



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

SERVICIO DE GENÉTICA

**IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN T315I EN EL
TRANSCRITO *BCR-ABL* DE PACIENTES MEXICANOS
CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y SU
CORRELACIÓN CON RESISTENCIA A INHIBIDORES
DE CINASAS DE TIROSINA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GENÉTICA MÉDICA**



P R E S E N T A:

DR. CUAUHTLI NACXITL AZOTLA VILCHIS

TUTORA: QFB. ROSA MARÍA ARANA TREJO

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**“IDENTIFICACIÓN DE LA MUTACIÓN T315I EN EL TRANSCRITO *BCR-ABL*
DE PACIENTES MEXICANOS CON LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA Y SU
CORRELACIÓN CON RESISTENCIA A INHIBIDORES DE CINASAS DE
TIROSINA”**

DIRECTORA DE TESIS:

QFB. ROSA MARÍA ARANA TREJO
QUÍMICO C, INVESTIGADOR EN CIENCIAS MÉDICAS B
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.

JEFE DE SERVICIO

DR. SERGIO ALBERTO CUEVAS COVARRUBIAS
JEFE DEL SERVICIO DE GENÉTICA
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, O.D.
PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE ESPECIALIDAD EN GENÉTICA MÉDICA
FACULTAD DE MEDICINA UNAM

Agradecimientos

A la QFB. Rosa María Arana por todo su trabajo y esfuerzo para la realización de esta investigación.

A la P. de QFB. Verónica González por su valiosa colaboración en el laboratorio.

A la Maestra Alicia Cervantes por su vocación incondicional a la enseñanza de la genética.

Al Dr. Sergio Cuevas y a la Dra. Refugio Rivera, titulares del curso de especialidad por el apoyo y conocimiento que me han brindado durante la residencia

A la Dra. Susana Kofman, al Dr. Carlos Venegas y a la Dra. Gloria Queipo por compartir su experiencia y conocimiento en genética médica.

A mis amigos de la residencia, a los compañeros residentes y en general a todo el personal del servicio de genética por hacer placentera la estancia en el servicio.

A los pacientes que me permitieron aprender de ellos.

A mi hermano Ocelotl, mi madre Flor y mi novia Luz, porque son mis mejores amigos y el mejor equipo que puedo tener.

Índice

1.- Resumen	7
2.- Marco teórico	8
2.1.- Síndromes Mieloproliferativos y su clasificación.....	9
2.2.- Leucemia Mieloide Crónica	10
2.2.1.- Historia	11
2.2.2.- Epidemiología.....	12
2.2.3.- Características clínicas	13
2.2.4.- Supervivencia.....	14
2.2.5.- Factores pronóstico.....	15
2.2.6.- Alteraciones en los valores de laboratorio.....	16
2.2.7.- Tratamiento y monitoreo	17
2.3.- Inestabilidad genética y evolución clonal.....	19
2.4.- Bases Moleculares	22
2.4.1.- Gen <i>BCR</i>	22
2.4.2.- Gen <i>ABL1</i>	23
2.4.3.- Gen de fusión <i>BCR-ABL</i>	24
2.4.4.- Proteínas cinasa.....	25
2.4.5.- Inhibidores de cinasas de tirosina	25
2.4.6.- Mecanismos de resistencia	28
2.4.7.- Mutaciones.....	30
3.- Planteamiento del problema	34
4.- Hipótesis	34
5.- Justificación	35
6.- Objetivos.....	35
6.1.- Objetivo general	35
6.2.- Objetivos específicos.....	36
7.- Material y métodos.....	36
7.1.- Aprobación de investigación.....	36

7.2.- Diseño del Estudio.....	36
7.3.- Población de estudio:	37
7.4.- Criterios de Inclusión	37
7.5.- Criterios de Exclusión:.....	37
7.6.- Variables.....	38
8.- Procedimientos:	38
8.1.- Análisis cromosómico.....	39
8.2.- Análisis Molecular.....	39
8.2.1.- Obtención de RNA	39
8.2.2.- Síntesis de cDNA (ADN complementario)	39
8.2.3.- Identificación del tipo de transcrito	40
8.2.4.- Análisis molecular por RFLPs	42
8.2.5.- Análisis molecular por secuenciación.....	46
9.- Resultados.....	47
9.1.- Estudio citogenético	49
9.2.- Tipo de Transcrito de Fusión	52
9.3.- Análisis por RFLP	55
9.4.- Secuenciación del dominio cinasa de tirosina	57
10.- Discusión y conclusiones.....	58
11.- Bibliografía.....	66
Anexo 1.- Hoja de consentimiento informado	72

1.- Resumen

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es un síndrome mieloproliferativo de naturaleza clonal, originado en las células madre hematopoyéticas y caracterizado por una translocación recíproca balanceada $t(9;22)(q34;q11)$, la cual resulta en el gen de fusión *BCR-ABL* que codifica para una proteína cinasa de tirosina. Los inhibidores de cinasas de tirosina son los medicamentos utilizados actualmente en LMC, con buena eficacia, sin embargo un porcentaje considerable de pacientes desarrolla resistencia a estos fármacos. Se ha observado que las mutaciones en el dominio cinasa de tirosina del gen *BCR-ABL* son la principal causa de resistencia. La mutación T315I resulta en resistencia a todos los inhibidores utilizados en LMC

Se trata de un estudio de tipo observacional analítico con el objetivo de identificar la mutación T315I en el dominio cinasa de tirosina del gen quimérico *BCR-ABL* y el de correlacionar el tipo de rearreglo *BCR-ABL* con la severidad de la enfermedad en un grupo de pacientes mexicanos tratados con inhibidores de cinasas de tirosina. Se incluyeron en el estudio muestras de médula ósea o sangre periférica de 113 pacientes durante o al inicio del tratamiento con cualquier tipo de inhibidores de cinasas de tirosina. Las muestras se procesaron para cariotipo y estudio molecular por RT-PCR para conocer el tipo de rearreglo *BCR-ABL*, RT-PCR-RFLP para la detección de la mutación T315I y secuenciación directa del dominio cinasa de tirosina para la detección de mutaciones.

En la presente tesis se muestran los resultados obtenidos hasta el momento. Se encontraron 4 pacientes positivos para la mutación T315I de 34 analizados (11.76%) por RT-PCR-RFLP, 3 de ellos en fases avanzadas de la enfermedad y uno en fase crónica. En la correlación clínica, citogenética y molecular se observó que el rearreglo b3a2+ se encontraba con mayor frecuencia que b2a2+ en los pacientes jóvenes (<20 años), en los que presentaban evolución clonal por citogenética y en los portadores de la mutación T315I, reflejo de una aparente mayor severidad en estos casos. El proyecto continúa realizándose en el Servicio de Genética del Hospital General de México.

2.- Marco teórico

Actualmente se acepta que el cáncer es en esencia una enfermedad genética a nivel celular, ocupando los primeros lugares de morbi-mortalidad poblacional; datos del INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía) reportan que los tumores malignos se encuentran entre las principales causas de muerte en México, en el 2007 representaron la tercera causa de muerte entre las mujeres con 15.4% del total, mientras que en los hombres fue la cuarta con 11.8%.

Para el desarrollo de una neoplasia existen dos tipos de evento génico inicial: la inactivación de genes tumor supresor por delección, mutación o mecanismos epigenéticos, y la activación o desregulación de oncogenes como consecuencia de mutaciones puntuales, amplificación o anomalías citogenéticas balanceadas .

Boveri en 1914 fue el primero en sugerir que las anormalidades cromosómicas adquiridas son un factor causal en el origen del cancer¹. Posteriormente con el descubrimiento de técnicas para visualización y bandedo de cromosomas humanos, muchas aberraciones específicas o incluso patognomónicas de los cromosomas han sido detectadas en varios tipos de tumores.

La mayoría de los rearrreglos estructurales balanceados causan desregulación por la sobreexpresión de un gen aparentemente normal en uno de los puntos de ruptura, o por la creación de un gen híbrido o quimérico que ocurre por la fusión de una parte de ambos genes localizados en cada uno de los puntos de ruptura. Los dos principales grupos de genes involucrados en más del 50% de los casos son factores de transcripción y genes que codifican para proteínas cinasas de tirosina. La fusión génica ha sido identificada en el 20% de los cánceres humanos, perteneciendo en el 75% de éstas a las neoplasias hematológicas²⁻³.

Muchos agentes externos inducen rupturas cromosómicas (clastógenos). En las neoplasias los cromosomas involucrados no corresponden a un patrón dado

por el azar, sino que son específicos de un agente nocivo, esto se sustenta en algunas neoplasias humanas asociadas con exposición ocupacional o ambiental a ciertos genotóxicos. En el caso de la leucemia mieloide crónica, la translocación cromosómica se ha asociado a la exposición de radiaciones ionizantes, de hecho hay una fuerte evidencia del riesgo inducido por radiación para todos los tipos de leucemia, en estudios de individuos sobrevivientes a bombas atómicas⁴.

Los rearrreglos balanceados observados en una neoplasia específica no son la única anomalía implicada en la patogénesis del cáncer, el desarrollo de un tumor es el resultado de un proceso de múltiples pasos debidos a la acumulación de muchos cambios genéticos que llevan a la transformación maligna y evolución clonal. Generalmente se acepta que las neoplasias hematológicas son sostenidas por células madre leucémicas, capaces de iniciar y mantener la enfermedad. El concepto de la célula madre cancerosa ha sido demostrado en algunos tumores sólidos malignos como en cáncer de mama, colon, pulmón y en sistema nervioso central³.

2.1.- Síndromes Mieloproliferativos y su clasificación

Los Síndromes Mieloproliferativos (SMP) son enfermedades clonales de células madre mieloides, caracterizadas por la proliferación autónoma monoclonal, resultando en la sobreproducción de uno o más linajes celulares hematopoyéticos. La presentación clínica e historia natural de cada una de las entidades es distinta, pero sus características frecuentemente se sobrelapan; tienden a tener un curso clínico prolongado y presentan anomalías de más de una línea de células hematopoyéticas⁵.

Las diversas líneas hematopoyéticas implicadas en los SMP derivan de un ancestro común pluripotencial, de modo que el proceso tumoral afecta primariamente a ese ancestro y no a las células progenitoras comprometidas para producir eritrocitos, granulocitos o plaquetas. Por lo que los SMP son

considerados como enfermedades de la célula madre o *stem cell* hematopoyética⁶.

La Organización Mundial de la Salud clasificó los SMP en leucemia mieloide crónica, mielofibrosis primaria (metaplasia mieloide), policitemia vera, trombocitemia esencial, leucemia neutrofílica crónica, leucemia eosinofílica crónica, síndrome hipereosinofílico, enfermedad de célula mastoide y neoplasia mieloproliferativa no clasificada⁷.

El diagnóstico clínico de un SMP a menudo se basa en el patrón morfológico de la célula involucrada. Los nombres de las diferentes entidades reflejan sus anomalías morfológicas. Así, la Leucemia Mieloide Crónica se caracteriza por la expansión incontrolada de las líneas celulares mieloides, mientras que la trombocitemia esencial muestra prominente expansión de megacariocitos con una excesiva producción de plaquetas. La policitemia vera es un ejemplo de una malignidad clonal, resultado de una producción incontrolada de glóbulos rojos⁵.

2.2.- Leucemia Mieloide Crónica

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC), también llamada Leucemia Granulocítica Crónica, es un síndrome mieloproliferativo crónico, con naturaleza clonal maligna de células madre hematopoyéticas pluripotenciales, comunes a las 3 series hematopoyéticas, resultando en un incremento de las líneas celulares mieloide, eritroide y megacariocítica en sangre periférica e hiperplasia mieloide en médula ósea. Los elementos mieloides proliferan en todos los estadios de diferenciación^{5,8}.

Clínicamente es una entidad de tres fases, la mayoría de los pacientes se diagnostican en la fase crónica, en la cual aún se producen granulocitos maduros, pero los pacientes tienen aumentada la cantidad de células progenitoras mieloides en sangre periférica. Cuando la enfermedad progresa, los pacientes entran a una fase acelerada que es seguida de una crisis blástica, en donde la diferenciación

hematopoyética ha sido bloqueada y hay acumulación de blastos inmaduros en médula ósea para después ser esparcidos en la circulación⁹⁻¹⁰.

La lesión genética en la célula madre hematopoyética es un rearrreglo cromosómico t(9;22) que involucra un gen de fusión llamado *BCR-ABL* que codifica para una proteína cinasa de tirosina, siendo la expresión de esta necesaria y suficiente para una transformación maligna de la célula. Es un hecho que el nivel de expresión del transcrito *BCR-ABL* se correlaciona con la progresión de la enfermedad, así un nivel alto, contribuye a la evolución de las fases avanzadas, varios estudios han indicado que la oncoproteína ejerce un efecto dependiente de dosis sobre factores de crecimiento, clonogenicidad, migración y en la tasa en la que la célula desarrolla resistencia a los inhibidores de cinasas de tirosina⁸.

La proteína quimérica BCR-ABL, que podemos clasificarla como un oncogén, es generada por una translocación t(9;22)(q34.1-q11.2) El brazo largo del cromosoma 9, específicamente en la sub-banda 1, de la banda 4, de la región 3, se rompe y se une a la sub-banda 2, de la banda 1, de la región 1 del brazo largo del cromosoma 22. La translocación fusiona la secuencia 3' desde el protooncogén *ABL1* del cromosoma 9, con la secuencia 5' del gen *BCR1* en el cromosoma 22¹¹⁻¹².

2.2.1.- Historia

La Leucemia Mieloide Crónica (LMC) es el primer cáncer humano en ser asociado a una anomalía genética adquirida, fue identificada en 1960 por dos investigadores estadounidenses en Filadelfia, Pensilvania. Nowell y Hungerford observaron que en 2 individuos con LMC, uno de los cromosomas del grupo G presentaba un tamaño menor¹³. Este marcador fue nombrado Cromosoma Filadelfia (Ph) en honor a la ciudad en el que fue descubierto. En ese tiempo no fue posible determinar cuál de los cromosomas del grupo G estaba involucrado, sin embargo, con la llegada de las técnicas de bandeado cromosómico en la década

de los 70s, Janet Rowley en el año 1973, descubrió que el cromosoma Ph resulta de una translocación recíproca y balanceada, que implica al cromosoma 9 y al 22, siendo la anomalía designada como $t(9,22)(q34;q11)$ ¹⁴.

Más tarde las técnicas de biología molecular, permitieron identificar los genes críticos involucrados, 2 investigadores del Instituto de Tecnología de California, Baltimore y Owen N. Witte identificaron el potencial de una proteína cinasa (c-Abl) en células transformadas por el virus de leucemia murina Abelson como principal causa de LMC ¹⁵⁻¹⁶, en esa misma década se encontró que los genes en los puntos de ruptura que originan el cromosoma Ph son el gen *ABL1* (Abelson) en el cromosoma 9 y el gen *BCR* (del inglés *breakpoint cluster region*) en el 22¹¹⁻¹².

En un inicio el tratamiento para la LMC fue rudimentario, el único agente con eficacia reconocida era el arsénico. Posteriormente la radioterapia, los agentes alquilantes y la hidroxiurea se convirtieron en el pilar de la terapia desde el principio del siglo XX hasta el advenimiento del interferón-alfa en la década de 1980. Durante ésta década también se descubrió que el trasplante alogénico de células madre, aunque no sin riesgo de mortalidad, podría resultar en una mayor supervivencia libre de enfermedad a largo plazo, y quizás la cura para los pacientes seleccionados. En 1998 se introdujo a la clínica el imatinib, el primer inhibidor cinasa de tirosina para LMC, revolucionando los enfoques para el tratamiento de pacientes recién diagnosticados en fase crónica¹⁷.

2.2.2.- Epidemiología

La LMC representa del 15 al 20 % del total de leucemias, es una enfermedad poco frecuente con tasas de incidencia que varían entre 0.6 y 2.0 casos por cada 100,000 habitantes, observándose un incremento de su prevalencia en los últimos años, causado principalmente por el uso de terapia con inhibidores de cinasas de tirosina que influyen positivamente en la sobrevida y expectativa de vida en los pacientes con LMC. Es principalmente una enfermedad de adultos, excepcionalmente se presenta antes de los 20 años y hay un incremento en su

frecuencia con la edad, con una edad de presentación en estudios multicéntricos alrededor de los 48-50 años. Los hombres están afectados más frecuentemente que las mujeres en una razón masculino a femenino que varía entre 1.3 y 1.8¹⁸. La etiología de la LMC es desconocida en la mayoría de los casos, sin embargo está bien establecida la relación entre LMC y la exposición con radiación ionizante⁴, la probabilidad de que una célula hematopoyética expuesta a radiaciones ionizantes (electromagnéticas o corpusculares) origine una LMC es proporcional a la dosis recibida, dosis de 50-100 Gy de radiación X o gamma es suficiente para inducir la fusión génica de *BCR-ABL* en líneas celulares de cultivos¹⁹.

2.2.3.- Características clínicas

La fase crónica o mielocítica se establece de forma insidiosa, haciendo difícil precisar el comienzo; su duración estimada es de 3 a 5 años, pero en algunos casos puede llegar a los 10 años. Las primeras manifestaciones son ataque al estado general caracterizado por astenia, adinamia, palidez y pérdida de peso, agregándose aquellas relacionadas con esplenomegalia como el dolor en hipocondrio izquierdo y la plenitud postprandial. El dato de laboratorio más importante es la leucocitosis, que al momento del diagnóstico puede ser de 40 a 300 x10⁹/L, con un promedio de 150 x10⁹/L. El aumento en el número de leucocitos ocurre siempre a expensas de los granulocitos principalmente de neutrófilos, con aparición de formas inmaduras en sangre periférica, aunque el número de mieloblastos supera pocas veces el 5% del recuento leucocitario. Otras alteraciones de la biometría hemática son basofilia, eosinofilia, trombocitosis y variaciones del hematocrito^{5,10,20}.

En la siguiente fase, denominada fase acelerada hay un decaimiento progresivo del estado general, con un aumento en la hepatoesplenomegalia, incremento de la leucocitosis con basofilia, anemia o plaquetopenia no atribuibles al manejo farmacológico y un aumento de blastos. Se observa una importante fibrosis en la biopsia de médula ósea, y aparecen nuevas alteraciones

citogenéticas. Una parte de los pacientes, fallecen durante esta fase por diversas complicaciones, éstas pueden ser sepsis, hemorragias, infiltraciones viscerales o fibrosis medular^{5,20}.

La fase terminal o blástica tiene un curso agudo con afección importante del estado general y aparición de hemorragias e infecciones, diferenciándose de las fases anteriores por un cuadro citológico (medular y periférico) con predominio creciente de mieloblastos y desaparición de las formas maduras. La fase blástica puede tener un comienzo brusco en pocas semanas o uno solapado con prolongación de la fase acelerada. En ambos casos, el signo de alerta es la infiltración de médula ósea por células inmaduras (blastos) y su aumento en sangre periférica donde representan más del 30% del recuento diferencial^{5,20}.

2.2.4.- Supervivencia

El promedio de sobrevida, una vez establecido el diagnóstico de LMC y dejando al paciente sin tratamiento médico, es de 3 años. El manejo farmacológico con busulfán e hidroxiurea, anteriormente usados, prolongaban la sobrevida a 4 o 5 años. La introducción del interferón α recombinante (IFN- α) aumentó la expectativa 2 años más. El uso actual de inhibidores de cinasas de tirosina de primera línea (imatinib) ha aumentado notablemente la sobrevida en los pacientes, publicaciones recientes han reportado una sobrevida a los 7 años del 86% y con un porcentaje de progresión a las fases avanzadas de solo el 7%²¹, sin embargo los tratamientos actuales solo controlan por algún tiempo la enfermedad, el único tratamiento curativo demostrado de la LMC es un trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos¹⁰.

2.2.5.- Factores pronóstico

El pronóstico en pacientes con LMC está muy relacionado con las fases avanzadas de la enfermedad. Existen dos clasificaciones para estimar un puntaje de riesgo inicial, la de Sokal y la de Hasford, ambas se basan en la edad del paciente, el tamaño del bazo, la cuenta plaquetaria y el porcentaje de blastos en sangre, además de estas variables el puntaje de Hasford toma en cuenta el porcentaje de basófilos y eosinófilos en sangre. Estos puntajes clasifican al paciente en un riesgo relativo, bajo e intermedio para la enfermedad^{10,21}.

Algunos factores predictores de una buena respuesta al imatinib son: el puntaje de riesgo de Sokal, la respuesta pretratamiento *in vitro* al IC50 (imatinib), la actividad de la proteína OCT-1 (factor de transcripción de unión a octameros tipo 1) antes del tratamiento, ya que niveles de actividad bajos requieren dosis iniciales mayores; otro factor son los polimorfismos o formas alternativas del gen *ABCB1* (miembro 1 de la subfamilia B de las proteínas con casete de unión a ATP), en donde la proteína codificada, al igual que OCT-1 tiene una función de proteína transportadora de fármaco, por lo que sus polimorfismos modifican la biodisponibilidad del imatinib. Se ha observado que el 85% de los pacientes homocigotos para la variante 1236T de *ABCB1* alcanzan una respuesta citogenética a dosis estándares, a diferencia de la respuesta del 45% cuando se tienen otros genotipos²¹⁻²².

Se consideran factores pronóstico la dosis inicial y los niveles plasmáticos del imatinib, dosis altas iniciales ayudan a alcanzar una respuesta citogenética más rápida. La respuesta molecular en los primeros tres meses, también es un factor de buen pronóstico.

El puntaje de Sokal también predice la sobrevida libre de progresión de la enfermedad, al igual que lo hace la respuesta hematológica alcanzada en los primeros 3 meses, la respuesta citogenética entre los 6 y 12 meses o la alcanzada molecularmente entre los 12 y 18 meses de tratamiento con imatinib²¹.

2.2.6.- Alteraciones en los valores de laboratorio

La cuenta de glóbulos blancos en los pacientes con LMC que cursan fase crónica, se encuentra invariablemente incrementada, en ocasiones puede ser mayor de 200,000/ μ L. La cuenta plaquetaria frecuentemente se incrementa, sin embargo, la trombocitopenia sugiere una fase acelerada o blástica. La hemoglobina usualmente esta en rangos normales. En la médula ósea, se observa una celularidad típicamente entre 90 y 100% que demuestra una marcada hiperplasia de la médula, la relación de células mieloides:eritroides es mayor de 20:1. El número de células blásticas (blastos) en la médula puede estar aumentado, pero es menor al 15% en la fase crónica. La fosfatasa alcalina leucocitaria es generalmente baja, el ácido úrico y LDH (lactato deshidrogenasa) frecuentemente están elevados^{5,23}.

La fase acelerada es asociada con el incremento de células inmaduras (promielocitos y blastos) tanto en médula ósea como sangre periférica y disminución en la cuenta plaquetaria. La leucocitosis aumenta, el porcentaje de basófilos en sangre a más del 20% (Ver tabla 1)²³.

Tabla 1 Criterios diagnósticos para las fases de LMC			
Característica	Crónica	Acelerada	Blástica
Blastos en MO o SP	<15%	15-29%	\geq 30%
Blastos + promielocitos en MO o SP	<30%	\geq 30%	
Basófilos en SP	<20%	\geq 20%	
Cuenta plaquetaria	>100,000		<100,000
MO: médula ósea, SP: sangre periférica			

Tomado de Munker, R. *Modern hematology*, 2006²³.

2.2.7.- Tratamiento y monitoreo

Existen principalmente dos opciones para el manejo del paciente con LMC, la terapia farmacológica y el trasplante alogénico de células madre. El trasplante continúa siendo el único tratamiento con efecto curativo demostrado, actualmente el progreso en la tipificación molecular de los alelos HLA (antígeno leucocitario humano), el avance en el manejo de las infecciones oportunistas, las modificaciones en el régimen de acondicionamiento, así como la terapia inmunosupresora han contribuido a mejorar los resultados del alotrasplante, el cual está indicado en pacientes con fase acelerada o blástica, con resistencia o toxicidad excesiva a los inhibidores de cinasas de tirosina, pacientes en fase crónica que cursen con algún dato de alerta como la evolución clonal, un puntaje alto en la escala de Sokal o la mutación T315I²⁴⁻²⁵.

A principios del siglo XX y hasta la llegada de la hidroxiurea y del interferón alfa, el busulfan (1,4-dimetanosulfoniloxibutano) fue el principal tratamiento de la LMC, es un agente alquilante con efecto prolongado, que aunque solo en pocos casos lograba disminuir el porcentaje de células cromosomas Ph+ y pocas veces retornaba la celularidad medular a lo normal, influye favorablemente en los efectos inmediatos de la leucocitosis excesiva, reduciendo temporalmente la esplenomegalia y aumentando el hematocrito, En la actualidad el busulfan se utiliza únicamente como tratamiento de acondicionamiento para el trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos^{5,10}.

La hidroxiurea (Hydrea) es un análogo de la urea y es un inhibidor cicloespecífico de la síntesis de DNA que bloquea la ribonucleótido-reductasa, enzima que transforma los ribonucleótidos en desoxirribonucleótidos. Su acción es máxima en la fase S del ciclo celular, consiguiendo la sincronización celular en la interfase G1-S. En la fase crónica de LMC su efecto es corto y transitorio. La supervivencia de pacientes manejados con busulfan e hidroxiurea es de 45 y 58 meses respectivamente y ninguno de los dos suprime la clona portadora de cromosoma Ph+²⁶.

El interferón alfa fue descubierto en 1957 y utilizado para LMC desde 1983, en su momento fue el fármaco de elección para el tratamiento médico de la LMC, comparte receptores dentro de una red de citocinas con otros interferones y presenta propiedades antiproliferativas, inmunomoduladoras y adherentes sobre las poblaciones neoplásicas²⁷.

El imatinib es la primera terapia dirigida para leucemias, es derivado de la 2 fenilaminopirimidina y bloquea la capacidad de ABL para transferir grupos fosfato a los residuos tirosina de sus proteínas blanco a partir del ATP, sin embargo entre el 2-4% de los casos anualmente desarrollan resistencia. Para los pacientes con resistencia adquirida a la dosis estándar de 400 mg al día, la escalación de dosis de Imatinib a 600-800 mg por día parece ser la primera opción. Para pacientes con resistencia primaria al imatinib, recurrencia hematológica o mutaciones emergentes en el dominio cinasa de BCR-ABL, están disponibles los potentes inhibidores de cinasas de tirosina de segunda generación como el dasatinib o el nilotinib²⁸. (Ver más adelante el capítulo 3.4.5, Inhibidores De cinasas de tirosina)

La eficacia del tratamiento se valora a través de pruebas de citogenética como son el cariotipo o el FISH (hibridación in situ por fluorescencia) o por técnicas de biología molecular. En el cariotipo de médula ósea la t(9;22)(q34.1;q11.2) constituye un indicador diagnóstico, pronóstico y marcador de evolución de la LMC. El estudio de FISH es complemento de la citogenética y puede detectar alteraciones cromosómicas en las células en interfase, por lo que tiene una mayor sensibilidad para detectar la translocación ya que detecta una célula leucémica en 200 a 500 normales, pero con la desventaja de no poder evaluar otras alteraciones cromosómicas estructurales o numéricas²⁹.

Se han diseñado criterios de respuesta citogenética al tratamiento. La respuesta citogenética es completa si no se detecta cromosoma Ph en al menos 20 metafases, parcial cuando las células Ph+ se presentan en el 1 a 34% y menor entre el 35 y 94%, cuando hay más del 95% de metafases Ph+ la respuesta se considera nula²⁹.

Cuando se obtiene la respuesta citogenética completa [RCgC] aún hay una cantidad de células leucémicas que no son detectadas por los estudios de citogenética o FISH. Los métodos moleculares basados en reacción en cadena de la polimerasa son los más sensibles para la detección de un porcentaje bajo de transcritos de *BCR-ABL*, y son los únicos útiles cuando hay RCgC. El RT-PCR es un método cualitativo útil para determinar el tipo de transcrito según su los puntos de ruptura de la translocación y para el monitoreo de la enfermedad mínima residual³⁰⁻³¹.

La técnica de RQ-PCR, reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real es un método cuantitativo con una sensibilidad de detección de una célula BCR-ABL positiva en 10^6 células, la monitorización molecular por estudios cuantitativos es necesaria una vez alcanzada la remisión citogenética completa, para poder estratificar la respuesta al tratamiento y detectar tempranamente resistencia secundaria al fármaco³¹.

2.3.- Inestabilidad genética y evolución clonal

Adicionales al cromosoma Ph, se han observado anomalías cromosómicas secundarias, siendo éstas de forma preferencial para algunos cromosomas y caracterizando las formas avanzadas de la enfermedad. Dentro de estas alteraciones citogenéticas, la anomalía más frecuente la constituye la trisomía 8 en el 33% de los casos, un segundo cromosoma Ph en 30%, en el 20% hay un isocromosoma de 17q, 12% tienen trisomía 19, 7% trisomía 21, el 5% monosomía del 7 y 8% de los casos en varones tienen pérdida del cromosoma Y³². La trisomía 8 provoca una sobreexpresión de *c-MYC*, el isocromosoma del 17q implica una pérdida de 17p donde se ubica *p53*, la duplicación del cromosoma Ph condiciona una sobreexpresión de *BCR-ABL*, aumentando la agresividad de la enfermedad.

Los mecanismos de detección de daño y de reparación genómicos se encuentran comprometidos en LMC, se ha propuesto que la proteína quimérica

BCR-ABL induce mutaciones en genes responsables para el mantenimiento de la integridad genómica, y que estas mutaciones funcionan como un "amplificador" de un fenotipo genéticamente inestable (ver tabla 1)⁸.

Se ha observado en células positivas para BCR-ABL disminución en la fosforilación y activación de la proteína CHK1 (del inglés *Checkpoint Kinase 1*) ocasionada por una inhibición de la proteína ATR (por Ataxia Telangiectasia y relacionada con RAD3). ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) parece no estar afectada, pero su sustrato BRCA1 se encuentra muy disminuido, éste organiza diferentes sensores de daño y coordina la actividad de reparación, estando ambas vías alteradas (ATR y ATM) causan una replicación inapropiada del DNA en presencia de daño genómico, incluyendo las rupturas de doble cadena, lo que pudiera explicar el alto índice de deleciones y translocaciones cromosómicas. Los niveles bajos de BRCA1 son dependientes de la actividad cinasa de tirosina de BCR-ABL y ocurren a través de mecanismos postranscripcionales^{8,33}.

La expresión de la proteína quimérica BCR-ABL también afecta a ciertos mecanismos de reparación genómica. La reparación para rupturas de doble cadena que incluye la unión de extremos no homólogos (UENH) y la reparación por recombinación homóloga (RH), se encuentran alteradas. En células progenitoras CD34⁺ portadoras de t(9;22), se han observado niveles casi indetectables de DNA-PKcs, una proteína cinasa dependiente de DNA indispensable para la reparación por UENH, sus niveles se correlacionan inversamente con los niveles de BCR-ABL.

BCR-ABL afecta la fidelidad de la reparación por RH al aumentar la expresión de la proteína RAD51 y bloquear su degradación proteolítica por la prevención de la activación de la caspasa 3. El aumento en la actividad de RAD51 se manifiesta con un fenotipo resistente a los agentes citotóxicos, ya que las lesiones en el DNA generados por estos agentes son reparadas rápidamente por incremento en la actividad de RH, sin embargo carece de fidelidad, con una tasa de mutación de 6×10^{-3} contra una tasa aparentemente libre de errores en células

normales. El aumento de la transcripción de RAD51 involucra la activación dependiente de homología Src de STAT5^{8,34}.

Una activación constitutiva de JAK2 lleva a la activación y fosforilación de STAT3 y STAT5, necesarios para la transformación inicial. La transformación mielóide obedece críticamente a los niveles de STAT5 de una forma dependiente de dosis génica, se ha visto que su delección induce un arresto en el ciclo celular G₀/G₁ seguido de apoptosis de células leucémicas tanto sensibles como resistentes al imatinib³⁵.

La presencia de la proteína de fusión BCR-ABL, específicamente la variante p210^{BCR-ABL} interfiere con la función normal de XPB, proteína cuya alteración ocasiona xeroderma pigmentosum del grupo B, se ha observado que se encuentra fosforilada y es incapaz de reparar defectos en el DNA en células cromosoma Ph⁺³⁶.

En varios tumores sólidos y leucemias ocurre un acortamiento de telómeros, las células con LMC tienen una tasa de pérdida de telómeros incrementada, sin embargo paradójicamente la actividad de la telomerasa está aumentada. En las células somáticas con cada división celular hay una pérdida de repetidos teloméricos, mientras que en células madre y de línea germinal el complejo enzimático de la telomerasa mantiene el largo de los repetidos. Para el caso de la LMC, el acortamiento de los telómeros se correlaciona con la fase de la enfermedad, duración de la fase crónica, el pronóstico valorado por puntaje de Hasford y a la respuesta terapéutica con inhibidores de cinasas de tirosina. En la fase crónica la actividad de la telomerasa ya se encuentra aumentada pero en las fases acelerada y blástica hay una fuerte regulación a la alta. Se ha propuesto una posible línea terapéutica a este nivel³⁷.

Tabla 2 Genes implicados en la evolución de la LMC	
Mecanismo alterado	Genes implicados
Arresto de la diferenciación	<i>CEBPα, HNRNPE2, NUP98-HOXA9, AML1-EVI1</i>
Alteración en la detección de daño genómico	<i>ATR, BRCA1</i>
Deficiencias en la reparación del ADN	<i>DNA-PKcs, RAD51, FANCD, WRN, XPB</i>
Fenotipo mutador	<i>POLB, MLH1, PMS2</i>
Acortamiento de telómeros	<i>TERT</i>
Pérdida de función tumor-supresor	<i>PP2A, TP53, CDKN2A, INK4A, ARF, RB1</i>
Desconocida	<i>PIASy, AML1, AF1Q, ETS2, LYL1, PLU1, IMPDH1, GBDR1, NME1, GRO2, CA4, SNC73, MSF, CREBBP, PRAME, GLI2, SOCS2, WT1, GAS2, MDFI, WIT1, RRAS2, ITPR1, FOS, ARG, CD7, PR3, ELA2, BMI1</i>

Tabla 2, traducido de *Nat Rev Cancer* 2007.⁸

2.4.- Bases Moleculares

2.4.1.- Gen *BCR*

El término de *bcr* (*breakpoint cluster region*) fue primero aplicado a una región cromosómica que se expande 5.8 kb en el brazo largo del cromosoma 22 (22q11) en la cual caen los puntos de ruptura observados en la translocación t(9;22)(q34;q11) en pacientes con LMC¹²; posteriormente se encontró el gen ubicado en esta región y se denominó *BCR*³⁸.

Por estudios realizados en pollo, ratón y tejidos humanos se sabe que el transcrito de este gen se encuentra altamente expresado en cerebro y células hematopoyéticas. El gen se expande 160 kb y contiene 23 exones. En la región UTR (no traducida) 5' se encuentra su promotor, el cual juega un papel importante en el gen quimérico *BCR-ABL*. En el primer exón se encuentran varios dominios:

un dominio con actividad de cinasa de serina/treonina, el cual cuenta con un sitio de unión a ATP y fosforila el grupo OH de la serina o la treonina, *in vitro* fosforila caseína e histonas; un dominio de oligomerización que puede formar homotetrámeros, 3 regiones de unión a proteínas SH2, la primera se une a GRB2 (proteína 2 de unión a receptor de factor de crecimiento), esencial en la vía de transducción de señales RAS. Del exón 3 al 10 tiene un dominio GEF (factor intercambiador de nucleótido de guanina) y del 19 al 22 actividad de GTPasa que regula p21^{rac} 39.

Varios pseudogenes han sido caracterizados (*BCR2*, *BCR3* y *BCR4*), aparentemente no traducidos a productos proteicos, están localizados en la región cromosómica 22q11, sin embargo durante la translocación t(9;22)(q34;q11) permanecen en el cromosoma 22³⁹.

2.4.2.- Gen *ABL1*

El gen *ABL1* (cinasa de tirosina Abelson 1) se localiza en 9q34.1 y codifica para una proteína cinasa de tirosina de 145 kd, actualmente se han descubierto 6 transcritos diferentes. El gen *ABL1* junto con su parólogo *ABL2* (gen relacionado a ABL) conforman la familia ABL, proteínas no receptores del tipo cinasas de tirosinas⁴⁰.

La proteína ABL se localiza en el núcleo, citoplasma, mitocondria, retículo endoplásmico y membrana celular, interactuando con adaptadores de señalización, cinasas, fosfatasas, reguladores del ciclo celular, factores de transcripción y con proteínas del citoesqueleto.

Todas las proteínas de las familias ABL, SRC y TEC tienen una organización estructural similar, compartiendo un dominio SH2 (dominio con homología a SRC 2) el cual reconoce y se une específicamente al estado fosforilado de residuos tirosina, su longitud es de aproximadamente 100 aminoácidos de largo y desempeña un papel vital en la transducción de señales intracelulares; un dominio

SH3 de 50 a 70 aminoácidos que reconoce y se une a secuencias típicamente ricas en prolina, y un dominio cinasa de tirosina que puede transferir un grupo fosfato del ATP a un residuo tirosina de una proteína. La actividad de la proteína está regulada negativamente por su dominio SH3, la delección de este dominio hace que el gen se comporte como un oncogén. La fosforilación en residuos tirosina que se produce en la interacción ligando-receptor capta y acerca a la membrana proteínas intracelulares, que de este modo actúan sobre sustratos cercanos o bien atraen hacia el nuevo complejo multiproteico otras proteínas⁴⁰⁻⁴¹.

2.4.3.- Gen de fusión *BCR-ABL*

La proteína codificada por el gen quimérico *BCR-ABL* varía en tamaño dependiendo de los puntos de ruptura en ambos genes, en el caso del gen *BCR* los puntos de ruptura se encuentran dentro de tres regiones: principal (*M-BCR*), menor (*m-BCR*) y región micro (μ -*BCR*)⁴².

El 95 % de los pacientes con LMC Ph+ presentan un punto de ruptura en *M-BCR*. En esta región cuando la ruptura se da después del exón 13 resulta en una unión b2a2 (e13a2) o si se da después del exón 14 da un transcrito de fusión b3a2 (e14a2), ambos transcritos son traducidos en una proteína con peso molecular de 210,000d nombrada como p210^{*BCR-ABL*}. En la región *m-BCR* se produce una fusión e1a2 con un producto proteico p190^{*BCR-ABL*} observado en algunos casos de leucemia linfoblástica aguda. En casos raros de LMC puede encontrarse una proteína P230^{*BCR-ABL*} en donde el punto de ruptura es localizado en la región μ -*BCR*, originado un transcrito de fusión e19a2⁴³⁻⁴⁴.

En cuanto al gen *ABL*, las rupturas se dan casi siempre en el exón 2 que resultan en uniones a2, otro punto descrito se encuentra entre el exón 2 y 3, denominándolas uniones a3. La parte del gen *ABL* siempre conserva el dominio cinasa de tirosina, por lo que cualquiera de las variantes (p210^{*BCR-ABL*}, p190^{*BCR-ABL*} y p230^{*BCR-ABL*}) tienen el potencial de desarrollar leucemia⁴⁵.

La cinasa *BCR-ABL* causa fosforilación y activación de un amplio rango de sustratos con tirosina corriente abajo que modulan la transducción de señales y transformación en la célula. Su actividad de cinasa está dada por los dominios cinasa de ambos genes (*BCR* y *ABL*), sin embargo el encendido de la actividad del dominio cinasa de tirosina de *ABL* es necesaria para el potencial oncogénico de la proteína quimérica⁴⁶.

2.4.4.- Proteínas cinasa

Una proteína cinasa es definida por su habilidad de catalizar la transferencia del fosfato terminal de una molécula de ATP a un sustrato que usualmente contiene un residuo de serina, treonina o tirosina. Típicamente estas proteínas comparten un rearreglo conservado de 12 subdominios que se pliegan en una estructura catalítica central bilobulada, entre estos lóbulos se forma una hendidura en la que se encuentra un ATP unido al anillo de una adenina, formando puentes de hidrógeno con la región bisagra (segmento que conecta los dominios terminales amino y carboxilo de la cinasa)⁴⁷.

Todas las cinasas tienen un asa de activación, que regula la actividad cinasa y esta marcada por dos motivos conservados, uno DFG (Asp-Phe-Gly) al inicio y un APE (Ala-Pro-Glu) al final del asa. El asa activa asume un gran número de conformaciones en su extremo, siendo catalíticamente competente y usualmente fosforilada, mientras que en la configuración inactiva, el asa bloquea el sitio de unión al sustrato⁴⁷.

2.4.5.- Inhibidores de cinasas de tirosina

Existen 4 clases de inhibidores de cinasas, el primer grupo constituye la mayoría de los inhibidores competitivos de ATP que reconocen la conformación tipo 1 o activa de la cinasa. El segundo grupo reconoce la conformación tipo 2 o inactiva, en donde el movimiento del asa de activación a la conformación DGF-out

expone un sitio adicional de unión hidrofóbico que se encuentra adyacente al sitio de unión del ATP, el imatinib pertenece a este grupo. El tercer grupo le corresponde a los inhibidores alostéricos, que se unen de manera reversible y no covalente a un sitio alostérico, fuera del sitio de unión a ATP, modificando la estructura tridimensional de la enzima y disminuyendo así su actividad. Los inhibidores del cuarto tipo son capaces de formar una unión covalente e irreversible con el sitio activo de la cinasa, frecuentemente por la interacción con un residuo cisteína⁴⁷.

El imatinib fue aprobado por la agencia estadounidense FDA (*Food and Drug Administration*) en el 2002 para ser el tratamiento de primera línea en pacientes con LMC, basándose en sus altas tasas de respuesta citogenética y molecular, en su eficacia a largo tiempo y a su tolerancia superior al Interferón.⁴⁸ Después de 7 años de seguimiento del estudio IRIS (Estudio aleatorio internacional de interferón *versus* STI571), la supervivencia estimada de pacientes recibiendo imatinib es de 86% y la falta de progresión a fase acelerada o blástica fue de 93%, sin embargo en el estudio IRIS se encontró que el 35% de los pacientes fallaban para alcanzar la respuesta óptima al imatinib: el 18% no alcanzó la respuesta citogenética completa, el 11% perdió esta respuesta y el 8% discontinuó el tratamiento⁴⁹.

Además de inhibir la actividad cinasa de BCR-ABL, se ha estudiado la capacidad del imatinib de bloquear la actividad de la telomerasa a través de la vía AKT/PDK. La telomerasa es una enzima formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico con actividad polimerasa, responsable de la síntesis de repetidos teloméricos en los extremos de los cromosomas para compensar la pérdida de telómeros durante la división celular. 85% de los cánceres poseen actividad de telomerasa y tienen telómeros relativamente cortos comparados con células normales, haciéndolos más susceptibles a ser eliminadas con inhibidores de telomerasa. Se ha demostrado que células resistentes al efecto del imatinib sobre BCR-ABL pueden ser aun sensibles al fármaco con respecto a otros componentes celulares y que su efecto sobre la telomerasa no es por un blanco conocido del imatinib⁵⁰.

Nilotinib, Dasatinib y Bosutinib son inhibidores de segunda generación requeridos para combatir la resistencia al imatinib causada por mutaciones en *BCR-ABL*, muestran una resistencia cruzada mínima entre ellos y demuestran diferentes respuestas de acuerdo al tipo de mutación. El tratamiento secuencial con diferentes inhibidores de cinasas de tirosina es una de las estrategias para el manejo de la LMC, pero se ve dificultado por los cambios dinámicos de las mutaciones en el dominio cinasa⁵¹.

El dasatinib es un compuesto derivado de tiazol, que inhibe potentemente la familia de cinasas SRC que incluyen FGR, FYN, HCK, LCK, LYN y YES, adicionalmente inhibe KIT (también llamado CD117), PDGFR (Receptor de factores de crecimiento derivado de plaquetas) y BCR-ABL. A diferencia del imatinib y el nilotinib, se une a la conformación activa del dominio cinasa de tirosina de BCR-ABL, inhibiendo 21 de 22 formas mutantes de la proteína que son resistentes al Imatinib. Es 325 veces más potente que el imatinib para inhibir BCR-ABL, pero al igual que el nilotinib no inhibe la variante T315I. Otras mutaciones no sensibles son: Q252H, E255K/V, F317L y V299L⁵².

El nilotinib es una fenilaminopirimidina 30 veces más potente y más selectivo que el imatinib para inhibir *ABL* y *BCR-ABL*, inhibe 33 formas mutantes de p210^{BCR-ABL} que son resistentes al imatinib. Las mutaciones no sensibles a este fármaco son: E255K/V, Y253H, F359V y T315I^{47,52}.

Todos los Inhibidores de cinasas de tirosina utilizados en la actualidad para LMC no son exclusivos de BCR-ABL, también inhiben la actividad cinasa de muchas otras proteínas. Todos inhiben la proteína ABL, importante mediador del funcionamiento cardiaco normal. Los efectos cardiológicos incluyen falla cardiaca congestiva, disfunción ventricular izquierda y prolongación del intervalo QT, todos reportados con el uso de Dasatinib y Nilotinib. Cerca del 2% de los pacientes recibiendo Dasatinib desarrollaran disfunción cardiaca⁵³.

La inhibición de la familia de cinasas SRC que se expresan solo en células hematopoyéticas (HCK, LYN, FGR, LCK y BLK) causa mielosupresión que se

manifiesta con anemia, neutropenia y trombocitopenia. En la fase crónica el 30% y el 28% de los pacientes manejados con Nilotinib desarrollan neutropenia y trombocitopenia, respectivamente, mientras que con el Dasatinib el 50% tiene neutropenia y el 49% trombocitopenia. El imatinib muestra una seguridad favorable en pacientes con LMC en fase crónica, el 14.3% desarrolla neutropenia, 7.8% trombocitopenia y 3.1% anemia⁵²⁻⁵³.

Otros efectos adversos son la alteración en el metabolismo óseo y la retención de líquidos causados por la inhibición de PDGFR, toxicidad dermatológica caracterizada por rash, edema superficial, despigmentación e hiperpigmentación por la inhibición de C-KIT. El Busutinib (SKI-606) es un nuevo inhibidor de cinasas de tirosina administrado por vía oral capaz de inhibir BCR-ABL 200 veces más potente que el imatinib y que no muestra actividad contra C-KIT y PDGFR⁵².

Existen nuevos agentes que están siendo probados en pacientes resistentes al imatinib y otros inhibidores, y que tienen una actividad preclínica significativa contra células con *BCR-ABL* T315I, varios de ellos son potentes inhibidores de cinasas Aurora. Ejemplos de estos agentes son, MK-0457, XL228, PHA-739358, AT-9283 y KW-2449. Otros fármacos no inhibidores de cinasas de tirosina tienen un mecanismo de acción pobremente entendido pero inhiben la proteína portadora de la mutación T315I de una forma independiente de BCR-ABL, como el Omacetaxine que logra una respuesta citogenética del 28% en pacientes portadores de la mutación T315I⁴⁹.

2.4.6.- Mecanismos de resistencia

En el caso de la LMC tratada con Imatinib, se ha observado una disminución de la tasa de progresión a fase acelerada o blástica después del segundo año de tratamiento, siendo del 0% al sexto año de terapia, por lo tanto el imatinib ha sido considerado como la primera línea terapéutica en pacientes con LMC. En algunos pacientes se desarrolla resistencia a este fármaco, principalmente cuando el

manejo se inicia en las fases avanzadas de la enfermedad. Se estima que entre el 20% y el 30% de los pacientes con LMC desarrollarán resistencia a imatinib^{48,54}.

La resistencia a los inhibidores de cinasas de tirosina se clasifica en primaria o refractaria y secundaria o adquirida. En la resistencia primaria no hay una respuesta eficaz desde el inicio del tratamiento, mientras que en la secundaria inicialmente puede observarse cierto grado de respuesta pero existe falta de respuesta citogenética mayor o respuesta hematológica completa, lo que ocasiona una falla del tratamiento en la evolución clínica del paciente. La tasa de resistencia primaria y secundaria varía dependiendo de la fase de la enfermedad. En la fase crónica se reporta una tasa de resistencia del 3%, en la fase acelerada del 9%, mientras que en la blástica llega a ser del 51%⁵⁵.

La resistencia puede estar ocasionada por cambios en la farmacocinética del inhibidor de cinasas de tirosina, alteraciones a este nivel impiden que el fármaco alcance concentraciones efectivas en las células blanco y por lo tanto una acción deficiente, un ejemplo es la disminución de la biodisponibilidad del imatinib cuando hay una gran cantidad de CYP3A4 y CYP3A5, ambas isoenzimas del citocromo p450, encargadas del metabolismo del fármaco; o las variaciones de su actividad dependiendo de las concentraciones de una proteína plasmática llamada AGP1 (α 1 glicoproteína ácida 1) la cual se une con el imatinib y lo inactiva⁵⁴.

Los mecanismos de resistencia también pueden estar relacionados directamente con la proteína p210^{BCR-ABL}. En algunos casos una sobreexpresión del gen quimérico, como la ocasionada por la formación de un segundo cromosoma Ph pueden originar una resistencia al imatinib a dosis estándar, sin embargo por estudios utilizando la técnica de FISH se sabe que solo un bajo porcentaje de pacientes presentan la amplificación de dosis génica, sugiriendo que las mutaciones puntuales en el gen son el mecanismo más común de resistencia⁵⁶.

Varios estudios han reportado resistencia a inhibidores de cinasas de tirosina causada por mutaciones puntuales generalmente en el dominio cinasa de tirosina

del gen *BCR-ABL*, la frecuencia de estas mutaciones en pacientes con resistencia varía desde el 40% al 90% en algunas series, dependiendo de la sensibilidad del método de detección utilizado, la fase clínica en la que se encuentran los pacientes estudiados y a los parámetros utilizados para definir la resistencia al fármaco⁵⁴.

Otro mecanismo de resistencia observado es un *splicing* (corte y empalme) alternativo del mRNA *BCR-ABL*, el cual resulta por 35 nucleótidos de la secuencia normal del intrón 8 de *ABL* que se insertan entre el exón 8 y 9, recorriendo el marco de lectura y formando una proteína con 10 nuevos residuos en la posición 475 y un codón de paro en la posición 485. Se propone que el nivel de expresión de este transcrito confiere una resistencia parcial al imatinib. La proporción de pacientes imatinib-resistentes que expresan el transcrito *BCR-ABL* alternativo es del 62% mientras que en los pacientes sin resistencia solo se ve en el 3%⁵⁷.

Las estrategias para el tratamiento de pacientes resistentes a imatinib, incluyen la escalación de dosis con imatinib, el ajuste de dosis basado en evaluaciones farmacocinéticas, el uso de nuevos agentes inhibidores de cinasas de tirosina o el trasplante alogénico de células madre^{52,58}

2.4.7.- Mutaciones

Más de cien mutaciones puntuales han sido detectadas en el dominio cinasa de tirosina, sin embargo entre el 60 y 70% de las encontradas corresponden a cambios en los residuos Gly250, Tyr253, Glu255, Thr315, Met351 y Phe359⁵⁹ (ver tabla 3). Algunos pacientes con resistencia tienen más de una mutación, representando una molécula con mayor potencial oncogénico que el producido por cada mutación individualmente, siendo necesario el uso combinado de inhibidores de cinasas de tirosina con actividad sobre cada una de las mutaciones.

A nivel molecular las mutaciones puntuales en el gen *BCR-ABL* reducen la unión del fármaco a la proteína a través de mecanismos directos e indirectos. Las

mutaciones que directamente bloquean la acción de los inhibidores de cinasas de tirosina se localizan alrededor del sitio de unión y en ocasiones parcialmente sobre el sitio de unión al ATP. Los cambios en la secuencia de aminoácidos alteran las interacciones de puentes de hidrógeno y contactos lipofílicos de la proteína quimérica o resultan en modificaciones topográficas que ocultan el sitio de unión, como ocurre con las posiciones Thr315 y Phe317 en el caso de resistencia a imatinib⁵⁹.

El imatinib se une a la configuración catalíticamente inactiva del dominio cinasa de tirosina, referido como la conformación “DFG-out”, en la cual la región DFG del asa de activación es lanzada de su posición usual. Esto forma un canal más allá del residuo *gatekeeper* perteneciente al aminoácido Thr315 que se abre como un sitio auxiliar de unión a una parte del imatinib. El residuo con función de guardián, portero o "*gatekeeper*" es localizado atrás del sitio de unión a ATP, cuyas propiedades de tamaño y carga determinan la accesibilidad de un sitio hidrofóbico, importante para varios inhibidores de cinasas de tirosina (tipo 2) porque las interacciones hidrofóbicas en este sitio son cruciales para la afinidad de la unión. Cambios en este residuo, principalmente en Thr315 alteran directamente e indirectamente la unión con los inhibidores^{47,59}.

Ciertas mutaciones puntuales en el dominio cinasa de tirosina alteran el asa-P (asa de unión a nucleótidos) a través de la pérdida de puentes de hidrógeno entre el grupo OH (hidroxilo) de Try253 y Asn322, primordiales para la estabilización de la conformación inactiva del asa-P, incrementando la energía libre del complejo BCR-ABL-imatinib y reduciendo su afinidad de unión. Ejemplos de esta situación son los cambios de los aminoácidos Glu255, Tyr253 y Gly250⁵⁹⁻⁶⁰.

Mutaciones en el asa-P y en el residuo T315I generalmente se encuentran en pacientes con fases avanzadas de la enfermedad⁶¹, sin embargo las mutaciones en el gen *BCR-ABL* que originan resistencia pueden estar presentes en niveles bajos o incluso indetectables por algunos métodos antes de iniciarse el tratamiento con inhibidores de cinasas de tirosina. Las subclonas con la mutación

pueden estar en menos del 1% entre las células tumorales y aumentar su prevalencia durante la terapia a través de un fenómeno llamado presión selectiva, el imatinib se encarga de disminuir las subclonas sin mutación, mientras que las que portan la mutación al ser resistentes al fármaco proliferan⁵⁹

Tabla 3. Mutaciones más comunes en pacientes resistentes al imatinib				
Mutación	Prevalencia en LMC resistente a imatinib	Imatinib IC ₅₀ (nM)	Nilotinib IC ₅₀ (nM)	Dasatinib IC ₅₀ (nM)
Alelo Silvestre		260	13	0.8
T315I	13 - 16%	>6400	>2000	>200
M351T	10 - 13%	880	15	1.1
E255K	9 - 14%	5200	200	5.6
G250E	5 - 9%	1350	48	1.8
Y253F	6%	3475	125	1.4
Y253H	5%	>6400	450	1.3
F359V	4 - 5%	1825	175	2.2
M244V	4%	2000	38	1.3
H396R	4%	1750	41	1.3
F317L	3 - 4%	1050	50	7.4
M237I	3%	1550	35	NA
Q252H	2 - 3%	1325	70	3.4
E255V	2 - 3%	>6400	430	11
E355G	2 - 3%	2400	47	1.8
L248V	2%	2100	100	NA
D276G	2%	2500	80	NA
F486S	2%	ND	ND	ND

Tabla 3. Prevalencia y sensibilidad *In vitro* de las mutaciones más frecuentes que otorgan resistencia a inhibidores de cinasas de tirosina.

Sensibilidad alta con un IC₅₀ de ≤1000 nM imatinib, ≤50 nM nilotinib y ≤3nM dasatinib. Sensibilidad baja con un IC₅₀ de ≥3000 nM imatinib, ≥500 nM nilotinib y ≥60nM dasatinib. No disponible, ND

Modificado de *J Mol Diagn* 11, 4-11 (2009)⁶⁰.

Como se explico anteriormente en la parte de Inestabilidad genética y evolución clonal el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno y del daño al DNA por múltiples mecanismos, se ven reflejados en la ocurrencia de mutaciones puntuales en las células madre leucémicas residuales. El acumulo de daño en el gen quimérico se manifestará en determinado momento con resistencia al imatinib y otros inhibidores, resultando en la progresión de la enfermedad. Actualmente hay un debate de si las mutaciones son preexistentes o adquiridas durante el tratamiento con inhibidores.

Actualmente no hay consenso referente a la técnica que debería ser usada de rutina para el monitoreo de mutaciones en pacientes con LMC. A pesar de que la secuenciación directa del gen es un estudio con sensibilidad limitada y con una tasa alta de falsos negativos, sigue siendo la prueba más empleada para detectar mutaciones en la mayoría de los estudios. Su sensibilidad aproximada es del 10 al 20%, definiendo sensibilidad como el menor porcentaje de subclonas portadoras de mutación que pueden ser detectadas por la prueba. La secuenciación directa tiene ventajas sobre las demás pruebas por su disponibilidad en la mayoría de los laboratorios, su uso relativamente fácil, y en relación al bajo costo y tiempo invertidos en el estudio. Técnicas más sensibles como el ASO-PCR (oligonucleótido alelo específico) pueden detectar las mutaciones varios meses antes que la secuenciación, con una sensibilidad del 0.001%, son específicas de mutaciones conocidas, pero no aplican para el tamizaje de mutaciones desconocidas^{54,62}.

El análisis de mutaciones por RFLP (del inglés *restriction fragment length polymorphism*) puede ser usado para el tamizaje de muestras para la misma mutación, siempre y cuando el cambio en la secuencia de DNA elimine o genere un sitio de restricción. La secuencia que delimita la mutación es amplificada y digerida con la enzima apropiada y los fragmentos son observados a través de una electroforesis en gel. Su sensibilidad para detectar subclonas portadoras de una mutación es del 5 al 10%. Para el caso de la LMC, es posible identificar la mutación T315I del dominio cinasa de tirosina de *ABL* con la enzima *Ddel*⁶³⁻⁶⁴.

3.- Planteamiento del problema

Los Inhibidores de cinasas de tirosina actualmente representan la mejor opción farmacológica para el manejo de la LMC, sin embargo un porcentaje considerable de pacientes desarrollan resistencia a estos medicamentos. Se ha observado que mutaciones en el dominio cinasa de tirosina del gen quimérico *BCR-ABL* son una de las causas más frecuente de resistencia. En base a lo anterior, nuestro problema es:

- I. ¿Cuál es la frecuencia de la mutación T315I en un grupo de pacientes mexicanos con LMC?
- II. ¿La mutación T315I en el dominio cinasa de tirosina de *BCR-ABL* es la principal causa de resistencia farmacológica al imatinib y dasatinib en pacientes mexicanos con LMC?
- III. ¿Existe alguna relación entre el tipo de transcrito *BCR-ABL* y la presencia de la mutación T315I en pacientes mexicanos con LMC?
- IV. ¿Qué tipo de transcrito se correlacionan más con la evolución clonal?

4.- Hipótesis

- I. La mutación T315I en el dominio cinasa de tirosina de *BCR-ABL* será la principal causa de resistencia al imatinib y dasatinib en pacientes mexicanos con LMC
- II. Si la resistencia a inhibidores de cinasas de tirosina aumenta conforme la progresión de la enfermedad, encontraremos una mayor frecuencia de la mutación T315I en el transcrito de fusión *BCR-ABL* en las etapas avanzadas de la enfermedad.
- III. Por ser el transcrito b2a2 aparentemente más sensible al imatinib, habrá mayor prevalencia de la mutación T315I en pacientes portadores del transcrito b3a2.
- IV. Los pacientes con el rearreglo b3a2, presentarán mayor riesgo de evolución clonal.

5.- Justificación

En México existe la necesidad de estudiar los mecanismos de resistencia a los inhibidores de cinasas de tirosina utilizados en pacientes con diagnóstico de LMC. La LMC es actualmente una enfermedad con varias opciones de tratamiento, los inhibidores de cinasas de tirosina han sido considerados como el tratamiento farmacológico de elección, siendo el imatinib aprobado por la FDA como fármaco de primera línea, sin embargo el costo elevado de estos medicamentos es una restricción para los pacientes mexicanos. Por otra parte, existen mutaciones en el dominio cinasa de tirosina de *BCR-ABL* que confieren resistencia a ciertos inhibidores y el paciente puede estar recibiendo el fármaco durante varios meses sin saber que es portador de una de estas mutaciones. Esto lleva al progreso de la enfermedad, motivo por el cual es importante monitorear a los pacientes a través de estudios citogenéticos y moleculares que nos indiquen si el fármaco elegido es el indicado para cada paciente. De la misma forma, para una Institución de Salud con recursos limitados constituye una guía eficaz para el mejor aprovechamiento de los recursos, tanto a nivel de pruebas diagnósticas y monitoreo, como para la administración y modificación oportuna del tratamiento.

Clínicamente la detección de la mutación T315I constituye el principal indicador de que el paciente desarrollará resistencia farmacológica para todos los Inhibidores de cinasas de tirosina disponibles en nuestro país. Si la detección se realiza oportunamente, el paciente puede entrar a protocolo de alotransplante de células madre o protocolos de nuevos fármacos y cambiar en gran medida su pronóstico.

6.- Objetivos

6.1.- Objetivo general

Identificar la mutación T315I en el dominio cinasa de tirosina del gen quimérico *BCR-ABL* en un grupo de pacientes mexicanos con LMC.

6.2.- Objetivos específicos

- I. Asociar la mutación T315I con el estado clínico del paciente y su respuesta al tratamiento farmacológico con inhibidores de cinasas de tirosina en los pacientes.
- II. Correlacionar el tipo de rearreglo *BCR-ABL* con la severidad de la enfermedad en un grupo de pacientes mexicanos tratados con inhibidores de cinasas de tirosina.
- III. Identificar la relación entre el tipo de rearreglo y la presencia de mutación T315I del dominio cinasa de tirosina.
- IV. Determinar la frecuencia de la mutación T315I del transcrito *BCR-ABL* en un grupo de pacientes mexicanos tratados con inhibidores de cinasas de tirosina.

7.- Material y métodos

7.1.- Aprobación de investigación

El proyecto de investigación, así como la carta de consentimiento informado en su momento fueron registrados en la Comisión de Ética e Investigación del Hospital General de México, O.D., con clave de registro DIC/09/311/04/053. En Junio de 2009 se dictaminó la aprobación del protocolo por la Dirección de Investigación del Hospital.

7.2.- Diseño del Estudio

Se trata de un estudio de tipo observacional analítico que incluye el análisis de muestras de médula ósea y/o sangre periférica de pacientes mexicanos con diagnóstico de LMC en diferentes fases de la enfermedad.

El universo de trabajo que se estableció es el total de las muestras recibidas en el año 2009 en el Servicio de Genética de pacientes con diagnóstico hematológico de LMC

7.3.- Población de estudio:

Fueron incluidas las muestras remitidas al Laboratorio de Genética para estudio citogenético de pacientes de nacionalidad mexicana con diagnóstico hematológico de LMC, en cualquier etapa de la enfermedad y durante o al inicio del tratamiento con cualquier tipo de inhibidores de cinasas de tirosina. Las muestras se procesaron para cariotipo por las técnicas habituales y de estas mismas se extrajo el RNA para el estudio molecular por RT-PCR del transcrito *BCR-ABL*, RT-PCR-RFLP en busca de la mutación T315I y secuenciación directa del dominio cinasa de tirosina para la detección de mutaciones. Los datos clínicos de los pacientes fueron obtenidos de sus expedientes o proporcionados por los médicos hematólogos tratantes.

7.4.- Criterios de Inclusión

- I. Pacientes mexicanos con diagnóstico de LMC,
- II. En tratamiento farmacológico con inhibidores de cinasas de tirosina (imatinib, dasatinib o nilotinib) o muestra inicial de pacientes que entran a protocolo con algún inhibidor.
- III. Material cromosómico suficiente para el estudio citogenético y con adecuado RNA para los estudios moleculares.

7.5.- Criterios de Exclusión:

- I. Antecedentes de otra neoplasia previa

- II. Diagnóstico hematológico diferente a LMC, o diagnóstico incompleto por abandono.
- III. Muestras insuficientes para ambos estudios citogenético y molecular.
- IV. Muestras positivas para VIH.

7.6.- Variables

Cariotipo:

- I. Número y tipo de alteraciones cromosómicas

Molecular:

- I. *BCR-ABL* positivo o negativo
- II. Tipo de rearreglo *BCR-ABL* b2a2, b3a2 o e1a2
- III. Mutación T315I positivo o negativo por RFLP
- IV. Tipo y número de mutaciones o polimorfismos en el transcrito *BCR-ABL* por secuenciación

8.- Procedimientos:

- I. Cariotipo en Médula Ósea. Detección del cromosoma Ph y alteraciones adicionales.
- II. RT-PCR de *BCR-ABL* múltiple y anidado. Cualitativos para ver tipo de transcrito
- III. RT-PCR-RFLP. Búsqueda específica de la mutación T315I
- IV. Secuenciación directa del dominio cinasa de tirosina de *BCR-ABL*, para detección de mutaciones y polimorfismos.

8.1.- Análisis cromosómico.

Las muestras de cariotipo se procesaron por técnica directa y/o cultivos de 72 horas, se realizó técnica de bandeo GTG en todos los casos, y fueron analizados con el sistema de cariotipo automatizado *Ikaros* de *Metasystem*. Para el reporte del resultado se utilizó el sistema de nomenclatura internacional ISCN 2009⁶⁵, que considera una alteración numérica o estructural cuando hay por lo menos tres metafases con el mismo rearrreglo y a un cariotipo complejo cuando presenta más de tres alteraciones cromosómicas numéricas o estructurales.

8.2.- Análisis Molecular

8.2.1.- Obtención de RNA

A partir de muestras de médula ósea o sangre periférica de los pacientes se extrajo el RNA utilizando un método orgánico con el TRIzol-Invitrogen (reactivo a base de isotiocianato de guanidina y fenol). El procedimiento es el siguiente: a 3 o 4 mL de la muestra se le realizan repetidos lavados con solución amortiguadora de lisis de glóbulos rojos (BLGR), agitando, centrifugando y decantando hasta obtener un botón solo de leucocitos. El botón se resuspende en 150 µL de BLGR y 1mL de TRIzol, se le añaden 200 µL de cloroformo, posteriormente se centrifuga a 4 °C, obteniéndose una fase acuosa y una orgánica. Se extrae la fase acuosa y se le añaden 600 µL de isopropanol manteniéndose por 2 hrs a -20 °C, a continuación se lava con etanol al 75%, se centrifuga a 4 °C, se decanta y se resuspende en 15 µL de agua esteril con dietilpirocarbonato, se incuba a 60 °C durante 10 min. Al final de la extracción el RNA es conservado a -20 °C.

La valoración de la calidad del RNA se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa y por PCR de los genes de BCR y/o ABL. La cuantificación de RNA se realizó por lectura de absorbancia a 260 y 280nm.

8.2.2.- Síntesis de cDNA (ADN complementario)

Una vez obtenido el RNA, se procede a la síntesis de cDNA, para lo cual se utilizó la enzima M-MLV RT (del inglés *Moloney-Murine Leukemia Virus Reverse-Transcriptasa*), una DNA polimerasa dependiente de RNA que sintetiza cDNA a partir de templados de RNA mensajeros de más de 5 kb. La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones:

Mezcla de reactivos: 4 µL de H₂O/DEPC, 1 µL de “*randoms primers*”, 2 µL de dNTPs (desoxirribonucleótidos trifosfato) a 10 mM y 5 µL de RNA.

Se deja 10 min a 65 °C y después 2 min a 4 °C, posteriormente a cada tubo se le agregan 4 µL de Buffer 5X, 2 µL de DTT (Ditiotreitol) a 100 mM, 2 µL de Inhibidor de ribonucleasas y 1 µL de enzima M-MLV RT (Invitrogene y/o Promega). Se mantiene la reacción 50 min a 37 °C y 15 min a 70 °C, obtenemos el cDNA, que evaluamos su viabilidad por una reacción de PCR simple de los genes Abl y/o BCR y la visualizamos por electroforesis en gel de agarosa teñido con BrEt.

8.2.3.- Identificación del tipo de transcrito

La identificación del tipo de transcrito se realizó a través de una PCR múltiple (multiplex) y una PCR anidada. La PCR múltiple nos permite evaluar la calidad de la muestra del cDNA mediante la amplificación simultánea de un fragmento del gen *BCR* y del transcrito *BCR-ABL*. La reacción de PCR anidada nos proporciona una mayor sensibilidad y se realizó para los tres tipos de transcritos más frecuentes: b2a2, b3a2 y e1a2.

PCR múltiple. Los oligonucleótidos utilizados son los siguientes:

BCR-C	5' – ACC GCA TGT TCC GGG ACA AAA G – 3'
C5e-	5' – ATA GGA TCC TTT GCA ACC GGG TCT GAA – 3'
CA3-	5' – TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G – 3'
B2B-	5' – ACA GAA TCC CGC TGA CCA TCA ATA AG – 3'

Condiciones de PCR múltiple

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	96°C	50 seg	30
Alineamiento	60°C	50 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	71°C	10 min	1

Los resultados se interpretan de la siguiente forma: La banda de 808 pb corresponde al fragmento del gen *BCR*, la de 481 pb al rearreglo e1a2 (región m-*BCR*), las bandas de 385 pb y 310 pb pertenecen a b3a2 y b2a2 de la región M-*BCR* respectivamente.

PCR anidada.

Oligonucleótidos, 1ª reacción:

NB1+ 5' – GAG CGT GCA GAC TGG AGG GAG AAC A – 3'
 JC- 5' – GGA GTG TTT CTC CAG ACT GTT G – 3'

Mezcla de reactivos de la 1ª reacción: 11.4 µL de H₂O, 4 µL de Buffer 5x, 0.4 µL de dNTPs a 10 mM, 0.4 µL de cada oligo, 0.16 µL de GoTaq y 3 µL de cDNA.

Condiciones de PCR anidada, 1ª reacción

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	96°C	30 seg	30
Alineamiento	68°C	25 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

Oligonucleótidos de la 2ª reacción:

CA3- 5' – TGT TGA CTG GCG TGA TGT AGT TGC TTG G – 3'
B2+ 5' – TTC AGA AGC TTC TCC CTG ACA T – 3'

Mezcla de reactivos de la 2ª reacción: 5.78 µL de H₂O, 8 µL de Buffer 5x, 0.8 µL de dNTPs a 10 mM, 0.8 µL de cada oligo, 0.32 µL de GoTaq y 3 µL del producto de la 1ª reacción.

Condiciones de PCR anidada, 2ª reacción

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	96°C	30 seg	30
Alineamiento	64°C	50 seg	
Extensión	72°C	1 min	
Extensión final	72°C	10 min	1

8.2.4.- Análisis molecular por RFLPs

El siguiente análisis por RFLP está diseñado para la búsqueda de la mutación T315I en los dominios cinasa de tirosina de los genes *ABL1* y *BCR-ABL*, el diseño se obtuvo del artículo: Chien, J.H 2008⁶⁶. Para el estudio se utilizó la enzima de restricción *Ddel*, la cual es obtenida de una bacteria anaeróbica, *Desulfovibrio desulfuricans*, que reconoce y corta las secuencias:



El fragmento a digerir fue delimitado por PCR utilizando oligonucleótidos pertenecientes a *ABL1*:

E7F 5' – GGG TCT GCA CCC GGG AGC – 3'
 E7R 5' – CTG TGG ATG AAG TTT TTC TTC T – 3'

Mezcla de reactivos de la reacción es: 12 µL de H₂O, 4 µL de Buffer 5x, 0.4 µL de dNTPs a 10 mM, 0.4 µL de cada oligo, 0.16 µL de GoTaq y 3 µL de cDNA.

Condiciones de PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	5 min	1
Desnaturalización	95°C	30 seg	40
Alineamiento	60°C	30 seg	
Extensión	72°C	30 seg	
Extensión final	71°C	10 min	1

Mezcla de reactivos de la reacción de restricción: 7.7 µL de H₂O, 3 µL de Buffer 5x, 1 µL de enzima *Ddel*, 0.3 µL de BSA y 8 µL del producto de PCR.

La reacción fue incubada a 37° C durante 50 minutos, posteriormente 7 µL de la reacción fueron corridos a través de un gel de agarosa al 4.5% conteniendo 5 µg/mL de bromuro de etilio. Las bandas de DNA fueron visualizadas en un transiluminador con luz ultravioleta.

Estos oligos delimitan una secuencia de 174 pares de bases (pb) con 3 regiones sensibles al corte por la enzima que resultan en 4 fragmentos 37, 35, 55 y 52 pb (ver Fig. 1 y 2). El cambio en la secuencia por la mutación T315I evita el corte entre el fragmento de 37 y 35 pb, obteniéndose un fragmento de 72 pb.

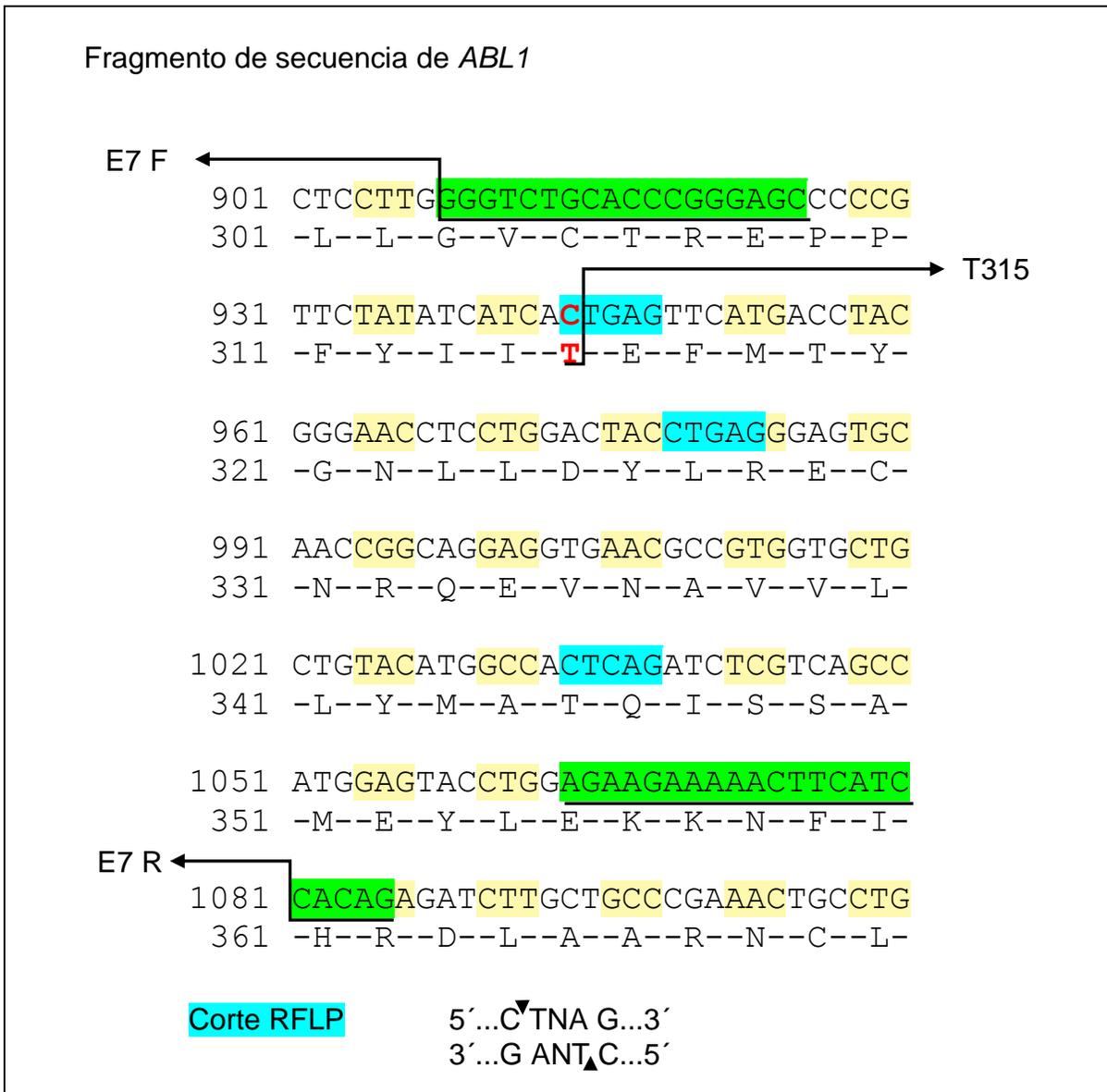


Fig. 1 Se muestra un fragmento de la secuencia cDNA del gen *ABL1*, con sus respectivos aminoácidos.

En verde los oligonucleótidos utilizados, E7 F y R, en azul las tres regiones de corte y en rojo el nucleótido C944 y el aminoácido T315.

Secuencia obtenida de www.ensembl.org (ENST00000318560)

Ensayo por RFLPs

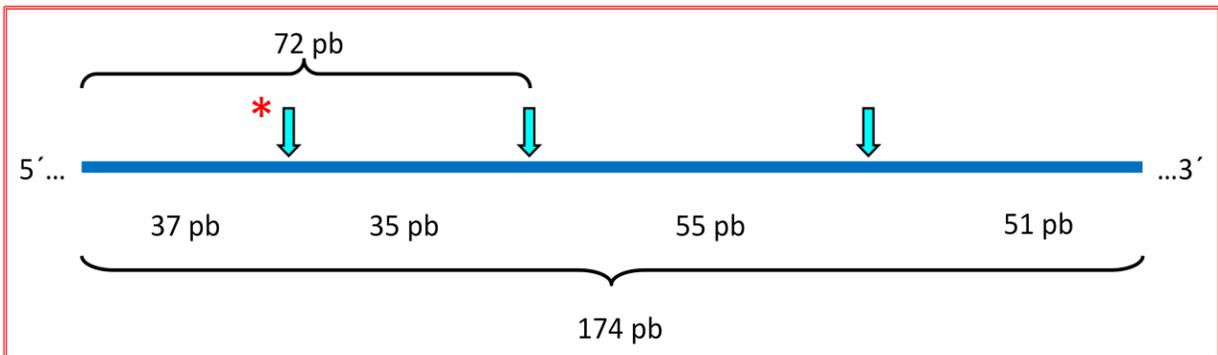


Fig. 2. Se muestran los diferentes tamaños de fragmentos en pb (pares de bases) productos de la digestión por *Ddel*, las flechas indican los sitios de corte, la mutación T315I evita el corte marcado con el asterisco, originando un fragmento de 72 pb⁶⁶.

Interpretación de los fragmento en el gel

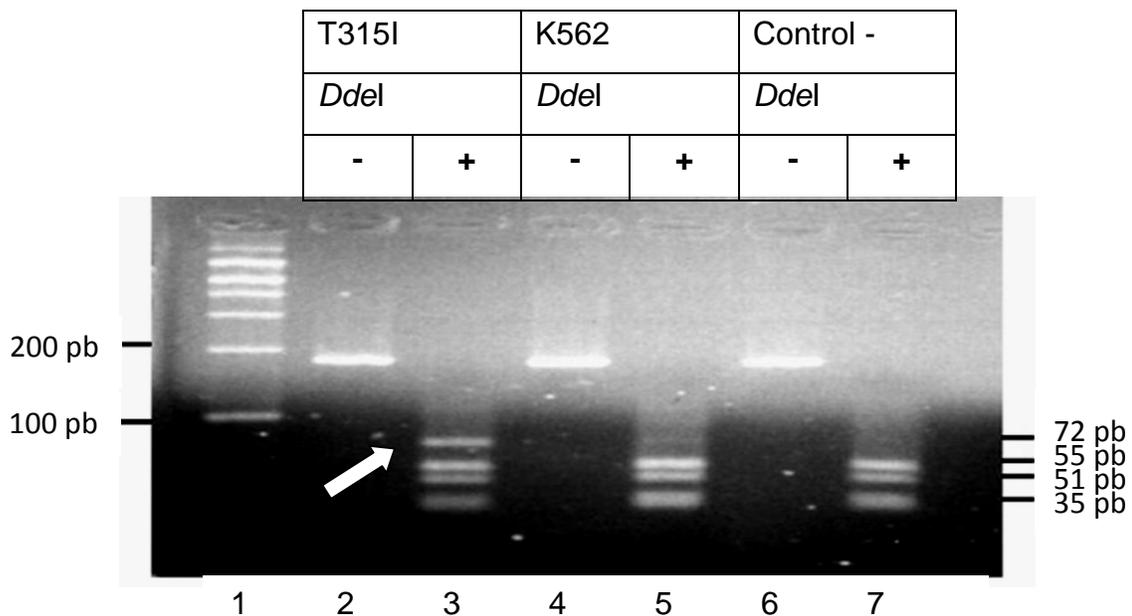


Fig. 3. Patrón de RFLPs sobre un gel de agarosa al 4%.

(-) sin digestión por *Ddel* y (+) con digestión por *Ddel*. La mutación T315I resulta en un fragmento de 72 pb (flecha). Carril 1, marcador de peso molecular, 2 y 3 paciente con mutación T315I, 4 y 5 clona K562 con Ph+, 6 y 7 control negativo. Tomado de *Leuk Res* 32, 1724-1734 (2008)⁶⁶

8.2.5.- Análisis molecular por secuenciación

Para la detección de mutaciones por secuenciación directa se analizan los productos de una PCR semianidada del dominio cinasa de *BCR-ABL*. En la primera reacción de PCR se utilizan oligonucleótidos 5' de *BCR* y 3' de *ABL*, amplificando una secuencia que incluye el punto de fusión génica para poder diferenciar la secuencia del dominio cinasa de *BCR-ABL* de la misma en *ABL1*. En la segunda reacción de PCR solo se usan oligos para el dominio cinasa de *ABL*, los productos de PCR son purificados y secuenciados en un equipo 3700 de Applied Biosystem en el Instituto de fisiología celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las secuencias de referencia del GeneBank a las que recurrimos para la comparación de secuencias son M14752 y X16416.

PCR semianidada.

Oligonucleótidos, 1ª reacción semianidada:

B2B+ 5' – ACA GCA TTC CGC TGA CCA TCA ATA A – 3'

A7- 5' – AGA CGT CGG ACT TGA TGG AGA ACT – 3'

Mezcla de reactivos de la 1ª reacción: 10.64 µL de H₂O, 4 µL de Buffer 5x, 0.4 µL de dNTPs a 10 mM, 0.4 µL de cada oligo, 0.16 µL de GoTaq y 4 µL de cDNA.

Condiciones de PCR semianidada, 1ª reacción

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	96°C	30 seg	30
Alineamiento	60°C	45 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1

Oligonucleótidos de la 2ª reacción semianidada:

AN4+ 5' – TGG TTC ATC ATC ATT CAA CGG TGG – 3'
A7- 5' – AGA CGT CGG ACT TGA TGG AGA ACT – 3'

Mezcla de reactivos de la 2ª reacción: 9.64 µL de H₂O, 4 µL de Buffer 5x, 0.4 µL de dNTPs a 10 mM, 0.4 µL de cada oligo, 0.16 µL de GoTaq y 4 µL del producto de la 1ª reacción.

Condiciones de PCR semianidada, 2ª reacción

Paso	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Desnaturalización	96°C	30 seg	30
Alineamiento	61°C	45 seg	
Extensión	72°C	45 seg	
Extensión final	72°C	10 min	1

9.- Resultados

Se procesaron para esta investigación muestras de 113 pacientes con diagnóstico de LMC, de 27 de ellos se contó con más de una muestra (de 1 a 4) en diferente momento de su enfermedad, en total las muestras que entraron al protocolo fueron 151. Las muestras en su mayoría fueron de médula ósea y solo 16 de sangre periférica. Estas muestras se empezaron a procesar en el laboratorio de biología molecular independientemente del resultado de cariotipo, por lo que en algunos casos se cuenta con el resultado molecular sin tener el cariotipo. Varias de las muestras sin resultado molecular continúan analizándose, a continuación se

muestran los resultados obtenidos al momento de escribir esta tesis, en cada uno de los procedimientos.

Todos los pacientes se encontraban o iniciaban tratamiento con imatinib, 66 son individuos del sexo masculino y 47 del femenino (ver Fig. 4). 30 son muestras basales, es decir al inicio del diagnóstico de LMC por lo tanto son pacientes que aún no han recibido manejo médico, pero entraron a protocolo con imatinib; el resto (121) son de seguimiento de 83 pacientes en tratamiento con algún inhibidor de cinasas de tirosina. La mayoría de los pacientes se encontraba en el grupo de 20 a 40 años (ver Fig. 5).

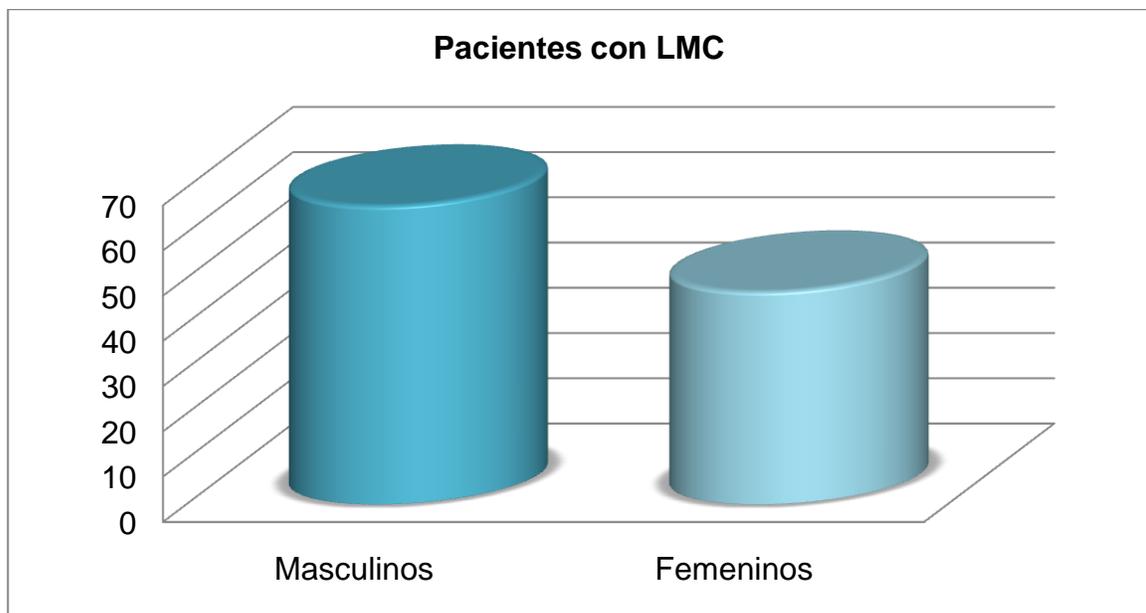


Fig. 4. Distribución de género de los 113 pacientes estudiados con LMC.

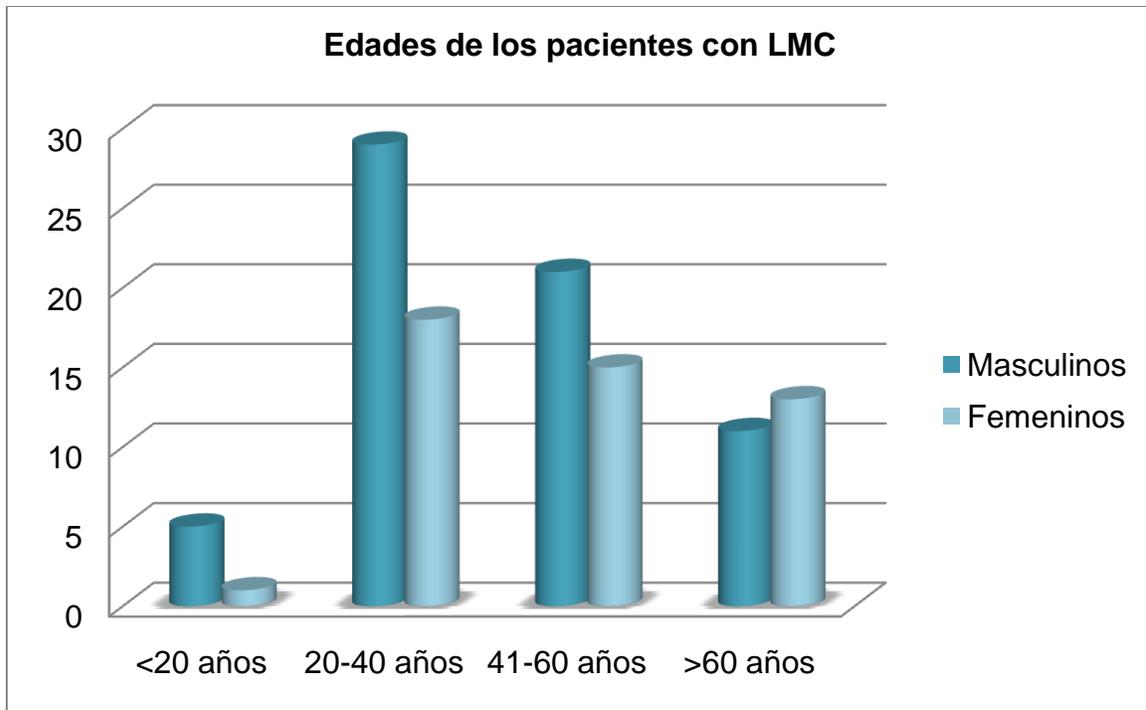


Fig. 5. Rango de edades de los 113 pacientes estudiados y su frecuencia por género.

9.1.- Estudio citogenético

El estudio citogenético pudo realizarse satisfactoriamente a 82 muestras. 37 de las cuales tenían un complemento normal por una respuesta citogenética completa (RCgC) al imatinib, 19 pertenecían a pacientes femeninos y 18 a masculinos, todas eran muestras de seguimiento.

10 femeninos portaban el cromosoma Ph+, en otros 4 se encontraron las alteraciones adicionales y en 2 más desapareció la clona con Ph, pero aparecieron otras alteraciones:

Pacientes femeninos con alteraciones cromosómicas adicionales al Ph+:			
Edad	Estudio	Rearreglo	Cariotipo
64a	Seg	b3a2	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]/48,XX,+8,t(9;22)(q34;q11),+19 [7]
63a	Seg	b2a2	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[4]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+8[6]/46,XX[10]
30a	Seg	b3a2	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[16]/47,XX,t(9;22)(q34;q11),+22[8]
67a	Inicial	b3a2	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[7]/Hiperdiploidia>50cromosomas,t(9;22)(q34;q11)[5]/46,XX[8]

Pacientes femeninos con alteraciones cromosómicas sin cromosoma Ph:			
Edad	Estudio	Rearreglo	Cariotipo
54a	Seg	b3a2	48,XXX,+8[5]/46,XX[25]
20a	Seg	ND	46,XX [18]/Hipodiploidía(35-40 cromosomas)[8]

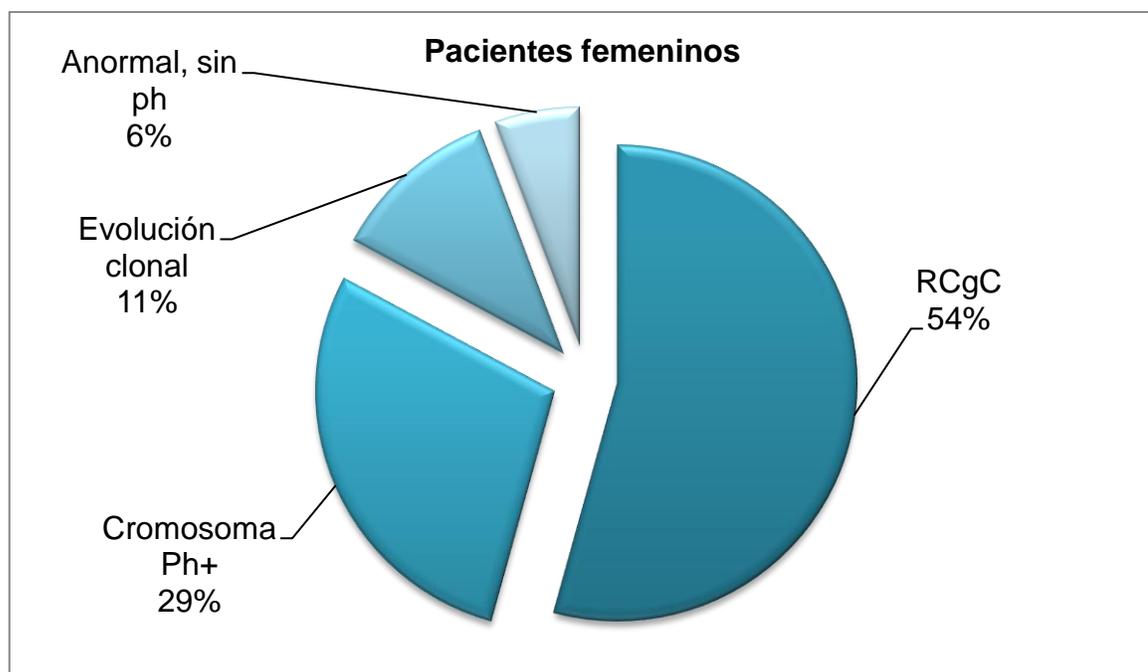


Fig. 6. Proporciones de los grupos de cariotipo encontrados en los pacientes femeninos. [N=35]
RCgC. Respuesta citogenética completa

De los varones con alteraciones citogenéticas 17 pacientes aún tenían presente la translocación t(9;22)(q34;q11), 6 alteraciones adicionales y 3 con alteraciones sin estar presente el cromosoma Ph:

Pacientes masculinos con alteraciones cromosómicas adicionales al Ph+:			
Edad	Estudio	Rearreglo	Cariotipo
34a	Seg	b3a2	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[5]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+21[3]/46,XY[17]
20a	Inicial	b3a2/b2a2	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[15]/46,XY,del(1q),t(9;22)(q34;q11)[5]
28a	Inicial	b3a2	46,XY,t(9;22)(q34;q11),der(3q+)[5]/46,XY[15]
41a	Seg	ND	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[12]/47,XY,t(9;22)(q34;q11),+der(22)t(9;22)(q34;q11)[8]
16a	Inicial	b3a2	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[3]/47,XY,+19,t(9;22)(q34;q11)[4]/46,XY[14]
49a	Seg	ND	46,XY,t(9;22)(q34;q11)[10]/47-48,XY,+14,+18,+21,t(9;22)(q34;q11)[4]/46,XY[10]

Pacientes masculinos con alteraciones cromosómicas sin cromosoma Ph:			
Edad	Estudio	Rearreglo	Cariotipo
39a	Seg	Ausente	47,XY,+8[4]/46,XY[26]
61a	Seg	Ausente	48,XY,+15,+21[4]/46,XY[16]
46a	Seg	b3a2	48-49,XY,+7,+8,+22[8]/46,XY[16]

53 muestras no fueron valorables y no fue posible realizar el cariotipo. Las 16 muestras de sangre periférica sólo se utilizaron para seguimiento molecular, ya que de acuerdo a los lineamientos internacionales, el cariotipo en sangre periférica de pacientes con LMC no tiene implicaciones pronosticas⁶⁷.

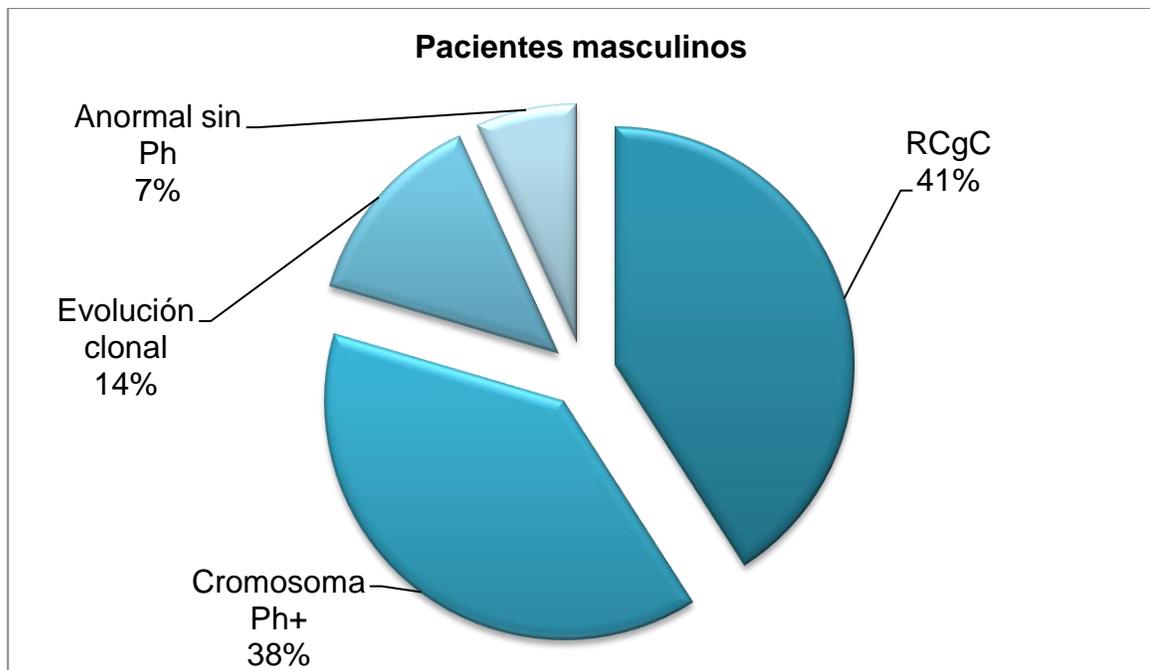


Fig. 7. Proporciones de los grupos de cariotipo encontrados en los pacientes masculinos. [N=44]
 RCgC. Respuesta citogenética completa

9.2.- Tipo de Transcrito de Fusión

El tipo de rearrreglo BCR/ABL pudo determinarse en 57 muestras, en el resto de las muestras el RNA o el cDNA no tuvieron la calidad adecuada o existía remisión molecular. Ninguna muestra dio positiva para el rearrreglo e1a2, 16 corresponden a b2a2, 34 a b3a2 y 7 al doblete con dos rearrreglos b3a2/b2a2 (ver Fig. 8 y 9).

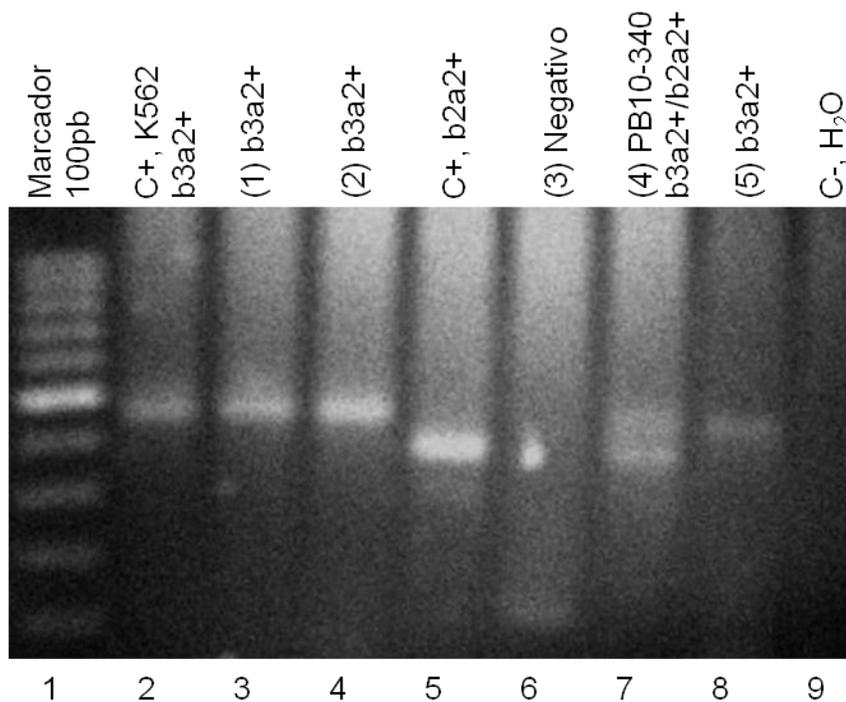


Fig.8. Fotografía de un gel de agarosa en el que se corrieron los productos de una PCR anidada con 5 pacientes (1-5) y 3 controles (C), en el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular (100pb), en el carril 2 y 5 se corrieron C+ para el rearreglo b3a2 y b2a2 respectivamente, los carriles 3,4,6,7 y 8 corresponden a muestras de pacientes. (1) y (2) portan el rearreglo b3a2, (3) presenta remisión molecular completa, el paciente (5) b3a2 y el (4) presenta un doblete con ambos rearreglos, carril 9 control negativo (H₂O)



Fig. 9. Frecuencias obtenidas del tipo de rearreglo *BCR-ABL* [N=57].

Se seleccionaron 4 pacientes al azar que fueran positivos para el transcrito *BCR-ABL*, para secuenciación del producto de PCR anidada que incluía el punto de fusión génica, para verificar si no existía alguna mutación y/o polimorfismo en esta región de *BCR/ABL*. Las 4 muestras correspondieron al rearreglo b2a2 y ninguna mostró mutación, ni polimorfismos a este nivel (ver Fig. 10).

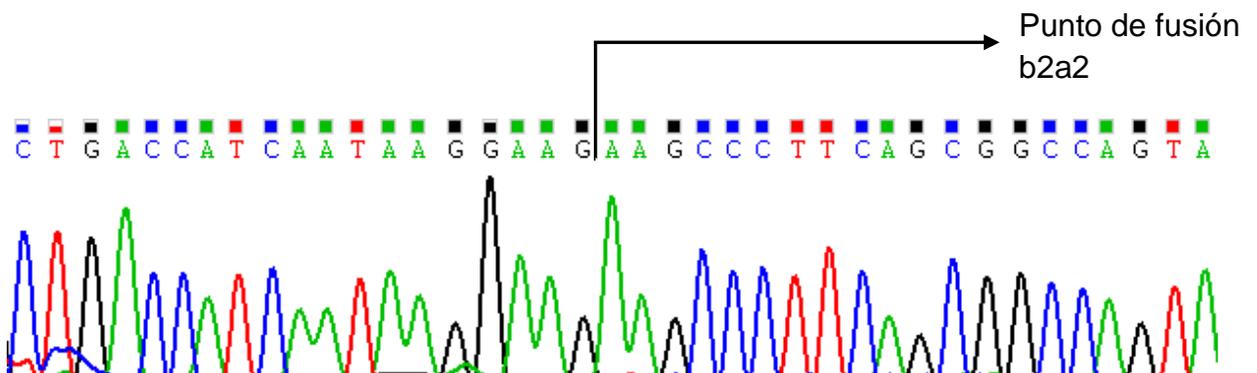


Fig. 10. Electroferograma de la secuencia de un fragmento del gen *BCR-ABL* que incluye el punto de fusión génica, en este caso perteneciendo a un paciente con rearreglo b2a2.

9.3.- Análisis por RFLP

Hasta el momento, sólo se han analizado 34 muestras para los RFLP que detectan el cambio T315I, de las cuales 4 resultaron positivas para el cambio en el sitio de corte de la enzima *Ddel*. Adicionalmente en la electroforesis de los productos de la digestión de una de las muestras analizadas se encontró una segunda banda adicional de aproximadamente 100 pb (ver Fig.11).

A continuación se muestran algunos datos clínicos de los 4 pacientes positivos para la mutación T315I por RFLP:

- I. Masculino de 34 años de edad, muestra inicial. Ingresó al servicio de urgencias por priapismo secundario a leucocitosis en Julio de 2009, el mismo mes se establece el diagnóstico de LMC en fase crónica y se toma muestra de médula ósea, el cariotipo se reporta con 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[18]/46,XY[5], la misma muestra revela que es portador del rearrreglo b3a2 y positivo para T315I por RFLP. Se inicia tratamiento con imatinib 400 mg c/24hrs. De este paciente no hay datos de seguimiento.

- II. Masculino de 63 años de edad con diagnóstico de LMC en fase crónica en marzo de 2008, primer cariotipo de médula ósea: 46,XY,t(9;22)(q34;q11)[27], inicialmente se manejó con hidroxiurea a dosis de 500 mg c/8hrs e imatinib de 400 mg c/24hrs. Por falta de respuesta óptima, se decidió el escalamiento de dosis del Imatinib a 800 mg c/24hrs. En muestra de seguimiento, el cariotipo se reportó como 46,XY[30], PCR múltiple y anidada dieron positivas para el rearrreglo b2a2, la misma muestra portaba la mutación T315I por RFLP. Actualmente el paciente presenta síndrome anémico y crisis

blástica. Una muestra posterior de enero de 2010, no incluida en el análisis de esta tesis, presentó el siguiente cariotipo:

46,XY,t(9;22)(q34;q11)[8]/46,XY,del(2)(p11→pter),t(9;22)(q34;q11)[2]/46,XY,del(2)(p11→pter)[4]

- III. Femenino de 76 años de edad, muestra inicial. Se diagnostica LMC en junio de 2009 por leucocitosis y esplenomegalia, presenta leucocitosis con 6% de blastos, se inicia imatinib. La muestra de médula ósea portaba el complemento cromosómico 46,XX,t(9;22)(q34;q11)[20] y el rearreglo b3a2, esa muestra en RFLP fue positiva para la mutación T315I. En enero de 2010 se diagnostica fase acelerada por leucocitosis severa y blastos altos. Se decide el cambio a nilotinib 400mg c/12hrs. Presenta toxicidad hepática, citopenias severas, falla cardíaca y finalmente fallece.

- IV. Femenino de 46 años, muestra inicial. Con diagnóstico de LMC en fase blástica, porta el rearreglo b3a2 en sangre periférica. No se cuenta con cariotipo. Hepato-esplenomegalia de 25cm. BH: Hb de 8.6 g/100mL, leuc 657.4 x 10⁹ /l, Neutrófilos 25%, linfocitos de 1%, Basófilos1%, Mielocitos 60% y plaquetas de 730,000. El estudio por RFLP muestra la banda originada por la mutación T315I y una banda adicional de aproximadamente 100 pb ocasionada por falta de corte a otro nivel. (ver Fig. 11). No se cuenta con muestras ni datos clínicos de seguimiento.

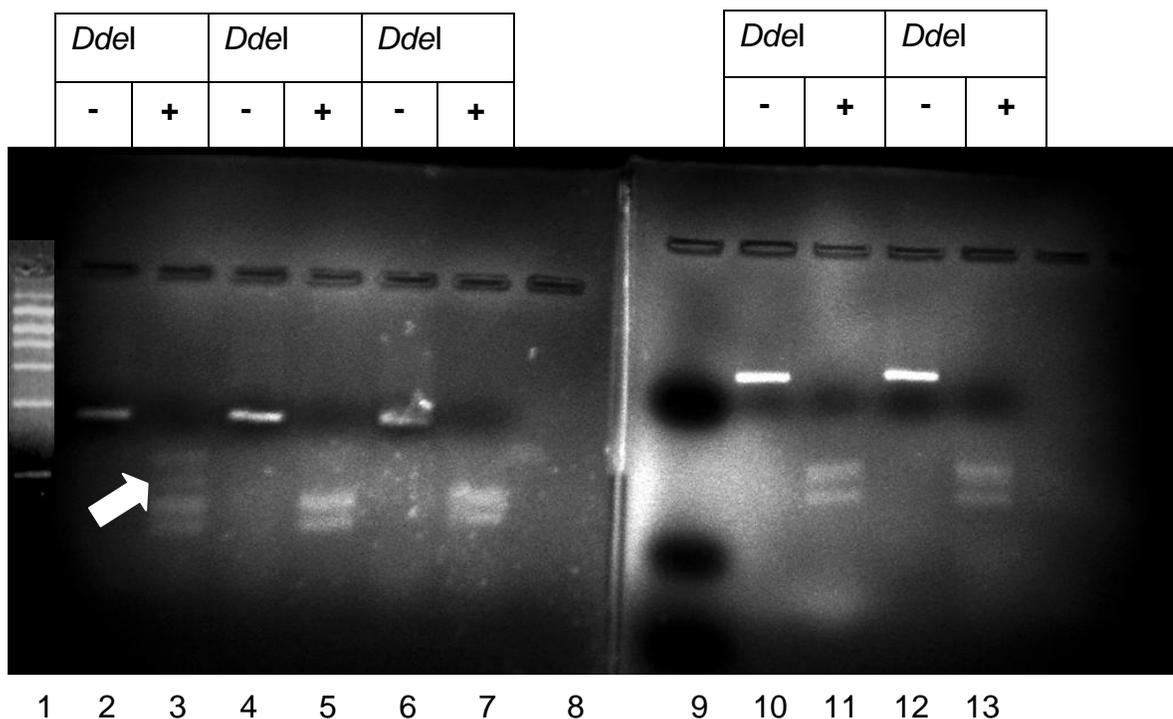


Fig. 11. Se muestra una fotografía de dos geles de agarosa al 4.5% en donde fueron corridos los productos de PCR-RFLP de 5 pacientes, de cada uno de ellos se corrió el producto previo y posterior a la digestión con *Ddel*. (-) sin digestión por *Ddel* y (+) con digestión por *Ddel*. El carril 1 muestra la escalera de peso molecular (100pb), los carriles 2 y 3 corresponden a un paciente positivo para la mutación y con una banda adicional de 110pb. (Paciente IV)

9.4.- Secuenciación del dominio cinasa de tirosina

Al momento del reporte de la presente tesis, sólo se había secuenciado la región correspondiente al dominio de cinasa de tirosina del rearreglo *BCR-ABL* de 4 pacientes con LMC. Estos pacientes fueron negativos por RFLP para la mutación T315I. La secuenciación se realizó para corroborar los resultados del análisis por RFLP de los productos de la RT-PCR- y para la búsqueda de otras mutaciones a lo largo del dominio de cinasa de tirosina del gen quimérico. Cabe mencionar que esta búsqueda continua realizándose y el objetivo es secuenciar

los 34 pacientes que se incluyeron en el análisis por RFLP. En ninguna de las secuencias obtenidas se observaron mutaciones o polimorfismos al compararlas con la secuencia de *ABL1* (ENST00000318560) obtenida de www.ensembl.org (Fig. 12). Dos muestras de médula ósea provenientes de pacientes con diagnóstico de síndrome mielodisplásico, se utilizaron como controles, en ambas se secuenció el dominio de cinasa de tirosina del gen *ABL1* sin encontrarse cambios en su secuencia.

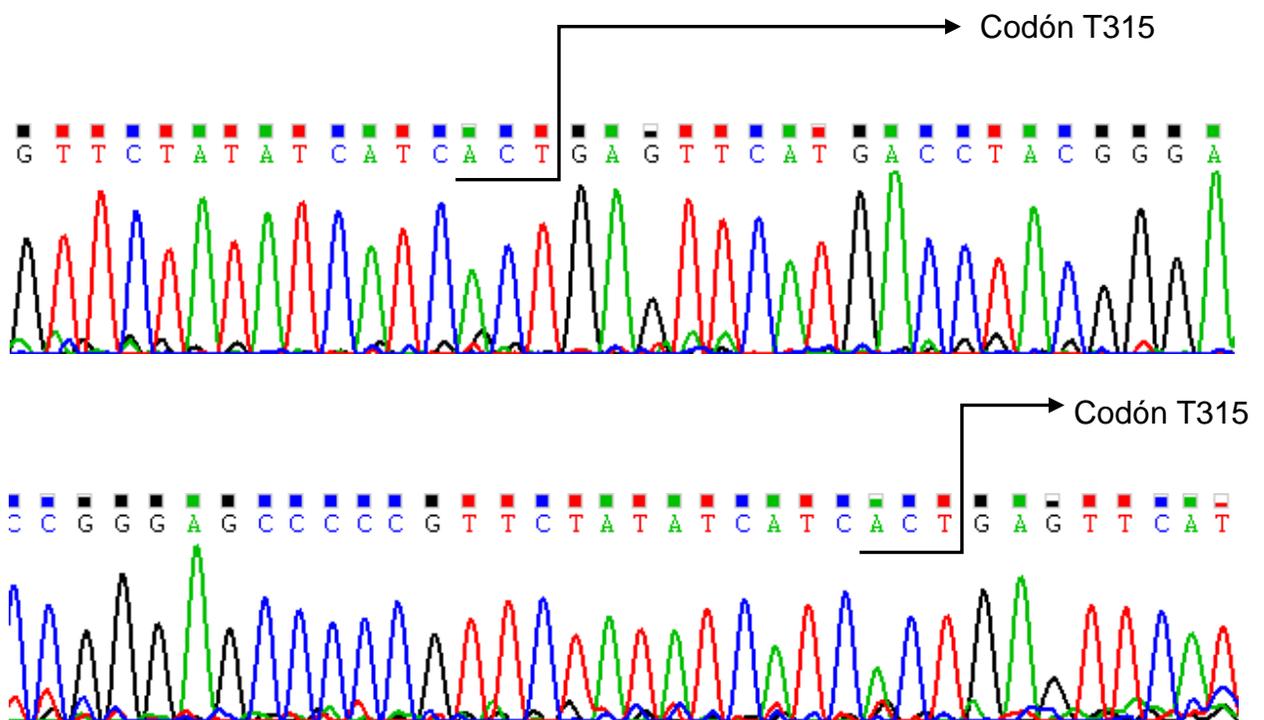


Fig. 12. Se muestran las secuencias de un pequeño fragmento del dominio cinasa de tirosina del gen *BCR-ABL*, que incluye la región que corresponde al codón 315 y codifica para el aminoácido treonina, de dos pacientes con LMC. En ambos casos no hay cambios en la secuencia.

10.- Discusión y conclusiones

La LMC representa entre e 15 a 20 % del total de las leucemias, con tasas de incidencia de 0.6 a 2.0 casos por cada 100,000 habitantes¹⁸, sin embargo al ser

el Hospital General de México un hospital de tercer nivel y un centro de referencia a nivel nacional, se juntó un número considerable de muestras pertenecientes a casos confirmados de LMC en un año (2009). El total de muestras de leucemia recibidas en el servicio de genética en el año 2009 fue de 707 de las cuales 151 pertenecían a LMC, representando el 21%.

Aunque excepcionalmente se presenta antes de los 20 años, se recibieron 5 muestras de pacientes masculinos con edades de 6,16,17,18 y 19 años y un femenino de 19 años. Solo en 3 de ellos fue posible determinar el tipo de rearrreglo *BCR-ABL*, observándose b3a2 en 3 masculinos (6, 16 y 18 años). La media de edad para los pacientes de nuestra serie fue de 46 años, muy similar a la reportada en estudios multicéntricos de alrededor de 48/49 años¹⁸.

Los hombres están afectados más frecuentemente que las mujeres en una razón masculino a femenino que varía entre 1.3 y 1.8¹⁸ Los pacientes estudiados guardaban una proporción de 1.4 en general, sin embargo al analizar esta proporción por grupos de edades, encontramos que la relación fue disminuyendo hasta ser más frecuente en el sexo femenino en el último grupo de edad, con una relación M/F de 0.84 (ver tabla.4), lo cual pudiera hablar de una mayor severidad en el caso de los varones.

Tabla 4. Relación entre géneros por grupos de edad			
Edades	Masculinos (M)	Femeninos (F)	Relación M/F
<20 años	5	1	5
20-40 años	29	18	1.6
41-60 años	21	15	1.4
>60 años	11	13	0.84
Total	66	47	1.4

Tabla 4. Número de pacientes estudiados ordenados por género y grupos de edad, y relación masculinos/femeninos por cada grupo.

El estudio citogenético mostró que 6 pacientes femeninos y 9 masculinos presentaban alteraciones adicionales al cromosoma Ph, entre ellas la trisomía 8 fue la más prevalente, presente en 5 pacientes, con una frecuencia igual a la esperada del 33%³². La presencia del segundo cromosoma Ph reportada en el 30% solo se encontró en 1 paciente (6.6%) y el isocromosoma del 17 que se ve en el 20% de los casos no se observó, la trisomía 19 y 21 estuvieron presentes en el 13.2% de los pacientes. Se encontraron anomalías reportadas en baja frecuencia como la trisomía 7, 14, 15, 18, X, 22 y las estructurales del(1q) y 3q+ (ver fig. 13),

En 5 cariotipos de seguimiento, correspondientes a pacientes conocidos del servicio de hematología con diagnóstico confirmado de LMC y bajo tratamiento con imatinib de 6 meses a 3 años, que incluso habían mostrado remisión hematológica y citogenética, mostraron clonas con alteraciones cromosómicas sin que estuviera presente el cromosoma Ph. 2 de estos 5 son *BCR-ABL+*, por lo que las alteraciones encontradas, aún siendo negativas para el cromosoma Ph, pueden ser preludio de una evolución clonal. En el resto de los casos el transcrito es negativo por lo que éstas alteraciones pueden ser producto de inestabilidad cromosómica ocasionada por los medicamentos utilizados, o bien, tratarse de una mielodisplasia secundaria al tratamiento con inhibidor de cinasa de tirosina, en estos últimos casos se debe corroborar con el siguiente cariotipo de seguimiento, con el cual aún no contamos.

De los pacientes con evolución clonal en los que se realizó PCR múltiple y anidada para el tipo de rearreglo, 8 fueron portadores del rearreglo b3a2, 2 tuvieron b2a2 y 1 el doblete b3a2/b2a2 (ver fig. 14).

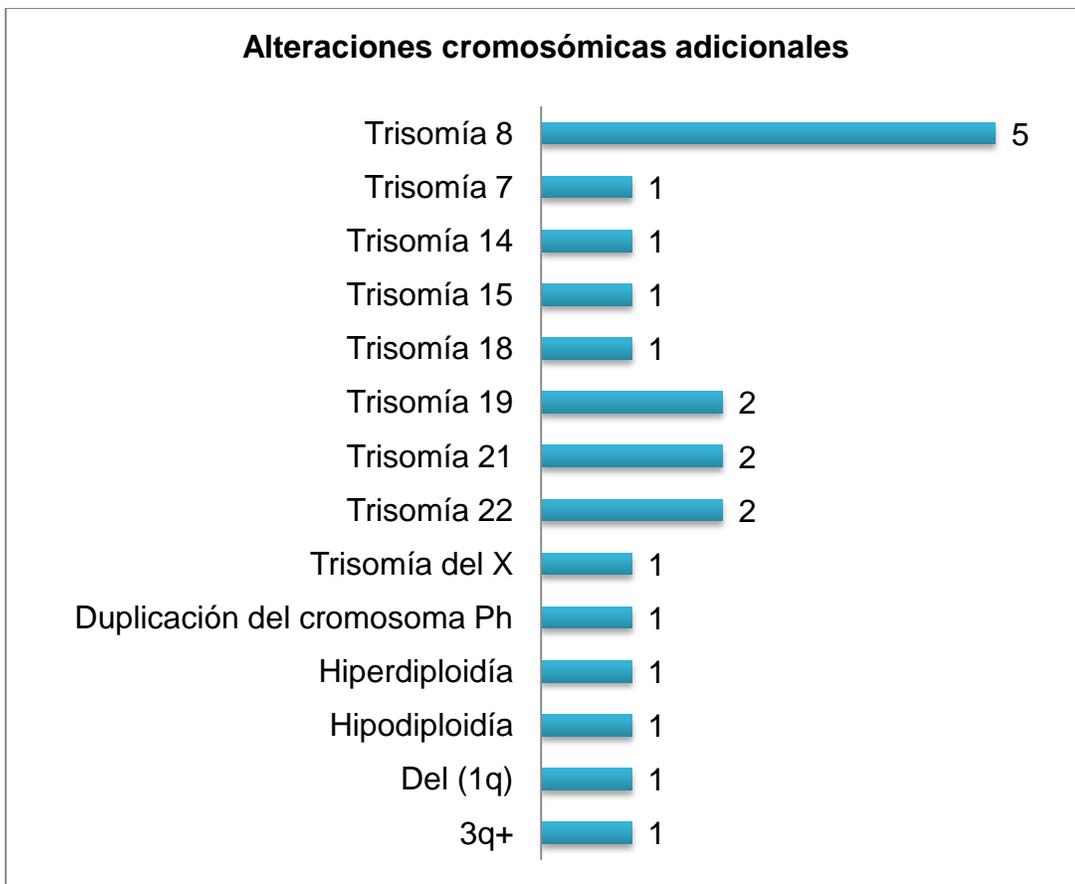


Fig. 13. Alteraciones cromosómicas adicionales al cromosoma Ph, encontradas en los pacientes con LMC.



Fig. 14. Porcentaje de rearrreglos presentes en los pacientes con evolución clonal. [N=9].

En diferentes poblaciones se han estimado las frecuencias del tipo de rearreglo para *BCR-ABL*, para la mayoría, el transcrito b3a2 es el más prevalente. En Latinoamérica el más frecuente es b3a2, sin embargo, en México se ha reportado b2a2 como el más frecuente⁶⁸⁻⁷¹.

Tabla 5. Frecuencias reportadas de rearreglos en pacientes mexicanos				
Referencia	n	b3a2 (%)	b2a2 (%)	b3a2/b2a2 (%)
Arana-Trejo, R.M., <i>et al</i> ⁶⁹ .	226	39	53	8
Rosas-Cabral, A., <i>et al</i> ⁶⁸ .	97	28	59	13
Ruiz-Arguelles, G.J., <i>et al</i> ⁷¹ .	238	54	43	3
Meza-Espinoza, J.P., <i>et al</i> ⁷⁰ .	93	48	40	12
Pacientes mexicanos estudiados	654	44	49	7

Tabla 5. Se muestran las proporciones de los transcritos encontrados en 4 series y su total en pacientes mexicanos con LMC. Modificado de *Rev Invest Clin* **59**, 338-341⁷⁰.

En nuestro estudio con 57 muestras analizadas encontramos una frecuencia mayor de b3a2 que de b2a2. El rearreglo b3a2 se halló en el 60% y difiere del 44% que ha sido reportado en el total de pacientes mexicanos con LMC. El transcrito b2a2 se encontró en 28% de los pacientes vs el 49% reportado⁷⁰. (Ver tabla 5)

En cuanto a los resultados del estudio por RFLP, se observó correlación entre los positivos para la mutación T315I y su evolución clínica. Un paciente en fase crónica, 2 en blástica y uno en acelerada. 3 de ellos fueron portadores del rearreglo b3a2 y uno para el b2a2.

En nuestra serie de 34 pacientes estudiados por RFLP, la frecuencia de la mutación T315I fue de 11.7%. Cabe mencionar que este método tiene una sensibilidad que detecta subclonas con mutación presentes de 5 al 10%⁶³; en este

caso hace falta la comprobación de los pacientes positivos a través de la secuenciación. Sin embargo, este último método tiene una sensibilidad menor que los RFLP, detectando las subclonas presentes en proporciones del 15 hasta el 25%⁷², por lo que un resultado positivo por RFLP y negativo por secuenciación se podría justificar por la diferencia entre sus capacidades de detección.

Para estimar la frecuencia de la mutación T315I en el dominio cinasa de tirosina de BCR-ABL en pacientes mexicanos con LMC y poder decir que es la principal causa de resistencia al imatinib y dasatinib es necesario contar con otro tipo de metodología más sensible para las mutaciones y contar con el seguimiento molecular cuantitativo por PCR en tiempo real de los pacientes al inicio del diagnóstico y tratamiento y cada 3 meses para ir valorando la presencia de resistencia. En nuestro caso esto no fue posible, pues se analizaron solo las muestras hematológicas recibidas, en donde contamos con una sola muestra de la mayoría de los pacientes.

Clínicamente 3 de los 4 pacientes positivos para la mutación por RFLPs se encontraban en fases avanzadas de la enfermedad y mostraban cierto grado de resistencia al imatinib. Una de las pacientes falleció a pesar del cambio a nilotinib.

El valor clínico de la discriminación del tipo de rearreglo *BCR-ABL* es controversial, algunos autores no encontraron valor pronóstico⁷³, mientras que otros han asociado al rearreglo b3a2 con un cuenta plaquetaria aumentada^{68,74}. Otro estudio más ha encontrado que el b2a2 podría ser más sensible al imatinib⁷⁵.

Como se planteo en las hipótesis, el rearreglo b3a2 aparentemente causa mayor severidad de la enfermedad, lo cual se apoya por nuestros resultados:

- I. En los pacientes menores de 20 años en los que se pudo determinar el rearreglo presentaron el transcrito b3a2 y ninguno el b2a2.

- II. El tipo más frecuente de rearrreglo en los pacientes con alteraciones cromosómicas diferentes al Ph+ fue b3a2 en el 78% de los casos.
- III. Tres de los pacientes positivos para la mutación, portaban el rearrreglo b3a2 y solo uno b2a2.

Es necesario contar con más resultados para realizar las pruebas estadísticas pertinentes y poder apoyar estas observaciones, ya que el rearrreglo b3a2 también fue el más frecuente en nuestra serie.

En México es necesario empezar a determinar si los pacientes con LMC son portadores de una mutación que otorga resistencia al imatinib, fármaco utilizado actualmente como primera línea. La identificación de mutaciones previas o durante el tratamiento permite utilizar el inhibidor de cinasas de tirosina óptimo para cada paciente. La mutación T315I, aparte de ser la más frecuente, tiene la mayor relevancia clínica puesto que su presencia condicionará la falla a todos los inhibidores disponibles en el país.

La identificación de la mutación T315I en los pacientes con LMC debería ser parte del manejo integral de la LMC. El estudio por RFLPs es un buen método para su detección debido a su gran disponibilidad en los laboratorios, su bajo costo y una mayor sensibilidad que el método de secuenciación.

Esta búsqueda de mutaciones debería realizarse periódicamente, así se identificaría oportunamente una mutación y se cambiaría de tratamiento de acuerdo al genotipo para ofrecer al paciente el mejor manejo,

En conclusión en el presente trabajo se cumplió el objetivo general de identificar la mutación T315I en el dominio cinasa de tirosina del gen quimérico *BCR-ABL*, al encontrarse 4 pacientes positivos para la mutación en un grupo de pacientes mexicanos con LMC, por el método de RT-PCR-RFLP.

Se analizó y correlacionó la presencia del tipo de transcrito en los pacientes con la severidad de la enfermedad, observándose que el rearreglo b3a2 se encontraba con mayor frecuencia que b2a2 en la mayoría de los pacientes jóvenes (<20 años), en los que presentaban citogenéticamente evolución clonal y en los portadores de la mutación T315.

Se determinó la frecuencia de la mutación T315I del transcrito *BCR-ABL* en un grupo de pacientes mexicanos tratados con inhibidores de cinasas de tirosina.

Es importante mencionar que estos resultados son los obtenidos al momento de la redacción de la presente tesis y que aun se sigue trabajando con este proyecto en el Servicio de Genética del Hospital General de México.

11.- Bibliografía

1. Boveri, T. *Zur frage der entstehung maligner tumoren*, (G. Fischer, Jena,, 1914).
2. Holland, A.J. & Cleveland, D.W. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 478-487 (2009).
3. Mitelman, F., Johansson, B. & Mertens, F. The impact of translocations and gene fusions on cancer causation. *Nat Rev Cancer* **7**, 233-245 (2007).
4. Preston, D.L., *et al.* Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* **137**, S68-97 (1994).
5. Wintrobe, M.M. & Greer, J.P. *Wintrobe's clinical hematology*, (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2009).
6. Campbell, P.J. & Green, A.R. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* **355**, 2452-2466 (2006).
7. Tefferi, A. & Vardiman, J.W. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* **22**, 14-22 (2008).
8. Melo, J.V. & Barnes, D.J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 441-453 (2007).
9. Silver, R.T. The blast phase of chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 387-394 (2009).
10. Aguayo, A. & Couban, S. State-of-the-art in the management of chronic myelogenous leukemia in the era of the tyrosine kinase inhibitors: evolutionary trends in diagnosis, monitoring and treatment. *Leuk Lymphoma* **50 Suppl 2**, 1-8 (2009).
11. Bartram, C.R., *et al.* Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature* **306**, 277-280 (1983).
12. Groffen, J., *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93-99 (1984).
13. Nowell, P.C. The minute chromosome (Ph1) in chronic granulocytic leukemia. *Blut* **8**, 65-66 (1962).
14. Rowley, J.D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* **243**, 290-293 (1973).

15. Witte, O.N., Sun, L., Rosenberg, N. & Baltimore, D. A trans-acting protein kinase identified in cells transformed by Abelson murine leukemia virus. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **44 Pt 2**, 855-857 (1980).
16. Baltimore, D. Abelson murine leukemia virus-induced transformation of immature lymphoid cells. *Prog Clin Biol Res* **45**, 297-308 (1981).
17. Melo, J.V. & Goldman, J.M. *Hematologic malignancies : myeloproliferative disorders*, (Springer, Berlin ; New York, 2007).
18. Rohrbacher, M. & Hasford, J. Epidemiology of chronic myeloid leukaemia (CML). *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 295-302 (2009).
19. Deininger, M.W., *et al.* Selective induction of leukemia-associated fusion genes by high-dose ionizing radiation. *Cancer Res* **58**, 421-425 (1998).
20. Lichtman, M.A. & Williams, W.J. *Williams hematology*, (McGraw-Hill, Medical Pub. Division, New York, 2006).
21. Hernandez-Boluda, J.C. & Cervantes, F. Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 343-353 (2009).
22. Schmitt-Graeff, A.H. [Chronic myeloid neoplasms. Diagnostic criteria and current therapeutic concepts]. *Pathologie* **31**, 29-41 (2010).
23. Munker, R. *Modern hematology : biology and clinical management*, (Humana Press, Totowa, N.J., 2006).
24. Baccarani, M., *et al.* Evolving concepts in the management of chronic myeloid leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **108**, 1809-1820 (2006).
25. Jabbour, E., Cortes, J. & Kantarjian, H. Treatment selection after imatinib resistance in chronic myeloid leukemia. *Target Oncol* **4**, 3-10 (2009).
26. Hehlmann, R., *et al.* Randomized comparison of busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia: prolongation of survival by hydroxyurea. The German CML Study Group. *Blood* **82**, 398-407 (1993).
27. Talpaz, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R. & Gutterman, J.U. Interferon alpha in the therapy of CML. *Br J Haematol* **79 Suppl 1**, 38-41 (1991).
28. Kantarjian, H.M., Cortes, J., La Rosee, P. & Hochhaus, A. Optimizing therapy for patients with chronic myelogenous leukemia in chronic phase. *Cancer* **116**, 1419-1430 (2010).
29. Kantarjian, H., Schiffer, C., Jones, D. & Cortes, J. Monitoring the response and course of chronic myeloid leukemia in the modern era of BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors: practical advice on the use and interpretation of monitoring methods. *Blood* **111**, 1774-1780 (2008).

30. van Dongen, J.J., *et al.* Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* **13**, 1901-1928 (1999).
31. Cross, N.C. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 355-365 (2009).
32. Johansson, B., Fioretos, T. & Mitelman, F. Cytogenetic and molecular genetic evolution of chronic myeloid leukemia. *Acta Haematol* **107**, 76-94 (2002).
33. Deutsch, E., *et al.* Down-regulation of BRCA1 in BCR-ABL-expressing hematopoietic cells. *Blood* **101**, 4583-4588 (2003).
34. Nowicki, M.O., *et al.* BCR/ABL oncogenic kinase promotes unfaithful repair of the reactive oxygen species-dependent DNA double-strand breaks. *Blood* **104**, 3746-3753 (2004).
35. Hoelbl, A., *et al.* Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med* **2**, 98-110 (2010).
36. Laurent, E., *et al.* Impact of p210(Bcr-Abl) on ultraviolet C wavelength-induced DNA damage and repair. *Clin Cancer Res* **9**, 3722-3730 (2003).
37. Keller, G., *et al.* Telomeres and telomerase in chronic myeloid leukaemia: impact for pathogenesis, disease progression and targeted therapy. *Hematol Oncol* **27**, 123-129 (2009).
38. Heisterkamp, N., Stam, K., Groffen, J., de Klein, A. & Grosveld, G. Structural organization of the bcr gene and its role in the Ph' translocation. *Nature* **315**, 758-761 (1985).
39. Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H. & Kurzrock, R. The BCR gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *Cancer Res* **61**, 2343-2355 (2001).
40. Hantschel, O. & Superti-Furga, G. Regulation of the c-Abl and Bcr-Abl tyrosine kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 33-44 (2004).
41. Pendergast, A.M. The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling. *Adv Cancer Res* **85**, 51-100 (2002).
42. Melo, J.V. The diversity of BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood* **88**, 2375-2384 (1996).
43. Jones, D., *et al.* BCR-ABL fusion transcript types and levels and their interaction with secondary genetic changes in determining the phenotype of

- Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Blood* **112**, 5190-5192 (2008).
44. Chasseriau, J., *et al.* Characterization of the different BCR-ABL transcripts with a single multiplex RT-PCR. *J Mol Diagn* **6**, 343-347 (2004).
 45. Davis, R.L., Konopka, J.B. & Witte, O.N. Activation of the c-abl oncogene by viral transduction or chromosomal translocation generates altered c-abl proteins with similar in vitro kinase properties. *Mol Cell Biol* **5**, 204-213 (1985).
 46. Maru, Y. & Witte, O.N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell* **67**, 459-468 (1991).
 47. Zhang, J., Yang, P.L. & Gray, N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* **9**, 28-39 (2009).
 48. Druker, B.J., *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408-2417 (2006).
 49. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H. & Cortes, J. Imatinib and beyond--exploring the full potential of targeted therapy for CML. *Nat Rev Clin Oncol* **6**, 535-543 (2009).
 50. Mor-Tzuntz, R., *et al.* Effect of imatinib on the signal transduction cascade regulating telomerase activity in K562 (BCR-ABL-positive) cells sensitive and resistant to imatinib. *Exp Hematol* **38**, 27-37 (2010).
 51. Kim, D., *et al.* Structural modeling of V299L and E459K Bcr-Abl mutation, and sequential therapy of tyrosine kinase inhibitors for the compound mutations. *Leuk Res* **33**, 1260-1265 (2009).
 52. Giles, F.J., O'Dwyer, M. & Swords, R. Class effects of tyrosine kinase inhibitors in the treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* **23**, 1698-1707 (2009).
 53. Force, T., Krause, D.S. & Van Etten, R.A. Molecular mechanisms of cardiotoxicity of tyrosine kinase inhibition. *Nat Rev Cancer* **7**, 332-344 (2007).
 54. Quintas-Cardama, A., Kantarjian, H.M. & Cortes, J.E. Mechanisms of primary and secondary resistance to imatinib in chronic myeloid leukemia. *Cancer Control* **16**, 122-131 (2009).
 55. Melo, J.V. & Chuah, C. Resistance to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Cancer Lett* **249**, 121-132 (2007).
 56. Hochhaus, A., *et al.* Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* **16**, 2190-2196 (2002).

57. Lee, T.S., *et al.* BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. *Mol Cancer Ther* **7**, 3834-3841 (2008).
58. Goldman, J.M. Treatment strategies for CML. *Best Pract Res Clin Haematol* **22**, 303-313 (2009).
59. Weisberg, E., Manley, P.W., Cowan-Jacob, S.W., Hochhaus, A. & Griffin, J.D. Second generation inhibitors of BCR-ABL for the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **7**, 345-356 (2007).
60. Jones, D., *et al.* Laboratory practice guidelines for detecting and reporting BCR-ABL drug resistance mutations in chronic myelogenous leukemia and acute lymphoblastic leukemia: a report of the Association for Molecular Pathology. *J Mol Diagn* **11**, 4-11 (2009).
61. Nicolini, F.E., *et al.* Mutation status and clinical outcome of 89 imatinib mesylate-resistant chronic myelogenous leukemia patients: a retrospective analysis from the French intergroup of CML (Fi(phi)-LMC GROUP). *Leukemia* **20**, 1061-1066 (2006).
62. Ernst, T., *et al.* A co-operative evaluation of different methods of detecting BCR-ABL kinase domain mutations in patients with chronic myeloid leukemia on second-line dasatinib or nilotinib therapy after failure of imatinib. *Haematologica* **94**, 1227-1235 (2009).
63. Haliassos, A., *et al.* Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res* **17**, 8093-8099 (1989).
64. Tsongalis, G.J. & Coleman, W.B. *Molecular diagnostics : for the clinical laboratorian*, (Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006).
65. International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature., Shaffer, L.G., Slovak, M.L. & Campbell, L.J. *ISCN 2009 : an international system for human cytogenetic nomenclature (2009)*, (Karger, Basel ; Unionville, CT, 2009).
66. Chien, J.H., Tang, J.L., Chen, R.L., Li, C.C. & Lee, C.P. Detection of BCR-ABL gene mutations in Philadelphia chromosome positive leukemia patients resistant to STI-571 cancer therapy. *Leuk Res* **32**, 1724-1734 (2008).
67. O'Brien, S., *et al.* NCCN clinical practice guidelines in oncology: chronic myelogenous leukemia. *J Natl Compr Canc Netw* **7**, 984-1023 (2009).
68. Rosas-Cabral, A., *et al.* [Analysis of Bcr-abl type transcript and its relationship with platelet count in Mexican patients with chronic myeloid leukemia]. *Gac Med Mex* **139**, 553-559 (2003).

69. Arana-Trejo, R.M., *et al.* BCR/ABL p210, p190 and p230 fusion genes in 250 Mexican patients with chronic myeloid leukaemia (CML). *Clin Lab Haematol* **24**, 145-150 (2002).
70. Meza-Espinoza, J.P., *et al.* Prevalence of the BCR/ABL1 transcripts in Mexican patients with chronic myelogenous leukemia. *Rev Invest Clin* **59**, 338-341 (2007).
71. Ruiz-Arguelles, G.J., Garces-Eisele, J., Reyes-Nunez, V. & Ruiz-Delgado, G.J. Frequencies of the breakpoint cluster region types of the BCR/ABL fusion gene in Mexican Mestizo patients with chronic myelogenous leukemia. *Rev Invest Clin* **56**, 605-608 (2004).
72. 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* **108**, 28-37 (2006).
73. Stentoft, J., *et al.* Kinetics of BCR-ABL fusion transcript levels in chronic myeloid leukemia patients treated with STI571 measured by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Eur J Haematol* **67**, 302-308 (2001).
74. Perego, R.A., *et al.* The possible influences of B2A2 and B3A2 BCR/ABL protein structure on thrombopoiesis in chronic myeloid leukaemia. *Eur J Cancer* **36**, 1395-1401 (2000).
75. de Lemos, J.A., *et al.* Differential molecular response of the transcripts B2A2 and B3A2 to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. *Genet Mol Res* **4**, 803-811 (2005).

Anexo.- Hoja de consentimiento informado



Hospital General de México, O.D. Servicio de Hematología

CONSENTIMIENTO BAJO INFORMACIÓN PARA EL PROTOCOLO:

"Identificación de mutaciones en el gen BCR/ABL y su correlación con la respuesta citogenética en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica tratados con inhibidores de tirosin cinasa".

PROPÓSITO DE LA HOJA DE INFORMACIÓN PARA EL PACIENTE

Usted ha sido invitado a participar en el estudio llamado: "identificación de mutaciones del gen BCR/ABL y su correlación con la respuesta citogenética en pacientes con Leucemia Mieloide Crónica tratados con inhibidores de tirosin cinasa". En esta carta le explicamos en que consiste el proyecto, cual será su participación y se le pide su consentimiento (autorización) para ser incluido con los datos de la enfermedad que usted tiene como paciente. Al terminar de leer esta carta y habiendo entendido el propósito del estudio usted puede elegir participar o no, siendo este aspecto completamente voluntario.

INFORMACION GENERAL SOBRE LA ENFERMEDAD.

Su médico hematólogo (a) le ha diagnosticado una enfermedad conocida como Leucemia Mieloide Crónica. Esta leucemia se origina en las células de la médula ósea (que se encuentra en los huesos del cuerpo). Su médico requiere analizar estas células para el diagnóstico adecuado de su enfermedad, se requiere de un procedimiento de aspirado o toma de médula ósea que es indispensable y lo realiza rutinariamente su hematólogo tratante. A la muestra tomada de su médula ósea se le realizarán dos estudios que se llaman cariotipo y estudio molecular del BCR/ABL. En el cariotipo se buscan las alteraciones en sus cromosomas (los cromosomas contienen los genes que se heredan de nuestros padres), en su enfermedad la alteración se llama cromosoma Filadelfia. Este cromosoma Filadelfia se identifica en el cariotipo de médula ósea, sin embargo puede pasar desapercibido con este estudio y es necesario confirmar su presencia por una prueba mucho más fina que identifica a los dos genes que forman el cromosoma Filadelfia (que se llaman BCR-ABL). La importancia de identificar al cromosoma Filadelfia o a sus genes BCR-ABL radica en que pueden ser usados como marcadores de su enfermedad y evaluar si desaparecen estos marcadores con el tratamiento. Los genes BCR/ABL pueden sufrir cambios llamados mutaciones que pueden o no ir apareciendo durante el curso de su enfermedad y afectar la forma en que puede responder al tratamiento.

INFORMACION SOBRE EL PROPOSITO DEL ESTUDIO.

Este protocolo pretende buscar los cambios en el gen BCR/ABL (mutaciones) y ver si tienen influencia sobre el cromosoma Filadelfia y la forma en que evoluciona la enfermedad. El conocer la frecuencia de estas mutaciones brindará información objetiva a los hematólogos con el fin de dar tratamientos oportunos y especializados, mejorando las posibilidades de curación.

INFORMACION SOBRE SU PARTICIPACION EN ESTE REGISTRO

Su participación en este protocolo consistirá en autorizar que su muestra de médula ósea que su médico tratante envía al Servicio de Genética para el cariotipo y la prueba molecular se incluya también en la búsqueda de mutaciones. Además de otros datos que su médico incluirá como la edad, el género, datos del tratamiento y la evolución de cada uno de los pacientes incluidos en el proyecto, siempre manteniendo su confidencialidad



Hospital General de México, O.D. Servicio de Hematología

(nunca se tendrán sus datos personales solo iniciales del nombre y los resultados de los estudios).

COMPROMISO PARA MANTENER SUS DATOS DE MANERA CONFIDENCIAL.

Los investigadores participantes en este proyecto, así como su hematólogo tratante se comprometen a preservar de manera confidencial los datos que nos proporcionará. Posteriormente parte de esta información será incluida en la tesis de especialidad de dos médicos residentes de esta institución y además se difundirá de manera científica como una publicación del registro de mutaciones en BCR/ABL en pacientes mexicanos con LMC, garantizando la confidencialidad y el anonimato de cada uno de los pacientes que ingresen a este protocolo.

POSIBILIDAD DE RETIRARSE DEL PROYECTO EN CUALQUIER MOMENTO.

Usted es libre de retirar su muestra y sus datos de este proyecto cuando usted lo decida y esto no influirá en su atención ni en el tratamiento de su leucemia; y usted no requiere explicar el motivo por el que solicite el retiro de sus datos.

BENEFICIOS Y COMPENSACIONES POR SU PARTICIPACION EN ESTE PROYECTO.

No existe ninguna remuneración de tipo económico por ingresar su muestra y datos clínicos y no se incluirá su nombre en este protocolo.

Los beneficios para usted son identificar si tuviera alguna mutación en BCR/ABL que pudieran afectar el curso de su respuesta al tratamiento y lograr la caracterización completa de su leucemia. Potencialmente los mayores beneficios surgirán para la comunidad de pacientes con esta enfermedad y médicos que la atienden ya que al integrar los datos de un centenar de pacientes es posible tener un estimado de la presencia de mutaciones en BCR/ABL, lo que permitirá planear de manera más eficiente las estrategias terapéuticas.

Si, en algún momento, tiene cualquier pregunta del estudio póngase en contacto con el Dr. Cuauhtli Azotla, quien responderá sus preguntas al teléfono 2789-2000 Ext.1278 y 1279 o al 04455-----

En caso de que usted tenga alguna duda acerca de su participación en este estudio favor de comunicarse con la Dra. Hilda Hidalgo Loperena, Presidenta del Comité de Ética de la Dirección de investigación del Hospital General de México OD. al tel: 2789-2000 Ext.1164.

Declaración del consentimiento

He leído y entendido la información que describe este estudio, presentada en esta forma de consentimiento informado. El médico del estudio me explicó esta información y de manera satisfactoria respondió todas mis preguntas. Estoy de acuerdo de manera libre y espontánea en participar en este estudio.



Hospital General de México, O.D.
Servicio de Hematología

Autorizo a los investigadores de este proyecto que puedan usar mi muestra de médula ósea y los datos de las molestias que produce mi enfermedad, así como los resultados de los estudios que se me realizan relacionada con este protocolo, incluyendo la forma de consentimiento firmada.

No renuncio a mis derechos legales como un participante de este estudio al firmar esta forma. Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento para poderla conservar. No renuncio a ninguno de mis derechos legales al firmar esta forma de consentimiento informado.

Asimismo doy mi autorización para el uso de los datos obtenidos de los estudios de laboratorio que se me realizaran de manera rutinaria, y con esto contribuiré a generar un conocimiento de cuanta enfermedad de este tipo hay en México.

Nombre y firma del paciente o representante legal (según sea el caso)

Dirección: _____

Teléfono: _____

FIRMA DE LOS TESTIGOS (llenar con letra de molde):

Nombre del 1er testigo		Nombre del 2do testigo	
Dirección y Teléfono		Dirección y Teléfono	
Parentesco con el Paciente		Parentesco con el Paciente	
Firma		Firma	
Fecha		Fecha	

Yo, el abajo firmante, expliqué completamente los detalles relevantes de este estudio al paciente anteriormente mencionado, y proporcionaré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento informado al paciente.

Nombre y firma del Hematólogo tratante.