensible ante ningún inhibidor de cinasas y el poder detectar su presencia le ayuda al médico hematólogo para tomar la mejor decisión en cuanto al tratamiento a seguir.<sup>58</sup>

Tabla 4.1. Frecuencia y sensibilidad a los inhibidores de cinasa de las mutaciones más comunes del dominio cinasa del gen *BCR-ABL*.<sup>41,43,58</sup>

| <b>Mutación</b> | <b>Frecuencia (%)</b> | <b>Sensibilidad a inhibidores de cinasa</b> |
|-----------------|-----------------------|---|
| <b>M244V</b>    | 4                     | Sensible                                    |
| <b>L248V</b>    | 2                     | Intermedia                                  |
| <b>G250E</b>    | 10                    | Sensible                                    |
| <b>Q252H</b>    | 2                     | Intermedia                                  |
| <b>Y253H</b>    | 11                    | Sensible                                    |
| <b>E255K</b>    | 11                    | Intermedia                                  |
| <b>T315I/S</b>  | 14                    | Insensible                                  |
| <b>F317L</b>    | 3                     | Intermedia                                  |
| <b>M351T</b>    | 10                    | Sensible                                    |
| <b>F359C</b>    | 6                     | Sensible                                    |
| <b>H396R/P</b>  | 5                     | Sensible                                    |

Para detectar la presencia de mutaciones en las muestras, en este proyecto se empleo la técnica de secuenciación directa que, como se mencionó anteriormente, no es la más sensible (10-20%), pero que se eligió por ser la más sencilla, accesible y que no requiere de mucho tiempo para realizarse.<sup>53,54</sup> Sin embargo, existen otras técnicas más sensibles para la detección de mutaciones; por ejemplo la cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (d-HPLC) que tiene una sensibilidad del 1% al 10% sin ser cuantitativa; también esta la pirosecuenciación con una sensibilidad del 5%, semicuantitativa; o la PCR oligonucleótido alelo específico (ASO-PCR) que es la técnica con mayor sensibilidad, del 0.001%, sin ser cuantitativa y específica sólo para mutaciones ya conocidas; por mencionar algunas. Aunque estas técnicas tienen mayor sensibilidad, no son tan accesibles ni sencillas y requieren de mayor tiempo para realizarse, por lo que su uso para rutina es complicado y son utilizadas con propósitos de investigación.<sup>53,54</sup>

Actualmente, no hay una estandarización en cuanto a la metodología para la detección de mutaciones, lo que provoca mucha variación en su frecuencia entre laboratorios, pero la técnica de secuenciación directa, por su sencillez y bajo costo, es la más adecuada y más utilizada en los laboratorios clínicos.<sup>53,54</sup>

## **5. CONCLUSIONES.**

Se estandarizó la metodología para la secuenciación de las muestras provenientes de pacientes con LMC, LLA y LAM Ph+. Se obtuvieron las secuencias de 11 muestras de pacientes que presentaban el rearrreglo *BCR-ABL* por RT-PCR, de las cuales cinco corresponden a muestras basales, dos se encuentran en remisión clínica y cuatro presentan recaída. En ninguna de estas muestras se encontró alguna mutación puntual. La recaída y resistencia al tratamiento también puede ser provocado por otros mecanismos, además de la presencia de mutaciones puntuales.

Estos resultados representan un comienzo para la detección y el estudio de mutaciones en pacientes con LMC o LLA Ph+. En la actualidad el tratamiento de primera línea es el imatinib por lo que es importante tener una metodología para monitorear a los pacientes y detectar tempranamente las mutaciones a fin de auxiliar al médico hematólogo en la decisión de modificar el tratamiento por recaída o resistencia de la enfermedad.

El presente trabajo continua realizándose en el Servicio de Genética del Hospital General de México, O.D.

## 6. REFERENCIAS.

1 Leitch H.A., Laneuville P., Miller W.H. Molecular Etiology and Pathogenesis of Leukemia. En: Adult Leukemias, Wiernik P, BC Decker Inc. 2001, Hamilton Ontario, pp 19-62.

2 Ruiz G. Fundamentos de Hematología. Editorial Médica Panamericana. México (1994), pp 146, 147.

3 Tefferi A., Gilliland G. Classification of chronic myeloid disorders: From Dameshek towards a semi-molecular system. *Best Practice & Research Clinical Haematology*; 2006, 19 (3): 365-368.

4 Albitar M. (2005) Myeloproliferative Diseases: Molecular Genetics. En: Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd. [www.els.net](http://www.els.net)

5 De Keersmaecker K., Cools J. Chronic myeloproliferative disorders: a tyrosine kinase tale. *Leukemia*; 2006, 20: 200-205.

6 Redaelli A., et al. Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous Leukaemia. *Expert Rev Anticancer Ther*; 2004, 4(1): 85-96.

7 Ren R. Mechanisms of BCR-ABL in the Pathogenesis of Chronic Myelogenous Leukaemia. *Nat Rev Cancer*; 2005, 5: 172-183.

8 Lichtman M.A. Williams Hematology. Chronic myelogenous leukemia and related disorders. 5ª edición. McGraw-Hill Inc. USA (1995), pp 298-309.

9 Goldman J.M., Melo J.V. Chronic Myeloid Leukemia — Advances in Biology and New Approaches to Treatment. *N Engl J Med*; 2003, 349: 1451-1464.

10 Gollin S.M. Mechanisms leading to nonrandom, nonhomologous chromosomal translocations in leukemia. *Seminars in Cancer Biology*; 2007, 17: 74-79.

11 Simposio Bristol-Myers Squibb de Hematología. Enfrentando los desafíos de las Neoplasias Hematológicas. 14 y 15 noviembre 2008. Buenos Aires, Argentina.

12 Sawyers C.L. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*; 1999, 1330-1340.

13 Schiffer C.A. BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors for Chronic Myelogenous Leukemia. *N Engl J Med*; 2007, 357: 258-65.

14 Deininger M., Goldman J.M., Melo J.V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*; 2000, 96 (10): 3343-3354.

15 Piccaluga P., Paolini S., Martinelli G. Tyrosine Kinase Inhibitors for the Treatment of Philadelphia Chromosome-Positive Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer*; 2007, 110: 1178-1186.

16 Meir Wetzler, et al. Harrison´s Principles of internal medicine. Acute and Chronic myeloid leukemia. Vol 1, 15ª edición, McGraw Hill. USA (2001), pp 711, 712.

18 Melo J., Barnes D. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer*; 2007, 7: 441-453.

19 Wang Y., et al. Chronic Myelogenous Leukemia: Laboratory Diagnosis and Monitoring. *Genes, Chromosomes & Cancer*; 2001, 32: 97-111.

20 Tefferi A., et al. Chronic Myeloid Leukemia: Current Application of Cytogenetics and Molecular Testing for Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*; 2005, 80(3): 390-402.

21 Savona M., Talpaz M. Getting to the stem of chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer*; 2008, 8: 341-350.

22 Ruiz E. Seguimiento citogenético y molecular en pacientes con LMC tratados con interferón. Tesis de Licenciatura QFB, Facultad de Química, UNAM. 2000.

23 Mark H.F., Sokolic R.A., Mark Y. Conventional cytogenetics and FISH in the detection of ***BCR-ABL*** fusion in chronic myeloid eukaemia. *Experimental and Molecular Pathology*; 2006. [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)  
Revisado en junio, 2009.

24 Gole L. (2001) Fluorescence in situ Hybridization. *Encyclopedia of Life Sciences*. En: Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd. [www.els.net](http://www.els.net)

25 Weisberg E., Manley P.W., Cowan-Jacob S., Hochhaus A., Griffin J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nature reviews| cancer*; 2007, 7: 345-356.

26 Luque J., Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ed. Elsevier. Madrid, España (2006), pp. 187-192.

27 Mas E., Poza J., Ciriza J., Zaragoza P., Osta R., Rodellar C. (2001) Fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). En: *Revista AquaTIC n°15*. [www.revistaaquatic.com](http://www.revistaaquatic.com)  
Revisado en mayo, 2007.

28 Bustin S.A., Mueller R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*; 2005, 109: 365–379.

29 [www.thomsonplm.com/mxplm](http://www.thomsonplm.com/mxplm)

Revisado en marzo, 2008.

30 Capdeville R. Buchdunger E., Zimmerman J., Matter A. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discovery*; 2002, 1: 493-502.

31 Jabbour E., **Cortes J.E., Giles F.J., O'brien S., Kantarjian H.M.** Current and Emerging Treatment Options in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancer*; 2007, 2171-2181.

32 Cohen M.H., Johnson J.R., Pazdur R. U.S. Food and Drug Administration Drug Approval Summary: Conversion of Imatinib Mesylate (STI571; Gleevec) Tablets from Accelerated Approval to Full Approval. *Clin Cancer Res*; 2005, 11: 12-19.

33 Imatinib dose escalation for chronic phase–chronic myelogenous leukaemia patients in primary suboptimal response to imatinib 400 mg daily standard therapy. *Leukemia*; 2009: 1–3.

34 Branford S., Hughes T. Detection of BCR-ABL mutations and resistance to imatinib mesylate. *Methods Mol Med*; 2006, 125: 93-106.

35 Weisberg E., et al. Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell*; 2005, 7: 129-141.

36 **O'Hare T.,** Walters D.K., Deininger M., Druker B.J. AMN107: Tightening the grip of imatinib. *Cancer Cell*; 2005, 7: 117-119.

37 Talpaz M., et al. Dasatinib in imatinib resistant Philadelphia chromosome positive leukemias. *N Engl J Med*; 2006, 354: 2531-2541.

38 O'Hare T., Corbin A.S., Druker B.J. Targeted CML therapy: controlling drug resistance, seeking cure. *Current Opinion in Genetics & Development*; 2006, 16: 92-99.

39 Apperley J.F. Part II: Management of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*; 2007, 8: 1116-1128.

40 Hofmann W., Komor M., Hoelzer D., Ottman O.G. Mechanisms of Resistance to STI571 (Imatinib) in Philadelphia-Chromosome Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leukemia & Lymphoma*; 2004, 45 (4): 655-660.

41 Apperley J.F. Part I: Mechanisms of resistance to imatinib in chronic myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*; 2007, 8: 1018-29.

42 Azam M., Latek R., Daley G.Q. Mechanisms of Autoinhibition and STI-571/Imatinib Resistance Revealed by Mutagenesis of ***BCR-ABL***. *Cell*; 2003, 112:831-843.

43 Cang S., Liu D. P-loop mutations and novel therapeutic approaches for imatinib failures in chronic myeloid eukaemia. *J Hematology & Oncology*; 2008, 1: 15.

44 Goldman J.M. Chronic myeloid eukaemia—still a few questions. *Exp Hematol*; 2004, 32: 2-10.

45 Chien J., Tang J., Chen R., Li C., Lee C.P. Detection of BCR-ABL gene mutations in Philadelphia chromosome positive eukaemia patients resistant to STI-571 cancer therapy. *Leuk Res*; 2008, 32: 1724-1734.

46 Fausel C. Targeted Chronic Myeloid Leukemia Therapy: Seeking a Cure. Am J Health-Syst Pharm, Suppl 15; 2007, 64: S9-S15.

47 Hochhaus A., et al. Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukaemia. Leukemia; 2009, 1-8.

48 Hochhaus A., et al. Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. Leukemia; 2002, 16: 2190-2196.

49 Hughes T., et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting **BCR-ABL** transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood; 2006, 108 (1): 28-37.

50 Goldman J.M., Melo J.V. Targeting the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukaemia. N Engl J Med; 2001, 344: 1084-86.

51 Gorre et al, 2001; von Bubnoff et al, 2002; Branford et al, 2002; Hofmann et al, 2002; Roche-L'Estienne et al, 2002; Shah et al, 2002; Hochhaus et al, 2002; Al-Ali et al, 2004. Congreso anual AMEH A.C., Acapulco, México; 2007.

52 Genbank. [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

Revisado en febrero, 2007.

53 Quintás-Cardama A., Kantarjian H.M., Cortes J.E. Mechanisms of Primary and Secondary Resistance to Imatinib in Chronic Myeloid Leukemia. Cancer Control; 2009, 16 (2): 122-130

54 Ernst T., BCR-ABL kinase domain mutations on second line dasatinib or nilotinib therapy in chronic myeloid leukaemia patients after imatinib failure:

a cooperative evaluation of different detection methods. Haematologica; 2009, doi: 10.3324/haematol.006981.

55 Giles F.J., Dwyer M., Swords R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukaemia. Leukemia; 2009: 1-10

56 Invitrogen: life technologies, Trizol® Reagent  
<http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596026.pdf>  
Revisado en febrero, 2007.

57 BigDye® Terminator v3.1. Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems.  
[http://genomics.as.wvu.edu/BDv3\\_1.pdf](http://genomics.as.wvu.edu/BDv3_1.pdf)  
Revisado en febrero, 2007

58 Branford S., Melo J., Hughes T. Selecting optimal second-line tyrosine kinase inhibitor therapy for chronic myeloid leukemia patients after imatinib failure: does the BCR-ABL mutation status really matter? Blood; 2009, 114 (27): 5426-5435.

## APÉNDICE 1

Preparación de reactivos.

### TAE 10x

| Reactivo       | Cantidad |
|----------------|----------|
| Tris           | 48.4 g   |
| Ácido acético  | 11.42 mL |
| EDTA 0.5M      | 20 mL    |
| Agua destilada | cbp 1 L  |

### BLGR-RNA

| Reactivo           | Cantidad   |
|--------------------|------------|
| NH <sub>4</sub> Cl | 4.14 g     |
| KHCO <sub>3</sub>  | 0.5 g      |
| EDTA 0.5M          | 100 µL     |
| Agua destilada     | cbp 500 mL |